



Etude de Eps1 et Eps2, deux exopolysaccharides du biofilm chez *Bacillus thuringiensis*

Racha Majed

► To cite this version:

Racha Majed. Etude de Eps1 et Eps2, deux exopolysaccharides du biofilm chez *Bacillus thuringiensis*. Bactériologie. Université Paris-Saclay; Université Saint-Joseph (Beyrouth). Faculté des Sciences, 2017. Français. NNT : 2017SACLS107 . tel-01674224v2

HAL Id: tel-01674224

<https://theses.hal.science/tel-01674224v2>

Submitted on 2 Jan 2018

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

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

NNT : 2017SACLS107

THESE DE DOCTORAT
DE
L'UNIVERSITE SAINT-JOSEPH DE BEYROUTH
ET DE
L'UNIVERSITÉ PARIS-SACLAY
PRÉPARÉE À
L'UNIVERSITÉ PARIS-SUD

ECOLE DOCTORALE N°577
STRUCTURE ET DYNAMIQUE DES SYSTÈMES VIVANTS

SPECIALITE DE DOCTORAT : SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

PAR

MLLE RACHA MAJED

**Etude de Eps1 et Eps2, deux exopolysaccharides du biofilm chez
Bacillus thuringiensis.**

Thèse présentée et soutenue à Beyrouth, le 18 Mai 2017

Composition du Jury :

M. Maroun Richard	PR, Université Saint-Joseph, Liban	Président
Mme Broussolle Véronique	CR, INRA, France	Rapporteur
M. Mahillon Jacques	PR, UCL, Belgique	Rapporteur
M. Guerardel Yann	DR, CNRS, France	Examineur
Mme Kallassy Mireille	PR, Université Saint-Joseph, Liban	Directeur de thèse
M. Gohar Michel	CR, INRA, France	Directeur de thèse

Remerciements

Ca y est. Le parcours qui a duré 3 ans et quelques mois, se termine. Je passe à l'écriture de ma partie préférée.

Je remercie profondément mon directeur de thèse Michel Gohar pour son encadrement qui m'a permis de me développer de la meilleure manière. Je te remercie pour tous tes encouragements et ton soutien qui partaient toujours droit au cœur. Je te remercie également pour tes conseils pertinents, j'ai beaucoup appris de toi. Ce fut un réel plaisir de travailler avec toi. Je te suis entièrement et profondément reconnaissante.

Un grand merci à Mme Kallassy, ma formidable directrice de thèse qui a crue en moi dès le début. Je vous remercie pour votre amabilité, vos conseils et encore une fois pour votre attention. Merci d'avoir été là au bon moment et d'être toujours là, votre présence m'est importante.

Stef et Nath, Merci infiniment pour votre soutien professionnel et personnel tout au long de cette thèse. J'ai passé tant de moments sympathiques avec vous, le travail se fait toujours dans la joie et la bonne humeur grâce à vous :).

Leyla, Cricri, Fer et Mounie, mes amies à Micalis, Un GRAND merci pour votre présence et votre soutien. Quels beaux et agréables souvenirs que je garde avec chacune d'entre vous !

Je n'oublie pas à remercier chaleureusement les membres de l'équipe GME, Agnès, Christina, Vincent, Eugénie, Laurent, Isabelle, Ludo, Sandrine, Christophe, Rafael et Emilie. A Didier Lereclus, un homme qui a fait de la modestie sa plus grande qualité, je te remercie pour m'avoir accueillie au sein de ton équipe, avec laquelle je ne garde que de beaux souvenirs.

J'exprime ma profonde reconnaissance à M. Vice-recteur Toufic Rizk et à M. le Doyen Richard Maroun pour m'avoir offert l'opportunité d'effectuer une thèse.

Je tiens à remercier tous les membres de jury pour avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse. Je remercie M. Jacques Mahillon et Mme Véronique Broussolle pour avoir accepté d'être rapporteurs, M. Yann Guerardel et M. Richard Maroun pour avoir accepté d'être examinateurs.

Je remercie le Conseil National de la Recherche Scientifique-Libanais et Campus France pour leurs soutiens financiers. Je remercie aussi l'AUF pour m'avoir accordée la bourse de mobilité à l'étranger afin de réaliser un congrès.

Je n'oublie pas aussi Danielle Chaaya, Vice-Recteur Dolla Sarkis et le laboratoire Rodoph Mérieux à Beyrouth, chez qui j'ai effectué quelques manipes.

J'adresse également un grand merci aux doctorants/doctorantes de la faculté des Sciences. Je vous remercie pour votre aide, votre bonne humeur et tous ces cafés sans sucre mais sucré. C'était agréable de travailler en votre compagnie.

Je vous remercie profondément tous mes amis, au Liban et en France (vous vous reconnaitrez) pour m'avoir soutenue à différents stades de ce parcours.

Je tiens à remercier mes belles Dr et Dr to be, Kiki, Rachoul et Nayou. Vous êtes mes nouvelles meilleures amies rencontrées pendant ce parcours. Un grand merci de tout mon coeur.

Je n'oublie pas ma KOUKI qui m'a supportée et encouragée pendant les périodes les plus dures de cette thèse. On a vécu 1 an ensemble en France et grâce à toi, j'ai passé des moments inoubliables ! Je te suis reconnaissante. Merci ma belle.

Enfin Merci à mon pilier : "Sans vous je ne serais pas allée en France, sans vous je n'aurais pas pu embarquer pour cette aventure" Un énorme merci à mes parents, pour leur patience, leurs soutiens et encouragements. Merci Mama, Baba, Teta et mes soeurs : Louleyti et Pati. Je vous aime.

Publications

Bacterial subpopulations use specific tools to build separate regions of a biofilm. (Soumis à science).

Majed R., Bennaceur I., Perchat S., El Khoury N., Ramarao N., Aymerich S., Kallassy M., Lereclus D., Gohar M.

Transcriptional regulation of two loci *eps1* and *eps2* involved in the formation of *B. thuringiensis* biofilm. (En préparation).

Majed R., Bennaceur I., Perchat S., Kallassy M., Lereclus D., Gohar M.

Bacillus cereus Biofilms-Same, Only Different. (Revue publiée dans frontiers in Microbiology).

Racha Majed, Christine Faille, Mireille Kallassy and Michel Gohar.

Spatio-Temporal Evolution of Sporulation in *Bacillus thuringiensis* Biofilm. (Publié dans frontiers in Microbiology).

El-Khoury N., **Majed R.**, Perchat S., Kallassy M., Lereclus D., Gohar M.

Congrès

- ✂ Présentation Orale, Colloque Bactéries Sporulantes Pathogènes ou d'Intérêt Technologique «BISPIT» à Paris, Juillet 2015: **Function of the *eps2* chromosomal locus of *Bacillus thuringiensis*.**
- ✂ Poster, The Lebanese Association for the Advancement of Science « LAAS » Conference, à Kaslik, Liban, 14-15 Avril: **Etude transcriptionnelle du locus *eps2* chez *B. thuringiensis*.**
- ✂ Présentation Orale, Society for Invertebrate Pathology « SIP » à Tours, 24-28 Juillet 2016: **Two polysaccharides are involved in the formation of specific biofilm structures in *Bacillus thuringiensis*.** Honorée avec 'Best Student oral presentation'.
- ✂ Présentation Orale, à la Journée de la Recherche, séminaire annuelle de l'Université Saint-Joseph, à Beyrouth, 2 Mai 2017 : **Etude de Eps1 et Eps2, deux exopolysaccharides du biofilm chez *Bacillus thuringiensis*.**

European Spores Conference à Londres, 18-20 Avril 2016: Time- and Spatial-Dependent Sporulation in the *Bacillus thuringiensis* Biofilm.

Abréviations

ADN	Acide Désoxyribonucléique
ADNe	ADN extracellulaire
AI	Auto-Inducteur
ARN	Acide Ribonucléique
Bap	Biofilms associated proteins
BCAA	Branched Chain Amino Acid
BY-Tyrosine	Bacterial Tyrosine Kinase
C-di-GMP	Di Guanosine Monophosphate Cyclique
CPS	Capsular polysaccharides
CytK	Cytotoxine K
DNase	Endonuclease
EAR	<i>eps</i> -associated RNA
EPS	Extracellular Polymeric Substances
Glc	Glucose
GlcUA	Acide Glucuronique
GTs	Glycosyltransférase
HA	Hyaluronic acide
Hbl	Hémolysine Bl
HCT	Hydrolysate Caseine Tryptone Broth
kDa	kilodalton
LB	Luria-Bertani Broth
LCP	LytR-Cps2A-PsR
LOS	Lipooligosaccharides

LPS	Lipopolysaccharides
NBD	Nucleotide-Bindind Domain
NB	Nombre
Nhe	Entérotoxine non hémolytique
NRPS	Non-Ribosomal Peptide Synthase
OPX	Outer membrane polysaccharide export
PAMs	Peptides Antimicrobiens
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDGA	Acide poly- γ -D-glutamate
PFT	Pore forming toxins
PIA	Polysaccharides Intercellular adhesion
PlcR	Phospholipase C Regulator
PNAG	N-Acétyle-Galactosamine
QS	Quorum Sensing
qRT-PCR	Real-Time Quantitative Reverse Transcription PCR
RNPP	Rap-Npr-PlcR-PrgX
RT-PCR	Reserve Transcription PCR
SCWP	Secondary Cell Wall Polymers
Spc	Spectinomycin
TIAC	Toxi-infection alimentaire collective
TM	Transmembranaire
Und-P	Undécaprényle Phosphate
Vip	Végétative Insecticidal Protein
wt	Wild Type

Table des matières

Avant-propos.....	12
Introduction bibliographique	15
I. Chapitre I : <i>B. cereus sensu lato</i>	16
A. <i>B. cereus sensu lato</i>.....	16
1. Caractéristiques biologiques.....	16
2. Taxonomie et diversité du groupe <i>cereus</i>	17
B. Pouvoir pathogène de <i>B. thuringiensis</i>	19
C. Pouvoir pathogène de <i>B. cereus sensu stricto</i>	21
1. Toxi-infections alimentaires	21
2. Facteurs de virulence et toxines.....	21
D. <i>B. cereus</i> et contamination des chaînes de production alimentaires.....	24
II. Chapitre II : Les biofilms.....	26
A. Généralités et définition des biofilms	26
B. Les étapes de formation du biofilm.....	28
1. Le contact des bactéries avec une surface « Adhésion »	28
2. Maturation du biofilm	29
3. L'essaimage des cellules du biofilm	30
C. Régulation de la formation des biofilm.....	31
1. Le biofilm est un mode de vie génétiquement régulé	31
2. Quorum sensing.....	35
D. Hétérogénéité dans un biofilm	39
1. <i>B. subtilis</i>	40
2. <i>B. cereus</i>	42
E. Cellule planctonique versus cellule sessile	44
F. La matrice des biofilms.....	46
1. L'ADN extracellulaire	48
2. Les protéines de la matrice.....	50
3. Les exopolysaccharides.....	53
4. Autres.....	53
G. Les biofilms : chez <i>B. cereus</i>	53
III. Chapitre III : Les polysaccharides microbiens	70
A. Généralités.....	70
B. Voie de biosynthèse.....	71

1. La voie Wzy-dépendante	71
2. La voie ABC transporteur-dépendante.....	72
3. La voie synthase-dépendante	73
C. Les loci « <i>eps</i> »	75
D. La capsule polysaccharidique	81
1. Ancrage des polymères aux peptidoglycanes.....	84
2. Pouvoir pathogène lié à la capsule polysaccharidique	86
E. Les exopolysaccharides	88
Objectifs	95
Résultats	97
Chapitre I	98
Chapitre II.....	126
Conclusion et discussion générale	144
Perspectives	150
Références.....	154
Annexes.....	176

Liste des figures

Figure 1. <i>B. cereus</i> en bâtonnets.....	17
Figure 2. <i>B. thuringiensis</i> en fin de sporulation observée par microscopie électronique.....	17
Figure 3. Diversité génétique au sein du groupe <i>B. cereus</i>	19
Figure 4. Observation par microscopie électronique à balayage du biofilm de <i>Staphylococcus</i>	27
Figure 5. Schéma montrant le cycle de formation d'un biofilm.	30
Figure 6. Schéma représentant les voies de régulation de la formation du biofilm chez <i>B. subtilis</i>	33
Figure 7. Schéma représentant les voies de régulation de la formation de biofilm chez <i>B. cereus/B. thuringiensis</i>	35
Figure 8. Schéma représentant les deux types de système du quorum sensing impliquant les AIPs chez les bactéries Gram positives.	37
Figure 9. Schéma représentant le système de quorum sensing chez <i>V. cholerae</i>	38
Figure 10. Hétérogénéité dans un biofilm.	40
Figure 11. Schéma qui illustre les différents programmes de différenciation observés dans une matrice de biofilm chez <i>B. subtilis</i>	42
Figure 12. Modèle de la différenciation cellulaire de <i>B. thuringiensis</i>	43
Figure 13. Schéma représentant les propriétés avantageuses du biofilm et la formation des habitats par les bactéries dans un biofilm.	45
Figure 14. L'ADN extracellulaire entoure la surface des cellules sessiles dans des biofilms de <i>B. cereus</i> formées sur de la laine de verre.	50
Figure 15. Observation par microscopie électronique à transmission des fibres formées par TasA et CalY.	53
Figure 16. Schéma illustrant la voie de biosynthèse Wzy-dépendante chez <i>S. pneumonia</i>	72
Figure 17. Schéma représentatif de la synthèse de lipopolysaccharidiques via la voie ABC transporteur-dépendante.	73
Figure 18. Schéma représentatif de la synthèse des polysaccharidiques via la voie Synthase-dépendante chez les bactéries <i>S. pneumonia</i>	74
Figure 19. Identification des gènes codant pour la capsule d'acide hyaluronique chez <i>B. cereus</i> G9241.	76
Figure 20. Schéma représentant la disposition de la protéine EpsA dans la membrane et la protéine EpsB (tyrosine kinase) chez <i>B. subtilis</i>	81

Figure 21. Effet de la délétion de chacun de deux loci, <i>bps</i> et <i>hasACB</i> sur la production capsulaire chez <i>B. cereus</i> G9241.	84
Figure 22. Schéma montrant la famille protéique LCP chez <i>S. pneumonia</i>	85
Figure 23. Les mécanismes d'échappement des bactéries au système immunitaire fournis par la capsule polysaccharidique.	87
Figure 24. Schéma représentant les structures chimiques des exopolysaccharides bactériens.....	90
Figure 25. Un schéma illustrant les mécanismes de l'interaction Fer-Psl chez <i>P. aeruginosa</i>	91
Figure 26. Un biofilm formé par le mutant <i>epsA-O</i> comparé à la souche sauvage chez <i>B. subtilis</i>	92
Figure 27. Un essai de "swarming" observé chez <i>B. subtilis</i> Δ <i>epsA-O</i> comparé à la souche sauvage.	93
Figure 28. Les chaînettes présentes dans le biofilm de la souche sauvage comparées à la souche Δ <i>epsA-O</i> de <i>B. subtilis</i>	94
Figure 29. Un essai de "swimming" observé chez <i>B. thuringiensis</i> Δ <i>eps1</i> et Δ <i>eps2</i> comparé à la souche sauvage.	101
Figure 30. Schéma résumant les voies de régulation des loci impliqués dans la formation de la matrice du biofilm chez <i>B. cereus</i> / <i>B. thuringiensis</i>	148

Liste des tableaux

Tableau 1. Un tableau regroupant les fonctions des EPS dans un biofilm.....	47
Tableau 2. Tableau regroupant les loci <i>eps</i> impliqués dans diverses fonctions chez différentes espèces bactériennes.	78
Tableau 3. Infections causées par la capsule polysaccharidique chez <i>E. coli</i>	88
Tableau 4. Composition de la matrice du biofilm chez <i>B. thuringiensis</i>	99
Tableau 5. Distribution du locus <i>eps2</i> dans les différentes espèces du groupe <i>cereus</i>	100

Avant-propos



Contexte de l'étude

Le mode de vie planctonique ne reflète pas le mode de vie naturel des microorganismes. En fait, ces microorganismes vivent sous forme de communautés bactériennes attachées à une surface. Ces communautés, nommées les biofilms, sont présentes dans tous types d'environnements, au niveau des surfaces industrielles ainsi que dans des milieux naturels comme l'organisme humain. Les biofilms sont considérés pour les microorganismes comme un moyen de persistance dans l'environnement. *Bacillus cereus* est une bactérie rencontrée dans de très nombreux environnements, associée au sol ou à la plante, de telle sorte qu'on la retrouve dans les différents processus de fabrication de l'industrie agro-alimentaire. Il constitue un contaminant récurrent dans les équipements utilisés en industrie laitière, il peut être présent dans les produits laitiers et dans les plats cuisinés. Il est considéré comme un véritable problème en santé publique à cause de sa capacité à provoquer des toxi-infections alimentaires (TIAC), dont les syndromes sont diarrhéiques ou émétiques. La persistance de *B. cereus* dans les industries alimentaires peut être attribuée à sa capacité à résister aux processus de nettoyage et aux désinfectants, utilisés dans ces industries, par la mise en place de stratégies de survie. Ces stratégies comprennent la formation de spores qui résistent à la chaleur et aux processus de traitement et de transformation des denrées alimentaires (stérilisation, pasteurisation, ionisation etc) et de biofilms denses dans des conditions variées et sur divers supports : avec circulation de milieu, ou en conditions statiques; à l'interface air-liquide ou en immersion; sur du plastique, du verre ou de l'acier inoxydable. Ces types de supports sont présents dans les industries agroalimentaires, raison pour laquelle *B. cereus* constitue une source de contamination récurrente des produits finis étant donné sa capacité à produire un biofilm.

Les biofilms sont des complexes multicellulaires de microorganismes assemblés et intégrés dans une matrice extracellulaire produite par les cellules elles-mêmes. Cette matrice est composée de protéines, d'ADN extracellulaire et d'exopolysaccharides. Les polysaccharides bactériens sont produits par une multitude d'espèces bactériennes, comprenant des bactéries pathogènes de l'homme, des animaux et des plantes.

Ces polysaccharides peuvent être des constituants du peptidoglycane. Ils peuvent également être à l'extérieur du peptidoglycane mais liés à celui-ci par des liaisons

covalentes et ainsi former soit le SCWP (Secondary Cell Wall Polymer), soit une capsule polysaccharidique (capsular polysaccharide, CPS). Cette capsule, lorsqu'elle existe, constitue le premier point de contact avec l'hôte et est considérée comme étant un facteur de virulence important chez les bactéries à Gram positif et à Gram négatif, et un moyen de protection de la bactérie contre des agents antimicrobiens et contre les réactions immunitaires de l'hôte. Un des rôles importants de la capsule réside dans le fait qu'elle permet à la bactérie, dans certains cas, d'adhérer sur des surfaces vivantes ou inertes.

Par ailleurs, les polysaccharides microbiens peuvent également être sécrétés et libérés dans le milieu de culture, on parle alors d'exopolysaccharides. Ces polysaccharides constituent souvent le composé majeur de la matrice du biofilm. Ils assurent la stabilité mécanique du biofilm et en immobilisant les bactéries, facilitent les interactions cellules-cellules. Ils protègent les bactéries contre la dessiccation et contre certains agents antimicrobiens. En plus de leur importance dans le domaine de la microbiologie, certains polysaccharides ont également des applications comme gélifiants et émulsifiants dans l'industrie agroalimentaire.

Le *Bacillus* à Gram positif, *Bacillus subtilis* qui forme à l'interface air-solide des colonies (considérées comme étant des biofilms sur l'interface air-solide) caractérisées par une architecture ridée qui lui est spécifique et une pellicule flottante à l'interface air-liquide. La majorité des exopolysaccharides de la matrice de *B. subtilis* est synthétisée par des enzymes codées par le locus *epsA-O* dont la délétion entraîne une désorganisation du biofilm. A la différence de *B. subtilis*, *B. cereus* produit en plus d'une pellicule épaisse flottant sur le milieu, un anneau entourant cette pellicule et adhérent aux surfaces solides. La production d'exopolysaccharides et la formation de biofilms ont été jusqu'à présent, peu étudiées chez *B. cereus/B. thuringiensis*. Cette problématique fait l'objet de mon travail de thèse.

Introduction bibliographique



I. Chapitre I : *B. cereus sensu lato*

A. *B. cereus sensu lato*

1. Caractéristiques biologiques

Le groupe *Bacillus cereus sensu lato* appartient à la famille des *Bacillaceae* et comporte sept espèces bactériennes génétiquement très proches : *B. mycoides*, *B. pseudomycoides*, *B. weihenstephanensis*, *B. anthracis*, *B. thuringiensis*, *B. cereus sensu stricto* et *B. cytotoxicus*. Parmi ces espèces, quatre sont pathogènes : *B. anthracis*, *B. thuringiensis*, *B. cereus sensu stricto* et *B. cytotoxicus*. Sous microscope, ces bacilles à Gram positif (Figure 1) de 1 μM à 3 μM de large et 3 μM à 4 μM de long sont soit isolés ou organisés en chaînettes et forment sur des boîtes gélosées des colonies grisâtres avec des bords dentelés. Ils partagent un profil génétique très proche et leur ADN est composé d'un faible pourcentage en guanine et cytosine (35 %) (Ivanova et al. 2003). De ce fait, ils ont été classés selon des caractéristiques phénotypiques, basées principalement sur les différentes toxines qu'ils secrètent. Les bactéries du groupe *cereus sensu lato* sont des microorganismes aérobies ou anaérobies facultatifs, mobiles par ciliature pérित्रiche ou immobiles. Pour la majorité des souches, leur croissance optimale se fait à une température comprise entre 25 °C et 37 °C mais certaines sont psychrotrophes et peuvent croître ainsi à des basses températures (4 °C) comme c'est le cas pour *B. weihenstephanensis* et *B. mycoides*, alors que d'autres peuvent croître à des températures plus hautes (55 °C) comme le cas de *B. cytotoxicus* (Drobniewski 1993, Guinebretiere et al. 2013).

Plus particulièrement, les bactéries du groupe *cereus* sont ubiquitaires ; elles peuvent être isolées du sol, des plantes, des aliments d'origines végétale et animale (Hill et al. 2004, Kotiranta, Lounatmaa and Haapasalo 2000, Baird-Parker, Gould and Lund 2000, Kramer and Gilbert 1989). Cette colonisation étendue du groupe *cereus* sur plusieurs habitats dans l'environnement est due à sa capacité à former des spores qui résistent à la dessiccation, aux métaux lourds, aux radiations et à de nombreux agents physiques et chimiques désinfectants et à d'autres stérilisants tels que la chaleur ou les antibiotiques. Selon les conditions environnementales, les bactéries du groupe *cereus* basculent entre deux états de vie, l'état dit végétatif durant lequel les bactéries sont métaboliquement

actives avec des conditions favorables à la croissance bactérienne, et l'état sporulant quand les conditions sont défavorables. Les spores peuvent germer et passer à l'état végétatif lorsque les conditions redeviennent favorables. Ces spores se situent en position centrale à subterminale chez *B. cereus* (Figure 2).

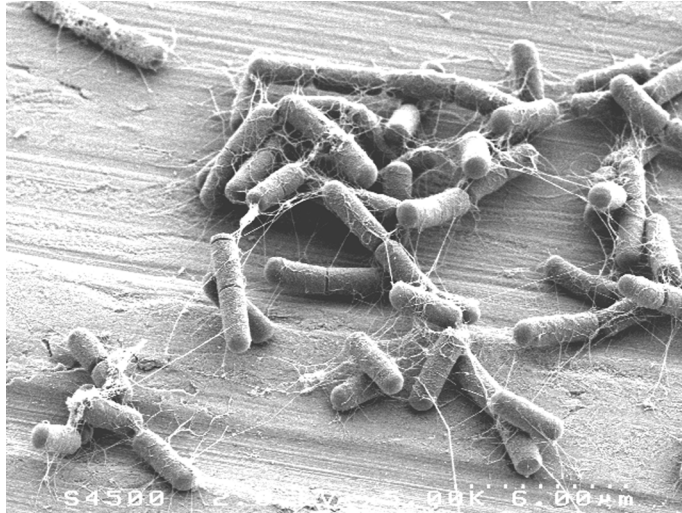


Figure 1. *B. cereus* en bâtonnets.

(Rita Kamar, thèse 2014)

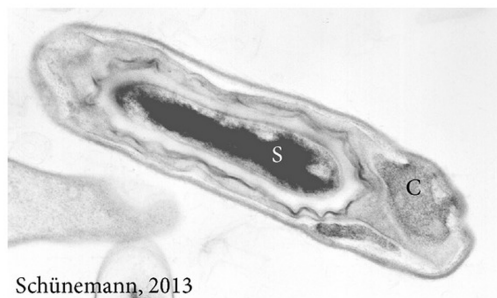


Figure 2. *B. thuringiensis* en fin de sporulation observée par microscopie électronique.

Coupe longitudinale de *B. thuringiensis* observée par microscopie électronique à transmission. S : La spore. C : le cristal formé des protéines Cry.

2. Taxonomie et diversité du groupe *cereus*

La classification phylogénétique du groupe *cereus* est complexe, puisque les espèces appartenant au groupe *cereus* partagent un fond génétique très proche et étroit. A l'origine, les espèces du groupe *cereus* ont été identifiées et classées en se basant sur des critères et propriétés phénotypiques à l'échelle microscopique et macroscopique. Parmi ces critères la position et la morphologie de la spore (Gilbert and Kramer 1986), les propriétés pathogéniques différentes entre les espèces comme, la formation d'un crystal parasporal chez *B. thuringiensis* ou la formation d'une capsule chez *B. anthracis*.

Chez *B. cereus sensu lato*, certains facteurs de virulence sont portés par des plasmides mobilisables et conjuguables et sont par conséquent mobiles et échangeables entre différentes espèces. Par exemple, les gènes codant pour les toxines et la capsule chez *B. anthracis* sont portés, respectivement, par les plasmides pXO1 (181.7 Kb) et pXO2 (94.8 Kb), les gènes codant pour les delta-endotoxines chez *B. thuringiensis* sont portés par les plasmides Cry de taille 128 kb. La perte de ces plasmides et par conséquent la perte des caractères relatifs, rend ces espèces indiscernables de *B. cereus sensu stricto*. De ce fait, certains caractères phénotypiques spécifiques à *B. anthracis* peuvent être retrouvés chez certaines souches de *B. cereus sensu stricto* ce qui est le cas de la souche *B. cereus* G9241 qui cause des infections mortelles anthrax-like chez les souris et dont les résultats de séquençage ont montré la présence de deux plasmides pBC218 et pBCXO1 (Oh et al. 2011). Ce dernier, présente un niveau élevé de synténie avec pXO1 et héberge l'ensemble des gènes codant pour les toxines de l'anthrax (*pagA1*, *lef1*, *cya1*) (Oh et al. 2011). Enfin, le classement des souches selon leur spectre d'hôte est rendu difficile par l'existence de souches pathogènes de mammifères ou d'insecte chez *B. cereus* (Perchat et al. 2005).

Deux souches sont considérées comme étant membres d'une même espèce lorsque leur ADN présente plus de 70 % de réassociation lors d'une hybridation et lorsque leur ARN ribosomal 16S montre plus de 97 % d'identité de séquence (Vandamme et al. 1996). Mais, la comparaison des séquences d'ARN 16S ou 23S et du gène *gyrB* (Ash et al. 1991, Bavykin et al. 2004, Chen and Tsen 2002) et les expériences d'hybridation ADN-ADN (Kaneko, Nozaki and Aizawa 1978, Nakamura 1998) ont révélé une forte parenté entre les espèces du groupe *cereus* rendant ainsi difficile la distinction entre les espèces en se basant uniquement sur ces techniques. Par conséquent, pour établir une relation phylogénétique entre ces souches, d'autres méthodes d'analyses moléculaires ont été adoptées. Celles-là regroupent les techniques suivantes : la rep-PCR fingerprinting (Cherif et al. 2003), le séquençage complet du génome, la MLEE (MultiLocus Enzyme Electrophoresis) (Carlson, Caugant and Kolsto 1994, Helgason et al. 1998, Helgason et al. 2000), le polymorphisme de longueur de fragments amplifiés (AFLP : amplified fragment length polymorphism) (Hill et al. 2004, Ticknor et al. 2001, Keim et al. 1997, Guinebretiere et al. 2008) et le typage génomique multilocus (MLST : multi-locus sequence typing) (Helgason et al. 2004, Sorokin et al. 2006, Hoffmaster et al. 2008) prise individuellement ou en combinaison (Tourasse et al. 2011). Malgré ces différentes

méthodes, la distinction entre ces espèces reste confuse : une diversité génétique importante est notée au niveau du groupe *cereus* à l'exception de *B. anthracis* dont les isolats se sont révélés issus d'une population clonale (Figure 3), de *B. cytotoxicus* et de *B. pseudomycoides* qui forment des groupes plus divergents (Nakamura 1998).

Parmi les espèces du groupe *cereus*, *B. cereus* et *B. thuringiensis* ont constitué le modèle expérimental de notre travail. Nous nous sommes particulièrement intéressés par ces deux espèces car l'une est pathogène de l'insecte et l'autre de l'homme.

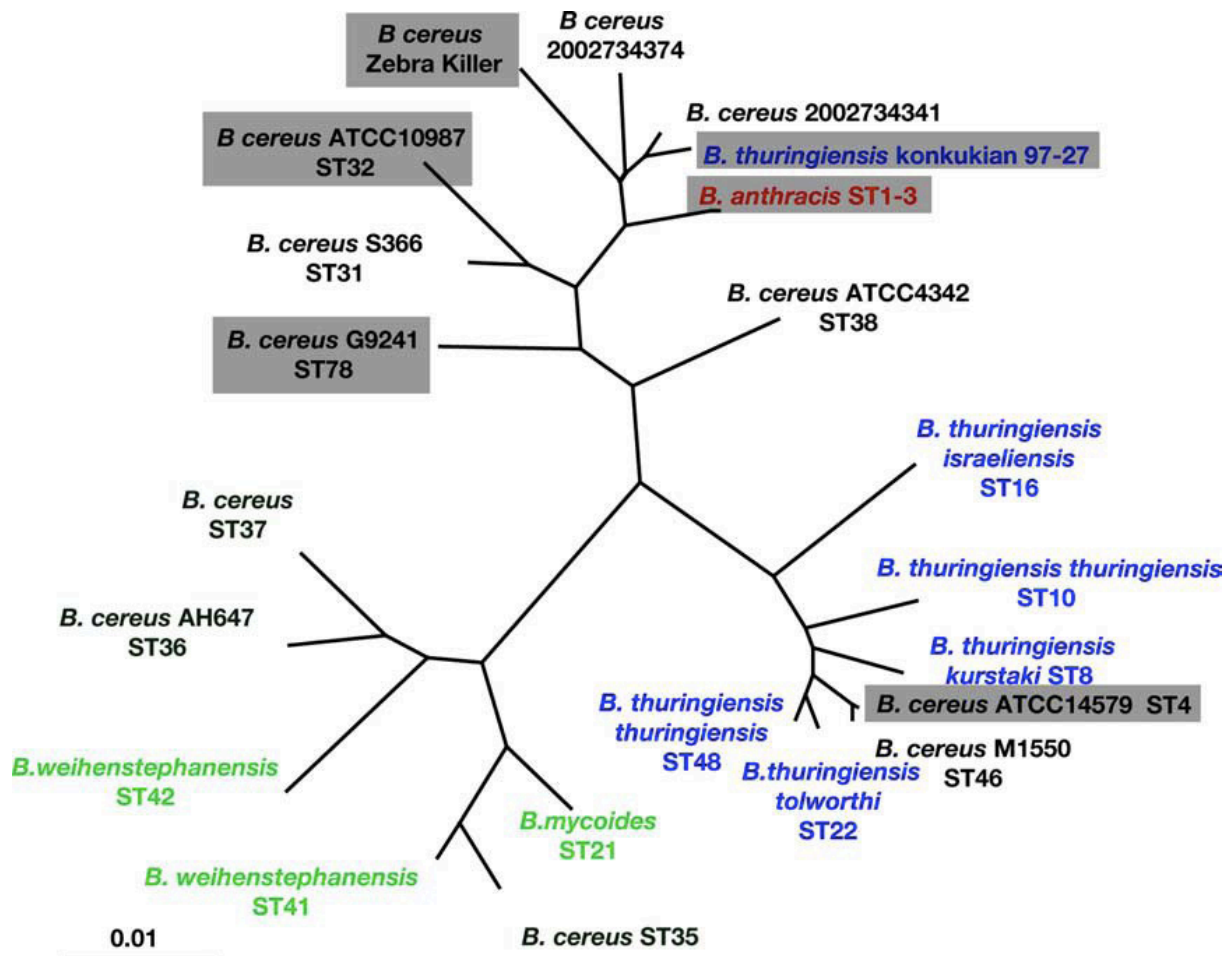


Figure 3. Diversité génétique au sein du groupe *B. cereus*.

Arbre phylogénétique des souches du groupe *B. cereus*, construit à partir du typage moléculaire obtenu par MLST. Tous les isolats de *B. anthracis* (colorés en rouge) sont représentés en un seul point sur l'arbre. Les isolats de *B. cereus* sont colorés en noir et ceux de *B. thuringiensis* sont colorés en bleu. Les isolats séquencés sont représentés dans les rectangles gris. D'après (Rasko et al. 2004).

B. Pouvoir pathogène de *B. thuringiensis*

B. thuringiensis est une espèce connue mondialement comme étant une espèce pathogène d'insectes. Cette bactérie entomopathogène est utilisée comme biopesticide. Ce pouvoir entomopathogène est lié à la production des δ -endotoxines qui s'accumulent

sous forme d'inclusions cristallines parasporales (Van Rie et al. 1990). Ces protéines sont souvent les protéines Cry mais aussi des protéines Cyt. *B. thuringiensis* est utilisé dans le secteur agricole pour lutter contre les insectes ravageurs attaquant les plantes et les arbres (ex: pyrale du maïs) (Vilas-Boas, Peruca and Arantes 2007) ou dans le contrôle des insectes vecteurs de maladies humaines comme l'onchocercose et le paludisme (Das and Amalraj 1997). Les toxines Cry sont spécifiquement actives contre les insectes appartenant à l'un des ordres Lépidoptères, Coléoptères, Hyménoptères et Diptères ainsi que contre certains Nématodes (Schnepf et al. 1998, Vilas-Boas et al. 2007) alors que les toxines Cyt sont principalement actives contre les Diptères (Bravo, Gill and Soberon 2007). Les toxines de *B. thuringiensis* appartiennent à la famille des PFT (Pore-Forming Toxins) (Parker and Feil 2005). Lors de l'ingestion d'un mélange de spores et de cristaux par une larve d'insecte (e.g. chez les lépidoptères), le pH alcalin de l'intestin de l'hôte entraîne la solubilisation des cristaux pour libérer les pro-toxines Cry (Koller, Bauer and Hollingworth 1992). Ces pro-toxines sont aussitôt activées par les protéases de l'hôte. Les formes actives vont se fixer spécifiquement sur des récepteurs des cellules épithéliales, s'oligomériser et s'insérer au niveau d'un raft lipidique de ces cellules afin de former des pores et conduire à leur lyse. Cette lyse permet alors aux bactéries de traverser la paroi digestive et d'envahir l'hémolymphe et ensuite provoquer une toxémie puis une septicémie conduisant à la mort de l'insecte (Raymond et al. 2010). Néanmoins, les protéines Cyt peuvent agir directement sur les lipides membranaires en s'y intégrant directement sans avoir recours à des récepteurs protéiques membranaires et former des pores (Bravo et al. 2007). Ces protéines Cyt peuvent agir en synergie avec les protéines Cry (Perez et al. 2005). Par ailleurs, ces protéines insecticides sont codées par des gènes localisés sur des plasmides conjugatifs et généralement flanqués par des éléments transposables (Schnepf et al. 1998). Actuellement, plus de 380 toxines Cry sont identifiées et classées en 42 familles en fonction du degré de divergence de leur séquence peptidique (Crickmore et al. 1998) et 33 gènes codant pour les protéines Cyt sont identifiés et séquencés (www.lifesci.sussex.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt). Les souches de *B. thuringiensis* peuvent également sécréter d'autres protéines à activité insecticide telle que les protéines insecticides Vip « Vegetative Insecticidal Proteins » produites pendant la phase exponentielle de croissance qui causent des symptômes similaires à ceux observés suite à l'action des protéines Cry. En dehors des protéines Vip, une majorité de

souches de *B. thuringiensis* sécrète des protéases, des chitinases et d'autres variétés d'enzymes.

C. Pouvoir pathogène de *B. cereus sensu stricto*

B. cereus sensu stricto est un pathogène opportuniste émergent qui contamine fréquemment les denrées alimentaires, entraînant des pertes économiques et des problèmes en santé publique. L'ingestion de *B. cereus* cause des toxi-infections alimentaires collectives (TIAC) et provoque ensuite deux types d'intoxications : émétique et diarrhéique. La pathologie développée est souvent peu sévère, mais quelques cas létaux ont été répertoriés (Evreux et al. 2007).

1. Toxi-infections alimentaires

a. Type diarrhéique

Les intoxications diarrhéiques sont provoquées par des facteurs de virulence chromosomique. Les symptômes de l'intoxication diarrhéique se déclenchent 8 à 16 heures après l'ingestion d'un aliment contaminé par des bactéries végétatives ou des spores. Cette apparition tardive des symptômes indique que la production des toxines responsables de l'intoxication, probablement les entérotoxines, a lieu dans l'intestin grêle de l'hôte lors de la croissance de *B. cereus sensu stricto*. Après ingestion d'un aliment contaminé, le patient commence à souffrir de crampes intestinales, de diarrhées profuses et de nausées.

b. Type émétique

Les intoxications émétiques sont liées généralement à des facteurs de virulence portés par un plasmide dont les symptômes surviennent à courte durée d'incubation, de 1 à 5 heures après ingestion d'un aliment contaminé. Cela suggère que la production des toxines se fait dans l'aliment. La toxine céréulide est responsable de l'apparition des symptômes émétiques. Les symptômes durent de 6 à 24 heures et consistent en des vomissements, des nausées et des douleurs abdominales (Granum and Lund 1997).

2. Facteurs de virulence et toxines

Bacillus cereus sensu stricto est capable de produire une grande diversité de toxine et des facteurs de virulence :

a. Entérotoxines

Le syndrome diarrhéique est probablement provoqué par des entérotoxines thermosensibles codées par des gènes chromosomiques. L'identité des toxines impliquées dans ce syndrome reste un sujet controversé. Cependant, trois entérotoxines sont potentiellement impliquées dans les infections gastro-intestinales (Stenfors Arnesen, Fagerlund and Granum 2008).

- L'hémolysine Bl ou Hbl, est formée d'une sous-unité B impliquée dans la liaison toxine-cellule et de deux sous-unités lytiques L₁ et L₂ (Beecher and Macmillan 1991). Cette toxine est active quand elle est sous forme d'un complexe tripartite (HblB, HblL1 et/ou HblL2). L'hémolysine, en plus de son activité entérotoxique, possède une activité hémolytique et dermonécrotique (Beecher et al. 2000, Beecher and Wong 1994, Beecher, Schoeni and Wong 1995).
- L'enterotoxine Nhe (Non-Hemolytic Enterotoxin) a été premièrement découverte lors d'une épidémie de gastroentérite (Lund and Granum 1996). Cette dernière est une toxine à 3 composantes (NheA, NheB et NheC). Des homologies de séquences sont observées entre les différentes sous-unités de Hbl et Nhe (Lund and Granum 1997). Nhe induit un effet toxique sur les cellules épithéliales HeLa et CaCo2 en formant des pores transmembranaires à hélices α (Lindback et al. 2004). Les gènes codant pour ces sous-unités sont organisés en opéron.
- La cytotoxine K, CytK, a été identifiée à partir d'une souche clinique de *B. cereus* ayant causée une intoxication alimentaire collective en 1998 (Lund, De Buyser and Granum 2000). Cette souche constitue aujourd'hui la nouvelle espèce *B. cytotoxicus* (Guinebretiere et al. 2013). C'est une toxine de 34 kDa, possédant deux variantes (CytK1 et CytK2), fortement cytotoxique, nécrotique et hémolytique contre les érythrocytes de boeuf et de lapin (Lund et al. 2000).

Hbl, CytK et Nhe, agiraient en formant des pores dans la membrane des cellules cibles, provoquant ainsi une lyse osmotique et conduisant à la mort cellulaire. Cependant, ces toxines seules ne sont pas suffisantes pour causer le syndrome diarrhéique, puisque des souches non-diarrhéiques les produisent (Gohar et al. 2005). La sécrétion de ces entérotoxines possédant toutes un peptide signal (Gohar et al. 2002) se fait probablement par la voie Sec.

Les gènes codant pour ces entérotoxines sont sous le contrôle d'un système de quorum sensing comprenant le régulateur transcriptionnel pléiotrope PlcR (Phospholipase C Regulator) (Agaisse et al., 1999), qui avec son peptide PapR régule l'expression de la plupart des facteurs de virulence chromosomiques chez *B. cereus* et *B. thuringiensis* (Slamti et al. 2014). Le régulon PlcR regroupe 45 gènes dont les produits représentent environ 80 % du protéome extracellulaire de *B. cereus* (Gohar et al. 2002). Ce régulateur joue un rôle important dans le pouvoir pathogène de *B. cereus* et *B. thuringiensis*. Les souches de *B. thuringiensis* et *B. cereus*, dépourvues de PlcR sont incapables de compléter leur cycle infectieux, à titre d'exemple l'infection chez *Galleria mellonella* (Salamitou et al. 2000), l'instillation nasale chez les souris et l'injection intraoculaire chez le lapin (Callegan et al. 2003, Salamitou et al. 2000). En plus, le surnageant de culture d'un mutant *plcR* perd ses propriétés cytotoxiques sur les hémocytes de *G. mellonella* et sur les lignées cellulaires épithéliales HeLa (Ramarao and Lereclus 2006).

b. Le céréulide

Le syndrome émétique est induit par la production d'une toxine appelée céréulide. Cette toxine correspond à un dodeca-depsipeptide cyclique qui a une taille de 1,2 kDa, constitué de 12 acides aminés liés par des liaisons non-peptidiques. Sa séquence ([_D-O-Leu-D-Ala-L-O-Val-L-Val]₃) est similaire à celle de la valynomycine, qui forme un canal ionophore à potassium et qui est produite par *Streptomyces griseus* (Agata et al. 1994). Le céréulide est hydrophobe, stable à des hautes températures (121 °C), à la protéolyse et à des pH acides. Ces propriétés confèrent à la toxine une résistance aux procédés de transformation alimentaire comme la cuisson et à la dégradation dans le tractus digestif. Ce dodeca-depsipeptide cyclique est synthétisé par des peptide-synthases non ribosomales (NRPSs, non-ribosomal peptide synthases)(Ehling-Schulz, Frenzel and Gohar 2015). Ces enzymes sont codés par les gènes du locus *ces* de 24 kb porté par un mégaplasme de 270 kb, pCER270, qui présente des similarités avec le plasmide pXO1 de *B. anthracis* (Ehling-Schulz et al. 2006). Le céréulide agit en perturbant le potentiel transmembranaire des cellules, entraînant des vomissements suite à la stimulation du nerf vague afférent (Agata, Ohta and Mori 1995). La production de céréulide semble être restreinte à quelques souches mésophiles de *B. cereus* phylogénétiquement très proches (Ehling-Schulz et al. 2005).

En outre, deux souches de *B. weihenstephanensis* produisant le céréulide ont également été identifiées (Thorsen et al. 2006).

D. *B. cereus* et contamination des chaînes de production alimentaires

B. cereus est considéré comme étant un véritable problème dans les industries agroalimentaires. Cette bactérie résiste à toutes les étapes de la chaîne de production alimentaire et contamine d'une façon persistante les équipements de ces industries. Etant donné son ubiquité, *B. cereus* être présent dans diverses matières premières telles que les légumes, le riz, le lait... Les spores présentes dans les matières premières sont résistantes à la chaleur, à la dessiccation et à de nombreux agents chimiques comme les agents nettoyants et les désinfectants. Ce qui rend les procédés de conservation des denrées alimentaires (pasteurisation, stérilisation, etc) inefficaces en grande partie dans le cas d'une contamination par *B. cereus*. Enfin, les propriétés de surface des spores (appendices, exosporium, ...) permettent leur fixation sur les surfaces internes des équipements de l'industrie agroalimentaire (Faille et al. 2007) ce qui rend leur élimination plus difficile.

Cependant, un autre moyen de persistance, pour cette bactérie, réside en sa capacité à former des biofilms. *B. cereus* est capable, en laboratoire, de former des biofilms sur différentes surfaces (inox, verre, plastique) et dans des conditions très variées (Wijman et al. 2007, Houry et al. 2010). Ces conditions sont très souvent retrouvées dans les industries agroalimentaires, ce qui peut conduire à la formation de biofilms par *B. cereus* dans ces industries. Ces derniers pourraient devenir une source de contamination continue qui a lieu spécifiquement durant le phénomène d'essaimage des cellules du biofilm (voir plus loin). Le pourcentage de spores peut atteindre 90% des cellules du biofilm selon la souche et les conditions expérimentales (Wijman et al. 2007). En condition statique, *B. cereus* et *B. thuringiensis* forment préférentiellement des biofilms à l'interface air-liquide, avec 2 composantes, une pellicule flottante sur le milieu de culture et un anneau extrêmement adhérent qui fixe la pellicule flottante sur la paroi du tube (Fagerlund et al. 2014). Il a été montré récemment (El-Khoury et al. 2016) que la sporulation est plus précoce dans l'anneau que dans la pellicule, et comme que l'anneau est la partie adhérente - donc persistante - du biofilm, celui-ci représente une source de recontamination, surtout en milieu industriel. En dehors des spores, en

mode de vie « sessile » (biofilm) les cellules végétatives baignent dans une matrice qui les protège contre les agents chimiques (Ryu and Beuchat 2005).

II. Chapitre II : Les biofilms

A. Généralités et définition des biofilms

L'étude des microorganismes connaît un essor important à partir des années 1800, grâce à Robert Koch qui a mis en place un milieu nutritif solide afin de développer et d'isoler des microorganismes vivants. Contrairement à ce que l'on croyait, les microorganismes se sont avérés être des êtres vivants complexes. Effectivement, afin de persister dans des conditions environnementales variables, les microorganismes adoptent plusieurs stratégies de survie. Parmi ces stratégies, les bactéries ont tendance à coloniser des surfaces et par la suite former des communautés appelées biofilms (Costerton, Stewart and Greenberg 1999). Les communautés microbiennes attachées aux surfaces (biofilms) ont été observées bien avant le développement des techniques qui permettent de les étudier plus profondément. En 1684, qu'Anthony van Leeuwenhoek (l'inventeur de la microscopie), découvre les biofilms en observant un entassement de microorganismes dans la plaque dentaire, qu'il appelle «*animalcules*». En 1969, Jones, par microscopie électronique à transmission et par des techniques de numération, démontre que les biofilms attachés sur les filtres utilisés dans une industrie traitant les eaux usées, sont composés d'une variété de microorganismes (Jones, Roth and Sanders 1969). Puis, William G. Characklis étudie les communautés bactériennes attachées aux systèmes de traitement de l'eau et rapporte qu'elles sont non seulement tenaces, mais aussi très résistantes aux désinfectants tels que le chlore (Characklis 1973). Le terme « biofilm » a été utilisé pour désigner ces communautés pour la première fois en 1978 par John Will Costerton, en expliquant les mécanismes par lesquels les microorganismes adhèrent sur les surfaces abiotiques et biotiques ainsi que les avantages que tirent les microorganismes habitant cette niche écologique (Costerton, Geesey and Cheng 1978).

Actuellement, une définition générale est donnée aux biofilms, comme étant un assemblage de microorganismes englobés dans une matrice constituée des substances polymériques extracellulaires « EPS » sécrétée par les cellules elles-mêmes (Figure 4). Le biofilm est une réponse adaptative que les bactéries mettent en œuvre lorsqu'elles sont faces à différents défis environnementaux tel qu'un appauvrissement en

nutriments, la dessiccation, la présence d'agents biocides ou face aux réponses immunitaires innées et acquises de l'hôte (Hall-Stoodley and Stoodley 2009). Dans la nature, ils sont considérés comme étant le mode de vie principal et majeur des microorganismes y compris les bactéries, les champignons et les protozoaires. En biofilms, les bactéries ont un profil d'expression génétique différent de celui des bactéries de la même espèce en mode planctonique. De plus, le biofilm est le siège d'échanges de signaux cellulaires conduisant à l'émergence de caractères sociaux tels que la coordination et la coopération des cellules sessiles (Li and Nair 2012). On peut par conséquent considérer le biofilm comme étant un mode de vie organisé des procaryotes et non comme une simple accumulation de cellules consolidées par une matrice. Ces cellules peuvent appartenir à la même espèce ou à différentes espèces donnant ainsi naissance respectivement à des biofilms monoespèces ou plurispèces. Les communautés bactériennes qui forment le biofilm subissent des mécanismes de différenciation donnant naissance à plusieurs sous-populations ayant des fonctions différentes (Vlamakis et al. 2008, Verplaetse et al. 2015).

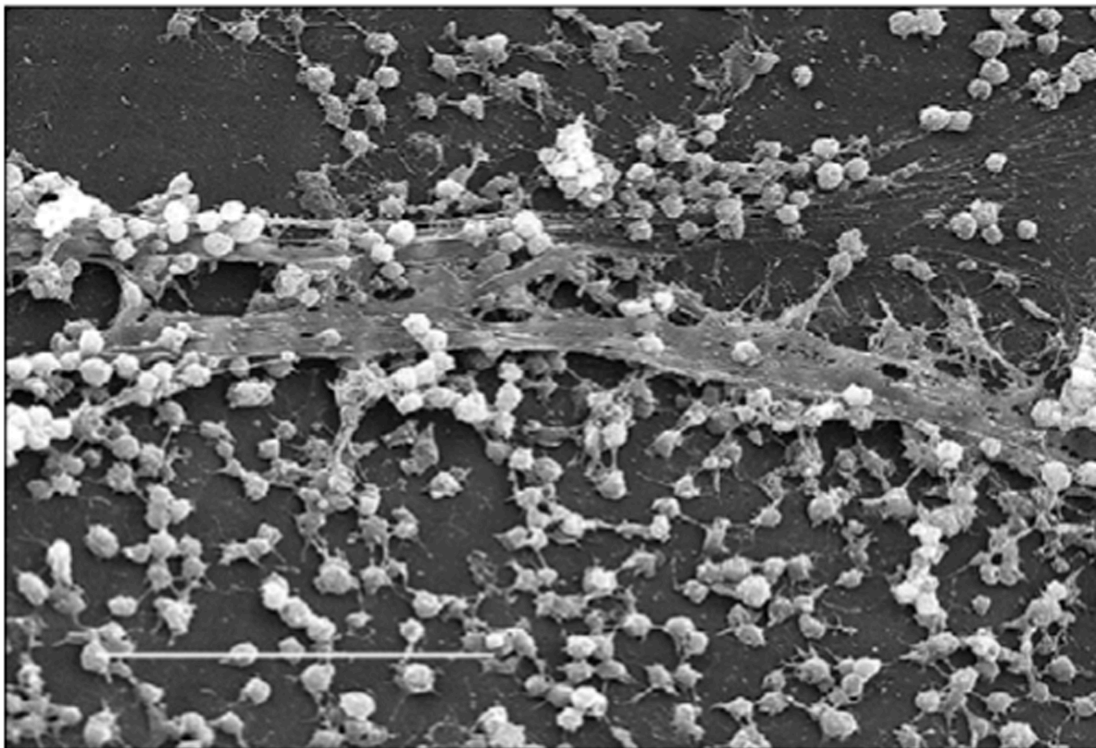


Figure 4. Observation par microscopie électronique à balayage du biofilm de *Staphylococcus*.

B. Les étapes de formation du biofilm

Suite à un changement d'expression génétique, les bactéries basculent du mode de vie planctonique individuel à un mode sessile en communauté où coexistent des populations différenciées. Ce processus comporte 3 étapes essentielles (Figure 5) : l'adhésion, la maturation pendant laquelle est produite la matrice, et finalement l'essaimage des cellules sessiles afin de coloniser d'autres surfaces.

1. Le contact des bactéries avec une surface « Adhésion »

L'adhésion bactérienne est l'étape initiatrice de la formation des biofilms. Les premières bactéries adhérentes servent de support pour recruter les autres bactéries encore en phase planctonique. L'adhésion se fait sur des surfaces biotiques (tissus animaux ou végétaux) ou abiotiques (particules colloïdales du sol, sable et pierres dans les cours d'eau, équipement des industries agroalimentaires et pétrolières, pharmaceutiques, lentilles de contact, différents types d'implants médicaux et dispositifs transcutanés). L'adhésion sur une surface s'effectue en deux étapes successives : adhésion réversible et adhésion irréversible.

a. Adhésion réversible (Docking stage)

Premièrement, les bactéries se rapprochent d'une surface, soit d'une façon aléatoire grâce au mouvement brownien du fluide dans lequel elles sont en suspension soit d'une façon dirigée quand les bactéries sont mobiles (flagelle). Ce contact dépend de plusieurs facteurs liés essentiellement aux propriétés physico-chimiques de la paroi des bactéries, de la surface abiotique ou biotique et du milieu dans lequel les bactéries et la surface de contact se trouvent. Quand les bactéries atteignent une distance critique avec la surface, souvent inférieure à 1 nm, une série d'interaction se met en jeu entre la bactérie et la surface. Celles-ci comportent des interactions électrostatiques qui favorisent en général la répulsion puisque la majorité des bactéries et les surfaces sont chargées négativement (Carpentier and Cerf 1993, Jucker, Harms and Zehnder 1996), les interactions de Van der Waals qui ont tendance à favoriser l'attraction, les interactions acide-base de Lewis et enfin les forces hydrodynamiques (An, Dickinson and Doyle 2000, Carpentier and Cerf 1993). Durant cette étape, les bactéries peuvent facilement se détacher sous l'effet, soit, des forces hydrodynamiques, soit des

changements de températures ou de pH ou bien des forces de détachement du fluide. De ce fait, elles sont capables de retourner à la phase planctonique.

b. Adhésion irréversible (Locking stage)

L'adhésion irréversible est la phase d'ancrage où les bactéries consolident leur contact direct avec la surface grâce à des composants de surfaces comme les pilis, les fimbriae, les appendices, ou grâce à la sécrétion de molécules comme les adhésines de surface (Klemm and Schembri 2000, Davies, Chakrabarty and Geesey 1993). L'adhésion des bactéries aux surfaces est renforcée par la production d'exopolysaccharides. A ce niveau, on passe à une adhésion irréversible et le détachement des bactéries nécessite des forces plus importantes. Les bactéries fixées sur la surface forment une couche qui peut interagir avec les bactéries planctoniques, et leur permettre de s'agréger au biofilm.

2. Maturation du biofilm

Après l'étape d'adhésion irréversible, une monocouche de bactéries en micro-colonie se forme, et croit pour former des macro-colonies. Ce phénomène est initié, d'une part, par le recrutement des bactéries planctoniques (Tolker-Nielsen et al. 2000) et d'autre part, par l'intervention des bactéries mobiles situées au bord des micro-colonies qui vont contribuer à l'extension de ces micro-colonies sur la surface (colonisation horizontale) (Houry et al. 2010) et enfin par division binaire des bactéries adhérentes au support (Heydorn et al. 2000). Ensuite, les bactéries vont consolider la structure du biofilm en produisant une matrice extracellulaire. Cette matrice est le support mécanique du biofilm qui va accorder aux bactéries sessiles une protection contre les conditions environnementales. La présence de la matrice crée des microenvironnements qui génèrent une distribution hétérogène de nutriments. Cette distribution hétérogène induit une expression différenciée des gènes qui se traduit en une hétérogénéité phénotypique. La structure du biofilm dépend de plusieurs facteurs, comme la composition de la matrice extracellulaire qui diffère selon les espèces formatrices du biofilm, le taux de croissance bactérienne ainsi que le type de surface colonisée.

3. L'essaimage des cellules du biofilm

Lorsque le biofilm a atteint son stade final, la couche périphérique se détache, retourne à l'état planctonique et pourra éventuellement coloniser de nouvelles surfaces et initier la formation d'un nouveau biofilm. Le vieillissement du biofilm s'accompagne d'une diminution de la quantité de nutriments disponibles et d'une accumulation des déchets toxiques. Il est donc plus avantageux pour les bactéries sessiles de quitter le biofilm et de retourner à l'état planctonique (Karatan and Watnick 2009). Ce processus fait intervenir des signaux qui stimulent ce détachement. Pour les biofilms de *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus*, un mélange de D-amino acides a un effet disséminateur (D-leucine, D-tyrosine, D-méthionine et D-tryptophane chez *B. subtilis*) qui induit la libération des fibres amyloïdes ayant pour rôle de lier les bactéries du biofilm et donc active le détachement des bactéries sessiles du biofilm (Kolodkin-Gal et al. 2010). En plus, les « EPS-degrading enzymes » notamment, l'alginate lyase trouvées chez *Pseudomonas fluorescens* induisent le clivage de l'alginate chez *P. aeruginosa*. Des molécules auto-inductrices impliquées dans le quorum sensing contrôlent l'essaimage des bactéries planctoniques. Notamment, l'auto-inducteur AI-2 inhibe la production des EPS chez *Vibrio cholera* (Hammer and Bassler 2003), et des oligopeptides impliqués dans un système de quorum sensing chez *S. aureus* (auto-inducteur AIP) régulent la production de métalloprotéinases ayant pour rôle le détachement de bactéries sessiles du biofilm (Boles and Horswill 2008).

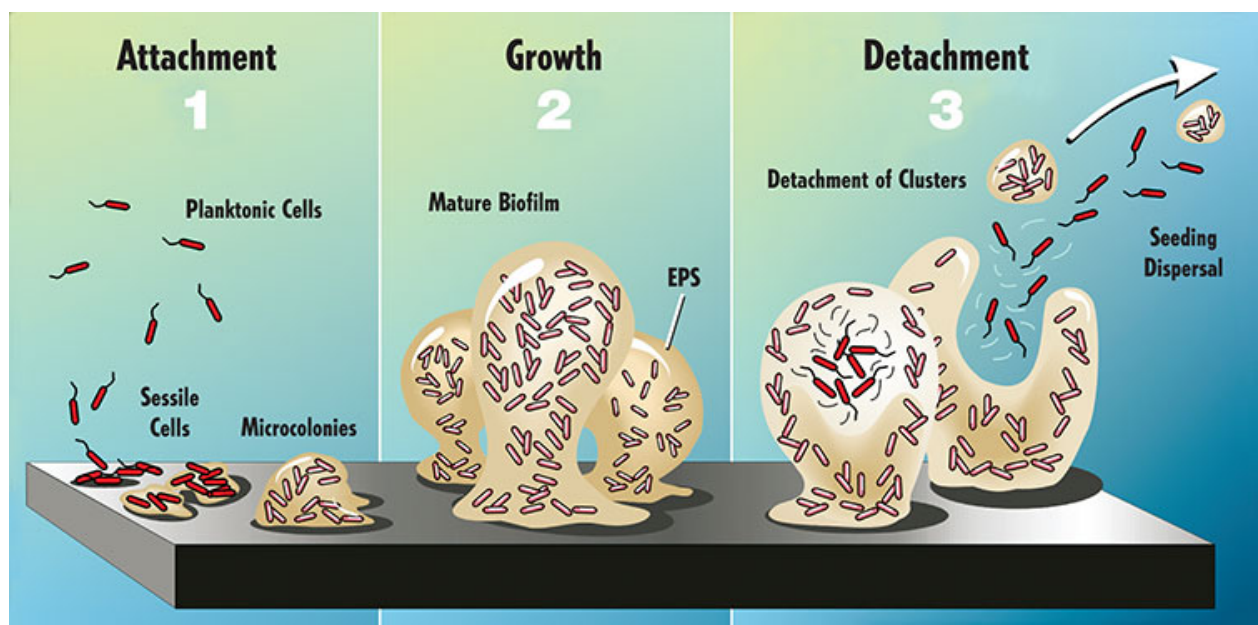


Figure 5. Schéma montrant le cycle de formation d'un biofilm.

La partie 1, illustre l'attachement des bactéries planctoniques sur une surface et la formation des microcolonies. On observe dans la partie 2, la transformation des microcolonies en macrocolonies par division binaire et par attachement d'autres bactéries planctoniques suivie par la maturation, où la matrice extracellulaire (EPS) est produite. Enfin, dans la partie 3, une sous-population sessile se détache du biofilm mature pour coloniser une autre surface et former un nouveau biofilm. Schéma adopté et modifié de (Stoodley and Dirckx 2003).

C. Régulation de la formation des biofilm

1. Le biofilm est un mode de vie génétiquement régulé

a. Chez B. subtilis

La transition planctonique/biofilm est régie en grande partie par le régulateur transcriptionnel Spo0A qui contrôle l'expression de plus de 100 gènes, y compris ceux qui sont impliqués dans la formation du biofilm et dans la sporulation (Fujita, Gonzalez-Pastor and Losick 2005, Molle et al. 2003, Hamon and Lazazzera 2001). Une cascade de phosphorylation (ou phosphorelais) aboutit à la phosphorylation du résidu aspartate de Spo0A et conduit ainsi à son activation. La concentration de Spo0A phosphorylé (Spo0A~P) dans une bactérie détermine le profil de transcription de cette bactérie et par la suite son état physiologique. Une concentration faible de Spo0A~P permet la transition vers la formation du biofilm tandis qu'une concentration plus élevée provoque la rentrée en sporulation (Fujita et al. 2005). L'activation de Spo0A est déterminée par l'activité des kinases (KinA, KinB, KinC, KinD et KinE) qui dépendent des signaux environnementaux et déclenchent la série de phosphorylations. Spo0A-P contrôle la formation du biofilm en inhibant SinR qui réprime la transcription des loci *epsA-O* et *tapA-sipW-tasA* (Chu et al. 2008). L'inhibition de SinR est réalisée par l'intermédiaire d'une protéine antagoniste, SinI, dont la transcription est sous le contrôle positif de Spo0A. SinI, en formant un complexe avec SinR, empêche la fixation de celui-ci sur son ADN-cible sous la forme de tétramère (Lewis et al. 1996). SinR réprime également le régulateur SlrR (Figure 6) (Kearns et al. 2005, Chu et al. 2006, Chu et al. 2008). Spo0A~P réprime aussi AbrB, l'un des répresseur de la formation du biofilm (Hamon et al. 2004), qui agit de la même manière que SinR (Kearns et al. 2005, Hamon et al. 2004, Chu et al. 2008, Chu et al. 2006). De plus, AbrB inhibe l'expression d'une protéine de la matrice BlsA (Verhamme, Murray and Stanley-Wall 2009) et des protéines régulatrices SlrR (Chu et al. 2008) et Abh (Strauch et al. 2007). SlrR est indispensable pour la formation du biofilm. Elle forme le complexe protéique SinR-SlrR et par conséquence empêche SinR de réprimer les loci codant pour la matrice et

empêche aussi l'action de SinR sur le promoteur de *slrR*. En plus, le complexe SlrR-SinR réprime également les gènes impliqués dans la division cellulaire et dans la mobilité des bactéries (*hag*, *lytABC* et *lytF*), favorisant ainsi la formation du biofilm (Chai et al. 2010b, Chai, Kolter and Losick 2010a). Une autre voie de régulation implique YwcC et SlrA (Figure 6). SlrA est un paralogue de SinI, et donc fonctionne comme un répresseur de SinR (Chai, Kolter and Losick 2009). Le gène *slrA* est réprimé par *ywcC*, un répresseur transcriptionnel de type TetR (Chai et al. 2009, Kobayashi 2008). Lorsque YwcC reçoit un signal jusqu'à présent non caractérisé, *slrA* est réprimé (Chai et al. 2009). Cependant, contrairement à SinI, *slrA* est exprimé dans presque toutes les cellules, ce qui stimule la production de la matrice par la totalité de la population. En plus, la transcription de *slrR* est indirectement activée par la protéine régulatrice Abh dont la transcription est contrôlée par plusieurs facteurs σ , y compris σ_M , σ_W et σ_X . La protéine Veg, nouvellement identifiée, est hautement transcrite en phase exponentielle et en sporulation, favorisant ainsi la production de la matrice par l'inhibition de l'activité de SinR ce qui favorise le développement du biofilm, à travers des voies indépendantes du SinI, SlrA et SlrR (Lei et al. 2013).

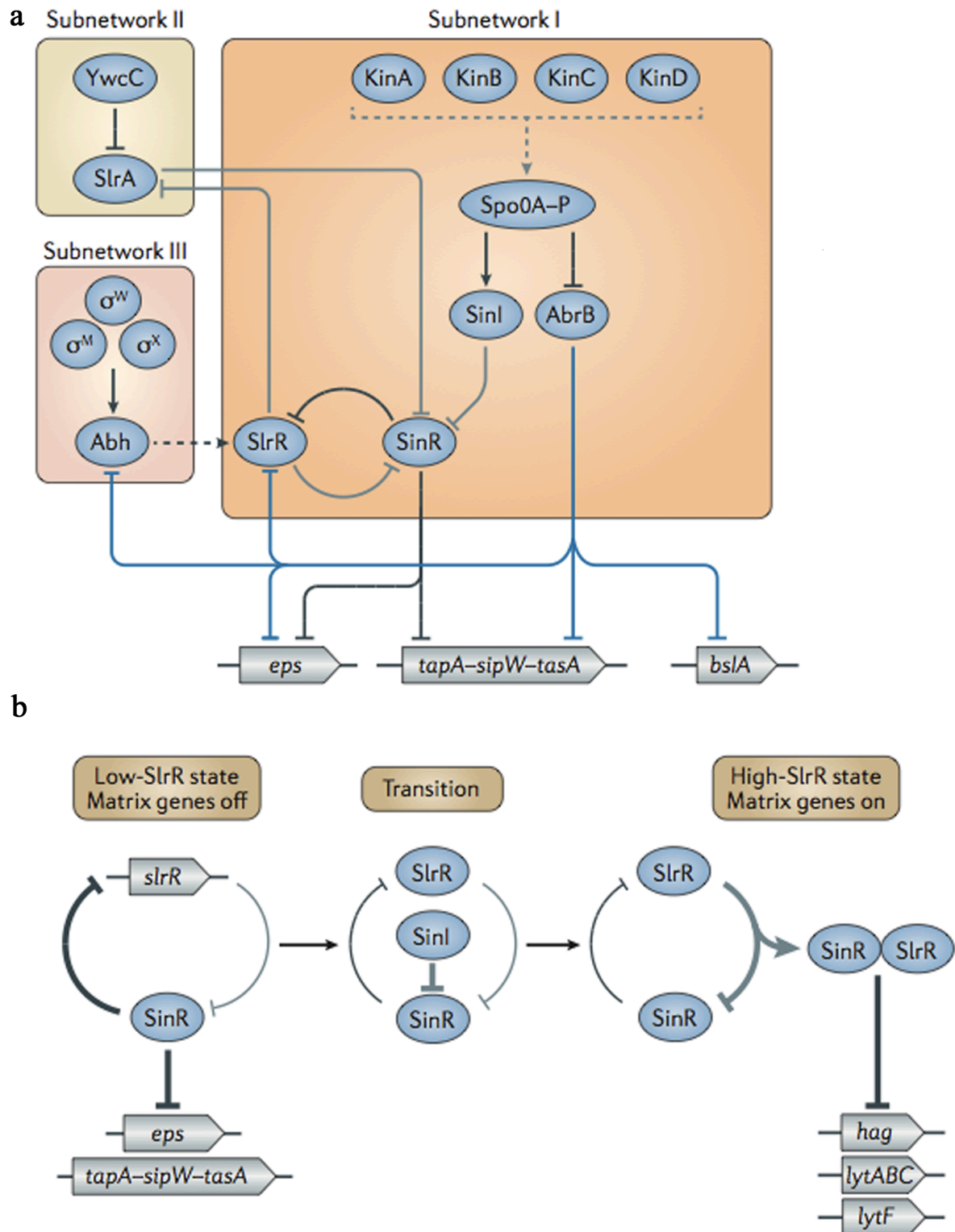


Figure 6. Schéma représentant les voies de régulation de la formation du biofilm chez *B. subtilis*.

Plusieurs réseaux sont impliqués dans la régulation de la formation du biofilm. Ils sont détaillés dans le paragraphe ci-dessus (Vlamakis et al. 2013)

b. Chez *B. cereus*

Nous nous sommes intéressés plus particulièrement à la formation du biofilm chez *B. cereus* et *B. thuringiensis*, ces deux espèces constituant en effet notre modèle d'étude. Il existe, cependant, peu d'informations disponibles sur la régulation de la formation des biofilms chez *B. cereus* en comparaison avec *B. subtilis*. Cette régulation possède des similitudes avec celle de *B. subtilis*, notamment, chez *B. cereus*, SinI active la formation des biofilms (Figure 7) et inhibe la mobilité cellulaire (Fagerlund et al. 2014), contrairement à SinR (Fagerlund et al. 2014). Par conséquent, les deux protéines antagonistes SinI/SinR agissent éventuellement comme un « switch on/off » entre la formation du biofilm et la mobilité chez *B. cereus*, pareil à ce qui a été déjà décrit chez *B. subtilis* entre la formation du biofilm et le « swarming » (Kearns et al. 2005). Enfin, chez *B. thuringiensis* comme chez *B. subtilis*, Spo0A stimule et AbrB réprime de la formation des biofilms (Fagerlund et al. 2014, Hamon and Lazazzera 2001).

Néanmoins, des différences existent entre les deux espèces. Ainsi, SinR régule le locus *epsA-O* chez *B. subtilis* mais n'a aucun effet sur le locus *eps* de *B. thuringiensis*. De même, le groupe *cereus* ne possède pas d'orthologue de SlrR (Pflughoeft, Sumby and Koehler 2011). Enfin, le régulon SinR de *B. thuringiensis* comprend des éléments absents dans celui de *B. subtilis*. Les enterotoxines Hbl sont en effet contrôlées par SinR chez *B. thuringiensis*, de même que la kurstakine, un surfactant lipopeptidique, alors que la surfactine, un lipopeptide de *B. subtilis* n'est pas dans le régulon SinR de cette espèce. La kurstakine est également incluse dans le régulon nécrotrophe NprR, requis pour la survie de *B. thuringiensis* dans le cadavre de l'insecte (Dubois et al. 2012).

Chez *B. thuringiensis*, il existe ainsi un lien entre la formation du biofilm, la virulence et le necrotrophisme. PlcR favorise la transcription de NprR (Dubois et al. 2013), qui à son tour, active la transcription de la kurstakine dont le rôle dans la formation des biofilm chez *B. thuringiensis* a été démontré récemment (Dubois et al. 2012, Gelis-Jeanvoine et al. 2016). De plus, le régulateur pléiotrope codY régule positivement l'activité de PlcR en phase stationnaire, en stimulant la production d'un transporteur requis pour l'import de PapR (Slamti et al. 2015), et réprime la transcription de NprR en phase exponentielle (Figure 7). Des études ont montré que CodY réprime la formation de biofilm chez la souche *B. cereus* ATCC14579 (Lindback et al. 2012) mais favorise la formation de biofilm chez *B. cereus* UW101C (Hsueh, Somers and Wong 2008). Enfin, les régulateurs

transcriptionnels Sigma peuvent contrôler plusieurs mécanismes liés à la formation des biofilms. Par exemple, Sigma 54 régule négativement l'expression de SinR et favorise la transcription des gènes impliqués dans la biosynthèse des polysaccharides du locus *eps* de *B. cereus* et des facteurs de virulence ainsi que de ceux impliqués dans la production des flagellines chez *B. cereus* (Hayrapetyan et al. 2015).

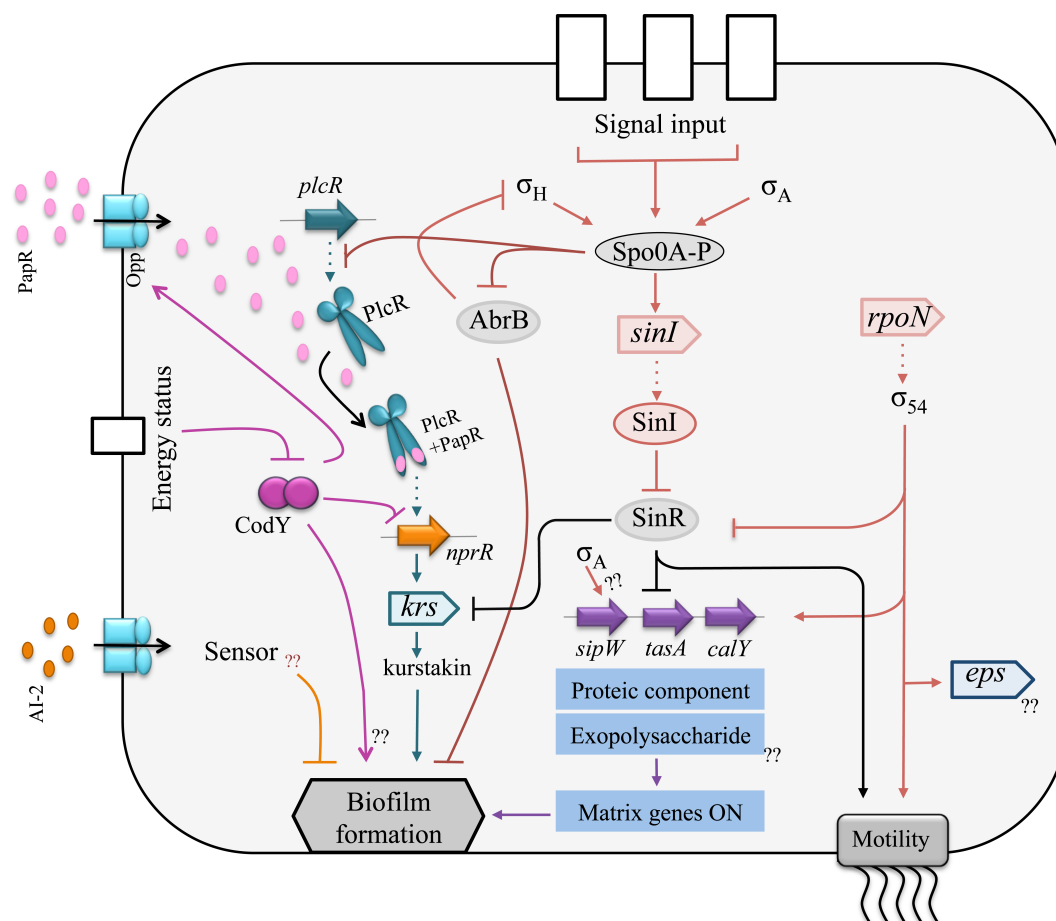


Figure 7. Schéma représentant les voies de régulation de la formation de biofilm chez *B. cereus*/*B. thuringiensis*.

L'expression de l'opéron *tasA* (*sipW-tasA-calY*) qui code pour les composantes protéiques de la matrice est activée par σ_{54} et réprimée par SinR. L'activation de ce dernier est antagonisée par SinI. La transcription de SinI est activée par le régulateur de sporulation Spo0A. De plus, Spo0A régule négativement le régulateur AbrB, ce qui entraîne l'activation de la formation de biofilm. Plusieurs systèmes de quorum sensing sont impliqués dans la formation de biofilm, le régulateur transcriptionnel PlcR active la transcription de NprR qui stimule la production de la kurstakin et favorise donc la formation de biofilm. Le récepteur « sensor » de la molécule de signalisation « Al-2 » est encore inconnu, toutefois, Al-2 possède un effet inhibiteur sur la formation de biofilm (Majed et al. 2016).

2. Quorum sensing

La bioluminescence, la sporulation, la conjugaison, la compétence, la production d'antibiotiques, la formation des biofilms ainsi que la sécrétion des facteurs de virulence sont des mécanismes bactériens qui peuvent être régulés par des systèmes

de quorum sensing (QS) (Williams and Cámara 2009). Ces systèmes impliquent la production et la sécrétion de molécules de signalisation. Ils sont régis par la densité de la population bactérienne. Lorsque la densité de la population est faible, la concentration de molécules de signalisation dans l'environnement est au-dessous du seuil qui permet de déclencher une réponse. Cependant, à forte densité de population la concentration en molécules de signalisation atteint un seuil capable d'activer la transcription d'un ensemble de gènes impliqués dans le « quorum-sensing », incluant les gènes impliqués dans la production des molécules de signalisation elles-mêmes. Ceci permet la mise en place d'une boucle de rétroaction positive qui accroît la réponse cellulaire et le déclenchement d'une réponse coordonnée entre les cellules de la population en question (Rutherford and Bassler 2012).

Les systèmes de quorum sensing reposent sur des petites molécules de signalisation secrétées par les bactéries elles-mêmes appelées auto-inducteurs (AIs) ou phéromones. Les trois familles principales d'autoinducteurs sont les N-acyl homosérine (AI-1) chez les bactéries Gram négatives, les oligopeptides (AIPs) chez les bactéries Gram positives, et les composés à base de 4,5-dihydroxy-2,3-pentanedione (AI-2) chez les bactéries Gram positives et Gram négatives. Les systèmes de quorum sensing qui impliquent les AIPs sont classés en 2 systèmes, en fonction de l'emplacement de leur cible, à l'extérieur ou à l'intérieur de la bactérie (Figure 8). Les AIPs ayant une cible extracellulaire, sont reconnus par un système à deux composants qui comprend une histidine kinase senseur (sensor histidine kinase) et un régulateur associé (response regulator). L'histidine kinase activée par l'AIP phosphoryle le régulateur, qui à son tour régule la transcription de gènes spécifiques. En revanche, les AIPs ayant des cibles intracellulaires, seront internalisés dans la bactérie par une oligopeptide perméase. Ensuite, ils vont se fixer sur un régulateur spécifique et altérer son activité (Slamti and Lereclus 2002). Les membres d'une nouvelle famille de régulateurs appelées RNPP (Declerck et al. 2007), parmi lesquels on trouve les Rap, NprR, PlcR et PrgX, font partie de ce type de quorum sensing.

Les AIPs impliqués dans les deux systèmes présentent des caractéristiques similaires. Leurs gènes sont transcrits puis traduits en pro-AIPs, secrétés activement puis hydrolysés en leur forme active par des protéases extracellulaires.

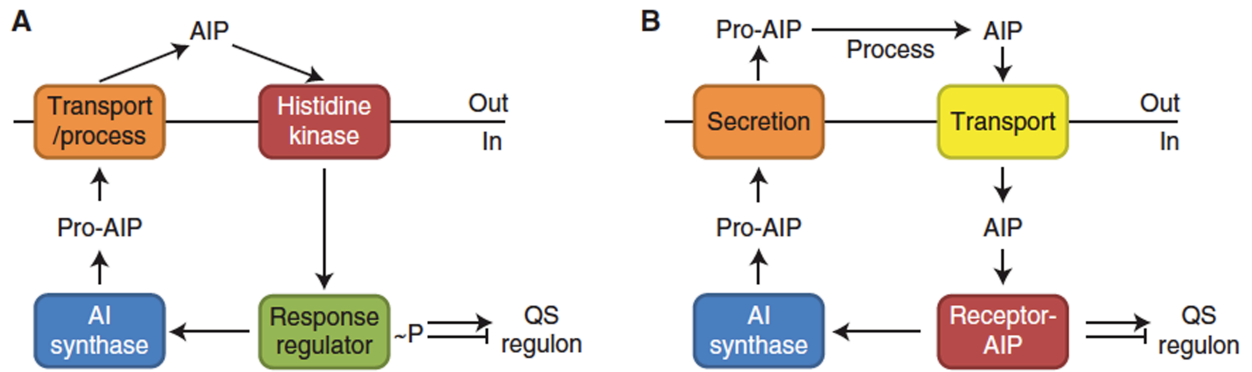


Figure 8. Schéma représentant les deux types de système du quorum sensing impliquant les AIPs chez les bactéries Gram positives.

La transcription et la synthèse des AIPs sont des étapes communes aux deux systèmes. Le schéma A : représente les mécanismes d'action extracellulaire des AIPs et le schéma B : représente les mécanismes d'action intracellulaire des AIPs (Rutherford and Bassler 2012).

Les biofilms sont des systèmes complexes ayant une densité cellulaire très élevée allant de 10^8 à 10^{11} cellules par g de poids humide (Morgan-Sagastume et al. 2008). Théoriquement, cette densité cellulaire élevée favorise l'accumulation des autoinducteurs (AIs) et par la suite l'activation des systèmes de quorum sensing. Plusieurs études ont souligné l'implication des systèmes de quorum sensing dans la formation des biofilms. Chez *Staphylococcus epidermidis*, les polysaccharides PIA (Polysaccharides intercellular adhesion PIA) sont régulés négativement par le système QS de type LuxS/AI-2, et la délétion de *luxS* favorise la formation du biofilm et induit une augmentation de la virulence chez le rat (Xu et al. 2006). Chez *V. cholerae*, AI-2 inhibe les gènes impliqués dans la production des exopolysaccharides (Hammer and Bassler 2003) (Figure 9). Alors que, chez *B. subtilis*, le système ComP/ComX (où ComX est le peptide messenger) régule positivement la production d'un lipopeptide sécrété : la surfactine. Ce dernier agit en formant des pores dans la membrane cellulaire, qui provoque une fuite de potassium. Cette fuite active la kinase membranaire KinC (Figure 11), ce qui conduit à la phosphorylation du régulateur transcriptionnel Spo0A et à la transcription de l'opéron *epsA-O* (Lopez et al. 2009a, López et al. 2009). Chez *S. aureus* et *S. epidermidis*, la délétion des gènes impliqués dans le système de QS de type Agr génère une surproduction du biofilm (Vuong et al. 2000, Vuong et al. 2003). Le système Agr régule positivement la production des protéases qui réduit l'extension du biofilm en dégradant la composante protéique de la matrice (Lauderdale et al. 2009), entraînant la dispersion du biofilm (Boles and Horswill 2008). Le système LuxS/AI-2 présent

également chez *S. epidermidis*, contrôle l'expression des gènes codant pour les exopolysaccharides de la matrice (Li et al. 2008). *P. aeruginosa* possède également deux systèmes de quorum sensing pour la formation de son biofilm, *lasR-lasI* et *rhlIR-rhII* (Davies and Geesey 1995).

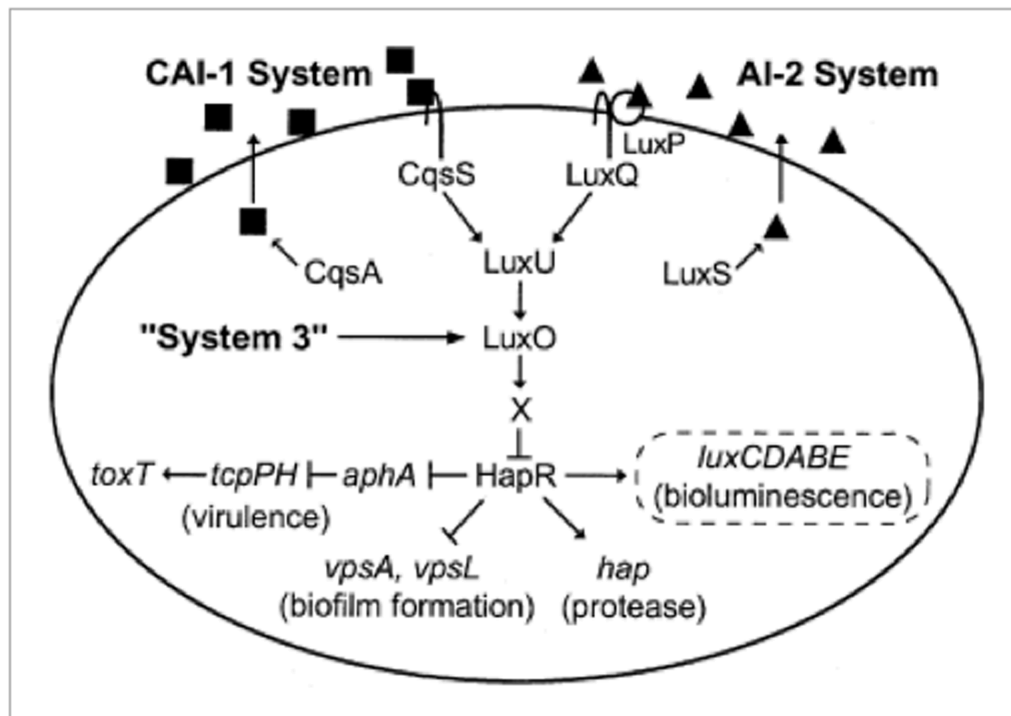


Figure 9. Schéma représentant le système de quorum sensing chez *V. cholerae*.

Trois circuits de quorum sensing convergent pour contrôler la formation du biofilm, la virulence et la production des protéases (Hammer and Bassler 2003).

Les protéines de la famille RNPP sont aussi présentes chez *B. cereus*. A l'exception de la protéine Rap, ces régulateurs RNPP sont des facteurs de transcription qui régulent directement l'expression de gènes. PlcR est caractérisé comme le principal régulateur contrôlant l'expression de la plupart des facteurs de virulence chromosomiques chez *B. cereus* / *B. thuringiensis* (Gohar et al. 2008). Le régulateur NprR contrôle les propriétés nécrotrophiques permettant aux bactéries de survivre dans l'hôte infecté. Les protéines Rap affectent négativement la sporulation par leur interaction avec une protéine impliquée dans l'activation de Spo0A et régule ainsi la persistance de *B. thuringiensis* dans le cadavre de l'insecte (Slamti et al. 2014). En outre, plusieurs études ont montré l'implication de plusieurs systèmes de quorum sensing dans la formation des biofilms chez *B. cereus*, notamment, le régulateur transcriptionnel PlcR et son peptide signal PapR (Hsueh et al. 2006), le système LuxS / AI-2 (Auger et al. 2006) ainsi que Spo0A

(Fagerlund et al. 2014). La délétion de PlcR augmente d'un facteur de quatre la quantité de biofilm obtenue en microplaques en polystyrène chez *B. cereus* ATCC14579 (Hsueh et al. 2006). Cependant, PlcR devrait théoriquement promouvoir la formation des biofilms. La transcription de NprR est en effet positivement régulée par PlcR (Dubois et al. 2013), et NprR active la production de la kurstakine, qui elle-même favorise la formation des biofilms (Gelis-Jeanvoine et al. 2016). Le résultat obtenu dans la souche ATCC14579 pourrait s'expliquer par l'interruption, dans cette souche, de NprR par un transposon. Enfin, l'autoinducteur AI-2 inhibe la formation des biofilms chez *B. cereus* (Auger et al. 2006) à l'inverse de ce qui est observé chez *B. subtilis*, où AI-2 stimule la formation du biofilm (Duanis-Assaf et al. 2016).

D. Hétérogénéité dans un biofilm

La présence dans le biofilm, d'une matrice d'exopolymères dans laquelle les coefficients de diffusion sont faibles, favorise au niveau local les interactions entre microorganismes, augmente les échanges génétiques, facilite les échanges de métabolites et de molécules de signalisation, et induit la formation de gradients (Figure 10). L'hétérogénéité qui en résulte, au niveau du biofilm, aboutit à une différenciation cellulaire où l'expression des gènes peut changer selon le stade de développement du biofilm. Au sein d'un biofilm monospèce, les cellules différenciées possèdent un profil génétique identique mais une expression différente des gènes (Fux et al. 2005, An and Parsek 2007, Spormann 2008), dépendante de l'emplacement de la bactérie au sein du biofilm.

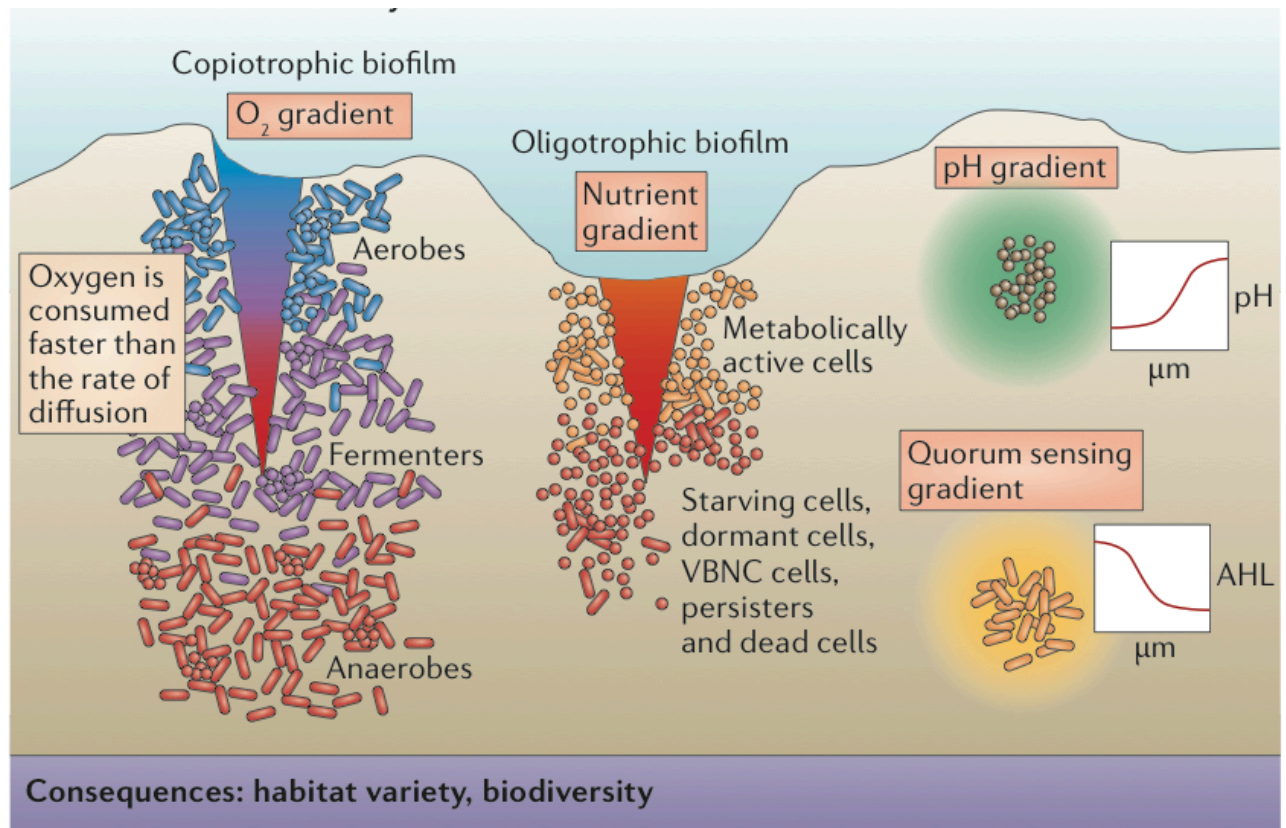


Figure 10. Hétérogénéité dans un biofilm.

La formation d'une matrice permet l'établissement de plusieurs gradients (pH, oxygène, nutriments) qui fournissent plusieurs habitats au sein d'un même biofilm (Flemming et al. 2016).

1. *B. subtilis*

Les bactéries résidentes dans un biofilm sont susceptibles de subir des différenciations cellulaires afin de donner des sous-populations phénotypiquement distinctes mais génétiquement identiques (Lopez et al. 2009a, Lopez and Kolter 2010). Le réseau génétique qui contrôle la différenciation cellulaire chez *B. subtilis* est assez complexe, mais on peut y distinguer trois régulateurs clés : DegU, ComA et Spo0A (Gaur, Dubnau and Smith 1986, Dahl et al. 1992, Tran, Nagai and Itoh 2000). Ces régulateurs sont responsables de l'activation de l'expression des gènes qui mène finalement à la différenciation cellulaire en plusieurs types qui coexistent dans le biofilm de *B. subtilis* (Figure 11). En revanche, en mode de vie planctonique, les bactéries ont tendance à être mobiles. La mobilité est établie lorsque les régulateurs sus-mentionnés ne sont pas phosphorylés (Kobayashi 2007b, Blair et al. 2008). Les bactéries mobiles basculent vers le mode sessile lors de l'activation de ces régulateurs, en réponse à des signaux externes favorisant alors la différenciation de la majorité de la population mobile en d'autres

types cellulaires. Il existe sûrement, une sous-population mobile dans un biofilm qui contribue à l'extension du biofilm. En premier lieu, la protéine Spo0A est activée quand elle est phosphorylée. Comme discuté précédemment, c'est le niveau de phosphorylation qui active des voies distinctes. Un niveau faible de phosphorylation de Spo0A caractérise une sous-population productrice de la matrice positionnée dans le corps du biofilm (Vlamakis et al. 2008). L'accumulation de la forme phosphorylée de Spo0A (Spo0A~P), favorise le passage de la bactérie en sporulation (Fujita et al. 2005). Les spores sont présentes dans les structures aériennes au niveau de la partie supérieure du biofilm, ce qui facilite leur dispersion (Vlamakis et al. 2008). Ces deux programmes de différenciation chevauchent pendant la transition d'un type cellulaire à un autre et coexistent dans un biofilm de *B. subtilis* (Figure 11). En premier lieu, Spo0A~P inhibe la mobilité en activant la transcription d'une protéine bi-fonctionnelle EpsE, codée par un gène du locus *epsA-O*, et qui possède à la fois une activité inhibitrice du moteur du flagelle, et une activité glycosyltransferase (Blair et al. 2008). En second lieu, les bactéries Spo0A-ON sont également cannibales (Lopez et al. 2009b, Gonzalez-Pastor, Hobbs and Losick 2003). Celles-ci produisent un facteur d'immunité et deux toxines (Skf et Sdp) qui tuent les bactéries non immunes (Gonzalez-Pastor et al. 2003, Gonzalez-Pastor 2011). Par ailleurs, l'activation de la protéine ComA (ComA~P) entraîne une différenciation des bactéries en cellules compétentes. Ces bactéries compétentes sont capables d'incorporer de l'ADN extracellulaire dans leur génome, accroissant ainsi la variabilité génétique au sein de la population sessile. L'activation de ComA est un processus régulé par un système de quorum sensing et dépend ainsi largement de la densité cellulaire. A son tour, ComA active les gènes impliqués dans la production de surfactine (López et al. 2009). La localisation de cette sous-population demeure inconnue en raison de sa petite taille. En dernier lieu, l'activation de DegU (DegU~P) conduit à l'obtention d'une sous-population appelée «mineurs» spécialisée dans la production d'exoprotéases (Veening et al. 2008). Les mineurs favorisent la dégradation des protéines en peptides plus assimilables par la communauté. Les cellules DegU-ON régulent positivement l'expression de *blsA*, un gène qui code pour une protéine hydrophobe et qui forme un film à la surface du biofilm, nécessaire pour garder l'intégrité du biofilm (Hobley et al. 2013). Ces cellules sont préférentiellement localisées à la surface d'une colonie sur agar, assimilée à un biofilm (Marlow et al. 2014).

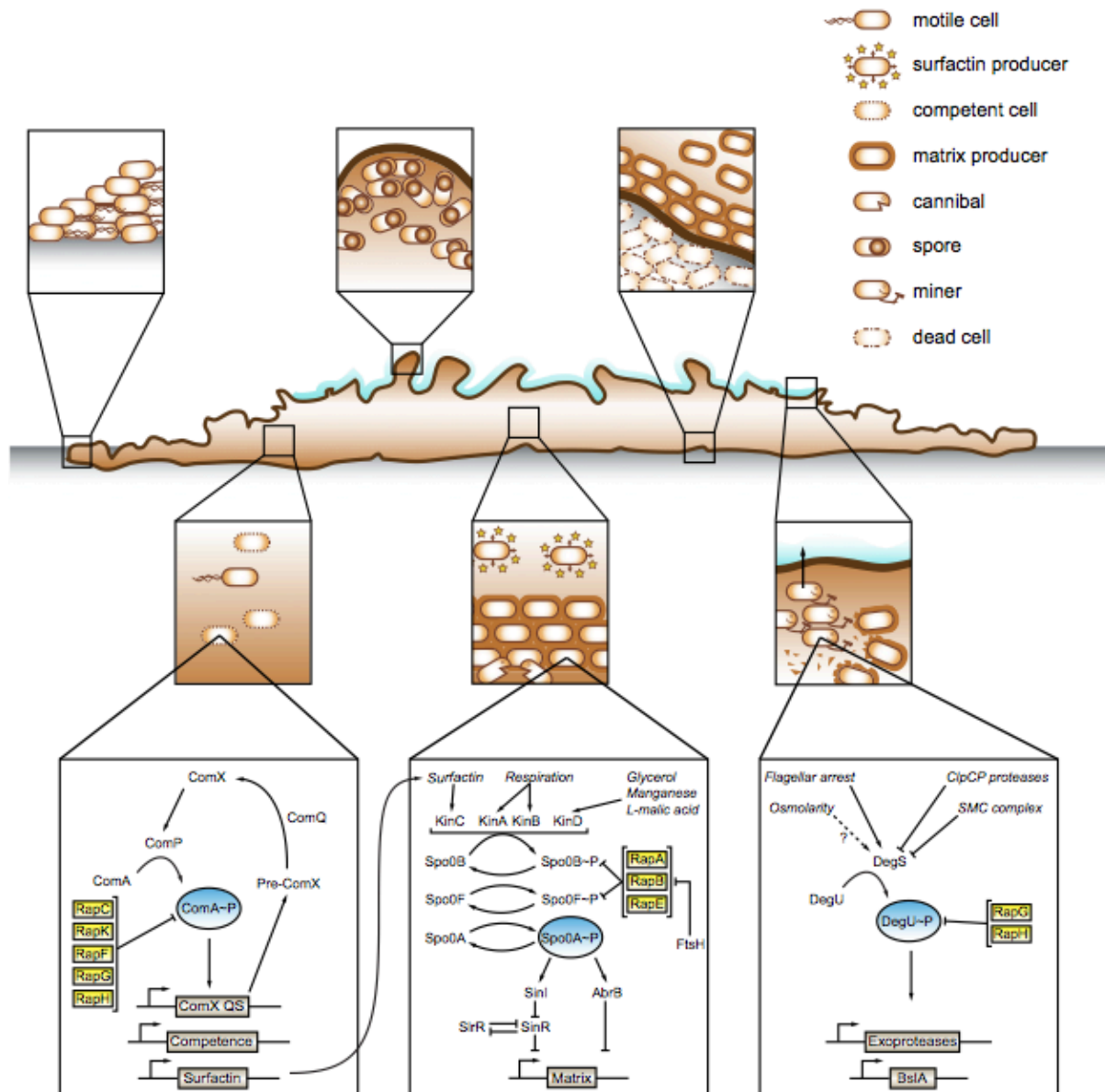


Figure 11. Schéma qui illustre les différents programmes de différenciation observés dans une matrice de biofilm chez *B. subtilis*.

(Mielich-Suss and Lopez 2015).

2. *B. cereus*

On observe, à l'intérieur du biofilm chez *B. cereus*, la coexistence de deux sous-populations non-mobiles et mobiles. La population mobile est présente en minorité par rapport à la sous-population non-mobile. Elle est plutôt originaire de la culture planctonique que du biofilm lui-même. Par conséquent, les bactéries planctoniques peuvent être recrutées dans un biofilm préformé et peuvent ensuite intervenir dans la croissance du biofilm. La sous-population des bactéries mobiles dans le biofilm de *B. cereus* représente entre 0,1 % et 1 % de la population totale (Houry et al.

2012). Cette sous-population est avantageuse pour le biofilm puisqu'elle crée des tunnels dans la matrice et donc augmente les transferts moléculaires, comme les nutriments et réduit les gradients nocifs. Ces tunnels peuvent être néfastes au biofilm, agissant comme un conduit pour les biocides et les désinfectants, et par la suite, facilitant l'accès des molécules aux bactéries résidentes dans le biofilm (Houry et al. 2012). Une étude menée par Verplaetse et al, montre la coexistence d'une sous-population virulente (qui formerait 35 % de la population totale), une sous-population nécrotrophe, qui croit avec la maturation du biofilm et une sous-population de bactéries en sporulation (Figure 12), au sein d'un même biofilm (Verplaetse et al. 2015). Cependant, Verplaetse a également identifié une sous-population indéfinie ou non différenciée, considérée comme étant Vir-, Nec- et Spo- (Verplaetse et al. 2015). Eventuellement, cette sous-population peut être responsable de la production de substances extracellulaires polymériques (EPS) utiles pour le reste de la communauté. En outre, Fagerlund a démontré dans son étude que les gènes *hbl* codant pour une entérotoxine sont exprimés en biofilm par une sous-population mineure (Fagerlund et al. 2014), ce qui peut faire du biofilm une source de toxines chez l'hôte.

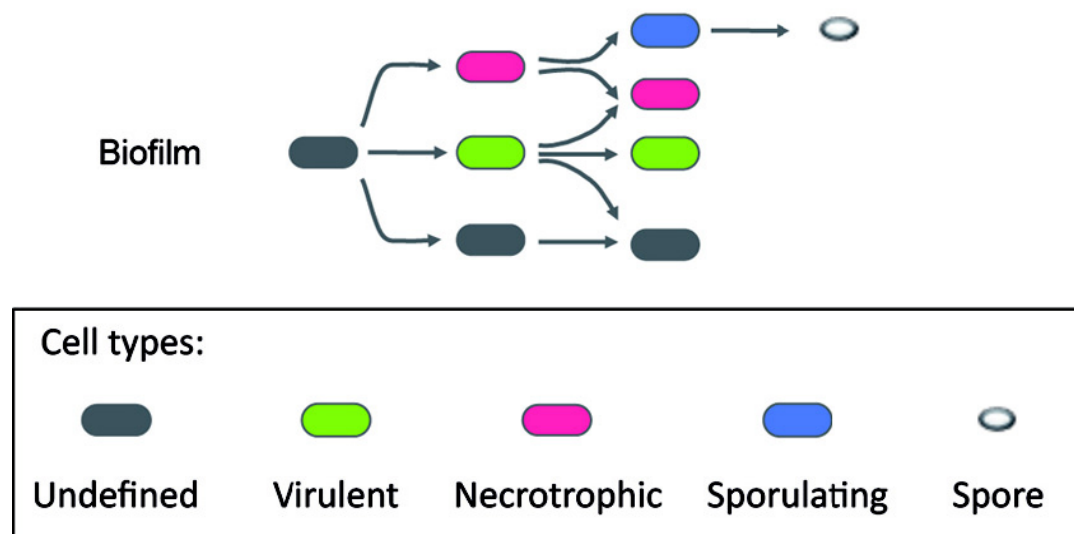


Figure 12. Modèle de la différenciation cellulaire de *B. thuringiensis*.

La culture de biofilm se fait en milieu LBP. L'ovale rouge représente les cellules nécrotrophes. L'ovale bleu représente les cellules engagées dans la sporulation. L'ovale gris représente les cellules qui ne rentrent pas dans les trois étapes différenciées mentionnées ci-dessous (Verplaetse et al. 2015).

E. Cellule planctonique versus cellule sessile

Les biofilms confèrent aux bactéries certaines propriétés que les bactéries solitaires ne possèdent pas. La production de la matrice extracellulaire est un processus énergétiquement coûteux pour les bactéries (Saville et al. 2011) mais qui est justifié, étant donné les avantages que procure cette matrice. La matrice extracellulaire limite le mouvement des bactéries dans un volume de forte densité cellulaire, et donc augmente la probabilité d'interactions intercellulaires, ce qui améliore le taux d'échange génétique. La matrice augmente également la tolérance ou la résistance des bactéries aux antibiotiques, limite le pâturage des protozoaires et confère une protection contre les défenses de l'hôte (Mah and O'Toole 2001, Anderson and O'Toole 2008, Flemming et al. 2016). Elle détermine les interactions avec l'environnement extérieur. Une des propriétés notables apportées par le biofilm est la tolérance à la dessiccation. Les bactéries planctoniques ne résistent pas à la dessiccation, mais elles sont, sous forme sessile, tolérantes à ce phénomène. En effet, les polymères extracellulaires hydratés de la matrice agissent comme une éponge qui retient l'eau (Flemming and Wingender 2010). De plus, *B. subtilis* produit une protéine, BlsA, qui forme un film hydrophobe autour du biofilm et par la suite renforce sa capacité à supporter la dessiccation (Vlamakis et al. 2013).

Le biofilm constitue un moyen efficace de capture de nutriments. En effet, la matrice présente une capacité de sorption passive, qui influence les échanges de nutriments, de gaz et d'autres molécules entre le biofilm et l'environnement extérieur (Figure 13) (Billings et al. 2015). En outre, en cas de mort cellulaire, les débris cellulaires, qui ne sont pas dispersés, sont cannibalisés par les cellules vivantes. Ce processus est observé dans les biofilms de *B. subtilis* (Lopez et al. 2009b), où l'ADN issu du lysat cellulaire est utilisé comme source de phosphore, de carbone et d'énergie (Pinchuk et al. 2008). Dans les biofilms de *P. aeruginosa* également, des DNases permettent l'utilisation de l'ADN du lysat cellulaire comme source de nutriments (Mulcahy, Charron-Mazenod and Lewenza 2010).

Il existe, dans la matrice et entre les microcolonies du biofilm, des pores et des tunnels qui causent un vide dans la matrice (Figure 13). Chez *B. thuringiensis*, ces structures proviennent d'un déplacement très rapide (allant jusqu'à 20 μm par sec) de bactéries mobiles issues du biofilm ou de la phase planctonique, qui ouvrent devant elles un

passage dans la matrice (Houry et al. 2012). Ces pores augmentent les échanges de composés à l'intérieur du biofilm. D'autre part, les cellules sessiles bénéficient plus efficacement de leurs propres enzymes de dégradation extracellulaires parce que celles-ci interagissent avec les EPS de la matrice et par suite sont retenues dans le biofilm. Tandis que les enzymes des cellules planctoniques se diluent dans l'environnement extracellulaire (Flemming and Wingender 2010).

D'un autre côté, les biofilms sont la cause de divers types d'infections chroniques localisées, par exemple, au niveau des dents, de l'oreille moyenne, du tube digestif, du système respiratoire, du tractus urogénital, et d'implants prothétiques (Donlan 2008, Hatt and Rather 2008, Hall-Stoodley, Costerton and Stoodley 2004). En effet, les microorganismes intégrés dans un biofilm sont plus résistants aux agents antimicrobiens, à la réponse immunitaire de l'hôte et à de multiples facteurs (Anderson and O'Toole 2008). Enfin, certaines bactéries dans la communauté sessile possèdent un métabolisme fortement ralenti, ce qui limite leur croissance et les rend insensibles à certains agents antimicrobiens (Pan, Breidt and Kathariou 2006).

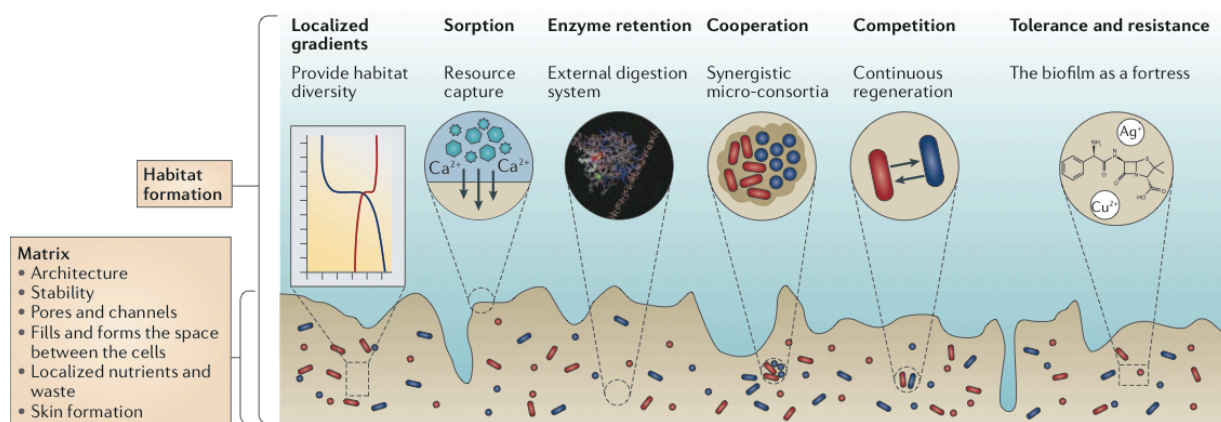


Figure 13. Schéma représentant les propriétés avantageuses du biofilm et la formation des habitats par les bactéries dans un biofilm.

Les bactéries dans un biofilm forment un habitat, elles sont entourées par une matrice qui leur fournit une stabilité mécanique. La matrice est composée de polymères extracellulaires (EPS). Les nutriments et les autres molécules peuvent être piégés par sorption aux EPS et dans les pores et les tunnels de la matrice, bien que, certains EPS sont hydrophobes et forment un film qui couvre le biofilm et augmente la capacité du biofilm à survivre suite à une dessiccation. Les biofilms confèrent plusieurs propriétés qui ne sont pas partagées avec les cellules bactériennes planctoniques. Ces propriétés comprennent, l'existence de gradients dans la matrice donnant naissance à divers habitats, la capture des ressources par sorption, la rétention d'enzyme qui fournit des capacités de dégradation des macromolécules, les interactions cellulaires et une capacité à survivre suite à l'exposition aux antibiotiques (Flemming et al. 2016).

F. La matrice des biofilms

Tout simplement, il n'existe pas de biofilms sans une matrice extracellulaire. Elle constitue un élément indispensable des biofilms microbiens (Lopez, Vlamakis and Kolter 2010). La formation de la matrice est un processus dynamique qui dépend largement de la disponibilité de nutriments. Dans les plupart des biofilms, les microorganismes représentent moins que 10 % de la masse totale sèche tandis que la matrice forme la majeure partie de la biomasse du biofilm (90%). La matrice est composée de polymères extracellulaires (extracellular polymeric substances - EPS), hydratés et principalement produits par les microorganismes eux-mêmes (Flemming and Wingender 2010). Les EPS déterminent l'organisation spatiale du biofilm, dans lequel les bactéries sont regroupées en micro-colonies. Ces polymères confèrent plusieurs fonctions au biofilm et aux bactéries qui y résident (Tableau 1) et remplissent le vide entre les micro-colonies sessiles. La composition des EPS présente une grande variabilité et dépend des microorganismes constituant le biofilm, et de l'environnement dans lequel se trouve celui-ci. La composante majeure de la matrice est l'eau (jusqu'à 97 %) dans laquelle baignent les composants structuraux et fonctionnels de la matrice, notamment les composants solubles comme les polysaccharides, les protéines et l'ADNe, ainsi que des composants insolubles tels que certains polysaccharides ou protéines comme la cellulose (Serra, Richter and Hengge 2013) ou les fibres amyloïdes, et des appendices cellulaires comme les frimbriae, les pili ou les flagelles (Hobley et al. 2015). La matrice extracellulaire impacte les conditions de vie des bactéries dans leur microenvironnement, en affectant la porosité, la densité, la quantité d'eau disponible, la charge, la capacité d'adsorption de nutriments, l'hydrophobicité ainsi que la stabilité mécanique de la totalité du biofilm (Flemming, Neu and Wozniak 2007).

Tableau 1. Un tableau regroupant les fonctions des EPS dans un biofilm.

(Flemming and Wingender 2010).

Fonction	Effet sur les biofilms	Les composants EPS impliqués
Adhésion	Assure les premières étapes de la colonisation des surfaces abiotiques et biotiques par les cellules planctoniques et l'attachement à long terme des biofilms entiers aux surfaces.	Les polysaccharides, les protéines, l'ADNe et les molécules amphiphiliques
Agrégation des bactéries	Favorise la formation des chaînettes, l'immobilisation temporaire des populations bactériennes, le développement des colonies à forte densité cellulaire et la reconnaissance cellule-cellule	Les polysaccharides, les protéines et l'ADNe
Cohésion des biofilms	Forme un réseau polymérique hydraté (la matrice du biofilm), intervient dans la stabilité mécanique du biofilm et détermine l'architecture du biofilm, ainsi qu'il permet la communication cellulaire	Les polysaccharides neutres et chargés, les protéines (fibres amyloïdes et lectines), et l'ADNe
Rétention de l'eau	Maintient l'hydratation du microenvironnement qui entoure les microorganismes du biofilm, et assure leur tolérance à la dessiccation dans des environnements appauvris en eau	Les polysaccharides hydrophiles et, probablement, les protéines
Protection	Confère une résistance contre les défenses spécifiques et non-spécifiques de l'hôte lors d'une infection, une tolérance à divers agents antimicrobiens, une protection contre les effets nocifs de l'oxygène et aussi une protection contre certains protozoaires	Les polysaccharides et les protéines
Sorption des composés organiques	Permet l'accumulation de nutriments de l'environnement et l'absorption des molécules	Les polysaccharides chargés ou hydrophobes et les protéines

Fonction	Effet sur les biofilms	Les composants EPS impliqués
Sorption des composés inorganiques	Favorise la formation d'un « gel » de polysaccharide, les échanges d'ions et l'accumulation d'ions métalliques toxiques (contribuant ainsi à la détoxification de l'environnement)	Les polysaccharides chargés et protéines, y compris les substituants inorganiques tels que le phosphate et le sulfate
Activité enzymatique	Permet la digestion de macromolécules exogènes en éléments nutritifs et la dégradation des EPS structuraux, conduisant à l'essaimage de cellules du biofilm	Les protéines
Source de nutriments	Fournit une source de carbone, d'azote et des composés contenant du phosphore assimilables par la communauté sessile	Potentiellement tous les composants EPS
Echange d'informations génétiques	Facilite le transfert des gènes entre les cellules sessiles	L'ADNe

1. L'ADN extracellulaire

De nombreuses études affirment que l'ADN extracellulaire (ADNe) qui est présent dans la matrice provient de plusieurs sources. Il peut être un dérivé de la lyse d'une sous-population du biofilm (Allesen-Holm et al. 2006), ou bien être sécrété via des vésicules membranaires par des cellules vivantes chez *P. aeruginosa* (Renelli et al. 2004), ou produit par sécrétion active (Hara and Ueda 1981), ou par la mort cellulaire programmée (Thomas and Hancock 2009) ou bien par le cannibalisme observé chez *B. subtilis* (Lopez et al. 2009b). L'ADNe est un composant majeur de la matrice du biofilm (Flemming and Wingender 2010). Cela est démontré par ajout de la DNase I, qui inhibe la formation du biofilm et dissocie les biofilms matures (Whitchurch et al. 2002). En revanche, plus le biofilm est âgé moins la DNase I est capable d'agir. Cela est dû soit à la solidité de la matrice du biofilm mature, soit à l'action de protéases sécrétées par le biofilm qui inactivent la DNase I. La quantité de l'ADNe dans la matrice peut différer entre des espèces étroitement apparentées, par exemple l'ADNe est un composant

structural majeur dans la matrice du biofilm de *S. aureus*, alors qu'il est présent en minorité dans les biofilms de *S. epidermidis* (Izano et al. 2008). Chez cette espèce, les sous-populations sessiles travaillent en synergie et l'ADNe provenant de la lyse cellulaire d'une sous-population, permet le développement du biofilm par le reste de la population sessile (Molin and Tolker-Nielsen 2003).

On attribue à l'ADN extracellulaire plusieurs rôles en fonction de l'espèce bactérienne. L'ADNe joue un rôle dans les interactions cellule-cellule (Whitchurch et al. 2002). L'exopolysaccharide cationique Pel réticule l'ADNe dans les biofilms de *P. aeruginosa* (Jennings et al. 2015), afin d'assurer l'intégrité structurelle de la matrice. Pel joue également le rôle d'un connecteur intercellulaire (Yang et al. 2007). D'autres espèces, comme les pathogènes à Gram positif, *S. aureus*, *S. epidermidis* et *Streptococcus pneumoniae* ont besoin aussi de l'ADNe pour maintenir l'intégrité de leur biofilm (Moscoso, Garcia and Lopez 2006, Qin et al. 2007, Izano et al. 2008). La présence d'ADNe dans la matrice du biofilm chez *B. cereus* a été décrit par Vilain et al et serait nécessaire pour l'adhésion du biofilm sur le polystyrène ou sur le verre (Figure 14) (Vilain et al. 2009). Son origine reste inconnue, mais elle pourrait être liée à la mort cellulaire programmée (Abee et al. 2011).

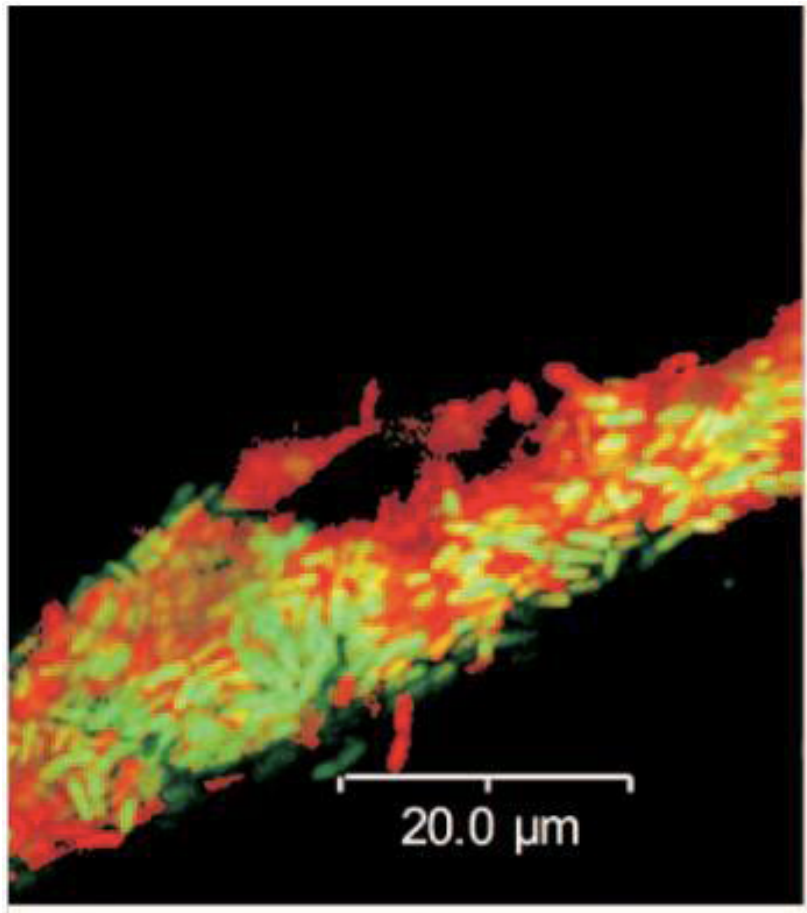


Figure 14. L'ADN extracellulaire entoure la surface des cellules sessiles dans des biofilms de *B. cereus* formées sur de la laine de verre.

L'ADN est coloré en vert par le Syto9 et en rouge par l'iodure de propidium (Live/dead viability assay). Le syto9 traverse librement la membrane cellulaire, ce qui n'est pas le cas de l'iodure de propidium. Cependant, ce dernier a une affinité plus forte pour l'ADN et déplace le Syto9, de telle sorte que les bactéries vivantes sont colorées en vert et les bactéries mortes en rouge. Sur une préparation de biofilm observée en microscopie confocale et colorée par le Syto9 et l'iodure de propidium, certaines bactéries sont fluorescentes à la fois dans le vert et dans le rouge. Dans cette photographie, de l'ADN extracellulaire, fluorescent dans le rouge, est probablement présent à l'extérieur des bactéries vivantes, fluorescentes dans le vert (Vilain et al. 2009).

2. Les protéines de la matrice

a. Protéines enzymatiques

Il existe dans la matrice du biofilm, une variété d'enzymes extracellulaires, dont la majorité est impliquée dans la dégradation des polymères. Leurs cibles comprennent les polymères solubles dans l'eau notamment, les polysaccharides, l'acide nucléique, et les protéines aussi bien que les polymères insolubles tels que la cellulose, la chitine et les lipides. Certaines enzymes peuvent également être impliquées dans la dégradation des EPS afin de favoriser l'essaimage des bactéries du biofilm comme la *N*-acetyl- β -

hexosaminidase, produite par le pathogène *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (Kaplan et al. 2004).

b. Protéines non-enzymatiques

La matrice contient également des protéines non-enzymatiques ou structurales telles que les protéines associées à la paroi bactérienne et des protéines appelées lectines qui se lient aux polysaccharides. Elles sont impliquées dans la formation et la stabilisation de la matrice en favorisant le lien entre la surface de la bactérie et les EPS. Le pathogène opportuniste de l'homme, *P. aeruginosa* produit 2 lectines, LecA et LecB qui jouent un rôle essentiel durant l'infection. LecA est requis pour la formation des biofilms sur les surfaces en polystyrène et en acier inoxydable. Une souche surproductrice de LecA montre une augmentation dans sa capacité à former des biofilms (Diggle et al. 2006). LecB est impliquée dans la formation des biofilms sur les surfaces en verre, et interagit avec le galactose et les résidus mannose du polymère Psl. De plus, *P. aeruginosa* produit une protéine de la matrice CdrA, dont la forme sécrétée se lie directement aux exopolysaccharides Psl, plus spécifiquement aux résidus mannose tandis que les CdrA associées à la paroi bactérienne, ancrent les bactéries aux Psl de la matrice. Chez *Escherichia coli*, les composants structuraux majeurs de la matrice du biofilm sont les appendices Curli, composés de protéines assemblées en fibres amyloïdes, attachées à la surface bactérienne. Le biofilm de *E. coli* peut être formé uniquement de fibres de Curli ou bien du duo Curli-cellulose qui assure l'intégrité des biofilms chez *E. coli* ainsi qu'une protection physique, une forte cohésion, une élasticité, une tolérance contre la dessiccation et une morphologie ridée qui lui est spécifique (Mika and Hengge 2014). Ces protéines sont des structures importantes pour les interactions avec les surfaces. Un autre groupe connu de protéines extracellulaires, les protéines Bap (Biofilms associated proteins), constitue un élément essentiel dans la formation du biofilm chez différentes espèces bactériennes Gram positives et Gram négatives comme *Streptococcus parasanguinis* FW213 (BapA1) (Liang et al. 2011), *Pseudomonas putida* (mus20) (Espinosa-Urgel, Salido and Ramos 2000), *P. fluorescens* (LapA) (Hinsa et al. 2003), *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* (Stm2689) (McClelland et al. 2001) et *Enterococcus faecalis* (Esp) (Toledo-Arana et al. 2001). Chez *S. aureus*, les protéines Bap peuvent être à la fois des facteurs de virulence impliqués dans la pathogenèse et aussi des protéines de la matrice qui interviennent dans l'adhésion aux surfaces abiotiques et

qui favorisent ainsi la formation des biofilms. Par ailleurs, les Baps subissent une régulation post-traductionnelle par l'intermédiaire de calcium. Celui-ci inhibe la formation du biofilm, en changeant la conformation de ces protéines (Shukla and Rao 2013). La matrice du biofilm de *V. cholerae* possède deux protéines très abondantes Bap1 et RbmA (Absalon, Van Dellen and Watnick 2011). Bap1 est localisée à la surface des bactéries se situant à la base du biofilm (au niveau du point de contact avec la surface), stabilisant ainsi son attachement au substrat. RbmA est sécrétée dans le biofilm pour assurer son intégrité.

B. subtilis sécrète une protéine de 31 kDa nommée TasA qui forme des fibres amyloïdes. Le gène *tasA* est inclus dans l'opéron tricistronique *tapA-sipW-tasA*. La formation de fibres amyloïdes par TasA, et l'ancrage de ces fibres sur les surfaces bactériennes, nécessitent la présence de la protéine TapA, dont le gène est compris dans le même opéron (Romero et al. 2011). Le troisième gène de l'opéron est le signal peptidase SipW qui permet la libération de TasA et de TapA dans l'espace extracellulaire. Il existe, dans la matrice du biofilm de *B. subtilis*, une autre protéine structurale nommée BlsA (auparavant nommée YuaB). BlsA forme une enveloppe hydrophobe sur la surface du biofilm (Kobayashi and Iwano 2012, Hobley et al. 2013). Cette enveloppe améliore la survie de *B. subtilis* dans son habitat naturel en repoussant les polluants environnementaux et les composés toxiques solubles tels que les métaux lourds et les agents antimicrobiens. Enfin, BlsA fonctionne en synergie avec la protéine TasA pour assurer l'intégrité de la matrice du biofilm chez *B. subtilis*. *B. cereus* ne possède pas un orthologue de BlsA, ni de TapA mais possède deux orthologues de TasA. Le premier est *tasA* situé dans l'opéron *tasA-sipW* et l'autre est *calY* situé à côté de l'opéron *tasA-sipW*. Ces deux protéines sont impliquées dans la formation des fibres qui sont observables par microscopie électronique (Figure 15). La délétion des gènes codant pour ces protéines, aussi bien que *sipW*, affecte la formation du biofilm d'une façon similaire à ce qu'on observe chez *B. subtilis* (Caro-Astorga et al. 2014).

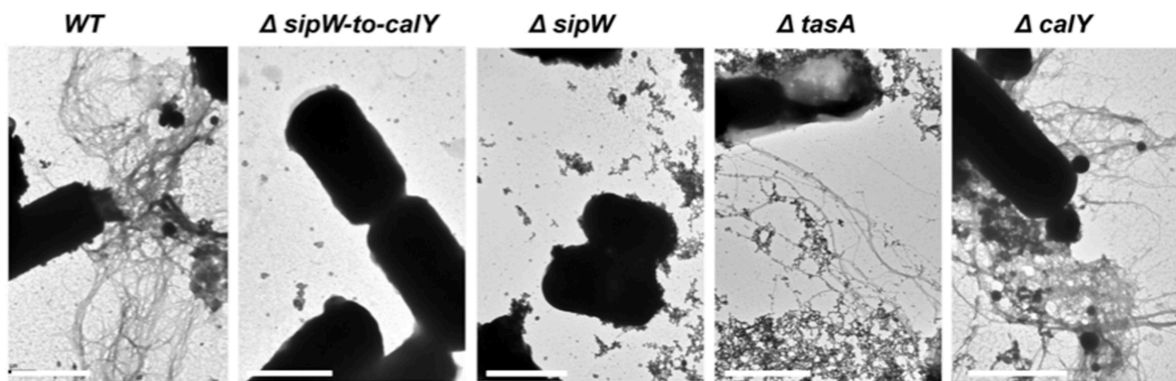


Figure 15. Observation par microscopie électronique à transmission des fibres formées par TasA et CalY.

Les biofilms de *B. cereus* sont récoltés après 24 H, observés par microscopie électronique à transmission après un traitement par l'uranyl acétate (Caro-Astorga et al. 2014).

3. Les exopolysaccharides

Les exopolysaccharides et les voies de leur biosynthèse sont discutés en détails dans le chapitre III.

4. Autres

L'eau est la composante la plus importante de la matrice, nous permettant d'appeler le biofilm « stiff water ». Effectivement, les substances polymériques extracellulaires assurent un milieu hautement hydraté qui sèche plus lentement que l'environnement extérieur et donc tamponne les cellules sessiles contre les fluctuations du potentiel hydrique. En dehors des EPS hautement hydratés, il y existe les surfactants. Ces derniers peuvent avoir des propriétés antimicrobiennes et antifongiques (Ron and Rosenberg 2001).

G. Les biofilms : chez *B. cereus*



Bacillus cereus Biofilms—Same, Only Different

Racha Majed^{1,2}, Christine Faille³, Mireille Kallassy² and Michel Gohar^{1,2*}

¹ Micalis Institute, INRA, AgroParisTech, CNRS, Université Paris-Saclay, Jouy-en-Josas, France, ² Unité de Recherche Technologies et Valorisation Alimentaire, Laboratoire de Biotechnologie, Université Saint-Joseph, Beirut, Lebanon, ³ UMR UMET: Unité Matériaux et Transformations, Centre National de la Recherche Scientifique, Institut National de la Recherche Agronomique, Université de Lille, Villeneuve d'Ascq, France

Bacillus cereus displays a high diversity of lifestyles and ecological niches and include beneficial as well as pathogenic strains. These strains are widespread in the environment, are found on inert as well as on living surfaces and contaminate persistently the production lines of the food industry. Biofilms are suspected to play a key role in this ubiquitous distribution and in this persistency. Indeed, *B. cereus* produces a variety of biofilms which differ in their architecture and mechanism of formation, possibly reflecting an adaptation to various environments. Depending on the strain, *B. cereus* has the ability to grow as immersed or floating biofilms, and to secrete within the biofilm a vast array of metabolites, surfactants, bacteriocins, enzymes, and toxins, all compounds susceptible to act on the biofilm itself and/or on its environment. Within the biofilm, *B. cereus* exists in different physiological states and is able to generate highly resistant and adhesive spores, which themselves will increase the resistance of the bacterium to antimicrobials or to cleaning procedures. Current researches show that, despite similarities with the regulation processes and effector molecules involved in the initiation and maturation of the extensively studied *Bacillus subtilis* biofilm, important differences exist between the two species. The present review summarizes the up to date knowledge on biofilms produced by *B. cereus* and by two closely related pathogens, *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus anthracis*. Economic issues caused by *B. cereus* biofilms and management strategies implemented to control these biofilms are included in this review, which also discuss the ecological and functional roles of biofilms in the lifecycle of these bacterial species and explore future developments in this important research area.

Keywords: *Bacillus*, *cereus*, *thuringiensis*, *anthracis*, biofilm, ecology, regulation, food

INTRODUCTION

Bacillus cereus is a large, Gram-positive bacterium which produces spores and displays a peritrichous flagellation. Soil has long been considered to be the natural habitat of this species, although its spores can be isolated from various materials, such as invertebrates, plants, or food (Sneath, 1986). Recently, the ecological niches of *B. cereus* were suggested to include insects and nematodes guts (Jensen et al., 2003; Ruan et al., 2015), or plant roots (Ehling-Schulz et al., 2015). The high diversity of *B. cereus* habitats is reflected by the genetic polymorphism of this species (Helgason et al., 2004), and is illustrated by the existence of probiotic (Cutting, 2011) as well as pathogenic strains. *B. cereus* is indeed one of the most frequent agent of food poisoning

OPEN ACCESS

Edited by:

Avelino Alvarez-Ordóñez,
Teagasc Food Research Centre,
Ireland

Reviewed by:

Francisco Noé Arroyo López,
Consejo Superior de Investigaciones
Científicas, Spain
Monika Ehling-Schulz,
University of Veterinary Medicine,
Austria

*Correspondence:

Michel Gohar
michel.gohar@jouy.inra.fr

Specialty section:

This article was submitted to
Food Microbiology,
a section of the journal
Frontiers in Microbiology

Received: 07 April 2016

Accepted: 23 June 2016

Published: 07 July 2016

Citation:

Majed R, Faille C, Kallassy M and
Gohar M (2016) *Bacillus cereus*
Biofilms—Same, Only Different.
Front. Microbiol. 7:1054.
doi: 10.3389/fmicb.2016.01054

outbreaks, which symptoms can be either emetic or diarrheal. Emetic strains of *B. cereus* can secrete in the food a highly toxic and heat-stable Non-ribosomal cyclic peptide which can withstand cooking temperatures and induce, when ingested, vomitic symptoms (Ehling-Schulz et al., 2015). For diarrheal strains, according to the current model of *B. cereus*-induced diarrheal gastroenteritis, spores contained in the food are ingested by the host and germinate within the intestine, where vegetative cells can grow and produce enterotoxins. Three enterotoxins (Hbl, Nhe, and CytK) can be secreted by *B. cereus* (Stenfors Arnesen et al., 2008). In addition to enterotoxins, *B. cereus* can produce several other toxins (hemolysins HlyI and HlyII) and degradative enzymes (phospholipases and proteases), which are either secreted or directed to the cell-surface, and which are controlled, for most of them, by the PlcR transcriptional activator (Gohar et al., 2008). PlcR is one of the numerous *B. cereus* quorum-sensing systems, which, together with a great number of chromosomally-encoded sensors and regulators (De Been et al., 2006), make the bacterium highly responsive to environmental changes and give it the ability to adapt to diverse conditions. The adaptative properties of *B. cereus* is also a consequence of the presence, within the bacterium, of a number of plasmids, which size is in the 2–500 kb range. *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus anthracis*, for instance, are two species of the *B. cereus* group *sensu lato* which differ from *B. cereus sensu stricto* mainly by the presence of megaplasmids carrying genes encoding toxins specifically active against, respectively, invertebrates or mammals.

B. cereus, *B. thuringiensis*, and *B. anthracis* (called hereafter *B. cereus sensu lato*) are all able to produce biofilms. In most isolates of these species, biofilms are found as floating pellicles, but can also stick on immersed abiotic surfaces or even be present on living tissues. These complex communities are likely to be a key element in the ability of *B. cereus* to colonize different environments. Together with spores, they confer to the bacterium a high resistance to various stresses and a high adhesive capacity on various substrates, including stainless steel, a material widely used in the food processing lines. In these facilities, *B. cereus* can persist for long durations and can even withstand sanitization procedures. The exponential increase in the number of articles published on *B. cereus* biofilms (Figure 1) illustrates the rising interest of the scientific community for this subject. Indeed not only are biofilms a key issue in *B. cereus* life, they also display interesting specificities. Although some of the molecular mechanisms involved in biofilm formation and in its regulation are shared with *Bacillus subtilis*—a saprophytic bacterium extensively studied for biofilm formation—striking differences exists between the two species regarding the biofilm structure, the effectors of matrix formation and the regulation pathways controlling them.

In the last decade, a considerable knowledge has been accumulated in a wide area of research regarding biofilm formation in *B. cereus sensu lato*. The aim of this review is to stress a panoramic view of the current knowledge, from the molecular mechanisms involved in biofilms formation in the three species to the functions and roles of these multicellular structures in the bacterium life, including pathogenesis and food

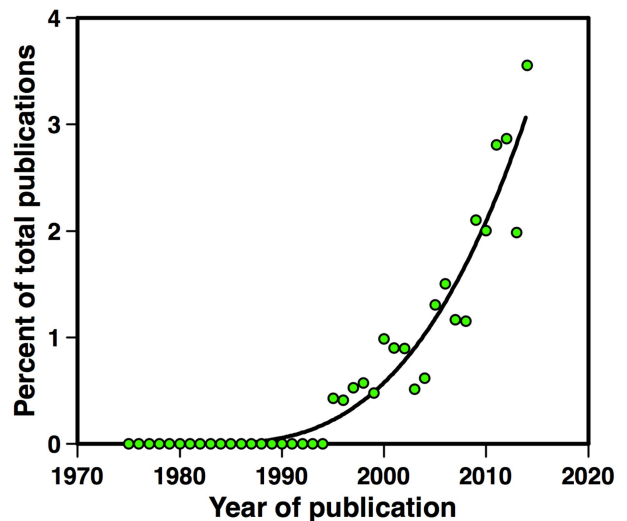


FIGURE 1 | Number of articles published between 1975 and 2015 on *B. cereus* biofilms. Articles published on *B. cereus*, *B. thuringiensis*, or *B. anthracis* biofilms, in percent of the total number of articles published on the same species.

industry contamination. From this panoramic view, we expect to draw the most promising incoming research developments and to address some intriguing questions, such as why has *B. anthracis*, a lethal and capsulated pathogen, kept the ability to produce biofilms. This review will also highlight the variety and prevalence of biofilm formation in the three species and will point, when necessary, to similarities and differences with *B. subtilis*.

MOLECULAR AND PHYSIOLOGICAL ASPECT

The molecular and physiological aspects of biofilm formation discussed here include the various extracellular macromolecules produced by the bacterium and specifically required for the biofilm matrix, cellular elements involved in biofilm formation such as flagella or cell-surface proteins, and the complex regulation network controlling biofilm formation and connecting it to other cellular functions. Also included in this part of the review is phenotypic heterogeneity within the biofilm, a field of growing interest since it is strongly involved in the bacterial survival in changing environments, and the role of mobile genetic elements in biofilm formation.

The Biofilm Matrix

Biofilms are usually embedded in a self-produced matrix whose structural elements are exopolysaccharides, proteins and DNA (Flemming and Wingender, 2010). *B. cereus* is no exception to this rule and its matrix contains the three components. In *B. subtilis*, most of the structural exopolysaccharides required for biofilm formation are synthesized by the products of the *epsA-O*

operon (Branda et al., 2001; Kearns et al., 2005). Deletion of *epsA-O* leads to a Non-structured and fragile biofilm pellicle (Lemon et al., 2008). An *eps* locus similar to *epsA-O* is found in bacteria of the *cereus* group (Ivanova et al., 2003; Gao et al., 2015). This similarity is supported by the presence, within the locus, of an anti-termination RNA element named EAR, found only in *epsA-O* and in the *eps* locus of the *cereus* group (Irnov and Winkler, 2010). However, deletion of the *B. cereus eps* locus does not affect biofilm formation (Gao et al., 2015), despite the presence of polysaccharides in the *B. cereus* biofilm matrix (Houry et al., 2012), whose origin therefore remains unknown.

The *B. subtilis* biofilm matrix also contains the three structural proteins TasA, TapA, and BslA (Vlamakis et al., 2013). BslA (Biofilm surface layer) forms a hydrophobic envelope surrounding the biofilm (Hobley et al., 2013) while TasA assembles into amyloid-like fibers attached to the cell wall by TapA, resulting in a fiber network strengthening the biofilm (Romero et al., 2011). In *B. subtilis*, *tapA*, and *tasA* are included in the *tapA-sipW-tasA* operon, where *sipW* codes for a signal peptidase, which releases the two proteins TapA and TasA into the extracellular milieu. There is no paralog of *bslA* or *tapA* in the *B. cereus* genome, but *tasA* have two paralogs. One is *tasA*, included in the *sipW-tasA* operon, and the other is *calY*, which is located next to *sipW-tasA* (Caro-Astorga et al., 2015). TasA and CalY are both involved in the production of fibers which can be observed by electron microscopy, and the deletion of their genes or of *sipW* leads to biofilm defects similar to the ones reported in *B. subtilis* (Caro-Astorga et al., 2015).

The extracellular DNA (eDNA) contained in the *B. cereus* biofilm matrix was shown to be produced specifically in biofilms and was reported to be required for adhesion on polystyrene or glass surfaces (Vilain et al., 2009). Its origin remains unknown but might be related to programmed cell death (Abee et al., 2011). However, in planktonic cultures of *B. subtilis*, the production of eDNA is not a consequence of cell-lysis but requires both competence genes and the Opp oligopeptide permease, and is involved in horizontal gene transfer (Zafra et al., 2012). Other bacterial species, including the Gram-positive bacteria *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pneumoniae*, also require eDNA for biofilm formation (Whitchurch et al., 2002; Moscoso et al., 2006; Izano et al., 2008). Possible interactions between the eDNA and other constituents of the biofilm matrix have not yet been investigated, neither has the mechanism or the regulation of eDNA production in biofilms.

Role of Flagella

Flagella are cell-surface structures extending far away the bacterial cell. In *B. cereus*, they are not required for adhesion to glass (Houry et al., 2010), but flagellar motility is involved in biofilm formation through 4 mechanisms. First, motility is a key element of biofilm formation when the bacterium must reach by its own (in static conditions) suitable places for biofilm formation (Houry et al., 2010), at the air-liquid interface. The suppression of motility in a strain which forms biofilms at the air-liquid interface resulted in the formation of submerged biofilms (Hayrapetyan et al., 2015b). Secondly, motile bacteria within the biofilm create channels in the matrix, leading to an increase in

nutrients exchange and, conversely, favoring the penetration of toxic substances (Houry et al., 2012). Thirdly, motile planktonic bacteria can enter the biofilm and increase its biomass (Houry et al., 2010, 2012). Fourthly, motile bacteria located at the edge of the growing biofilm extend the surface covered by this structure, resulting in colony spreading (Houry et al., 2010). Although flagellin transcription decreases continuously with biofilm age (Houry et al., 2010), the biofilm bacterial population is heterogeneous and includes a fraction of motile bacteria (Houry et al., 2012) which, in *B. subtilis*, is located at the edge of the colony (Vlamakis et al., 2008).

Cell-Surface Properties

B. cereus cells in biofilm differ from their planktonic counterparts regarding their cell-surface properties. For example, the structure of the secondary cell wall polymer (SCWP), a polysaccharide linked to the peptidoglycan by phospho-diester linkages, was shown to vary during biofilm aging in *B. cereus* (Candela et al., 2011). Since SLH (S-layer homology) domain-containing proteins bind to the SCWP, changes in the SCWP structure might result in changes in the proteins displayed on the cell-surface, and possibly involved in the adaptation of the bacterium to its environment. Within these SLH-proteins are autolysins, whose variation during biofilm growth might lead to changes in the bacterial chain length. Similarly, a cell-surface peptidase (CwpFM) involved in autolysis was shown to play a role in biofilm formation, possibly because this autolysin can modulate the length of bacterial chains and consequently act on the motility of the bacterium (Tran et al., 2010).

Regulation Networks

The regulation network controlling *B. cereus* biofilm formation shows a combination of similarities and differences with *B. subtilis*. In *B. cereus sensu lato*, *sipW*, *tasA*, and *calY* transcriptions are repressed by the SinR regulator (Pflughoeft et al., 2011), which controls biofilm formation (Fagerlund et al., 2014) as for *B. subtilis*. SinR is antagonized by SinI and, in both species, deletion of SinI leads to the absence of biofilm and to hypermotility while the reverse phenotype (biofilm overproduction, no motility) is obtained upon deletion of SinR (Kearns et al., 2005; Fagerlund et al., 2014; **Figure 2**). Consequently, the SinI/SinR anti-repressor/repressor pair is likely to act as a switch between biofilm formation and swimming motility in *B. cereus* or *B. thuringiensis* as it does in *B. subtilis*. In addition, Spo0A is required for biofilm formation in *B. thuringiensis* and in *B. subtilis*, and AbrB represses biofilm formation in both species (Hamon and Lazazzera, 2001; Fagerlund et al., 2014).

However, the SinR regulon also displays important differences in the two species: the *B. subtilis epsA-O*, but not the *B. thuringiensis eps*, is included in this regulon. Conversely, the production of kurstakin, a lipopeptide biosurfactant, is controlled by SinR in *B. thuringiensis* while surfactin, a *B. subtilis* lipopeptide, is not in the SinR regulon. Kurstakin is also included in the NprR necrotrophic regulon required for survival in the insect cadaver (Dubois et al., 2012), and the hemolysin Hbl, controlled by SinR in *B. thuringiensis* (Fagerlund et al., 2014),

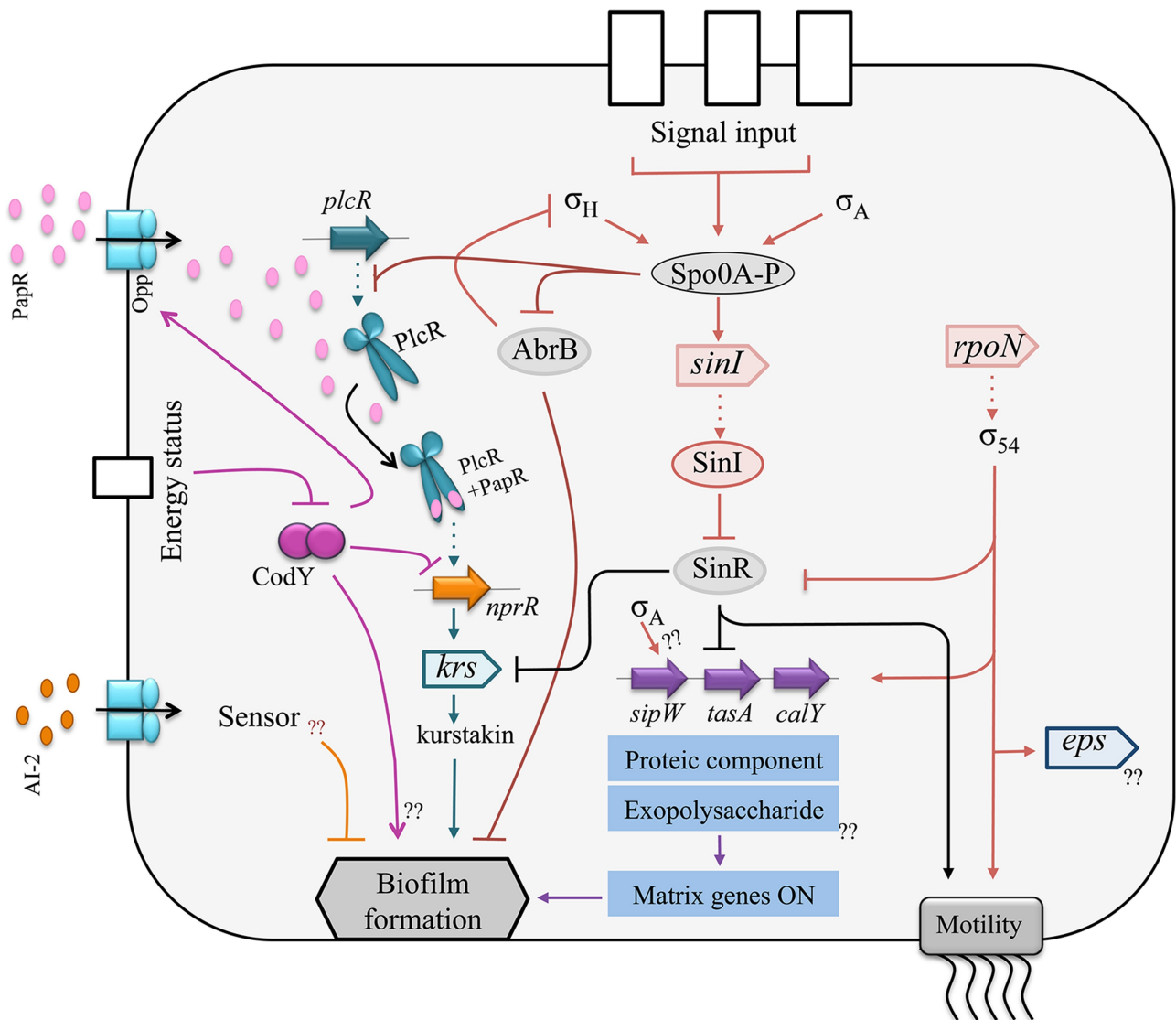


FIGURE 2 | Schematic representation of the regulatory network controlling biofilm formation in *B. cereus*. Circles symbolize proteins, triangles symbolize open reading frames (ORFs). Arrows indicate activation and blunt lines indicate repression. Dotted arrows represent transcription. The protein component of the matrix is encoded by the *sipW-tasA* operon and by *calY* which promoters are activated by σ_{54} and repressed by SinR. SinR is antagonized by SinI. The transcription of *sinI* is activated by the master regulator of sporulation Spo0A. Furthermore, Spo0A downregulates the regulator AbrB, resulting in biofilm formation. Several quorum sensing systems are involved in biofilm formation. The regulator PlcR activates the transcription of *nprR*. NprR promotes kurstakin production, which itself promotes biofilm formation. The autoinducer AI-2 plays an inhibitory effect on biofilm formation.

is included in the PlcR virulence regulon of this species (Gohar et al., 2008). Other differences, in addition to the SinR regulon, exist between *B. subtilis* and *B. cereus sensu lato* for the regulation of biofilm formation. The AI2 autoinducer represses biofilm formation in *B. cereus* (Auger et al., 2006), but induces biofilm formation in *B. subtilis* (Duanis-Assaf et al., 2015), and the DegU regulator, which controls biofilm formation in *B. subtilis* (Kobayashi, 2007b; Cairns et al., 2014), has no homolog in *B. cereus*.

In *B. thuringiensis*, there is an interaction between biofilm formation, virulence and necrotrophism in insects (Figure 3),

since PlcR promotes NprR transcription (Dubois et al., 2013), which positively controls kurstakin transcription (Dubois et al., 2012), which, in turn, promotes biofilm formation (Gélis-Jeanvoine et al., 2016). In *B. cereus* strain ATCC14579, PlcR was reported to repress biofilm formation (Hsueh et al., 2006), which is in disagreement with these observations. The disruption of *nprR* by a transposon in strain ATCC14579, and therefore the shutdown of the necrotrophic regulon, can explain this discrepancy. For the same reason, the regulator CodY was reported, either to repress biofilm formation in the *B. cereus* ATCC14579 strain (Lindbäck et al., 2012), or to promote biofilm

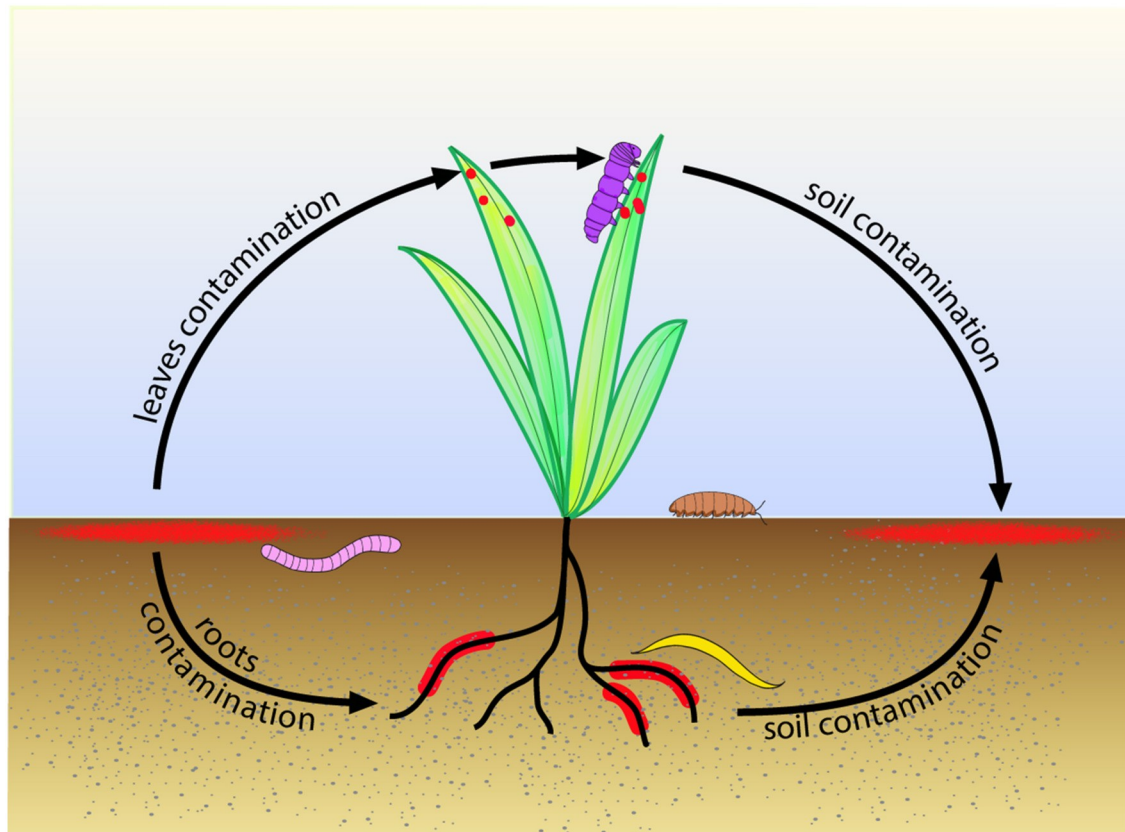


FIGURE 3 | Suggested model for biofilm role in the life cycle of *B. cereus* and *B. thuringiensis* in the environment. Biofilms (in red) growing in the topsoil contaminate the roots and leaves of plants. Earthworm (in pink) feeding on soil organic matter, nematodes (in yellow) feeding on plant roots, caterpillar (in purple) feeding on plant leaves, or isopodes (in brown) feeding on plant debris, ingest bacteria, which can then grow as biofilms in their gut. The invertebrates move further in the environment and, upon death, contaminate back the topsoil, giving birth to a new cycle.

formation in the *B. cereus* UW101C strain (Hsueh et al., 2008). CodY is a regulator sensing the energy and the nutrient state of the bacterial cell (Sonenshein, 2005). It promotes PlcR transcription in stationary phase (Frenzel et al., 2012; Lindbäck et al., 2012) by inducing the production of a transporter required for the import of the PlcR-activating peptide PapR (Slamti et al., 2015), and represses NprR transcription in exponential phase (Dubois et al., 2013). Therefore, the expected effect of CodY on biofilm formation, if this phenotype is induced in early stationary phase, should rather be positive. The connection between biofilm formation and virulence is mediated by another regulator in *B. cereus*. In this species, Sigma 54 (RpoN) promotes the transcription of virulence factors, *eps* genes and flagellins (Hayrapetyan et al., 2015b). These interconnections are an indication that biofilms could be involved in the pathogenic, commensal or necrotrophic lifestyles of *B. cereus sensu lato*.

Heterogeneity in the Biofilm

The limited diffusion of nutrients and signal molecules within the biofilm matrix creates micro-environments and local quorum-sensing states, resulting in a heterogeneous spatial distribution of bacteria in different physiological states. This heterogeneity

has been described in several species, including *B. subtilis*, where vegetative cells, sporulating cells, and matrix-producing cells co-exist with different spatial localizations (Vlamakis et al., 2008). In *B. thuringiensis*, motile vegetative cells make from 0.1 to 1% of the total biofilm population and could be beneficial to the whole community by creating channels within the biofilm matrix (Houry et al., 2012). In the same species, in a 48 h-aged biofilm, about 15% of the cells express the enterotoxin Hbl (Fagerlund et al., 2014) which, if it accumulates within the matrix, could make the biofilm a toxic patch-like structure when formed on host tissues. Actually, the biofilm matrix of strains ATCC14579 and ATCC10987 contains the enterotoxins Hbl and Nhe, a collagenase, the phospholipases PI-PLC and sphingomyelinase, and the immune inhibitor protease InhA1, all being virulence factors (Karunakaran and Biggs, 2011). Genes expression heterogeneity within the *B. thuringiensis* biofilm evolves with time, from 24 to 72 h, and shows a decrease in the proportion of bacteria expressing virulence genes, an increase in the proportion of bacteria expressing necrotrophic genes, and a constant proportion of sporulating cells (about 15%; Verplaetse et al., 2015). Interestingly, necrotrophic bacteria arouse mainly from cells, which have previously expressed virulence genes. In a

sporulating medium, only necrotrophic and sporulating bacteria were observed in the biofilm (Verplaetse et al., 2016).

Mobile Genetic Elements

Plasmids were shown to be involved in biofilm formation in a variety of Gram-negative and Gram-positive bacterial species (Cook and Dunne, 2014), through conjugative (Ghigo, 2001) as well as Non-conjugative mechanisms, and, conversely, biofilms were reported to favor plasmids transfer, resulting in an increase of genetic exchange between bacteria, including antibiotic resistance genes (Van Meervenne et al., 2014). Plasmids are present in all *B. cereus*, *B. thuringiensis* and *B. anthracis* strains, in number, not including copies, ranging from 1 to 13, and in size ranging from 2 to almost 500 kb (Rasko et al., 2005; Reyes-Ramirez and Ibarra, 2008). Strains of these species also harbor integrated or Non-integrated temperate prophages (Rasko et al., 2005). While mobile genetic elements play a key role in the adaptation of *B. cereus* and related species to their specific environment, data on their involvement in biofilm formation or on the role of biofilms in their transfer are scarce for this group of bacteria. The role of plasmids in biofilm formation have not been considered until now, although there are indications that large pXO1-like plasmids contained in periodontitis or emetic strains might be involved in the specific behavior of these strains regarding this phenotype. Indeed, addition to the culture medium of cereulide, the product of the *ces* locus located on the pCER270 emetic strains pXO1-like plasmid, promotes the formation of biofilm (Ekman et al., 2012). Conversely, phages were shown to act on biofilm formation. The GIL01 and GIL16 prophages of the tectiviridae family, present as linear plasmids in *B. thuringiensis* strains, negatively affect biofilm formation and sporulation, and enhance swarming motility (Gillis and Mahillon, 2014). In *B. anthracis*, prophages of different families (siphoviridae, myoviridae, or tectiviridae) could either inhibit sporulation (Wip4, Wip5, Frp1), or induce this phenotype (Wip1, Wip2, Frp2) in culture conditions where spore formation does not usually occur—for example absence of aeration (Schuch and Fischetti, 2009). The lysogenic strains containing one of these phages displayed an increased production of cell-surface exopolysaccharides and an enhanced production of biofilms at the air-liquid interface in BHI culture medium (Schuch and Fischetti, 2009). The phages effect on the ability to produce exopolysaccharides or biofilms was the result of a prophage-chromosome dialog mediated by a sigma-factor-like regulator encoded in the prophage sequence (Schuch and Fischetti, 2009).

STRUCTURE AND PROPERTIES

Data related to the biofilm structure are scarcely available in *B. cereus*. Although the *B. cereus* biofilm macrostructure has been described, the distribution in the biofilm of the different bacterial subpopulations or its morphogenesis are unknown, even more in the case of multispecies biofilms. Biofilm properties include adhesion to surfaces (which is dealt with in the part 5- Biofilm control in the food environment, of this review) and resistance to stresses. They also include the ability of the biofilm to produce

spores, a property which add to the problems induced by the biofilm persistence.

Structure

The *B. cereus sensu lato* floating pellicle displays differences in its architecture with the one produced by *B. subtilis*. The *B. subtilis* floating pellicle exhibits a high number of folds and do not bind to the recipient wall (Kobayashi, 2007a). In contrast, *B. cereus* biofilm, when formed at the air-liquid interface, includes a ring strongly sticking to the recipient wall, and the pellicle itself which displays protrusions instead of folds (Fagerlund et al., 2014). Wrinkles in the *B. subtilis* pellicle were shown to be a consequence of biomass extension, confined space, and elasticity of the pellicle, which is dependent from the extracellular matrix (Trejo et al., 2013). In *B. subtilis* colonies on agar plates, wrinkles forms preferentially where cell death occurs (Asally et al., 2012). The difference in the pellicle architecture between *B. cereus* and *B. subtilis* might be a consequence of the strong adhesion of the biofilm to the vessel walls in the former, and of the different polymers present in the matrix produced by the two species.

On immersed surfaces, *B. subtilis* and some *B. cereus* strains (see Section Ecological Aspects) are able to produce submerged biofilms. In the *B. subtilis* immersed biofilm, cells are organized in bundles which can, for some strains, protrude over the biofilm and form aerial structures at heights greater than 100 µm (Bridier et al., 2013). Few data are available on the structure of *B. cereus* immersed biofilm. The amount of biofilm formed in this condition was variable according to the strain, but a strain isolated from a food processing line produced, on stainless steel coupon, a thick and uneven biofilm with an aerial structure (Faille et al., 2014).

Properties: Sporulation and Resistance to Stresses

The limited diffusion of nutrients and signal molecules within the matrix creates microenvironments in the biofilm, resulting in a heterogeneity of the bacterial population, which might include cells in the motile, virulent, necrotrophic, or sporulating states, as discussed in the Section Molecular and Physiological Aspects of this review. Sporulation rates in biofilms were highly variable and were dependent from the strain, the culture medium or the device used to form the biofilm (Table 1). Highest rates were obtained with strains isolated from the food environment and grown in poor media, with rates as high as 90%. Sporulation could occur in immersed biofilms although the rate of sporulation was increased when the biofilm was exposed to air or was let to dry (Ryu and Beuchat, 2005; Hayrapetyan et al., 2016), and was greater in the biofilm comparatively to the coexisting planktonic population (Hayrapetyan et al., 2015a). Stainless steel was more favorable to sporulation within the biofilm than polystyrene (Table 1). It was hypothesized that this result could be due to an increased iron availability on stainless steel coupons, as a consequence of corrosion (Hayrapetyan et al., 2015a). In addition to be suitable for sporulation, the biofilm confers to bacteria a protection against stresses. In biofilm, *B. anthracis* was from 40 (doxycycline) to 150 (ciprofloxacin) times more resistant to antibiotics than planktonic cells (Lee et al., 2007), and a

TABLE 1 | Sporulation rates in biofilms after 48 h of incubation.

Strain	Subs ^a	Biofilm ^b	Device	Medium ^c	%Spore ^d	References
Bc 98/4	SS	imm	Petri dish	TSB 1/10	87	Failla et al., 2014
Bc 5832	SS	imm	Petri dish	TSB 1/10	61	Failla et al., 2014
Bc D22	SS	imm	Petri dish	TSB 1/10	55	Failla et al., 2014
Ba Sterne	PS	air	96 wells plate	BHI	5	Lee et al., 2007
Bt 407	Glass	air	Glass tube	LBP	15*	Verplaetse et al., 2015
Bt 407	Glass	air	Glass tube	HCT	25*	Verplaetse et al., 2016
PAL25	PS	air	24 wells plate	Y1	91	Wijman et al., 2007
PAL25	PS	air	24 wells plate	LB	22	Wijman et al., 2007
ATCC10987	PS	air	24 wells plate	Y1	39	Wijman et al., 2007
ATCC10987	PS	air	24 wells plate	LB	10	Wijman et al., 2007
BC15	SS	air	12 wells plate	BHI	8	Hayrapetyan et al., 2015a
BC15	PS	air	12 wells plate	BHI	4	Hayrapetyan et al., 2015a
ATCC10987	SS	air	12 wells plate	BHI	2.5	Hayrapetyan et al., 2015a
ATCC10987	PS	air	12 wells plate	BHI	1	Hayrapetyan et al., 2015a
NIZO 4080	SS	air	12 wells plate	Y1	51	Hayrapetyan et al., 2016
NIZO 4080	PS	air	12 wells plate	Y1	38	Hayrapetyan et al., 2016
ATCC10987	SS	air	12 wells plate	Y1	13	Hayrapetyan et al., 2016
ATCC10987	PS	air	12 wells plate	Y1	3	Hayrapetyan et al., 2016

Experiments were done at 30°C except for *B. anthracis* (37°C) or for strains 98/4, 5832, and D22 of *B. cereus* (25°C).

^aSubs, substrate; SS, stainless steel; PS, polystyrene.

^bImm, immersed biofilm; air: biofilm at the air-liquid interface.

^cY1: defined culture medium.

^dPercentage of spores relatively to the total number of colony forming units.

*These values represent the percentage of cells committed to sporulation instead of the actual percentage of spores.

multispecies biofilms containing *B. cereus* and *Pseudomonas fluorescens* was more resistant to antimicrobials than the biofilm of each species alone (Simoes et al., 2009).

ECOLOGICAL ASPECTS

In nature, bacteria live predominantly in biofilms rather than in a planktonic state (Costerton et al., 1995), and this observation is likely to stand also for *B. cereus* or *B. thuringiensis*. Consequently, biofilms are expected to be a key element for the adaptation of these species to their biotopes and to their biocenosis. However, *B. cereus* and its close relatives are found in a high diversity of biotopes, which questions the role that biofilm formation, in addition to other physiological properties, would play for their fitness to specific environments.

Biofilm Formation among *B. Cereus* Strains

Although biofilms are suspected to be involved in strains adaptation to their specific environment, there is a considerable variation in the ability to produce biofilms among isolates of *B. cereus* and *B. thuringiensis*, and no correlation was found between this ability and the origin (food poisoning, clinical, or environmental) of the strain (Wijman et al., 2007; Auger et al., 2009; Kuroki et al., 2009; Kamar et al., 2013; Hayrapetyan et al., 2015a). However, strains isolated from a specific niche, the oral cavity of periodontitis-diseased patients, were all unable to form biofilms (Auger et al., 2009), although these strains were isolated

from dental plaques—which are biofilms. While unexpected, this result looks coherent since periodontal strains of *B. cereus*, as secondary colonizers of the dental plaque, do not need to initiate biofilms. Another interesting finding from prevalence studies is the observation that about 50% of *B. cereus* strains isolated from various food preparations produced less biofilms after 48 h than after 24 h of incubation (Hayrapetyan et al., 2015a), a proportion also found in emetic strains (Auger et al., 2009), which are frequent food contaminants (Ehling-Schulz et al., 2015). In contrast, only a minor proportion (less than 15%) of *B. cereus* strains isolated from blood samples (Kuroki et al., 2009), from the environment, or of *B. thuringiensis* strains (Auger et al., 2009) showed a drop in the biofilm biomass after 24 h of culture. This decrease can be explained by a massive emigration of biofilm cells. When back to the planktonic state, reverting cells will be able to create new biofilms and to spread the colonized area. Therefore, combined with their resistance to cleaning procedures (see the “Bacillus biofilms and their control in the food environment” section below), this property would confer food isolates the ability to persist and thrive in the food production lines.

Prevalence studies also revealed that the biomass of biofilms produced on stainless steel by *B. cereus* in LB or in a defined medium (Y1) is greater when they are formed at the air-liquid-solid interface than on submerged surfaces (Wijman et al., 2007). In BHI medium, only one strain, out of 23 isolates from food products, was able to form a submerged biofilm on

polystyrene or on stainless steel coupons (Hayrapetyan et al., 2015a). Consequently, the property to form submerged biofilms appear to be rare among *B. cereus* strains. In the food industry production units, air-liquid interfaces are found in tanks while pipes are mostly in a flooded state. One would expect that the proportion of strains able to produce submerged biofilms would increase in isolates sampled from pipes when compared to isolates from tanks or to other isolates—although we have no data to support this expectation. It would be interesting to proceed to this comparison, since the ability to produce submerged biofilms affect *B. cereus* persistence within the food processing lines.

***B. cereus* Role in Multispecies Biofilms**

Most biofilms found in natural environments include several bacterial species. *B. cereus* or *B. thuringiensis* make no exception to this observation and are found, when in biofilms, in association to other microorganisms. Multispecies biofilms are often described as cooperative consortiums where each partner contributes to the community resilience and development (Davey and O'toole, 2000). For example, periodontitis strains of *B. cereus* are found in the dental plaque (Rasko et al., 2007), which is one of the best studied multispecies biofilms. The dental plaque is located at the tooth-gum interface and is a severe illness leading, ultimately, to gum bleeding, ligaments digestion and loosening and loss of teeth. Bacteria build the dental plaque in a precise sequence, where pioneer species such as *Streptococcus* mutants bind first to the teeth enamel, followed by secondary colonizer species which bind to pioneer species or to themselves through a co-aggregation process (Kolenbrander et al., 2006). Secondary colonizers benefit from biofilm settlement by primary colonizers and, in turn, might contribute to the biofilm survival and growth. Indeed, *B. cereus* is able to shift the pH of a *Streptococcus* mutants biofilm from acidic to neutral values and in this way contributes to the biofilm pH balance (Sissons et al., 1998). It can also strongly participate to host tissues digestion owing to the numerous degradation enzymes which it secretes (Gohar et al., 2002) and which are present in the biofilm matrix (Karunakaran and Biggs, 2011). Likewise, *B. cereus* strains isolated from multispecies biofilms settled in paper machines were strong producers of exopolysaccharides (Ratto et al., 2005) and could therefore contribute actively to the biofilm development.

The integration of *B. cereus* vegetative cells can also occur in the depth of a Pre-existing biofilm, thanks to the high motility of these cells, which are able to create channels in the matrix and reach deep areas in the biofilm (Houry et al., 2010). Interestingly, *B. cereus* and *B. thuringiensis* secrete a number of bacteriocins (Ahern et al., 2003; Risoen et al., 2004; Oscariz et al., 2006), which, when produced within the integrated biofilm, could lead to drastic changes in the balance of bacterial biofilm populations. For example, a *B. thuringiensis* strain engineered to produce lysostaphin could invade and replace a *Staphylococcus aureus* biofilm native population (Houry et al., 2012), which clearly indicate that inter-species competition could occur within biofilms. Another example of competition between bacterial species within a natural biofilm is found in the pretreatment filters of water reclamation systems. These filters contain zeolite

stones on which multispecies biofilms can grow. The *B. cereus* strains found in these biofilms are able to degrade the Gram-negative bacteria quorum sensing signal AHL (acylhomoserine lactone; Hu et al., 2003), interrupting the communication of their cohabitants and thus conferring a competitive advantage to *B. cereus*.

Biofilms in Soil, Plants, and Invertebrates

The environment is likely to be a major source of food contamination by microorganisms which can live in biofilms on plants or in the soil. *B. cereus* or *B. thuringiensis* are often described as saprophytic species whose natural habitat would be the soil (Vilain et al., 2006), from which they can easily be sampled (Vilas-Boas et al., 2002; Anjum and Krakat, 2016) and in which they can persist for long periods (Hendriksen and Carstensen, 2013). Interestingly, a number of *B. cereus* strains could multiply and form biofilm-like structures when cultivated in a liquid topsoil extract—but not in LB (Vilain et al., 2006), suggesting that some soil components are required to induce the formation of biofilm by *B. cereus* in the culture conditions used. However, not all soils can support *B. cereus* or *B. thuringiensis* growth, since an asporogenic strain of *B. thuringiensis* could not survive in a sterilized soil (Vilas-Boas et al., 2000), and it was speculated that the invertebrate gut rather than the soil might be the main ecological niche of these species (Jensen et al., 2003). *B. cereus* and *B. thuringiensis* were found in the gut of insects (Visotto et al., 2009), earthworms (Hendriksen and Hansen, 2002), nematodes (Schulte et al., 2010; Ruan et al., 2015), and isopods—which are terrestrial crustaceans (Swiecicka and Mahillon, 2006). In the intestine of insects and isopods, *B. cereus* forms filamentous structures described as “Arthromitus,” which proved to be chains of dividing bacteria (Margulis et al., 1998). Long chains of *B. cereus* or *B. thuringiensis* vegetative cells are typically found in biofilms, which suggests that these species can form biofilms in the gut of insects or isopods—and probably in the gut of other invertebrates as well.

In addition to the invertebrates gut, *B. cereus* is found in the rhizosphere and in the mycorrhiza of plants. When present in these subterranean structures, *B. cereus* can protect the plant from fungal attacks. For example, *B. cereus* UW85 produces zwittermicin A and kanosamine, both fungistatic molecules being suspected to contribute to the suppression of damping-off disease of alfalfa caused by *Phytophthora medicaginis* (Silo-Suh et al., 1994). Another strain of *B. cereus* (strain 0–9) isolated from roots of wheat cultures, was able to induce a reduction of 31% of the disease caused by the fungal pathogen *Rhizoctonia cerealis*, the agent of wheat sharp eyespot (Xu et al., 2014). A mutant of this strain obtained by random mutagenesis and selected for defective biofilm formation was unable to colonize wheat roots and to control the fungal disease (Xu et al., 2014). *B. cereus* is therefore likely to colonize plant roots through biofilm formation. This hypothesis is supported by the finding that, in *B. subtilis*, *tasA*, a gene required for biofilm formation which paralog is also required for biofilm formation in *B. cereus* (Caro-Astorga et al., 2015), is needed for the colonization of *Arabidopsis thaliana* roots (Lakshmanan et al., 2012). *B. cereus* can also be associated with plants through the mycorrhiza. It was, for example, isolated

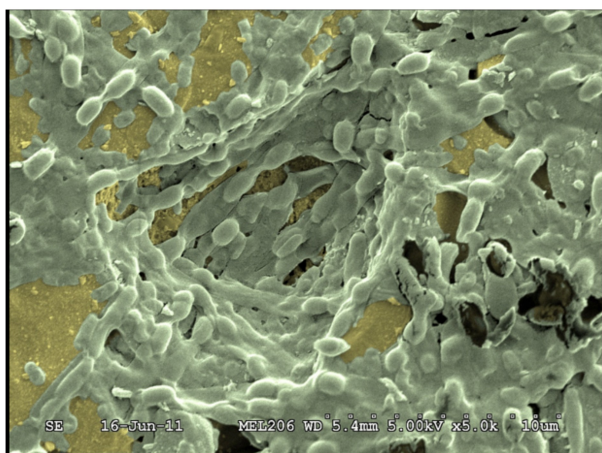


FIGURE 4 | Observation by scanning electron microscopy of a mixed biofilm formed by two strains: *B. cereus* 98/4 and *Comamonas testosteroni* CCL24 (Faille et al., 2014).

from *Glomus irregulare* spores sampled from the rhizosphere of *Agrotis stolonifera* growing in a natural stand (Lecomte et al., 2011) and was shown to form biofilms on the hyphae of *Glomus* sp. (Toljander et al., 2006). The arbuscular mycorrhizal fungi are plant roots symbionts which mycelial network can explore soil volumes much larger than the roots themselves (Lecomte et al., 2011).

These data are summarized in the model depicted **Figure 3**, in which *B. cereus* and *B. thuringiensis* growing as biofilms in the topsoil would contaminate germinating plants, leading to biofilms on the rhizosphere and to spores on the phylloplane. Invertebrates feeding on roots (nematodes), soil organic matter (earthworms), vegetal debris (isopods), or leaves (caterpillars) would be infected by these bacteria, which could behave as commensals or as pathogens and settle as biofilms in their host gut. Invertebrates, through their mobility, could disseminate the bacteria in the environment and, upon death, contaminate back the topsoil, thus initiating a new cycle. Biofilms of *B. cereus* settled in soils and on plants could then contaminate raw food materials.

The Case of *B. Anthracis*

Formation of biofilms by *B. anthracis* in the environment is controversial. *B. anthracis* does not need to produce biofilms for its infective cycle in mammals. Its spore is the infective agent, its toxins are extremely efficient and it is protected against the host immune defenses by a capsule. After the host death, *B. anthracis* multiply within the host, sporulate, and the spores are finally released into the environment at the host death spot. It is believed that the spores can survive in the soil for a long time, keeping their full infective properties, until their uptake by a new host. Yet, it has been argued that a multiplication step would be required to explain how slow the spore decay in soil is. Indeed, multiplication was observed in soil on plant roots, where *B. anthracis* formed long chains reminiscent of the bacterial chains found in biofilms (Saile and Koehler, 2006). *B. anthracis* can also

produce biofilms in static and in flow conditions (Lee et al., 2007; Schuch and Fischetti, 2009). It expresses the regulators required for biofilm formation and at least a part the proteic components of the biofilm matrix (Pflughoeft et al., 2011), and can sporulate in biofilms (Lee et al., 2007). In addition, *B. anthracis* can colonize the earthworm gut for long periods (Schuch and Fischetti, 2009) and is found in flies and mosquitoes (Turell and Knudson, 1987), although only short-term colonization of flies gut was observed (Fasanella et al., 2010). While these data support a multiplication of *B. anthracis* outside its mammal host, further observations and experiments are required to determine if the model displayed **Figure 5** apply to this bacterium.

BIOFILMS CONTROL IN THE FOOD ENVIRONMENT

Bacillus strains, including strains from the *B. cereus* group, can be isolated from endemic biofilms in various environments such as paperboard production or hospitals (Kolari et al., 2001; Ohsaki et al., 2007; Kuroki et al., 2009), but also food and beverage industries (Evans et al., 2004; Gunduz and Tuncel, 2006; Storgards et al., 2006; Marchand et al., 2012). The presence of biofilms containing *B. cereus* is a great concern for food industry settings such as fresh products, poultry, dairy, and red meat processing, and they are a potential source of recurrent cross-contamination and Post-processing contamination of finished products, sometimes resulting in food spoilage or foodborne illness (Rajkovic et al., 2008). The contamination of food processing lines by *B. cereus* biofilms could therefore be a serious public health risk, especially in foods that undergo mild processing such as minimally heat-treated foods (Tauveron et al., 2006). This risk must be given full attention since the total annual cost caused by *B. cereus* and *Staphylococcus aureus* in food illness is estimated at \$523 million in the United States (Bennett et al., 2013).

B. Cereus, a Food Spoilage Agent

As underlined above, the presence of biofilms in the food industry can result in food spoilage. Indeed, *B. cereus* strains produce extracellular proteases and lipases resulting in food degradation and spoilage, like sweet curdling and bitterness of milk sour taste, decreasing the shelf life of the product and therefore resulting in significant economic loss to food producers (Fromm and Boor, 2004; Flach et al., 2014). Even if present in raw milk at low concentration, *Bacillus* sp. become dominant after long periods of storage at a temperature of 10°C (which is often the case in shops), or when produced in improved technological conditions (Samarzija et al., 2012). Consequently, *Bacillus* spp. are today considered the main microbial causes for the spoilage of milk and milk products, and the main reason for significant economic losses in the dairy industry (Meer et al., 1991; Brown, 2000). It is estimated that the dairy industry has losses of up to 30 % due to spoilage and reduced product quality caused by psychrotrophic bacteria, including *Bacillus* sp. (Samarzija et al., 2012).

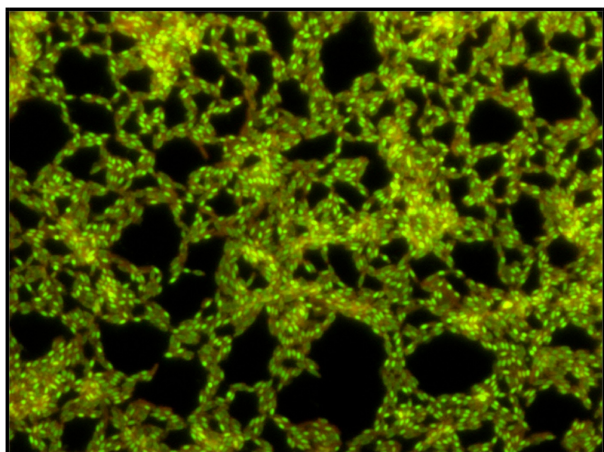


FIGURE 5 | Microscopic images of a *B. cereus* biofilm grown for 48 h in TSB 1/10. Observation by epifluorescence after staining with the Live/Dead stain (magnification $\times 400$). Endospores produced within the biofilm are stained in green, cells are stained in orange-green.

Biofilms in Food Environments

In food environments, *Bacillus* biofilms are found on every food contact surfaces of open or closed equipment, such as conveyor belts, pasteurizers, evaporators, filling machines, storage tanks, but also on cleaning and handling tools (Christison et al., 2007). Depending on the species or the strain, surfaces of cold rooms and equipment of processes lines where elevated temperatures prevail could be contaminated by *Bacillus* biofilms (Sharma and Anand, 2002a; Kolari et al., 2003; Evans et al., 2004; Gunduz and Tuncel, 2006; Kumari and Sarkar, 2014). In fact, *Bacillus* spores or biofilms are capable of contaminating every surface commonly found in food-industry plants, including inert surfaces such as stainless steel surfaces (Faille et al., 2014), plastics or rubber (Mettler and Carpentier, 1997), but also surface of vegetables (Elhariry, 2011). Moreover, *Bacillus* strains are able to form biofilms both under static and flow conditions, and thick biofilms of *B. cereus* would particularly develop at the air-liquid interface (Wijman et al., 2007). Along food processing lines, *B. cereus* is often found in association with other bacterial species to form mixed biofilms (Figure 4) where high levels of *Bacillus* isolates have sometimes been reported (Mattila et al., 1990). For example, percentages as high as 25% of *Bacillus* sp. isolates (including *B. cereus* isolates) have been found in dairy processing industries (Sharma and Anand, 2002c). In addition, sporulation occurs within biofilms (Figure 5) on food contact surfaces (Storgards et al., 2006), sometimes at very high levels (De Vries et al., 2004; Faille et al., 2014), suggesting a potentially significant role for biofilm-derived spores in contamination of food with *Bacillus* spp. (Scott et al., 2007).

Biofilms Control

In food plants, disinfection of processing lines (e.g., pipes, heat-exchangers, valves tanks) is preceded by a cleaning step, involving alkali or other cleaning agents. Cleaning and sanitation

procedures are set up to guarantee the detachment of organic and inorganic contaminations, disinfection of the cleaned surface and elimination of the residues of the sanitation agents (Vlkova et al., 2008). Unfortunately, the detachment of spores and biofilms but also of food residues in the food processing environment is critical since they often accumulate in areas which are difficult to clean, e.g., crevices, valve, gaskets, and dead ends (Czechowski, 1990; Austin and Bergeron, 1995; Sharma and Anand, 2002b). Of particular concern is the increased resistance of biofilms, compared with bacteria in a free-living environment, to disinfection processes. For example, two widely-used sanitizers, a quaternary ammonium compound and sodium hypochlorite, did not effectively inactivate the adherent single cells and biofilms of *B. cereus* at concentrations able to induce a reduction in CFU/ml of more than 5.0 log of their planktonic counterparts. Furthermore, the efficacy of both disinfectant was even lower when biofilms were formed on milk Pre-soiled stainless steel (Peng et al., 2002). Adherent *Bacillus* spores also exhibit a greater resistance to high temperature and disinfectant than spores in suspension (Sagripanti and Bonifacino, 1999; Faille et al., 2001; Kreske et al., 2006a). Indeed, residual *Bacillus* contamination of equipment surfaces after cleaning and/or sanitizing procedures was detected at different points on milk pasteurization lines and on the surface of the packaging machine (Mattila et al., 1990; Sharma and Anand, 2002b; Salustiano et al., 2009). Hence, considering the difficulty in inactivating adherent *Bacillus* spores and biofilms, cleaning the biomass from the surfaces is fundamental for controlling biofilm development.

Cleaning-in-Place Protocols

The cleaning-in-place (CIP) protocols used to clean processing lines without dismantling or opening of the equipment, vary according to industries or the food chain and the residues that need to be cleaned, although caustic and acid cleaning has remained the standard method used in many food processing industries. Both chemical (cleaning agents) and mechanical (shear stresses) actions are supposed to play a major role on soil removal. However, the effectiveness of CIP regimes against *B. cereus* biofilm has not been extensively reported. In the food industries, CIP regimes frequently involve a 60°C cleaning alkali wash (mainly sodium hydroxide), followed by an acid (mainly nitric acid) wash disinfection step (Bremer et al., 2006), but a reduction of viable spores by only 40% has been reported (Andersson et al., 1995). In the case of *Bacillus* biofilms, relatively low efficiency of the reference CIP regime (1% NaOH at 65°C for 10 min—water rinse—1% HNO₃ at 65°C for 10 min—water rinse) has been reported, but the removal would be improved by increasing the concentration of NaOH or the duration of the cleaning procedure (Flint et al., 1997; Bremer et al., 2006; Kumari and Sarkar, 2014).

Mechanical and Chemical Cleaning

In order to better understand the mechanism of spore and biofilm detachment during CIP, the respective role of rinsing vs. cleaning (mechanical and chemical forces) in the detachment of *Bacillus* biofilms and spores was investigated. When the *B. cereus* biofilm was formed on milk Pre-soiled stainless chips (Peng et al.,

2002) or at different shear stresses (Lemos et al., 2015), a rapid population decrease occurred during the first 5 min whatever the detachment conditions, and no further removal was observed for longer times, either in terms of vegetative cells or spores, even if the amount of detached biofilm was significantly higher in the presence of cleaning agents. Similar observations have been reported when *B. cereus* biofilm was formed on milk Pre-soiled stainless chips (Peng et al., 2002) or at different shear stresses (Lemos et al., 2015). Further works, performed on spores from the *B. cereus* group, demonstrated that during a CIP, chemical action plays a major role in the detachment of adherent spores, while mechanical action is poorly effective (less than 90% decrease in the number of adherent spores at wall shear stresses of 500 Pa, whatever the strain; Faille et al., 2013). Spores produced in biofilms showed greater resistance to detachment than the complete biofilms on inert surfaces (Faille et al., 2014) and on vegetables (Elhariry, 2011).

If the contaminated areas are allowed to dry before cleaning, e.g., in half-filled tanks or pipes or on open surfaces, the sporulation level would increase within *Bacillus* biofilms (Hayrapetyan et al., 2016) and the resistance to shear of attached spores increase concomitantly (Nanasaki et al., 2010). The increase in resistance to detachment is particularly noteworthy for long times and/or high temperature of drying (Faille et al., 2016).

In order to improve the efficiency of cleaning procedures, some industrialists opted to develop enzymatic cocktails effective against biofilms found in food processing plants, which are known to poorly respond to traditional cleaning procedures. The enzymes offer major advantages over traditional cleaning solutions, e.g., low toxicological risk and ecological risk, ease of rinsing external residues and compatibility with different surface material. Many products are nowadays commercially available, essentially for medical use. Some of the commercialized cocktails have proven their efficiency against biofilms produced by *B. cereus*, *B. mycoides* or *B. flavothermodurans*, and also against *B. cereus* adherent spores (Langsrud et al., 2000; Parkar et al., 2004; Lequette et al., 2010). These enzymatic “detergents” being more expensive than conventional products, their use is proposed as a complementary solution to current cleaning procedures.

Spores and, to a lesser extent, vegetative cells embedded in a *B. cereus* biofilm are protected against inactivation by the sanitizers commonly used to control foodborne pathogens, such as chlorine and hydrogen peroxide, which are easy to handle, inexpensive, and are soluble in water and relatively stable over a long storage time. For example, hydrogen peroxide or peracetic acid show little activity on adherent *B. subtilis* and *B. cereus* spores (Faille et al., 2001; Dequeiroz and Day, 2008). At higher temperatures and longer exposures, a significant reduction in *B. cereus* viable counts would be observed, but it is not suitable for practical disinfection due to corrosion and toxicity (Langsrud et al., 2000; Dequeiroz and Day, 2008). However, although the peroxygen-based disinfectants are not sporicidal alone, the use of NaOH 1% (typically used at 0.5–2% in the food and beverage industries) or of an enzymatic cocktail would sensitize *Bacillus* spores to the action of these oxidative disinfectants (Langsrud et al., 2000). The activity of sodium hypochlorite on *B. cereus*

spores on surfaces and in field trials is also limited (Te Giffel et al., 1995). Indeed, although hypochlorite solutions are more stable above pH 9.5, they are only efficient at neutral or acidic pH (Sagripanti and Bonifacino, 1999). However, a marked synergistic effect between both was described on the efficacy to reduce spore counts on contaminated surfaces (Dequeiroz and Day, 2008). The same phenomenon was observed with biofilms produced in immersed conditions or exposed to air (Ryu and Beuchat, 2005). Furthermore, chlorine dioxide was less effective than chlorine in killing *Bacillus* spores on stainless steel, mainly in the presence of organic soil (Kreske et al., 2006a) and injured *B. cereus* cells were sometimes seen to recover overnight (Lindsay et al., 2002). Within biofilms, spores were more resistant to chlorine and chlorine dioxide than the vegetative cells (Kreske et al., 2006b).

Control of Multispecies Biofilms Including *B. cereus*

The control of mixed species biofilms including *B. cereus* and other *Bacillus* species has also been investigated. For example, the efficiency of sodium hypochlorite and iodophor, commonly used in the beverage and dairy industries, has been studied in different segments of pasteurization lines (Sharma and Anand, 2002b). Results from this study suggest that sodium iodophors were in some cases more efficient than sodium hypochlorite in inactivating biofilms and that the latter treatment was affected by the constitutive microflora or by spatial heterogeneity of biofilms. However, biofilms were still detected on the different areas even after CIP and iodophor treatment. Since iodophors are much less active against spores than hypochlorite, one can hypothesize that the residual biofilms following treatment with iodophors would be largely composed of *Bacillus* spores. A laboratory work on dual biofilms (*B. cereus* and *P. fluorescens*) showed that dual biofilms are characterized by an increased stability to shear stress and are more resistant to a quaternary ammonium compound (QAC), cetyltrimethylammonium bromide, and glutaraldehyde solutions (sanitizers commonly used in the medical field) than each single species biofilm (Simoes et al., 2009). Once more, a significant proportion of the population of both bacteria remain in a viable state after exposure to antimicrobials. The presence of residual bacterial population after treatment by QACs, also frequently used in food-processing industries, could encourage the development of resistance among food-associated bacteria, as already observed in Gram-negative bacteria and *Enterococcus* spp. (Sidhu et al., 2002).

CONCLUDING REMARKS

In the last decade, a number of studies have shown that although *B. cereus sensu lato* biofilms looked the same as the *B. subtilis* ones, there are quite different in several aspects. These studies brought a huge improvement to our understanding of how *B. cereus* biofilms are built, what is their contribution to the bacterium lifestyle, or how to get rid of them when required. Still, a number of issues stay unresolved or has been brought to light by recent findings. While the role of the TasA-like proteins in the biofilm matrix has been confirmed, the duplication of their

genes asks the question of their role in the biofilm formation and in the adaptation of the bacterium to its environment or to its host. Similarly, the genetic determinants required for the building of the polysaccharidic part of the matrix remains a mystery, as well as the regulation of their production and the role of the large *epsA-O*-like polysaccharidic locus, since this locus does not seem to be involved in biofilm formation. The mechanisms through which eDNA, which was found in high quantities in the *B. cereus* biofilm matrix, is released remains unknown. The possible involvement of programmed cell death (PCD) in this release as well as in the shaping of the biofilm architecture, and the connection of its regulation to the regulation of biofilm formation represent other exciting issues in the forthcoming work on *B. cereus* biofilm formation. The impact of plasmids, which are known to play a major role in *B. cereus sensu lato* pathogenesis, on biofilm formation, and the mechanism through which plasmids act on this phenotype is still to be determined. Regarding pathogenesis, the presence and the evolution of biofilms in vivo has not been yet established, nor has been their exact contribution to the bacterium virulence. Another important issue is relative to the role of biofilms in the *B. cereus sensu lato*, including *B. anthracis*, survival and growth in the soil environment. Finally, the traditional hygiene procedures used in the food industry have revealed their limit in the control of surface contamination with *Bacillus* spores and biofilms. If we consider that *B. cereus* and other species can act as spoilage organisms and pathogens, these surface contaminations are still of concern in the food industry. This

problem is thus far from being resolved and there are many questions that remain to be addressed concerning the different approaches to manage the surface hygiene and limit the risks to consumers.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

All authors listed, have made substantial, direct and intellectual contribution to the work, and approved it for publication.

FUNDING

Researches were funded by the Agence Nationale pour la Recherche (ANR, France), Campus France, the University St Joseph of Beirut and the Conseil National de la Recherche Scientifique (CNRS-L, Lebanon). These agencies had no role in this work (study design, data analysis, manuscript writing)

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank the Lebanese National Council for Scientific Research (CNRS-L), the Grant research program 01-08-15 and the Scholarship Programs 2014-2015, and Campus France for supporting Racha Majed. In addition our gratitude is also extended to the Research Council of Saint-Joseph University: CNRS-FS81 and FS 84. This study was also funded by the French Agence Nationale de la Recherche (Bt-Surf,N ° ANR-12-EMMA_0005).

REFERENCES

- Abee, T., Kovács, A. T., Kuipers, O. P., and Van Der Veen, S. (2011). Biofilm formation and dispersal in Gram-positive bacteria. *Curr. Opin. Biotechnol.* 22, 172–179. doi: 10.1016/j.copbio.2010.10.016
- Ahern, M., Verschueren, S., and Van Sinderen, D. (2003). Isolation and characterisation of a novel bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis* strain B439. *FEMS Microbiol. Lett.* 220, 127–131. doi: 10.1016/S0378-1097(03)00086-7
- Andersson, A., Ronner, U., and 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, 145–155.
- Anjum, R., and Krakat, N. (2016). Detection of multiple resistances, biofilm formation and conjugative transfer of *Bacillus cereus* from contaminated soils. *Curr. Microbiol.* 72, 321–328. doi: 10.1007/s00284-015-0952-1
- Asally, M., Kittisopikul, M., Rue, P., Du, Y., Hu, Z., çagatay, T., et al. (2012). Localized cell death focuses mechanical forces during 3D patterning in a biofilm. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, 18891–18896. doi: 10.1073/pnas.1212429109
- Auger, S., Krin, E., Aymerich, S., and Gohar, M. (2006). Autoinducer 2 affects biofilm formation by *Bacillus cereus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 937–941. doi: 10.1128/AEM.72.1.937-941.2006
- Auger, S., Ramarao, N., Faille, C., Fouet, A., Aymerich, S., and Gohar, M. (2009). Biofilm formation and cell surface properties among pathogenic and nonpathogenic strains of the *Bacillus cereus* group. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 6616–6618. doi: 10.1128/AEM.00155-09
- Austin, J. W., and Bergeron, G. (1995). Development of bacterial biofilms in dairy processing lines. *J. Dairy Res.* 62, 509–519. doi: 10.1017/S0022029900031204
- Bennett, S. D., Walsh, K. A., and Gould, L. H. (2013). Foodborne disease outbreaks caused by *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, and *Staphylococcus aureus*—United States, 1998–2008. *Clin. Infect. Dis.* 57, 425–433. doi: 10.1093/cid/cit244
- Branda, S. S., Gonzalez-Pastor, J. E., Ben Yehuda, S., Losick, R., and Kolter, R. (2001). Fruiting body formation by *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 11621–11626. doi: 10.1073/pnas.191384198
- Bremer, P. J., Fillery, S., and Mcquillan, A. J. (2006). Laboratory scale Clean-In-Place (CIP) studies on the effectiveness of different caustic and acid wash steps on the removal of dairy biofilms. *Int. J. Food Microbiol.* 106, 254–262. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2005.07.004
- Bridier, A., Meylheuc, T., and Briandet, R. (2013). Realistic representation of *Bacillus subtilis* biofilms architecture using combined microscopy (CLSM, ESEM and FESEM). *Micron* 48, 65–69. doi: 10.1016/j.micron.2013.02.013
- Brown, K. L. (2000). Control of bacterial spores. *Br. Med. Bull.* 56, 158–171. doi: 10.1258/0007142001902860
- Cairns, L. S., Hobley, L., and Stanley-Wall, N. R. (2014). Biofilm formation by *Bacillus subtilis*: new insights into regulatory strategies and assembly mechanisms. *Mol. Microbiol.* 93, 587–598. doi: 10.1111/mmi.12697
- Candela, T., Maes, E., Garénaux, E., Rombouts, Y., Krzewinski, F., Gohar, M., et al. (2011). Environmental and biofilm-dependent changes in a *Bacillus cereus* secondary cell wall polysaccharide. *J. Biol. Chem.* 286, 31250–31262. doi: 10.1074/jbc.M111.249821
- Caro-Astorga, J., Pérez-García, A., De Vicente, A., and Romero, D. (2015). A genomic region involved in the formation of adhesin fibers in *Bacillus cereus* biofilms. *Front. Microbiol.* 5:745. doi: 10.3389/fmicb.2014.00745
- Christison, C. A., Lindsay, D., and Von Holy, A. (2007). Cleaning and handling implements as potential reservoirs for bacterial contamination of some ready-to-eat foods in retail delicatessen environments. *J. Food Prot.* 70, 2878–2883.
- Cook, L. C., and Dunne, G. M. (2014). The influence of biofilms in the biology of plasmids. *Microbiol. Spectr.* 2:0012. doi: 10.1128/microbiolspec.plas-0012-2013
- Costerton, J. W., Lewandowski, Z., Caldwell, D. E., Korber, D. R., and Lappin-Scott, H. M. (1995). Microbial biofilms. *Annu. Rev. Microbiol.* 49, 711–745. doi: 10.1146/annurev.mi.49.100195.003431

- Cutting, S. M. (2011). *Bacillus* probiotics. *Food Microbiol.* 28, 214–220. doi: 10.1016/j.fm.2010.03.007
- Czechowski, M. H. (1990). Bacterial attachment to Buna-n gaskets in milk processing equipment. *Aust. J. Dairy Technol.* 45, 113–114.
- Davey, M. E., and O'toole, G. A. (2000). Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64, 847–867. doi: 10.1128/MMBR.64.4.847-867.2000
- De Been, M., Francke, C., Moezelaar, R., Abee, T., and Siezen, R. J. (2006). Comparative analysis of two-component signal transduction systems of *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus anthracis*. *Microbiology* 152, 3035–3048. doi: 10.1099/mic.0.29137-0
- Dequeiroz, G. A., and Day, D. F. (2008). Disinfection of *Bacillus subtilis* spore-contaminated surface materials with a sodium hypochlorite and a hydrogen peroxide-based sanitizer. *Lett. Appl. Microbiol.* 46, 176–180. doi: 10.1111/j.1472-765X.2007.02283.x
- De Vries, Y. P., Van Der Voort, M., Wijman, J., Van Schaik, W., Hornstra, L. M., De Vos, W. M., et al. (2004). Progress in food-related research focussing on *Bacillus cereus*. *Microbes Environ.* 19, 265–269. doi: 10.1264/jsme2.19.265
- Duanis-Assaf, D., Steinberg, D., Chai, Y., and Shemesh, M. (2015). The LuxS based quorum sensing governs lactose induced biofilm formation by *Bacillus subtilis*. *Front. Microbiol.* 6:1517. doi: 10.3389/fmicb.2015.01517
- Dubois, T., Faegri, K., Perchat, S., Lemy, C., Buisson, C., Nielsen-Leroux, C., et al. (2012). Necrotrophism is a quorum-sensing-regulated lifestyle in *Bacillus thuringiensis*. *PLoS Pathog.* 8:e1002629. doi: 10.1371/journal.ppat.1002629
- Dubois, T., Perchat, S., Verplaetse, E., Gominet, M., Lemy, C., Aumont-Nicaise, M., et al. (2013). Activity of the *Bacillus thuringiensis* NprR-NprX cell-cell communication system is co-ordinated to the physiological stage through a complex transcriptional regulation. *Mol. Microbiol.* 88, 48–63. doi: 10.1111/mmi.12168
- Ehling-Schulz, M., Frenzel, E., and Gohar, M. (2015). Food-bacteria interplay: pathometabolism of emetic *Bacillus cereus*. *Front. Microbiol.* 6:704. doi: 10.3389/fmicb.2015.00704
- Ekman, J. V., Kruglov, A., Andersson, M. A., Mikkola, R., Raulio, M., and Salkinoja-Salonen, M. (2012). Cereulide produced by *Bacillus cereus* increases the fitness of the producer organism in low-potassium environments. *Microbiology* 158, 1106–1116. doi: 10.1099/mic.0.053520-0
- Elhariry, H. M. (2011). Attachment strength and biofilm forming ability of *Bacillus cereus* on green-leafy vegetables: cabbage and lettuce. *Food Microbiol.* 28, 1266–1274. doi: 10.1016/j.fm.2011.05.004
- Evans, J. A., Russell, S. L., James, C., and Corry, J. E. L. (2004). Microbial contamination of food refrigeration equipment. *J. Food Eng.* 62, 225–232. doi: 10.1016/S0260-8774(03)00235-8
- Fagerlund, A., Dubois, T., Økstad, O. A., Verplaetse, E., Gilois, N., Bennaceur, I., et al. (2014). SinR controls enterotoxin expression in *Bacillus thuringiensis* biofilms. *PLoS ONE* 9:e87532. doi: 10.1371/journal.pone.0087532
- Faille, C., Benezech, T., Blel, W., Ronse, A., Ronse, G., Clarisse, M., et al. (2013). Role of mechanical vs. chemical action in the removal of adherent *Bacillus* spores during CIP procedures. *Food Microbiol.* 33, 149–157. doi: 10.1016/j.fm.2012.09.010
- Faille, C., Benezech, T., Midelet-Bourdin, G., Lequette, Y., Clarisse, M., Ronse, G., et al. (2014). Sporulation of *Bacillus* spp. within biofilms: a potential source of contamination in food processing environments. *Food Microbiol.* 40, 64–74. doi: 10.1016/j.fm.2013.12.004
- Faille, C., Bihi, L., Ronse, G., Baudoin, M., and Zoueshtigh, F. (2016). Increased resistance to detachment of adherent microspheres and *Bacillus* spores subjected to a drying step. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 143, 293–300. doi: 10.1016/j.colsurfb.2016.03.041
- Faille, C., Fontaine, F., and Benezech, T. (2001). Potential occurrence of adhering living *Bacillus* spores in milk product processing lines. *J. Appl. Microbiol.* 90, 892–900. doi: 10.1046/j.1365-2672.2001.01321.x
- Fasanella, A., Scasciamacchia, S., Garofolo, G., Giangaspero, A., Tarsitano, E., and Adone, R. (2010). Evaluation of the house fly *Musca domestica* as a mechanical vector for an anthrax. *PLoS ONE* 5:e12219. doi: 10.1371/journal.pone.0012219
- Flach, J., Grzybowski, V., Toniazio, G., and Corcao, G. (2014). Adhesion and production of degrading enzymes by bacteria isolated from biofilms in raw milk cooling tanks. *Food Sci. Technol.* 34, 571–576. doi: 10.1590/1678-457x.6374
- Flemming, H. C., and Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 623–633. doi: 10.1038/nrmicro2415
- Flint, S. H., Bremer, P. J., and Brooks, J. D. (1997). Biofilms in dairy manufacturing plant - Description, current concerns and methods of control. *Biofouling* 11, 81–97. doi: 10.1080/08927019709378321
- Frenzel, E., Doll, V., Pauthner, M., Lucking, G., Scherer, S., and Ehling-Schulz, M. (2012). CodY orchestrates the expression of virulence determinants in emetic *Bacillus cereus* by impacting key regulatory circuits. *Mol. Microbiol.* 85, 67–88. doi: 10.1111/j.1365-2958.2012.08090.x
- Fromm, H. I., and Boor, K. J. (2004). Characterization of pasteurized fluid milk shelf-life attributes. *J. Food Sci.* 69, M207–M214. doi: 10.1111/j.1365-2621.2004.tb09889.x
- Gao, T., Foulston, L., Chai, Y., Wang, Q., and Losick, R. (2015). Alternative modes of biofilm formation by plant-associated *Bacillus cereus*. *Microbiologyopen* 4, 452–464. doi: 10.1002/mbio.3.251
- Gélis-Jeanvoine, S., Canette, A., Gohar, M., Gominet, M., Slamti, L., and Lereclus, D. (2016). Genetic and functional analyses of kurstakin, a lipopeptide produced by *Bacillus thuringiensis*. *Res. Microbiol.* doi: 10.1016/j.resmic.2016.06.002. [Epub ahead of print].
- Ghigo, J. M. (2001). Natural conjugative plasmids induce bacterial biofilm development. *Nature* 412, 442–445. doi: 10.1038/35086581
- Gillis, A., and Mahillon, J. (2014). Influence of lysogeny of Tectiviruses GIL01 and GIL16 on *Bacillus thuringiensis* growth, biofilm formation, and swarming motility. *Appl. Environ. Microbiol.* 80, 7620–7630. doi: 10.1128/AEM.01869-14
- Gohar, M., Faegri, K., Perchat, S., Ravnum, S., Økstad, O. A., Gominet, M., et al. (2008). The PlcR virulence regulon of *Bacillus cereus*. *PLoS ONE* 3:e2793. doi: 10.1371/journal.pone.0002793
- Gohar, M., Økstad, O. A., Gilois, N., Sanchis, V., Kolsto, A. B., and Lereclus, D. (2002). Two-dimensional electrophoresis analysis of the extracellular proteome of *Bacillus cereus* reveals the importance of the PlcR regulon. *Proteomics* 2, 784–791. doi: 10.1002/1615-9861(200206)2:6<784::AID-PROT784>3.0.CO;2-R
- Gunduz, G. T., and Tuncel, G. (2006). Biofilm formation in an ice cream plant. *Antonie Van Leeuwenhoek* 89, 329–336. doi: 10.1007/s10482-005-9035-9
- Hamon, M. A., and Lazazzera, B. A. (2001). The sporulation transcription factor Spo0A is required for biofilm development in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* 42, 1199–1210. doi: 10.1046/j.1365-2958.2001.02709.x
- Hayrapetyan, H., Abee, T., and Nierop Groot, M. (2016). Sporulation dynamics and spore heat resistance in wet and dry biofilms of *Bacillus cereus*. *Food Control* 60, 493–499. doi: 10.1016/j.foodcont.2015.08.027
- Hayrapetyan, H., Muller, L., Tempelaars, M., Abee, T., and Nierop Groot, M. (2015a). Comparative analysis of biofilm formation by *Bacillus cereus* reference strains and undomesticated food isolates and the effect of free iron. *Int. J. Food Microbiol.* 200, 72–79. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2015.02.005
- Hayrapetyan, H., Tempelaars, M., Nierop Groot, M., and Abee, T. (2015b). *Bacillus cereus* ATCC 14579 RpoN (Sigma 54) Is a pleiotropic regulator of growth, carbohydrate metabolism, motility, biofilm formation and toxin production. *PLoS ONE* 10:e0134872. doi: 10.1371/journal.pone.0134872
- Helgason, E., Tourasse, N. J., Meisal, R., Caugant, D. A., and Kolsto, A. B. (2004). Multilocus sequence typing scheme for bacteria of the *Bacillus cereus* group. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 191–201. doi: 10.1128/AEM.70.1.191-201.2004
- Hendriksen, N. B., and Carstensen, J. (2013). Long-term survival of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* in a field trial. *Can. J. Microbiol.* 59, 34–38. doi: 10.1139/cjm-2012-0380
- Hendriksen, N. B., and Hansen, B. M. (2002). Long-term survival and germination of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* in a field trial. *Can. J. Microbiol.* 48, 256–261. doi: 10.1139/w02-009
- Hobley, L., Ostrowski, A., Rao, F. V., Bromley, K. M., Porter, M., Prescott, A. R., et al. (2013). BslA is a self-assembling bacterial hydrophobin that coats the *Bacillus subtilis* biofilm. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110, 13600–13605. doi: 10.1073/pnas.1306390110
- Houry, A., Briandet, R., Aymerich, S., and Gohar, M. (2010). Involvement of motility and flagella in *Bacillus cereus* biofilm formation. *Microbiology* 156, 1009–1018. doi: 10.1099/mic.0.034827-0
- Houry, A., Gohar, M., Deschamps, J., Tischenko, E., Aymerich, S., Gruss, A., et al. (2012). Bacterial swimmers that infiltrate and take over the biofilm matrix. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, 13088–13093. doi: 10.1073/pnas.1200791109

- Hsueh, Y. H., Somers, E. B., Lereclus, D., and Wong, A. C. (2006). Biofilm formation by *Bacillus cereus* is influenced by PlcR, a pleiotropic regulator. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 5089–5092. doi: 10.1128/AEM.00573-06
- Hsueh, Y. H., Somers, E. B., and Wong, A. C. (2008). Characterization of the *codY* gene and its influence on biofilm formation in *Bacillus cereus*. *Arch. Microbiol.* 189, 557–568. doi: 10.1007/s00203-008-0348-8
- Hu, J. Y., Fan, Y., Lin, Y. H., Zhang, H. B., Ong, S. L., Dong, N., et al. (2003). Microbial diversity and prevalence of virulent pathogens in biofilms developed in a water reclamation system. *Res. Microbiol.* 154, 623–629. doi: 10.1016/j.resmic.2003.09.004
- Innov, I., and Winkler, W. C. (2010). A regulatory RNA required for antitermination of biofilm and capsular polysaccharide operons in *Bacillales*. *Mol. Microbiol.* 76, 559–575. doi: 10.1111/j.1365-2958.2010.07131.x
- Ivanova, N., Sorokin, A., Anderson, I., Galleron, N., Candelon, B., Kapatral, V., et al. (2003). Genome sequence of *Bacillus cereus* and comparative analysis with *Bacillus anthracis*. *Nature* 423, 87–91. doi: 10.1038/nature01582
- Izano, E. A., Sadvovskaya, I., Wang, H., Vinogradov, E., Ragunath, C., Ramasubbu, N., et al. (2008). Poly-N-acetylglucosamine mediates biofilm formation and detergent resistance in *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Microb. Pathog.* 44, 52–60. doi: 10.1016/j.micpath.2007.08.004
- Jensen, G. B., Hansen, B. M., Eilenberg, J., and Mahillon, J. (2003). The hidden lifestyles of *Bacillus cereus* and relatives. *Environ. Microbiol.* 5, 631–640. doi: 10.1046/j.1462-2920.2003.00461.x
- Kamar, R., Gohar, M., Jéhanno, I., Rejasse, A., Kallassy, M., Lereclus, D., et al. (2013). Pathogenic potential of *Bacillus cereus* strains as revealed by phenotypic analysis. *J. Clin. Microbiol.* 51, 320–323. doi: 10.1128/JCM.02848-12
- Karunakaran, E., and Biggs, C. A. (2011). Mechanisms of *Bacillus cereus* biofilm formation: an investigation of the physicochemical characteristics of cell surfaces and extracellular proteins. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 89, 1161–1175. doi: 10.1007/s00253-010-2919-2
- Kearns, D. B., Chu, F., Branda, S. S., Kolter, R., and Losick, R. (2005). A master regulator for biofilm formation by *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* 55, 739–749. doi: 10.1111/j.1365-2958.2004.04440.x
- Kobayashi, K. (2007a). *Bacillus subtilis* pellicle formation proceeds through genetically defined morphological changes. *J. Bacteriol.* 189, 4920–4931. doi: 10.1128/JB.00157-07
- Kobayashi, K. (2007b). Gradual activation of the response regulator DegU controls serial expression of genes for flagellum formation and biofilm formation in *Bacillus subtilis* molecular Microbiology 66, 395–409. doi: 10.1111/j.1365-2958.2007.05923.x
- Kolari, M., Nuutinen, J., Rainey, F. A., and Salkinoja-Salonen, M. S. (2003). Colored moderately thermophilic bacteria in paper-machine biofilms. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 30, 225–238. doi: 10.1007/s10295-003-0047-z
- Kolari, M., Nuutinen, J., and Salkinoja-Salonen, M. S. (2001). Mechanisms of biofilm formation in paper machine by *Bacillus* species: the role of *Deinococcus geothermalis*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 27, 343–351. doi: 10.1038/sj.jim.7000201
- Kolenbrander, P. E., Palmer, R. J. Jr., Rickard, A. H., Jakubovics, N. S., Chalmers, N. I., and Diaz, P. I. (2006). Bacterial interactions and successions during plaque development. *Periodontol.* 2000, 42, 47–79. doi: 10.1111/j.1600-0757.2006.00187.x
- Kreske, A. C., Ryu, J. H., and Beuchat, L. R. (2006a). Evaluation of chlorine, chlorine dioxide, and a peroxyacetic acid-based sanitizer for effectiveness in killing *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* spores in suspensions, on the surface of stainless steel, and on apples. *J. Food Prot.* 69, 1892–1903.
- Kreske, A. C., Ryu, J. H., Pettigrew, C. A., and Beuchat, L. R. (2006b). Lethality of chlorine, chlorine dioxide, and a commercial produce sanitizer to *Bacillus cereus* and *Pseudomonas* in a liquid detergent, on stainless steel, and in biofilm. *J. Food Prot.* 69, 2621–2634.
- Kumari, S., and Sarkar, P. K. (2014). In vitro model study for biofilm formation by *Bacillus cereus* in dairy chilling tanks and optimization of clean-in-place (CIP) regimes using response surface methodology. *Food Control* 36, 153–158. doi: 10.1016/j.foodcont.2013.08.014
- Kuroki, R., Kawakami, K., Qin, L., Kaji, C., Watanabe, K., Kimura, Y., et al. (2009). Nosocomial bacteremia caused by biofilm-forming *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*. *Intern. Med.* 48, 791–796. doi: 10.2169/internalmedicine.48.1885
- Lakshmanan, V., Kitto, S. L., Caplan, J. L., Hsueh, Y. H., Kearns, D. B., Wu, Y. S., et al. (2012). Microbe-associated molecular patterns-triggered root responses mediate beneficial rhizobacterial recruitment in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 160, 1642–1661. doi: 10.1104/pp.112.200386
- Langsrud, S., Baardsen, B., and Sundheim, G. (2000). Potentiation of the lethal effect of peroxigen on *Bacillus cereus* spores by alkali and enzyme wash. *Int. J. Food Microbiol.* 56, 81–86. doi: 10.1016/S0168-1605(00)00221-X
- Lecomte, J., St-Arnaud, M., and Hijri, M. (2011). Isolation and identification of soil bacteria growing at the expense of arbuscular mycorrhizal fungi. *FEMS Microbiol. Lett.* 317, 43–51. doi: 10.1111/j.1574-6968.2011.02209.x
- Lee, K., Costerton, J. W., Ravel, J., Auerbach, R. K., Wagner, D. M., Keim, P., et al. (2007). Phenotypic and functional characterization of *Bacillus anthracis* biofilms. *Microbiology* 153, 1693–1701. doi: 10.1099/mic.0.2006/003376-0
- Lemon, K. P., Earl, A. M., Vlamakis, H. C., Aguilar, C., and Kolter, R. (2008). Biofilm development with an emphasis on *Bacillus subtilis*. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 322, 1–16. doi: 10.1007/978-3-540-75418-3_1
- Lemos, M., Mergulhão, F., Melo, L., and Simões, M. (2015). The effect of shear stress on the formation and removal of *Bacillus cereus* biofilms. *Food Bioproducts Process.* 93, 242–248. doi: 10.1016/j.fbp.2014.09.005
- Lequette, Y., Boels, G., Clarisse, M., and Faille, C. (2010). Using enzymes to remove biofilms of bacterial isolates sampled in the food-industry. *Biofouling* 26, 421–431. doi: 10.1080/08927011003699535
- Lindback, T., Mols, M., Basset, C., Granum, P. E., Kuipers, O. P., and Kovacs, A. T. (2012). *CodY*, a pleiotropic regulator, influences multicellular behaviour and efficient production of virulence factors in *Bacillus cereus*. *Environ. Microbiol.* 14, 2233–2246. doi: 10.1111/j.1462-2920.2012.02766.x
- Lindsay, D., Brözel, V. S., Mostert, J. F., and Von Holy, A. (2002). Differential efficacy of a chlorine dioxide-containing sanitizer against single species and binary biofilms of a dairy-associated *Bacillus cereus* and a *Pseudomonas fluorescens* isolate. *J. Appl. Microbiol.* 92, 352–361. doi: 10.1046/j.1365-2672.2002.01538.x
- Marchand, S., De Block, J., De Jonghe, V., Coorevits, A., Heyndrickx, M., and Herman, L. (2012). Biofilm formation in milk production and processing environments; influence on milk quality and safety. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 11, 133–147. doi: 10.1111/j.1541-4337.2011.00183.x
- Margulis, L., Jorgensen, J. Z., Dolan, S., Kolchinsky, R., Rainey, F. A., and Lo, S. C. (1998). The *Arthromitus* stage of *Bacillus cereus*: intestinal symbionts of animals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 1236–1241. doi: 10.1073/pnas.95.3.1236
- Mattila, T., Manninen, M., and Kyläsiurola, A. L. (1990). Effect of cleaning-in-place disinfectants on wild bacterial strains isolated from a milking line. *J. Dairy Res.* 57, 33–39. doi: 10.1017/S0022029900026583
- Meer, R. R., Baker, J., Bodyfelt, F. W., and Griffiths, M. W. (1991). Psychrotrophic *Bacillus* Spp. in fluid milk-products - a review. *J. Food Prot.* 54, 969–979.
- Mettler, E., and Carpentier, B. (1997). Location, enumeration and identification of the microbial contamination after cleaning of EPDM gaskets introduced into a milk pasteurization line. *Lait* 77, 489–503. doi: 10.1051/lait:1997435
- Moscoso, M., García, E., and López, R. (2006). Biofilm formation by *Streptococcus pneumoniae*: role of choline, extracellular DNA, and capsular polysaccharide in microbial accretion. *J. Bacteriol.* 188, 7785–7795. doi: 10.1128/JB.00673-06
- Nanasaki, Y., Hagiwara, T., Watanabe, H., and Sakiyama, T. (2010). Removability of bacterial spores made adherent to solid surfaces from suspension with and without drying. *Food Control* 21, 1472–1477. doi: 10.1016/j.foodcont.2010.04.016
- Ohsaki, Y., Koyano, S., Tachibana, M., Shibukawa, K., Kuroki, M., Yoshida, I., et al. (2007). Undetected *Bacillus pseudo-outbreak* after renovation work in a teaching hospital. *J. Infect.* 54, 617–622. doi: 10.1016/j.jinf.2006.10.049
- Oscáriz, J. C., Cintas, L., Holo, H., Lasa, I., Nes, I. F., and Pisabarro, A. G. (2006). Purification and sequencing of cerein 7B, a novel bacteriocin produced by *Bacillus cereus* Bc7. *FEMS Microbiol. Lett.* 254, 108–115. doi: 10.1111/j.1574-6968.2005.00009.x
- Parkar, S. G., Flint, S. H., and Brooks, J. D. (2004). Evaluation of the effect of cleaning regimes on biofilms of thermophilic bacilli on stainless steel. *J. Appl. Microbiol.* 96, 110–116. doi: 10.1046/j.1365-2672.2003.02136.x
- Peng, J. S., Tsai, W. C., and Chou, C. C. (2002). Inactivation and removal of *Bacillus cereus* by sanitizer and detergent. *Int. J. Food Microbiol.* 77, 11–18. doi: 10.1016/S0168-1605(02)00060-0

- Pflughoeft, K. J., Sumby, P., and Koehler, T. M. (2011). *Bacillus anthracis* sin locus and regulation of secreted proteases. *J. Bacteriol.* 193, 631–639. doi: 10.1128/JB.01083-10
- Rajkovic, A., Uyttendaele, M., Dierick, K., Samapundo, S., Botteldoorn, N., Mahillon, J., et al. (2008). Risk Profile of the *Bacillus cereus* Group Implicated in Food Poisoning. Report for the Superior Health Council Belgium.
- Rasko, D. A., Altherr, M. R., Han, C. S., and Ravel, J. (2005). Genomics of the *Bacillus cereus* group of organisms. *FEMS Microbiol. Rev.* 29, 303–329. doi: 10.1016/j.femsre.2004.12.005
- Rasko, D. A., Rosovitz, M. J., Okstad, O. A., Fouts, D. E., Jiang, L., Cer, R. Z., et al. (2007). Complete sequence analysis of novel plasmids from emetic and periodontal *Bacillus cereus* isolates reveals a common evolutionary history among the *B. cereus* -group plasmids, including *Bacillus anthracis* pXO1. *J. Bacteriol.* 189, 52–64. doi: 10.1128/JB.01313-06
- Ratto, M., Suihko, M. L., and Siika-Aho, M. (2005). Polysaccharide-producing bacteria isolated from paper machine slime deposits. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 32, 109–114. doi: 10.1007/s10295-005-0210-9
- Reyes-Ramirez, A., and Ibarra, J. E. (2008). Plasmid patterns of *Bacillus thuringiensis* type strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 125–129. doi: 10.1128/AEM.02133-07
- Risoen, P. A., Ronning, P., Hegna, I. K., and Kolsto, A. B. (2004). Characterization of a broad range antimicrobial substance from *Bacillus cereus* J. *Appl. Microbiol.* 96, 648–655. doi: 10.1046/j.1365-2672.2003.02139.x
- Romero, D., Vlamakis, H., Losick, R., and Kolter, R. (2011). An accessory protein required for anchoring and assembly of amyloid fibres in *B. subtilis* biofilms. *Mol. Microbiol.* 80, 1155–1168. doi: 10.1111/j.1365-2958.2011.07653.x
- Ruan, L., Crickmore, N., Peng, D., and Sun, M. (2015). Are nematodes a missing link in the confounded ecology of the entomopathogen *Bacillus thuringiensis*? *Trends Microbiol.* 23, 341–346. doi: 10.1016/j.tim.2015.02.011
- Ryu, J. H., and Beuchat, L. R. (2005). Biofilm formation and sporulation by *Bacillus cereus* on a stainless steel surface and subsequent resistance of vegetative cells and spores to chlorine, chlorine dioxide, and a peroxyacetic acid-based sanitizer. *J. Food Prot.* 68, 2614–2622.
- Sagripanti, J. L., and Bonifacino, A. (1999). Bacterial spores survive treatment with commercial sterilants and disinfectants. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 4255–4260.
- Saile, E., and Koehler, T. M. (2006). *Bacillus anthracis* multiplication, persistence, and genetic exchange in the rhizosphere of grass plants. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 3168–3174. doi: 10.1128/AEM.72.5.3168-3174.2006
- Salustiano, V. C., Andrade, N. J., Soares, N. F. F., Lima, J. C., Bernardes, P. C., Luiz, L. M. P., et al. (2009). Contamination of milk with *Bacillus cereus* by post-pasteurization surface exposure as evaluated by automated ribotyping. *Food Control* 20, 439–442. doi: 10.1016/j.foodcont.2008.07.004
- Samarzija, D., Zamberlin, S., and Pogacic, T. (2012). Psychrotrophic bacteria and their negative effects on milk and dairy products quality. *Mljekarstvo* 62, 77–95.
- Schuch, R., and Fischetti, V. A. (2009). The secret life of the anthrax agent *Bacillus anthracis*: bacteriophage-mediated ecological adaptations. *PLoS ONE* 4:e6532. doi: 10.1371/journal.pone.0006532
- Schulte, R. D., Makus, C., Hasert, B., Michiels, N. K., and Schulenburg, H. (2010). Multiple reciprocal adaptations and rapid genetic change upon experimental coevolution of an animal host and its microbial parasite. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 7359–7364. doi: 10.1073/pnas.1003113107
- Scott, S. A., Brooks, J. D., Rakonjac, J., Walker, K. M. R., and Flint, S. H. (2007). The formation of thermophilic spores during the manufacture of whole milk powder. *Int. J. Dairy Technol.* 60, 109–117. doi: 10.1111/j.1471-0307.2007.00309.x
- Sharma, M., and Anand, S. K. (2002a). Bacterial biofilm on food contact surfaces: a review. *J. Food Sci. Technol.* 39, 573–593. doi: 10.2478/v10222-011-0018-4
- Sharma, M., and Anand, S. K. (2002b). Biofilms evaluation as an essential component of HACCP for food/dairy processing industry - a case. *Food Control* 13, 469–477. doi: 10.1016/S0956-7135(01)00068-8
- Sharma, M., and Anand, S. K. (2002c). Characterization of constitutive microflora of biofilms in dairy processing lines. *Food Microbiol.* 19, 627–636. doi: 10.1006/fmic.2002.0472
- Sidhu, M. S., Sorum, H., and Holck, A. (2002). Resistance to quaternary ammonium compounds in food-related bacteria. *Microb. Drug Resist.* 8, 393–399. doi: 10.1089/10766290260469679
- Silo-Suh, L. A., Lethbridge, B. J., Raffel, S. J., He, H., Clardy, J., and Handelsman, J. (1994). Biological activities of two fungistatic antibiotics produced by *Bacillus cereus* UW85. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 2023–2030.
- Simoës, M., Simoës, L. C., and Vieira, M. J. (2009). Species association increases biofilm resistance to chemical and mechanical treatments. *Water Res.* 43, 229–237. doi: 10.1016/j.watres.2008.10.010
- Sissons, C. H., Wong, L., and Shu, M. (1998). Factors affecting the resting pH of in vitro human microcosm dental plaque and *Streptococcus mutans* biofilms. *Arch. Oral Biol.* 43, 93–102. doi: 10.1016/S0003-9969(97)00113-1
- Slamti, L., Lemy, C., Henry, C., Guillot, A., Huillet, E., and Lereclus, D. (2015). CodY regulates the activity of the virulence quorum sensor plcR by controlling the import of the signaling peptide papR in *Bacillus thuringiensis*. *Front. Microbiol.* 6:1501. doi: 10.3389/fmicb.2015.01501
- Sneath, P. H. A. (1986). “13 Endospore-forming gram-positive rods and cocci,” in *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 2., eds J. G. Holt and P. H. A. Sneath (Baltimore, MD: William & Wilkins), 1599.
- Sonenshein, A. L. (2005). CodY, a global regulator of stationary phase and virulence in Gram-positive bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* 8, 203–207. doi: 10.1016/j.mib.2005.01.001
- Stenfors Arnesen, L. P., Fagerlund, A., and Granum, P. E. (2008). From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiol. Rev.* 32, 579–606. doi: 10.1111/j.1574-6976.2008.00112.x
- Storgards, E., Tapani, K., Hartwall, P., Saleva, R., and Suihko, M. L. (2006). Microbial attachment and biofilm formation in brewery bottling plants. *J. Am. Soc. Brewing Chem.* 64, 8–15. doi: 10.1094/ASBCJ-64-0008
- Swiecicka, I., and Mahillon, J. (2006). Diversity of commensal *Bacillus cereus* sensu lato isolated from the common sow bug (*Porcellio scaber*, Isopoda). *FEMS Microbiol. Ecol.* 56, 132–140. doi: 10.1111/j.1574-6941.2006.00063.x
- Tauveron, G., Slomianny, C., Henry, C., and Faille, C. (2006). Variability among *Bacillus cereus* strains in spore surface properties and influence on their ability to contaminate food surface equipment. *Int. J. Food Microbiol.* 110, 254–262. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2006.04.027
- Te Giffel, M. C., Beumer, R. R., Van Dam, W. F., Slaghuis, B. A., and Rombouts, F. M. (1995). Sporocidal effect of disinfectants on *Bacillus cereus* isolated from the milk processing environment. *Int. Biodeterior. Biodegradation* 36, 421–430. doi: 10.1016/0964-8305(95)00104-2
- Toljander, J. F., Artursson, V., Paul, L. R., Jansson, J. K., and Finlay, R. D. (2006). Attachment of different soil bacteria to arbuscular mycorrhizal fungal extraradical hyphae is determined by hyphal vitality and fungal species. *FEMS Microbiol. Lett.* 254, 34–40. doi: 10.1111/j.1574-6968.2005.00003.x
- Tran, S. L., Guillemet, E., Gohar, M., Lereclus, D., and Ramarao, N. (2010). CwpFM (EntFM) is a *Bacillus cereus* potential cell wall peptidase implicated in adhesion, biofilm formation, and virulence. *J. Bacteriol.* 192, 2638–2642. doi: 10.1128/JB.01315-09
- Trejo, M., Douarche, C., Bailleux, V., Poulard, C., Mariot, S., Regeard, C., et al. (2013). Elasticity and wrinkled morphology of *Bacillus subtilis* pellicles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110, 2011–2016. doi: 10.1073/pnas.1217178110
- Turell, M. J., and Knudson, G. B. (1987). Mechanical transmission of *Bacillus anthracis* by stable flies (*Stomoxys calcitrans*) and mosquitoes (*Aedes aegypti* and *Aedes taeniorhynchus*). *Infect. Immun.* 55, 1859–1861.
- Van Meervenne, E., De Weirtd, R., Van Coillie, E., Devlieghere, F., Herman, L., and Boon, N. (2014). Biofilm models for the food industry: hot spots for plasmid transfer? *Pathog. Dis.* 70, 332–338. doi: 10.1111/2049-632X.12134
- Verplaetse, E., Slamti, L., Gohar, M., Lereclus, D. (2015). Cell differentiation in a *Bacillus thuringiensis* population during planktonic growth, biofilm formation, and host infection. *MBio* 6, e00138–e00115. doi: 10.1128/mBio.00138-15
- Verplaetse, E., Slamti, L., Gohar, M., and Lereclus, D. (2016). Two distinct pathways lead *Bacillus thuringiensis* to commit to sporulation in biofilm. *Res. Microbiol.* doi: 10.1016/j.resmic.2016.03.006. [Epub ahead of print].
- Vilain, S., Luo, Y., Hildreth, M. B., and Brozel, V. S. (2006). Analysis of the life cycle of the soil saprophyte *Bacillus cereus* in liquid soil extract and in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 4970–4977. doi: 10.1128/AEM.03076-05
- Vilain, S., Pretorius, J. M., Theron, J., and Brozel, V. S. (2009). DNA as an adhesin: *Bacillus cereus* requires extracellular DNA to form biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 2861–2868. doi: 10.1128/AEM.01317-08
- Vilas-Bôas, G., Sanchis, V., Lereclus, D., Lemos, M. V., and Bourguet, D. (2002). Genetic differentiation between sympatric populations of *Bacillus*

- cereus and *Bacillus thuringiensis* applied and environmental Microbiology 68, 1414–1424. doi: 10.1128/AEM.68.3.1414-1424.2002
- Vilas-Boas, L. A., Vilas-Boas, G. F., Saridakis, H. O., Lemos, M. V., Lereclus, D., and Arantes, O. M. (2000). Survival and conjugation of *Bacillus thuringiensis* in a soil microcosm. FEMS Microbiol. Ecol. 31, 255–259. doi: 10.1016/S0168-6496(00)00002-7
- Visotto, L. E., Oliveira, M. G., Ribon, A. O., Mares-Guia, T. R., and Guedes, R. N. (2009). Characterization and identification of proteolytic bacteria from the gut of the velvetbean caterpillar (Lepidoptera: Noctuidae). Environ. Entomol. 38, 1078–1085. doi: 10.1603/022.038.0415
- Vlamakis, H., Aguilar, C., Losick, R., and Kolter, R. (2008). Control of cell fate by the formation of an architecturally complex bacterial community. Genes Dev. 22, 945–953. doi: 10.1101/gad.1645008
- Vlamakis, H., Chai, Y., Beauregard, P., Losick, R., and Kolter, R. (2013). Sticking together: building a biofilm the *Bacillus subtilis* way. Nat. Rev. Microbiol. 11, 157–168. doi: 10.1038/nrmicro2960
- Vlkova, H., Babak, V., Seydlova, R., Pavlik, I., and Schlegelova, I. (2008). Biofilms and hygiene on dairy farms and in the dairy industry: sanitation chemical products and their effectiveness on biofilms - a review. Czech. J. Food Sci. 26, 309–323.
- Whitchurch, C. B., Tolker-Nielsen, T., Ragas, P. C., and Mattick, J. S. (2002). Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. Science 295:1487. doi: 10.1126/science.295.5559.1487
- Wijman, J. G., De Leeuw, P. P., Moezelaar, R., Zwietering, M. H., and Abee, T. (2007). Air-liquid interface biofilms of *Bacillus cereus*: formation, sporulation, and dispersion. Appl. Environ. Microbiol. 73, 1481–1488. doi: 10.1128/AEM.01781-06
- Xu, Y. B., Chen, M., Zhang, Y., Wang, M., Wang, Y., Huang, Q. B., et al. (2014). The phosphotransferase system gene *ptsI* in the endophytic bacterium *Bacillus cereus* is required for biofilm formation, colonization, and biocontrol against wheat sharp eyespot. FEMS Microbiol. Lett. 354, 142–152. doi: 10.1111/1574-6968.12438
- Zafra, O., Lamprecht-Grandio, M., De Figueras, C. G., and Gonzalez-Pastor, J. E. (2012). Extracellular DNA release by undomesticated *Bacillus subtilis* is regulated by early competence. PLoS ONE 7:e48716. doi: 10.1371/journal.pone.0048716

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

Copyright © 2016 Majed, Faille, Kallassy and Gohar. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

III. Chapitre III : Les polysaccharides microbiens

A. Généralités

Les polysaccharides bactériens sont des polymères hydratés composés d'unités répétitives liés par des liaisons glycosidiques (Roberts 1995). La majorité sont de longs hétéropolymères de sucres neutres ou chargés, linéaires ou branchés, d'une masse moléculaire allant de $0,5 \times 10^6$ à 2×10^6 daltons variant suivant les souches (Flemming and Wingender 2010). Les hétéropolymères présents chez plusieurs souches appartenant à l'espèce *Streptococcus thermophilus*, possèdent une composition monomérique différente et des masses moléculaires différentes (Vanningelgem et al. 2004). Néanmoins, certains polysaccharides sont des homopolymères, à titre d'exemple les glucanes et les fructanes comme ceux produits par les streptocoques dans les biofilms oraux (Klein et al. 2015), ainsi que la cellulose produite par plusieurs espèces d'Enterobacteriaceae (Zogaj et al. 2001) et Pseudomonadaceae (Wingender et al. 2001).

Certains polysaccharides (CPS) fixés de façon covalente à la paroi bactérienne peuvent former une couche appelée capsule entourant la cellule. Cette couche peut jouer un rôle dans la virulence des bactéries pathogènes, par exemple en interagissant avec les mécanismes de défense du système immunitaire. Les polysaccharides peuvent également être faiblement attachés à la paroi bactérienne ou bien libérés dans le milieu de culture, on parle alors de polysaccharides extracellulaires ou exopolysaccharides (Yother 2011). Ils peuvent enfin être intégrés dans les couches de peptidoglycanes (Lovering, Safadi and Strynadka 2012), formant les « secondary cell wall polymers » (SCWP) (Schaffer and Messner 2005), ou encore impliqués dans la formation des lipopolysaccharides (LPS) ou des lipooligosaccharide (LOS) chez les bactéries Gram négatives.

Le paragraphe suivant expose plus en détail la structure et la fonction des polysaccharides capsulaires et des exopolysaccharides.

B. Voie de biosynthèse

Les mécanismes moléculaires impliqués dans la synthèse, l'assemblage et l'exportation des polysaccharides capsulaires ou des exopolysaccharides peuvent actuellement être classés en trois mécanismes distincts, qui sont la voie Wzy-dépendante, la voie synthase-dépendante ou la voie ABC transporteur-dépendante (ATP-binding cassette). Les voies Wzy- et synthase-dépendantes sont nommées en fonction des polymérases qui y sont impliquées alors que, la voie ABC transporteur-dépendante est nommée en fonction des mécanismes impliqués dans l'exportation du polysaccharide vers la surface externe de la bactérie. La voie ABC transporteur-dépendante n'est décrite que chez les bactéries Gram négatives tandis les deux autres voies sont présentes également chez les bactéries Gram positives.

1. La voie Wzy-dépendante

La synthèse de la capsule polysaccharidique se fait *via* la voie Wzy-dépendante chez la plupart des bactéries Gram positives (Yother 2011) notamment chez les staphylocoques et la plupart des streptocoques ainsi que chez les groupes 1 et 4 de *E. coli* (Whitfield 2006). Il est de même pour la synthèse des exopolysaccharides des lactococci (Yother 1999).

En général, la synthèse des polysaccharides débute par le transfert réversible d'un sucre activé (sucre-1-P) de l'UDP vers un lipide, l'undécaprényl phosphate (und-P), dont la tête phosphate chargée est orientée vers le cytoplasme et dont la queue hydrophobe est insérée dans la membrane plasmique (Cartee, Forsee and Yother 2005). Chez *S. pneumonia*, le transfert d'un Glucose-1-P à partir de l'UDP-Glucose est catalysé par CpsE (glycosyltransférase initiatrice) (Figure 16) (Bentley et al. 2006a). Ensuite des glycosyltransférases (GTs) (CpsT, F, G et I dans le cas de *S. pneumonia*) transfèrent de nouveaux monomères de sucre à l'und-P pour donner un und-P lié à une unité répétée, composée d'un oligosaccharide de séquence définie pouvant comporter des branchements. Le complexe est ensuite exporté à travers la membrane par l'intermédiaire d'une flippase Wzx. Ceci permet l'obtention du substrat nécessaire pour l'activation de la polymérase « Wzy » (protéine intégrée dans la membrane). Par la suite, la polymérase transfère sur la chaîne naissante de nouvelles unités répétées, régénérant ainsi l'und-P qui est rétabli dans une orientation cytoplasmique et peut recevoir une

nouvelle unité répétée. Enfin, le polysaccharide est transféré vers sa localisation définitive (milieu extracellulaire, peptidoglycane ou membrane plasmique) (Figure 16).

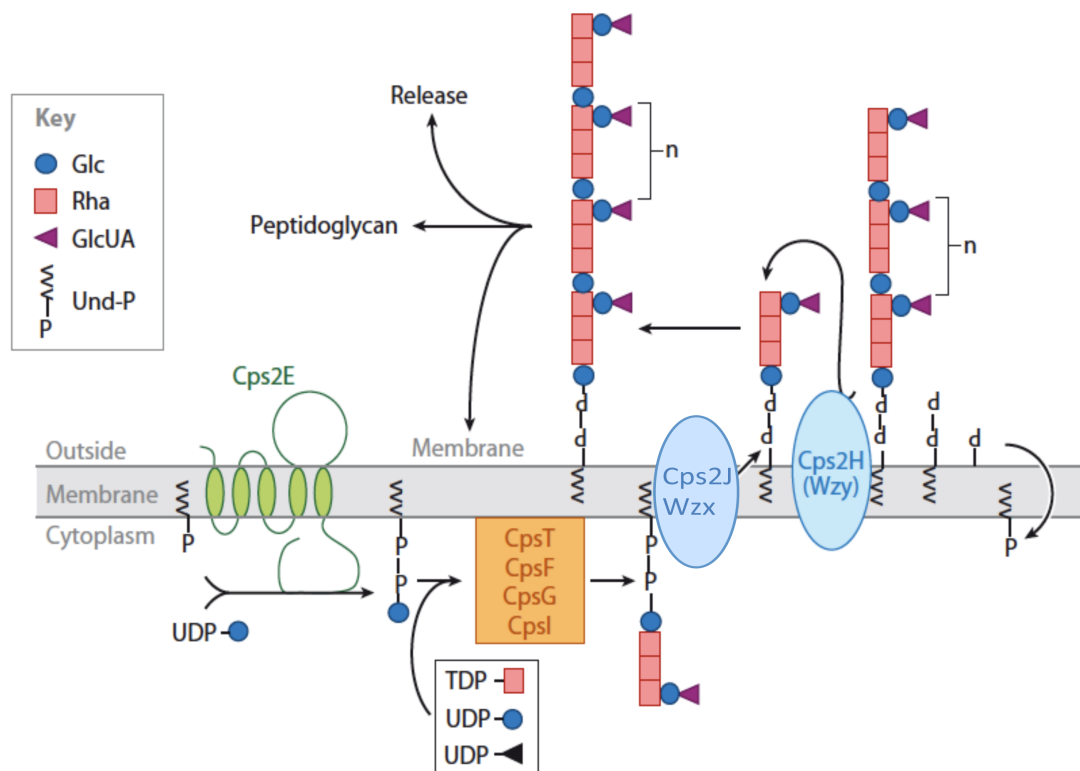


Figure 16. Schéma illustrant la voie de biosynthèse Wzy-dépendante chez *S. pneumoniae*.

Le schéma est détaillé dans le texte ci-dessus (Yother 2011).

2. La voie ABC transporteur-dépendante

La voie ABC transporteur-dépendante est décrite uniquement chez les bactéries Gram négatives, notamment la synthèse de lipopolysaccharides (LPS) (Figure 17). Les LPS sont composés de deux à trois parties: le lipide A, qui ancre le polysaccharide à la membrane, un oligosaccharide connu sous le nom du noyau « core » et parfois, un polysaccharide appelé O-antigène. La synthèse du lipide A est effectuée du côté cytoplasmique de la membrane interne par l'intermédiaire d'une voie conservée, la voie Raetz (Raetz and Whitfield 2002), qui implique neuf enzymes. Après l'ajout des autres résidus du noyau par des glycosyltransférases (GTs), le polymère est exporté à travers la membrane interne, via un ABC transporteur appelé MsbA (Figure 17). Il est un dimère dont chaque sous-unité est composée d'un domaine transmembranaire (TM) (composé de six hélices transmembranaires) et d'un domaine de type nucléotide-binding (NBD) présent du côté cytoplasmique (Ward et al. 2007). MsbA est orienté de deux façons différentes, une dans laquelle les hélices TMs sont ouvertes vers le

cytoplasme et l'autre où elles sont ouvertes vers le périplasma (Ward et al. 2007). Ceci est stimulé par la fixation de LPS et l'hydrolyse d'ATP (Doshi and van Veen 2013). Ensuite, le lipopolysaccharide est expulsé de la membrane interne via un ABC transporteur appelé LptB₂FG (complexe constitué de deux protéines LptB, chacune possède un NBD et deux protéines transmembranaires LptF et LptG) (Figure 17). Ensuite, dans le périplasma, deux protéines prennent le relais, LptA et LptC. Elles forment un pont qui assure le transport continu du lipopolysaccharide à travers le périplasma grâce à leur capacité de fixer les LPS. La translocation complète du périplasma vers la membrane externe de la bactérie nécessite un complexe hétéro-oligomère de LptD, appartenant à la famille des « Outer membrane polysaccharide export » (OPX) (Cuthbertson et al. 2009) et d'une lipoprotéine LptE (Figure 17).

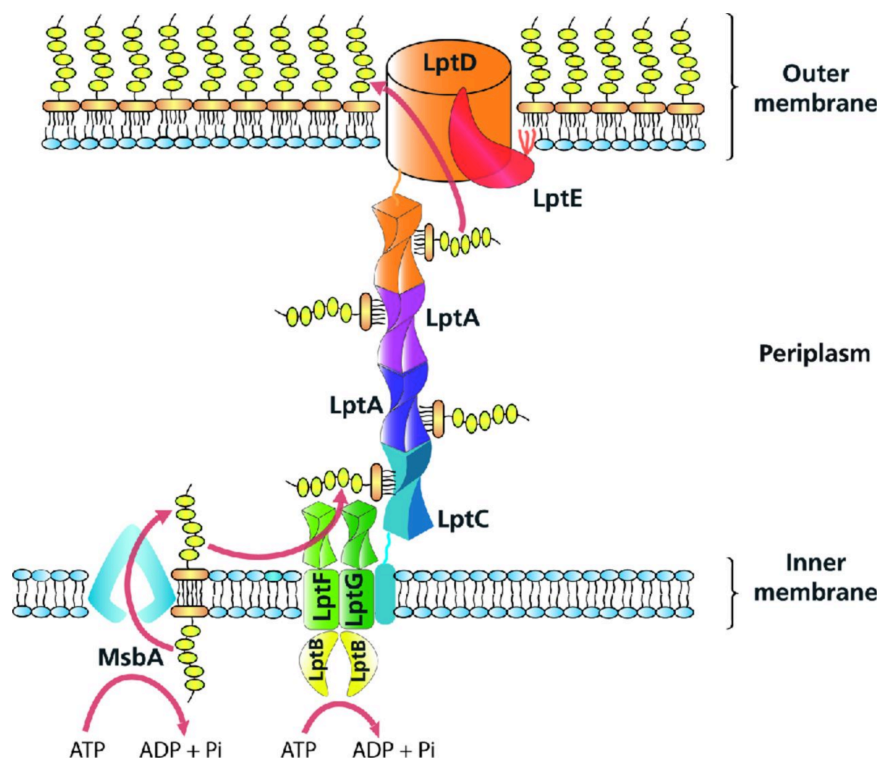


Figure 17. Schéma représentatif de la synthèse de lipopolysaccharidiques via la voie ABC transporteur-dépendante.

Schéma qui illustre la synthèse, l'assemblage et l'exportation de LPS chez les bactéries Gram négatives. Le schéma est détaillé dans le texte ci-dessus (Putker, Bos and Tommassen 2015).

3. La voie synthase-dépendante

Les polysaccharides synthétisés par cette voie sont relativement simples et sont composés d'un seul ou de deux monosaccharides assemblés en une chaîne linéaire non branchée. La cellulose ou l'acide hyaluronique sont produits par une synthase. En

fonction de la nature du polysaccharide, cette production peut nécessiter une molécule acceptrice lipidique (a lipid acceptor molecule) (Cartee et al. 2001, Hubbard et al. 2012). A l'inverse des voies Wzy et ABC, une seule enzyme - ou un seul complexe enzymatique - est responsable de l'initiation, la polymérisation et le transport des polymères. Chez *S. pneumoniae*, cette enzyme appartient à la famille β -glycosyltransférase 2 (Keenleyside and Whitfield 1996, Campbell et al. 1997), qui sont des protéines membranaires composées de multiples domaines transmembranaires et d'une boucle extracellulaire associée à l'activité glycosyltransférase (Figure 18). La synthèse débute la synthèse de polysaccharides chez *S. pneumonia* par le transfert d'un glucose (Glc) de l'UDP-Glc au phosphatidylglycérol, puis l'addition alternative d'acide glucuronique (GlcUA) et de Glc à l'extrémité non-réductrice, assure la croissance du polymère. quand celui-ci atteint ses 8 sucres, l'octasaccharide se lie étroitement à un site carbohydate de la synthase et ainsi commence la synthèse rapide et hautement processive d'un polymère de haut poids moléculaire (Forsee, Cartee and Yother 2006). Néanmoins, si la concentration de l'UDP-GlcUA est insuffisante (Figure 18), l'oligosaccharide lié au phosphatidylglycérol sera incapable d'atteindre la longueur critique de l'octasaccharide, la synthèse de la chaîne se termine et l'oligosaccharide lié au phosphatidylglycérol sera éjecté de la synthase et donc incapable de servir de substrat pour la polymérisation.

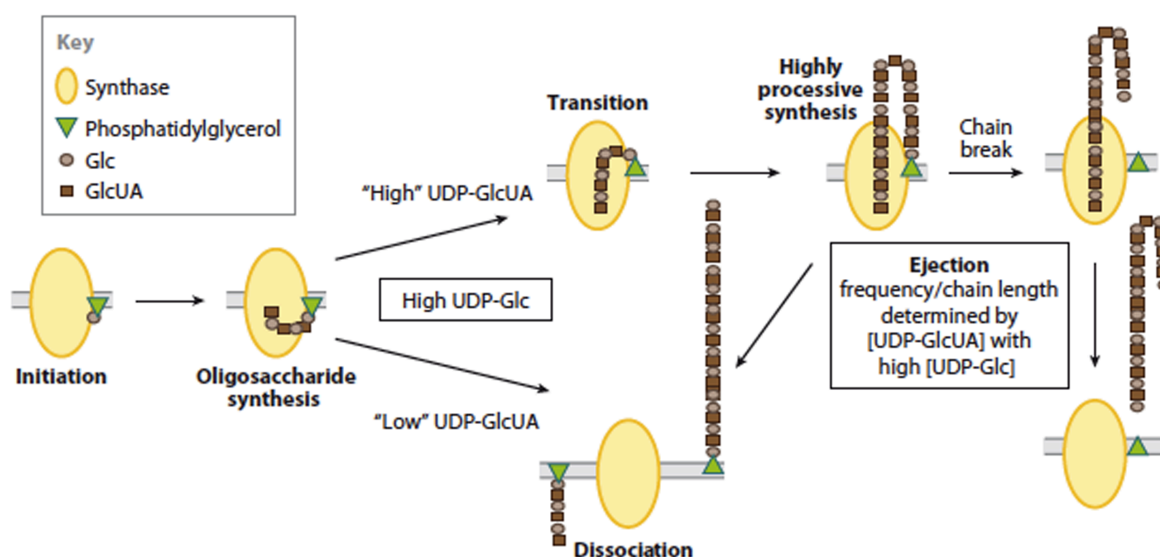


Figure 18. Schéma représentatif de la synthèse des polysaccharidiques via la voie Synthase-dépendante chez les bactéries *S. pneumonia*.

Le schéma est détaillé dans le texte ci-dessus (Yother 2011).

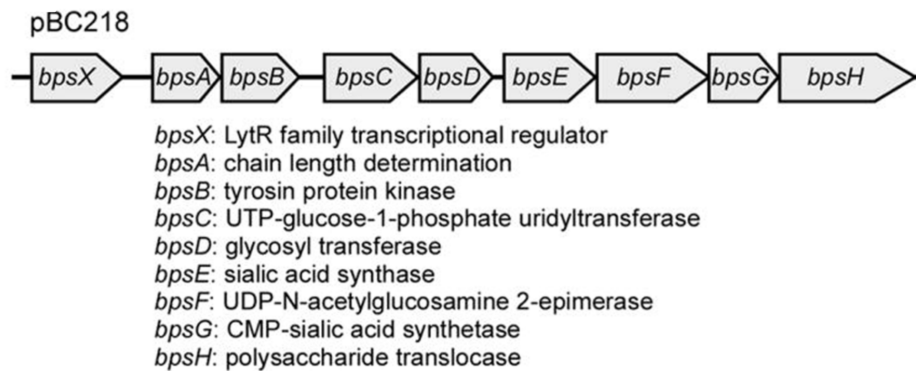
Cependant, la voie de biosynthèse des exopolysaccharides chez *B. cereus*/*B. thuringiensis* n'est pas étudiée jusque là.

C. Les loci « *eps* »

Les enzymes nécessaires pour la synthèse des polysaccharides sont dans la plupart des cas codées par des gènes regroupés en loci chromosomiques et orientés dans la même direction. Ces loci sont nommés généralement *eps* (pour les exopolysaccharides) ou *cps* (pour les polysaccharides capsulaires). Dans certains cas, des loci responsables de la production des polysaccharides sont localisés sur des plasmides comme chez des lactocoques mésophiles (van Kranenburg R 1997), ou chez certaines souches de *B. cereus* (Figure 19) (Oh et al. 2011) (détaillé dans le paragraphe suivant).

Chez *S. pneumonia*, les gènes responsables de la production des polysaccharides sont rassemblés au niveau d'un seul locus, localisés entre deux gènes *dexB* et *aliA* (Bentley et al. 2006b) (Tableau 2). En revanche, la composition de ces loci diffère selon les sérotypes de *S. pneumonia* : certains sérotypes possèdent un locus dont les gènes codent pour les enzymes impliquées dans la voie Wzy-dépendante alors que d'autres possèdent un locus comprenant des gènes codant pour les enzymes impliquées dans la voie synthase-dépendante (Yother 2011). Le locus *cps2* chez la souche *S. pneumonia* D39 est constitué de 17 gènes transcrits sous le contrôle d'un seul promoteur (Guidolin et al. 1994) situé en amont du premier gène *cps2A* de ce locus, un gène potentiellement impliqué dans la régulation de la production capsulaire, similaire au gène *lytR* chez *B. subtilis* (Stingele, Neeser and Mollet 1996).

A



B

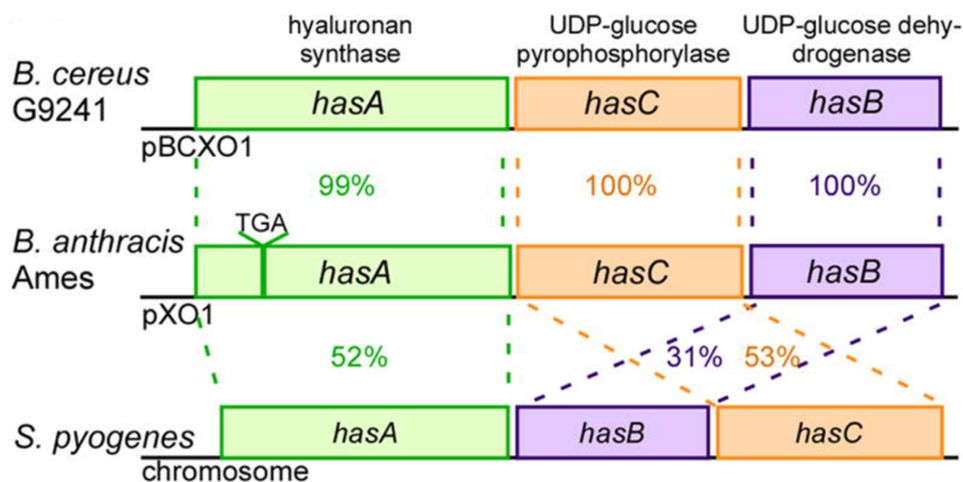


Figure 19. Identification des gènes codant pour la capsule d'acide hyaluronique chez *B. cereus* G9241.

A : Les gènes du locus responsable de la synthèse de exopolysaccharides BPS portés par le plasmide pBC218. Le locus *bpsX-H* comporte 9 gènes dont leur fonction est décrite dans la figure.

B : Organisation génétique du locus *hasACB* chez *B. cereus* G9241, *B. anthracis* Ames et *S. pyogenes*. Schéma adopté et modifié de (Oh et al. 2011).

Chez *B. subtilis*, la composante exopolysaccharide de la matrice est dépendante du locus *epsA-O* composé de 15 gènes, (Irnov and Winkler 2010) et organisé en un seul opéron. L'un des gènes de ce locus, *epsE*, code pour une protéine bifonctionnelle, qui est à la fois une glycosyltransférase appartenant à la famille 2 (Coutinho et al. 2003), et qui est impliquée dans l'inhibition de la mobilité en bloquant la rotation flagellaire (Blair et al. 2008). Quatre gènes (*epsH*, *I*, *J*, et *K*) de ce locus interviennent dans la production de la N-acétyl-galactosamine « PNAG » (Roux et al. 2015).

Chez *P. aeruginosa*, l'exopolysaccharide « Pel » est dépendant du cluster de gènes *pelA-G*. Ceux-ci sont hautement conservés entre les souches de *P. aeruginosa*. La production de

Pel est régulée post-traductionnellement par le second messenger c-di-GMP (di guanosine monophosphate cyclique) (Lee et al. 2007). Chez cette même espèce, l'exopolysaccharide « Psl » est synthétisé par des enzymes codées par les 15 gènes de l'opéron *pslA-O* (Ryder, Byrd and Wozniak 2007). La production de Psl est régulée positivement par le facteur σ RpoS (Irie et al. 2010) et inhibée par le répresseur AmrZ (Jones et al. 2013).

Les gènes impliqués dans la production capsulaire des sérotypes 5 et 9 chez *S. aureus* sont groupés dans une région allant jusqu'à 17,5 kb qui forme le locus *capA-P*. Elle contient 16 gènes très conservés (12 gènes sont pratiquement identiques chez les 2 sérotypes) (O'Riordan and Lee 2004). La capsule de sérotype 1 est dépendante d'un locus de 15 gènes, le locus *capA-O* qui occupe une région de 15,5 kb (O'Riordan and Lee 2004).

Les PIA (Polysaccharides intercellular adhesion) sont synthétisés par des enzymes codées par les gènes du locus *icaADBC*, qui est régulé négativement par IcaR dont le gène *icaR* est situé en amont du gène *icaA* (Cramton et al. 1999). Des gènes orthologues du locus *icaADBC* ont été identifiés chez d'autres agents pathogènes de l'homme tels que *E. coli* (Wang, Preston and Romeo 2004) *Yersinia pestis* (Bobrov et al. 2008) *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Kaplan et al. 2004).

Tableau 2. Tableau regroupant les loci *eps* impliqués dans diverses fonctions chez différentes espèces bactériennes.

Espèces bactériennes	Locus <i>eps</i>	Fonction	Référence
<i>P. aeruginosa</i>	<i>alg</i>	Impliqués dans la formation de la matrice du biofilm.	(Ryder et al. 2007)
	<i>pel</i>		
	<i>psl</i>		
<i>S. aureus</i>	<i>icaADBC</i>	Agrégation, adhésion et interaction cellulaire.	(Oppermann-Sanio and Steinbuchel 2002)
	<i>capA-P</i>	Impliqué dans la virulence bactérienne.	(O'Riordan and Lee 2004)
<i>V. vulnificus</i>	<i>brp</i>	Impliqué dans la formation de la pellicule et la mobilité	(Garrison-Schilling et al. 2014)
	<i>eps</i>	Production d'une capsule polysaccharidique	
<i>B. subtilis</i>	<i>epsA-O</i>	Impliqué dans la formation d'une pellicule rigide et structurée	(Irnov and Winkler 2010)
<i>B. cereus</i>	<i>eps</i>	N'est pas impliqué dans la formation du biofilm (Fonction inconnue).	(Gao et al. 2015)
	<i>bps</i>	Impliqués dans la formation d'une capsule	(Oh et al. 2011)
	<i>hasACB</i>		

Espèces bactériennes	Locus <i>eps</i>	Fonction	Référence
<i>E. coli</i>	<i>cps/kps</i> (dépend du groupe)	Production d'une capsule polysaccharidique et l'acide colanique	(Whitfield 2006)
	<i>bcsQABZC</i>	Production de la cellulose impliquée dans la formation de la matrice	
	<i>pgaABCD</i>	Production de poly- β -D- <i>N</i> -acétylglucosamine	
<i>S. pneumonia</i>	<i>cps2</i>	Responsable de la production d'une capsule	(Yother 2011)
<i>M. xanthus</i>	<i>epsA-Z</i>	Production des exopolysaccharides impliqués dans le swarming bactérien.	(Lu et al. 2005)
<i>B. anthracis</i>	<i>capBCADE</i>	Production d'une capsule d'acide poly- γ -D-glutamate	(Makino et al. 1989)

❖ Tyrosine Kinase :

Les loci *eps* contiennent souvent des gènes dont le produit intervient dans une régulation post-traductionnelle de la production du polysaccharide. Cette régulation post-traductionnelle est effectuée à l'aide d'une tyrosine kinase (BY-kinase pour bacterial tyrosine kinase) dont la cible est l'un des enzymes impliqué dans la biosynthèse du polysaccharide (Grangeasse, Nessler and Mijakovic 2012, Grangeasse, Terreux and Nessler 2010, Grangeasse et al. 2007). Chez les bactéries Gram positives, les BY-kinases sont associées à deux autres composants localisés au niveau de la membrane cytoplasmique. L'un d'eux est le modulateur, une protéine membranaire

avec deux domaines transmembranaires, un domaine extracellulaire et un domaine cytoplasmique C-terminal. La fonction présumée du modulateur est d'activer la BY-kinase et de déterminer la longueur des chaînes polysaccharidiques. Le deuxième composant associé à la BY-kinase est une phosphatase, qui peut déphosphoryler la BY-kinase et moduler son activité. L'activité catalytique des BY-kinases est située dans la partie N-terminale de la protéine, qui possède également un cluster de deux à sept résidus tyrosine dans son domaine C-terminal qui sont des sites d'autophosphorylation (Figure 20) (Grangeasse et al. 2012). Ce système est impliqué dans la régulation de la production des polysaccharides. Chez *E. coli* les BY-kinases Wzc et Etk stimulent la production de deux types de polysaccharides capsulaires (groupe I et groupe IV) par phosphorylation d'une uridine diphosphate (UDP)-sucre déshydrogénase impliquées dans leurs voies biosynthétiques respectives (Wugeditsch et al. 2001, Grangeasse et al. 2003, Lacour et al. 2008). Chez *S. pneumoniae* (Grangeasse et al. 2007, Jadeau et al. 2008, Elsholz, Wacker and Losick 2014), le niveau de phosphorylation de la BY-kinase CpsD influence la quantité de la capsule formée (Morona et al. 2003) et l'ampleur de l'attachement de la capsule à la paroi bactérienne (Morona, Morona and Paton 2006). De même, le complexe EpsC-EpsD (modulateur + BY-kinase) chez *S. thermophilus* phosphoryle une phosphogalactoglycosyltransférase (EpsE) impliquée dans les étapes précoces de la biosynthèse des polysaccharides (Minic et al. 2007). Chez *B. subtilis*, la BY-kinase EpsB phosphoryle la glycosyltransférase EpsE (Elsholz et al. 2014) et EpsA, le modulateur de EpsB, est activé par les polysaccharides dont la production est dépendante de *epsA-O*, ce qui conduit à une rétroaction positive. Une rétroaction positive des exopolysaccharides sur leur propre production a aussi été décrite chez *P. aeruginosa*, concernant Psl (Irie et al. 2012), mais celle-ci fait intervenir le second messenger c-di-GMP, sachant que *P. aeruginosa* ne possède aucun membre de la famille des tyrosines kinases (Jadeau et al. 2012).

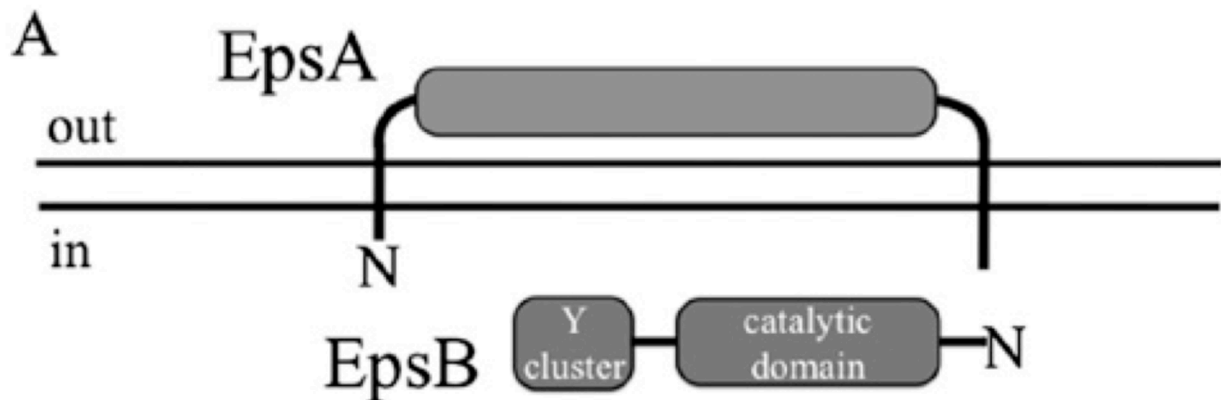


Figure 20. Schéma représentant la disposition de la protéine EpsA dans la membrane et la protéine EpsB (tyrosine kinase) chez *B. subtilis*.

EpsA est une protéine membranaire constituée de deux domaines transmembranaires et un domaine extracellulaire. La tyrosine kinase EpsB, est une protéine cytoplasmique possédant dans sa partie N-terminale, le domaine à l'activité catalytique et un cluster qui est un site d'autophosphorylation, se trouve dans la partie N-terminale de la protéine (Elsholz et al. 2014).

D. La capsule polysaccharidique

La capsule forme la structure la plus externe de l'enveloppe bactérienne. Les bactéries encapsulées sont le plus souvent des bactéries pathogènes (Robbins et al. 1980, Goller and Seed 2010, Oh et al. 2011, Morona et al. 2006, Morona et al. 2004, Briles et al. 1992), du fait que la capsule favorise la protection des bactéries contre la phagocytose et le système immunitaire de l'hôte (Whitfield 2006). La capsule est considérée comme étant un mécanisme de défense et une couche protectrice pour résister aux changements environnementaux (Islam and Lam 2013). En plus, elle joue un rôle dans l'interaction des bactéries avec leur environnement. Les capsules sont souvent composées de polysaccharides de masse moléculaire élevée (CPS) qui sont fermement ancrées à la paroi bactérienne. Elles sont impliquées dans la modulation des divers phénotypes microbiens comme la formation des biofilms. Elles confèrent une protection contre la dessiccation (Ophir and Gutnick 1994), favorisent, dans certains cas, l'adhésion sur plusieurs surfaces, y compris les bactéries entre elles et favorisent ainsi la formation des microcolonies (Costerton, Irvin and Cheng 1981). De même, elles déterminent l'accès des molécules et des ions à la membrane cytoplasmique (Costerton and Irvin 1981).

Les *Pseudomonas* forment une capsule polysaccharidique à base de Levan qui les protège contre l'action des bactériophages et contre la dessiccation (Paton 1960). En plus, la présence d'une capsule polysaccharidique affecte la morphologie des colonies

de certaines espèces bactériennes (Enos-Berlage and McCarter 2000, Gilbert 1931). *Vibrio vulnificus* produit une capsule polysaccharide qui contribue à la pathogénicité de cette espèce puisqu'elle lui assure la protection contre la phagocytose (Gulig, Bourdage and Starks 2005). En revanche, les souches de *V. vulnificus* ne sont pas toutes encapsulées, ce qui se répercute sur la morphologie des colonies au niveau de leur degré d'opacité. Chez *Vibrio parahaemolyticus*, l'opacité et par conséquent la production de la capsule est régulée par le locus *opaR*. Ce locus contient un gène de régulateur transcriptionnel *opaR*, similaire à *luxR* chez *Vibrio harveyi* (McCarter 1998).

Les capsules polysaccharidiques sont impliquées dans les interactions hôte-bactérie que ce soit chez les bactéries commensales ou pathogènes. Chez *S. pneumoniae*, les souches capsulées sont pathogènes et produisent 93 sérotypes de capsule polysaccharidiques distinctes (Bratcher et al. 2010, Henrichsen 1995, Geno et al. 2015). Ces polymères sont des antigènes de surface, servant dans la virulence, en fonction de l'organisme qui les produits. En outre, *S. aureus*, qui fait partie des pathogènes produisant une capsule, est séparé en 13 sérotypes différents (von Eiff et al. 2007, Arbeit et al. 1984).

Contrairement à la plupart des espèces bactériennes, *B. anthracis* produit une capsule peptidique, constituée d'acide poly- γ -D-glutamate (PDGA). Ceci est rare chez le genre *Bacillus*. Cependant, certaines espèces y compris, *B. subtilis*, *Bacillus megaterium* et *Bacillus licheniformis* et certaines bactéries Gram négatives synthétisent des polymères d'acide glutamique liés par des liaisons γ qui sont sécrétés dans le milieu extérieur et non organisés en capsule (Tomcsik 1956, Candela et al. 2009). La taille des polymères d'acide glutamique dépend largement des conditions de croissance. Le plasmide pXO2 chez *B. anthracis* porte trois gènes, *capB*, *capC* et *capA* responsables de la production de la capsule (Makino et al. 1989). Ces gènes sont des paralogues respectifs de PgsB, PgsC et PgsA chez *B. subtilis natto*. Des études plus détaillées du locus *cap* indiquent la présence d'un 4ème gène, *capD*, initialement appelé *dep* (Uchida et al. 1993) et d'un 5ème gène appelé *capE* (Candela, Mock and Fouet 2005), disposés dans un opéron avec *capB*, *capC* et *capA*.

A noter que la souche *B. cereus* G9241 serait à l'origine de la maladie anthrax-like similaire à l'anthrax causée par *B. anthracis*. La pathogénicité de cette souche est due à deux plasmides virulents pBCX01 et pBC218. Le plasmide pBCX01 présente les gènes *pagA1*, *lef1* et *cya1* qui codent pour la toxine anthrax et en plus le locus *hasACB* (Figure

19) dont les gènes codent pour l'acide hyaluronique (HA). Le plasmide pBC218 porte l'opéron *bpsX-H* (Figure 19) dont les gènes codent pour les exopolysaccharides (BPS). Sachant que, *B. cereus* G9241 produit une large capsule composée de deux polysaccharides, BPS et l'acide hyaluronique (HA) (Figure 21). Malgré, l'homologie entre le plasmide pXO1 et pBCXO1, plus précisément au niveau des loci *hasACB* (Figure 19), aucune capsule d'acide hyaluronique a été détectée chez la souche *B. anthracis* Ames (Oh et al. 2011). Du fait que, le gène *hasA* chez *B. anthracis* présente une délétion d'un nucléotide, ce qui déplace le cadre de lecture et introduit ainsi un codon TGA (Figure 19). Lors de l'infection, la capsule à deux composantes (BPS et HA) permet à la souche G9241, d'échapper à la phagocytose et ceci renforce l'aspect pathogène de la maladie anthrax-like (Oh et al. 2011). La présence d'une capsule composée d'acide hyaluronique a été rapportée chez *Streptococcus pyogenes* permettant à cette dernière de résister contre la réponse immunitaire de l'hôte (Kendall, Heidelberger and Dawson 1937).

E. coli produit 80 sérotypes différents de la capsule polysaccharidique à l'antigène K, qui sont classés en quatre groupes (1, 2, 3 et 4) en fonction des critères sérologiques, génétiques et biochimiques. Les capsules polysaccharidiques du groupe 1 sont généralement composées d'acides uroniques, qui partagent des similitudes avec les capsules de *Klebsiella pneumoniae*. La composition des CPS du groupe 4 est plus diversifiée et elle se distingue du groupe 1 par la présence de sucres acétamides au niveau des unités répétées. Les mécanismes de biosynthèse et d'assemblage de la capsule des groupes 1 et 4 semblables et se font à travers la voie de Wzy-dépendant. En revanche, la composition de la capsule des groupes 2 et 3 varie considérablement : certaines contiennent des résidus phosphate, rappelant les acides teichoïques chez les bactéries Gram positives et sont synthétisées via la voie ABC transporteur-dépendante (Whitfield 2006).

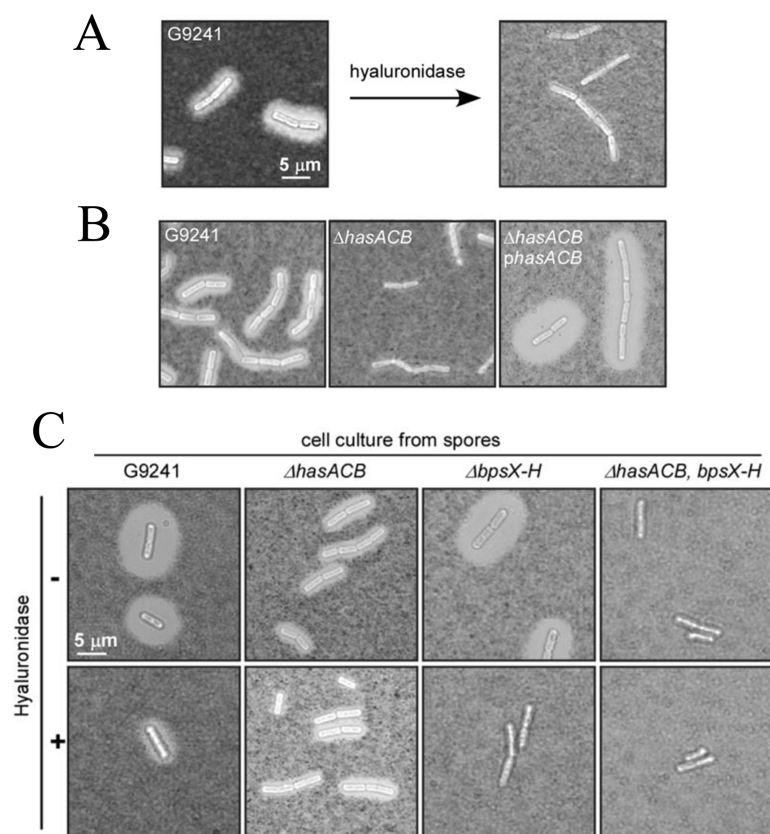


Figure 21. Effet de la délétion de chacun de deux loci, *bps* et *hasACB* sur la production capsulaire chez *B. cereus* G9241.

A. La capsule de l'acide hyaluronique produite par la souche *B. cereus* G9241. *B. cereus* est cultivé pendant la nuit et puis cette culture a été rafraîchie dans HIB_{FBS} (Milieu heart infusion broth contenant 50% (vol/vol) du sérum heat-inactivation fetal bovine), incubé pendant 4 heures à 37 °C puis la culture est traitée avec 200 unités de hyaluronidase pendant 2 heures. La capsule a été visualisée par microscopie après la coloration par l'encre de l'Inde.

B. Le locus *hasACB* est requis pour la production de la capsule par *B. cereus* G9241. La complémentation par un plasmide portant l'opéron *hasACB* rétablit la production de la capsule dans le mutant $\Delta hasACB$. Les bactéries ont été traitées comme décrit dans (B).

C. Observation microscopique de la capsule produite par la souche sauvage et les souches mutantes $\Delta hasACB$, $\Delta bpsX-H$ et le $\Delta hasACB \Delta bpsX-H$ chez *B. cereus* G9241. Schéma adopté et modifié de (Oh et al. 2011).

1. Ancrage des polymères aux peptidoglycanes

Généralement, les polymères synthétisés sont soit sécrétés dans le milieu extracellulaire, soit ancrés à la paroi bactérienne pour former la capsule polysaccharidique. Chez les bactéries Gram positives, cet ancrage des polysaccharides à la paroi peut être réalisé par une protéine appartenant à la famille LCP (Eberhardt et al. 2012, Chan et al. 2014). Cette famille comporte trois protéines Cps2A, Psr et LytR (Figure 22).

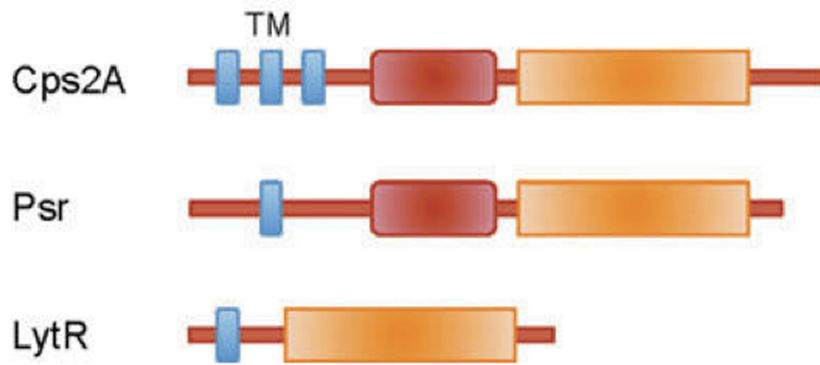


Figure 22. Schéma montrant la famille protéique LCP chez *S. pneumoniae*

La protéine Cps2A possède trois domaines transmembranaires (indiqués en bleu) tandis que Psr et LytR possèdent uniquement un seul domaine. Les domaines LCP sont schématisés par les rectangles orange. Cps2A et Psr possèdent un domaine en plus, représenté par un rectangle rouge. Schéma adopté et modifié de (Eberhardt et al. 2012).

Ces dernières catalysent le transfert des chaînes de polysaccharides, ou des acides teichoïques liés à l'undécaprényle phosphate, à l'acide N-acétylmuramique du peptidoglycane de la paroi, via des liaisons phosphodiester (Kawai et al. 2011). Les gènes codant pour les protéines LCP sont très répandus chez les bactéries Gram positives et souvent présents en plusieurs copies (Hubscher et al. 2008). Par exemple, il existe chez *B. anthracis*, six enzymes LCP (*lcpB1*, 2, 3 et 4, *lcpC* et *lcpD*), impliquées dans l'ancrage des SCWPs au niveau l'enveloppe bactérienne (Liszewski Zilla et al. 2015b).

Chez les Streptocoques, la protéine Cps2A est impliquée dans le transfert et l'ancrage de la chaîne polysaccharidique de l'Und-P aux peptidoglycanes. La délétion de ce gène entraîne la libération de la chaîne polysaccharidique dans le milieu extérieur (Eberhardt et al. 2012). Comme mentionné précédemment, cette protéine est similaire à LytR chez *B. subtilis*. LytR, appartenant à la famille LCP, qui a été suggérée d'être impliquée dans la régulation de la production polysaccharidique. Cependant, Kawai et al (Kawai et al. 2011) ont démontré que les protéines LCP ne sont pas impliquées dans la régulation, ce sont en effet des phosphotransférases catalysent une des dernières étapes de l'assemblage de la paroi bactérienne, ainsi que la fixation de polymères anioniques à la paroi bactérienne, comme les polysaccharides capsulaires et les acides teichoïques des peptidoglycanes.

Chez *B. subtilis*, parmi les gènes codant pour les protéines de la famille LCP, se trouvent les gènes du locus *tagTUV*. La délétion de ces derniers entraîne une perte des WTAs (acides teichoïques attachés à la paroi) (Kawai et al. 2011). De façon similaire, les gènes *lcpABC* chez *S. aureus* interviennent dans l'attachement des acides teichoïques à la paroi

bactérienne (Chan et al. 2013). La protéine LcPC est aussi impliquée dans l'ancrage des CPS à la paroi bactérienne mais cette dernière peut être en partie remplacée dans cette fonction par les protéines LcpA et LcpB (Chan et al. 2014).

2. Pouvoir pathogène lié à la capsule polysaccharidique

Chez les humains et chez les animaux, la première réaction de défense contre les agents pathogènes est le système immunitaire inné, y compris les composants du complément, les phagocytes et les peptides antimicrobiens sécrétés (PAMs). Ces molécules se trouvent dans le sang, dans de nombreux tissus et sur toutes les surfaces des muqueuses. Les capsules permettent aux bactéries de s'échapper du système immunitaire inné à plusieurs niveaux en mettant en jeu des interactions au niveau de la surface bactérienne avec les composants de ce système. Ainsi, les bactéries capsulées permettent de prévenir soit l'opsonophagocytose, ou bien chez les bactéries Gram négatives, la lyse par médiation du complément. L'interaction de la capsule avec le système immunitaire de l'hôte affecte largement la réussite de l'infection (Roberts, Saunders and Boulnois 1989).

Les Streptocoques peuvent être à l'origine des maladies systémiques en mettant en place plusieurs stratégies de survie dans l'organisme hôte (Figure 23). Par exemple, les capsules limitent la fixation du complexe des compléments C3b/iC3b sur la surface des bactéries. Une autre stratégie, adoptée par *S. pneumonia* implique une capsule de charge négative qui repousse électrostatiquement les macrophages phagocytaires et les neutrophiles qui sont également chargés négativement (Hyams et al. 2010), en plus, la capsule peut inhiber stériquement les interactions ligand-récepteur avec les composants de surface pneumococciques (Magnusson 1989) et par conséquent, la reconnaissance des antigènes spécifiques par les anticorps produits par l'hôte (Hyams et al. 2010, Hardy et al. 2001). La colonisation de *S. pneumoniae* dans la cavité nasopharyngée nécessite une interaction avec les cellules hôtes où la capsule joue deux rôles contradictoires. Elle permet d'échapper au système immunitaire de l'hôte mais limite la capacité de la bactérie à coloniser le milieu (Bender, Cartee and Yother 2003, Magee and Yother 2001, Kim and Weiser 1998). Ceci est attribué à la charge nette ainsi qu'à la possibilité réduite des adhésines bactériennes d'interagir avec leurs ligands sur la surface de la cellule hôte. Dans le cas des pneumonies et des bactériémies, une production élevée de capsule est essentielle pour éviter l'opsonophagocytose (Hardy et

al. 2001, Magee and Yother 2001, Mac and Kraus 1950, Avery and Dubos 1931). De même, chez *P. aeruginosa*, la capsule protège contre l'attaque des bactériophages et peut aussi prévenir contre la dessiccation (Paton 1960).

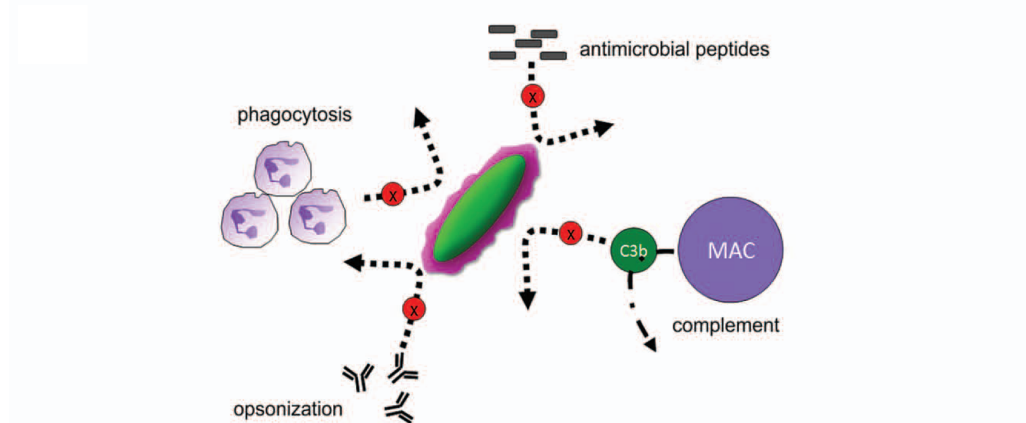


Figure 23. Les mécanismes d'échappement des bactéries au système immunitaire fournis par la capsule polysaccharidique.

Lors d'une infection, la capsule polysaccharidique protège le pathogène des réponses immunitaires innées et adaptative, y compris l'opsonisation, la phagocytose et empêche l'action des protéines du système de complément (C3b) (Goller and Seed 2010).

Certains sérotypes capsulaires confèrent à *S. aureus* une résistance à l'activité opsonophagocytaire des leucocytes polymorphonucléaires humains (Arizono, Umeda and Amako 1991, Lee et al. 1987, Verbrugh et al. 1982, Wilkinson 1983). La capsule couvre la paroi bactérienne et par conséquent couvre les composants et les antigènes de la paroi bactérienne (Verbrugh et al. 1982, Wilkinson 1983) et empêche ainsi le dépôt du complément C3b sur la surface des bactéries et son interaction avec les anticorps spécifiques de la paroi bactérienne.

En plus, la capsule polysaccharide confère aux bactéries une résistance aux PAMs chez différentes espèces, notamment chez *S. epidermidis* (Kocianova et al. 2005), *S. pneumonia* (Shenoy and Orihuela 2016) et *K. pneumoniae* (Campos et al. 2004) en agissant comme une « éponge » pour séquestrer et neutraliser les PAMs (Llobet, Tomás and Bengoechea 2008). Ceci est décrit uniquement dans le cas des capsules acides.

Les souches uropathogéniques d'*E. coli* (UPEC) produisent des capsules des groupes 2 et 3, qui assurent leur persistance en s'échappant aux neutrophiles et causent ainsi des infections des voies urinaires (Tableau 3) (Goller and Seed 2010).

In vivo, chez *B. anthracis* les mutants *cap* incapables de synthétiser la capsule, ont, selon le modèle utilisé, une virulence plus ou moins atténuées (Welkos 1991). Le mécanisme

par lequel la capsule inhibe la phagocytose n'est pas encore établi en ses détails chez *B. anthracis*. La capsule peut bloquer les activités bactéricides des produits sécrétés à partir des neutrophiles et de certains peptides cationiques, y compris les défensines α et β .

Certaines sérotypes capsulaires confèrent à *S. aureus* une résistance à l'activité opsonophagocytaire des leucocytes polymorphonucléaires humains (Arizono et al. 1991, Lee et al. 1987, Verbrugh et al. 1982, Wilkinson 1983). La capsule couvre la paroi bactérienne et par conséquent couvre les composants et les antigènes de la paroi bactérienne (Verbrugh et al. 1982, Wilkinson 1983) et empêche ainsi le dépôt du complément C3b sur la surface des bactéries et son interaction avec les anticorps spécifiques de la paroi bactérienne.

En plus, la capsule polysaccharide confère aux bactéries une résistance aux peptides antimicrobiens (PAMs) chez différentes espèces, notamment chez *S. epidermidis* (Kocianova et al. 2005), *S. pneumonia* (Shenoy and Orihuela 2016) et *K. pneumoniae* (Campos et al. 2004) en agissant comme une « éponge » pour séquestrer et neutraliser les PAMs (Llobet et al. 2008). Ceci est décrit uniquement dans le cas des capsules acides. Les souches uropathogénique d'*E. coli* (UPEC) produisent des capsules des groupes 2 et 3, qui assurent leur persistance en s'échappent aux neutrophiles et causent ainsi des infections des voies urinaires (Tableau 3) (Goller and Seed 2010).

Tableau 3. Infections causées par la capsule polysaccharidique chez *E. coli*.

Capsule polysaccharidique à antigène K	Groupe 1 et 4	Groupe 2 et 3
	Cause des infections intestinales (ETEC, EHEC, EPEC).	Cause des infections extra-intestinales (ExPEC).

E. Les exopolysaccharides

L'utilisation de la microscopie confocale à balayage laser avec des lectines fluorescentes ou des anticorps spécifiques a permis de révéler la présence des exopolysaccharides parmi les substances polymériques extracellulaires (EPS) de la matrice du biofilm (Lawrence et al. 2007).

Chez *E. coli*, trois exopolysaccharides sont impliqués dans la formation des agrégats cellulaires et la formation des biofilms sur des surfaces abiotiques: la cellulose constituée de monomères de (1-4)- β -glucane (Zogaj et al. 2001), l'exopolysaccharide PNAG composé d'unités de (1-6)- β -Glc-NAc, similaire à un polymère produit par les

Staphylococcus (Jann and Jann 1992) et l'acide colanique (Whitfield 2006). Par ailleurs, *P. aeruginosa* produit au moins 3 exopolysaccharides distincts qui contribuent au développement du biofilm et à maintenir son architecture: le polysaccharide Pel, l'alginate et le Psl (Figure 24). L'alginate est un hétéropolymère, à haute masse moléculaire, produit uniquement par les souches mucoïdes suite à une mutation dans le gène codant pour un régulateur négatif *mucA* (Bravo et al. 1993). Ce sont des résidus de β -D-mannuronate et de l' α -L-guluronate liés par des liaisons β -1-4. L'alginate est responsable du phénotype mucoïde, impliqué dans l'établissement de micro-colonies pendant les phases précoces de la formation des biofilms, mais il est également responsable de la stabilité mécanique des biofilms matures et il contribue également à la persistance et l'établissement des infections pulmonaires chroniques (Ryder et al. 2007). Cependant, les souches non-mucoïdes n'expriment pas les gènes de biosynthèse d'alginate mais produisent deux autres exopolysaccharides impliqués dans l'établissement des biofilms, Pel et Psl. Pel est un polymère riche en glucose, indispensable pour le développement de la pellicule à l'interface air-liquide. Psl est un polymère constitué d'une répétition de pentasaccharide de D-mannose, D-glucose et de L-rhamnose (Figure 24) impliqués dans l'adhésion sur les surfaces biotiques et abiotiques, la maintenance de l'architecture du biofilm et l'interaction cellulaire (Colvin et al. 2012, Ryder et al. 2007).

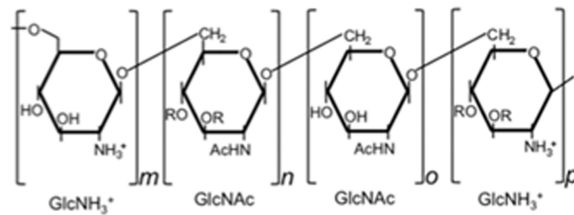
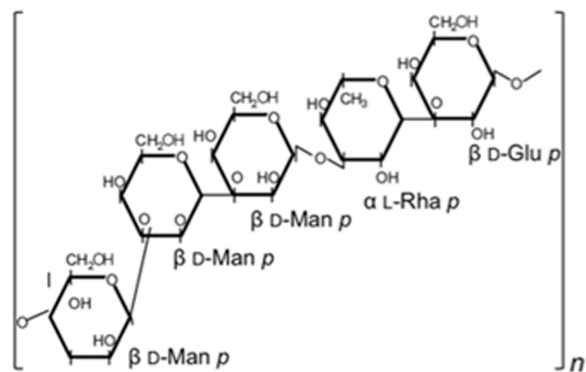
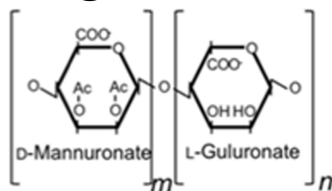
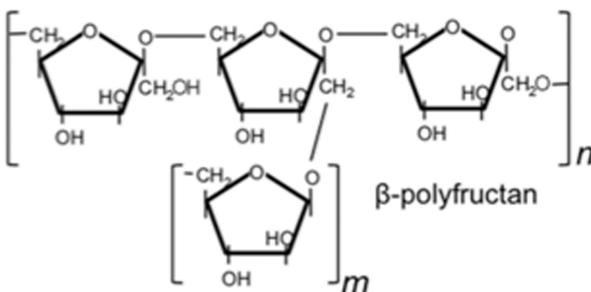
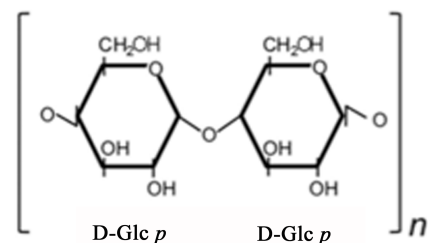
PIA**Psl****Alginate****Levan****Cellulose**

Figure 24. Schéma représentant les structures chimiques des exopolysaccharides bactériens.

Schéma adopté et modifié de (Limoli, Jones and Wozniak 2015).

Récemment, il a été montré que le fer favoriserait la formation du biofilm de *P. aeruginosa* (Yu et al. 2016) en améliorant la production des polymères Psl, en inhibant le répresseur AmrZ et aussi en réduisant la production des rhamnolipides qui rentrent en compétition avec les exopolysaccharides puisqu'ils partagent les mêmes sucres précurseurs dans leur voie de biosynthèse (Figure 25).

S. epidermidis et *S. aureus* synthétisent des polysaccharides adhésifs (Polysaccharides intercellular adhesion PIA) qui favorisent l'agrégation, l'adhésion et l'interaction cellulaire (Mack et al. 1996, Gotz 2002, Vanningelgem et al. 2004). Chez *Streptococcus mutans*, les exopolysaccharides assurent des sites d'interaction entre les microcolonies et peuvent être considérés comme un caractère de virulence, en plus de leur rôle dans la protection contre les agressions extérieures (Xiao et al. 2012).

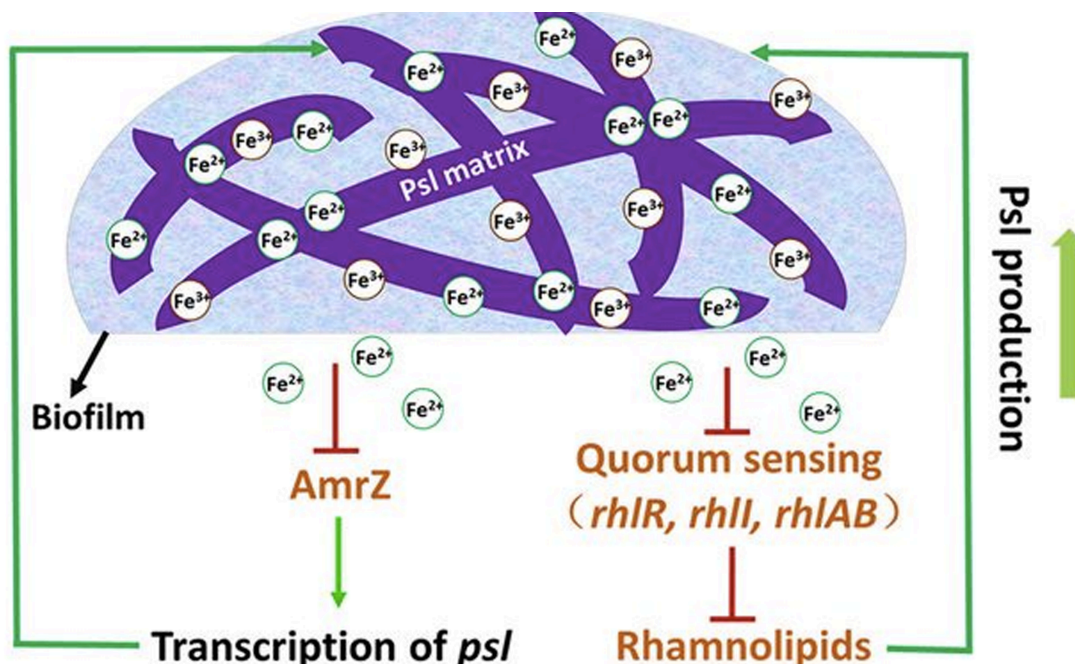


Figure 25. Un schéma illustrant les mécanismes de l'interaction Fer-Psl chez *P. aeruginosa*.

Les ions de fer (Fe^{3+} et Fe^{2+}) sont séquestrés et stockés dans les chaînes polysaccharidiques de Psl. Le fer peut stimuler la production de Psl en inhibant l'expression AmrZ et en réduisant la synthèse des rhamnolipide et donc améliorer la formation de biofilm (Yu et al. 2016).

Chez *B. subtilis*, les exopolysaccharides les plus étudiés sont le levan de type I et II (Figure 24). Le levan de type I est constitué d'unités de D-fructose liées par des liaisons de type β -2,6, tandis que le levan de type II est composé d'un polymère de fructose avec un résidu de glucose lié fructose terminal par des liaison α -glycosidique (Marvasi, Visscher and Casillas Martinez 2010). Les levans sont synthétisés à l'extérieur de la bactérie suite à l'exportation d'une enzyme extracellulaire, la levansucrase (Marvasi et al. 2010, Li and Ullrich 2001, El-Refai, Abdel-Fattah and Mostafa 2009). Néanmoins, la majorité des exopolysaccharides contribuant à la formation de la matrice du biofilm, est codée par le locus *epsA-O* (Irnov and Winkler 2010) qui code pour des enzymes responsables de la production des composés de glucose, du galactose et du PNAG (Chai et al. 2012, Roux et al. 2015). La délétion de ce locus entraîne une réduction de sucres de la matrice et une perte de l'architecture de la pellicule formée à l'interface air-liquide donnant un biofilm fragile non structuré (Figure 26) (Branda et al. 2006, Branda et al. 2005, Lemon et al. 2008).

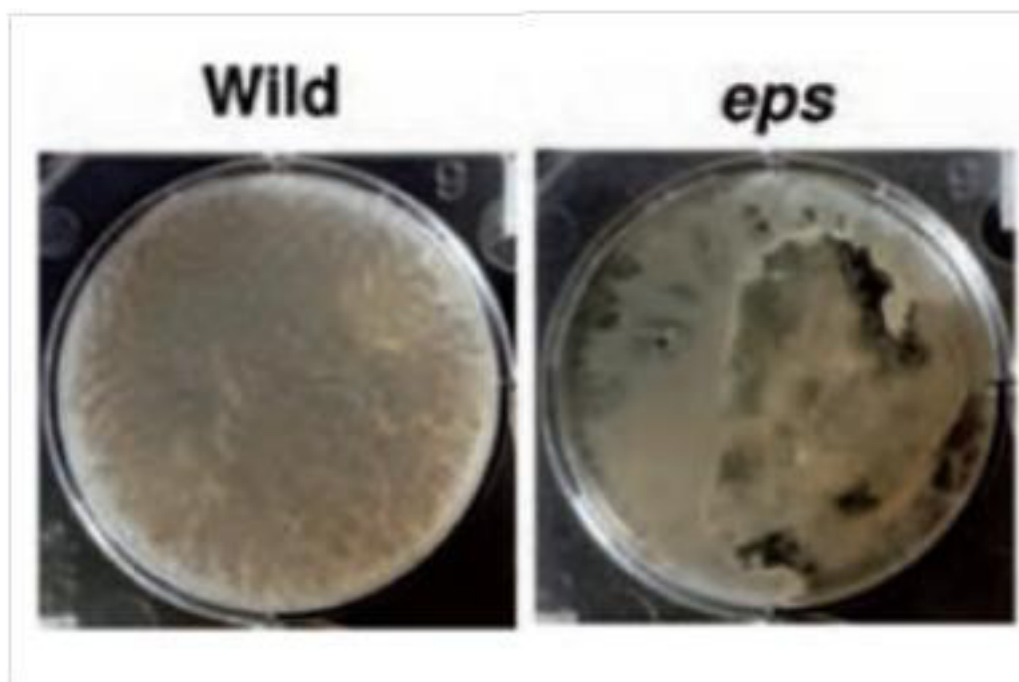


Figure 26. Un biofilm formé par le mutant *epsA-0* comparé à la souche sauvage chez *B. subtilis*.

(Branda et al. 2006).

En revanche, chez *Listeria*, la surproduction des polysaccharides donne un biofilm lisse, dépourvu d'anfractuosités et incapable d'intégrer de nouvelles bactéries (Habimana et al. 2009). Certaines espèces du genre *Alteromonas*, des bactéries marines produisent des exopolysaccharides qui sont utilisés comme biomatériau de comblement osseux (Zanchetta, Lagarde and Guezennec 2003). Chez *B. cereus*, la délétion du locus *eps* (Ivanova et al. 2003) le seul locus comparable au locus *epsA-0* de *B. subtilis*, n'affecte pas la formation du biofilm chez cette espèce (Gao et al. 2015).

Les exopolysaccharides sont impliqués également dans la modulation de la mobilité bactérienne (Bazaka et al. 2011). Les exopolysaccharides ont la capacité d'agir en tant que 'lubrifiant' et participent ainsi au processus de « swarming » bactérien. Ils favorisent également la communication intercellulaire nécessaire au swarming en stabilisant les contacts entre les bactéries (Harshey 2003, Rahman et al. 1999, Branda et al. 2001). Le « swarming » se définit comme un mouvement de masse bactérien sur une surface solide. Les biofilms et le « swarming » sont tous les deux considérés comme étant des communautés multicellulaires associées à la surface. Chez certaines espèces, le « swarming » est considéré comme étant un biofilm sur l'interface air-solide (Branda et al. 2001). Il possède des similarités avec le biofilm, comme le changement de morphologie, la production des surfactines, ainsi que plusieurs facteurs de régulation en

commun (Kobayashi 2007a). Chez *B. subtilis*, les exopolysaccharides participent majoritairement à la formation des biofilms mais aussi au swarming des bactéries sur les surfaces solides (Figure 27) (Nagorska et al. 2010).

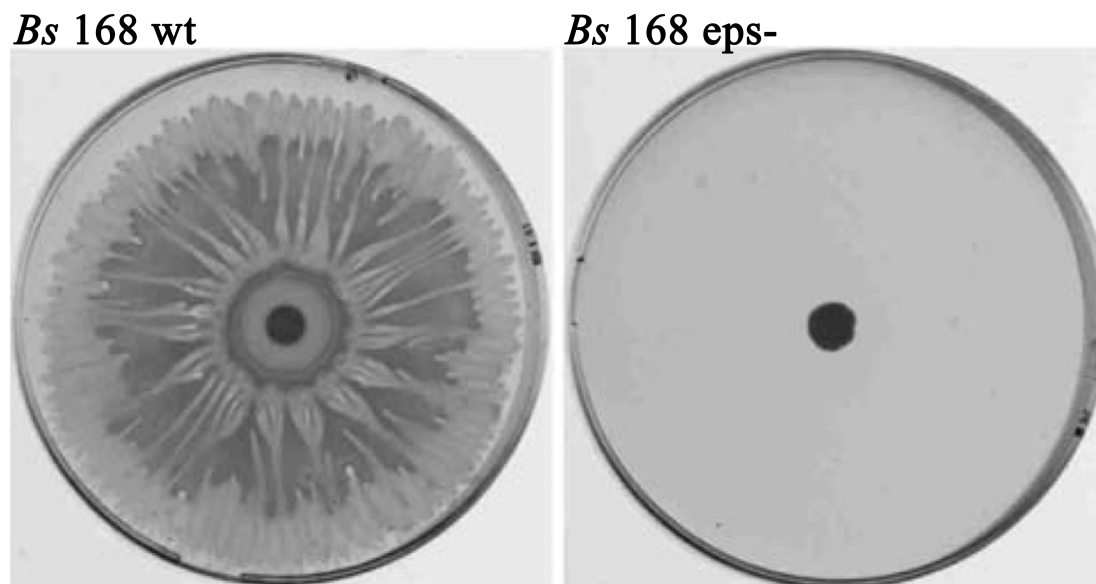


Figure 27. Un essai de "swarming" observé chez *B. subtilis* Δ *epsA-O* comparé à la souche sauvage.

Les essais sont faits sur des boîtes de pétri contenant 25 mL du L milieu LB à 0,7 % d'agar, incubé à 30 °C pendant 24 h (Nagorska et al. 2010).

La production des exopolysaccharides et de lipopolysaccharides et en particulier la présence l'antigène O, sont requis pour la mobilité active et le swarming chez plusieurs espèces Gram négatives, notamment chez *E. coli*, *Vibrio cholerae*, *Salmonella enterica* et *Myxococcus xanthus* (Wang et al. 2004, Toguchi et al. 2000, Bowden and Kaplan 1998, Brown and Hase 2001, Lu et al. 2005). Les exopolysaccharides sont également impliqués dans la formation de longues chaînes de bactéries (Nagorska et al. 2010) (Figure 28) en jouant un rôle de « ciment » qui renforce les interactions cellule-cellule, cellule-surface.

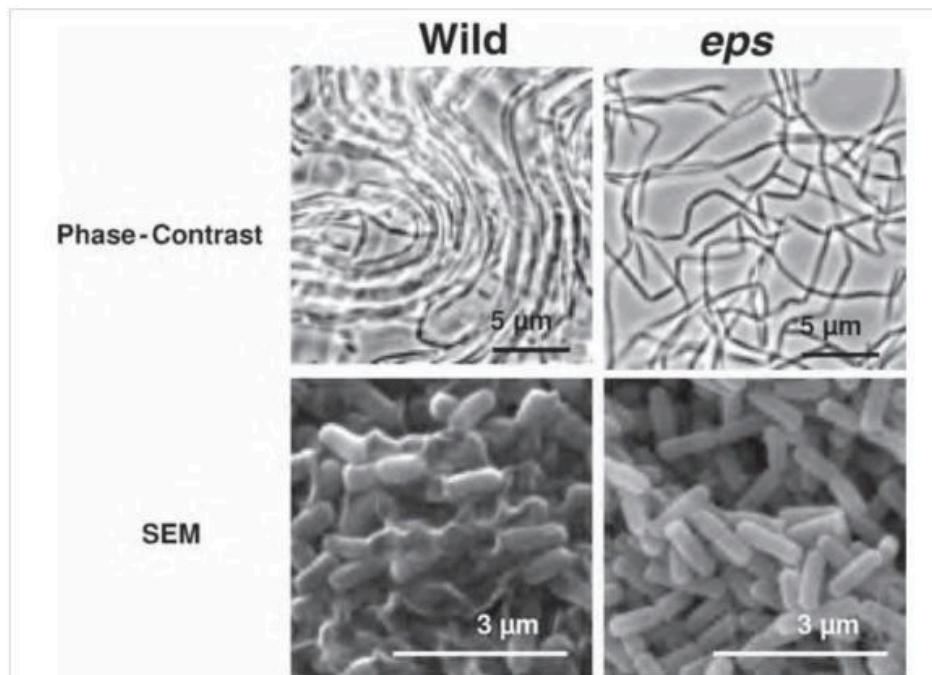


Figure 28. Les chaînettes présentes dans le biofilm de la souche sauvage comparées à la souche $\Delta epsA-O$ de *B. subtilis*.

(Lemon et al. 2008).

Une nouvelle fonction attribuée aux exopolysaccharides a été récemment observée chez *P. aeruginosa*. Elle produit des exopolysaccharides, plus spécifiquement Psl capable de chélater le fer qui sera réutilisable en cas de carence en Fer dans le milieu (Yu et al. 2016) (Figure 25). Ce mécanisme est une nouvelle fonction biologique que possèdent les exopolysaccharides bactériens, considérés ainsi comme étant une nouvelle stratégie pour contourner le stress chez *P. aeruginosa*. Plus largement, on peut considérer que la matrice constitue une réserve de nutriments en cas de carence. Par ailleurs, chez les bactéries lactiques certains exopolysaccharides possèdent un effet prébiotique (Caggianiello, Kleerebezem and Spano 2016). Dans certains cas, les exopolysaccharides augmentent la viscosité de l'environnement qui héberge les bactéries (Caggianiello et al. 2016) ce qui est important pour certaines industries agroalimentaires (Yaourt).

Objectifs

Le locus *eps* homologue du locus *epsA-O* de *B. subtilis* chez les bactéries du groupe *B. cereus* avait fait l'objet il y a plusieurs années, d'une étude au laboratoire « Génétique Microbienne et Environnement » (GME). Son rôle dans la formation des biofilms avait alors été décrit comme étant marginal, ce qui a été confirmé très récemment (Gao et al. 2015). La question, d'une part de la fonction de ce locus dans la physiologie de la bactérie, d'autre part de la nature des gènes impliqués dans la formation de la matrice du biofilm chez cette bactérie, était dès lors posée. Un effet de la délétion du locus *eps* sur le recrutement de bactéries planctoniques par le biofilm avait été observé, ouvrant la voie à un réexamen de la fonction de ce locus.

J'ai donc recherché des gènes candidats impliqués dans la production de la matrice polysaccharidique chez *B. thuringiensis*/*B. cereus* par analyse bioinformatique, en utilisant les tyrosines kinases comme moyen de recherche. Cette analyse m'a permis d'identifier deux loci, l'un correspondant au locus *eps* déjà connu, qui a donc été baptisé *eps1*, l'autre non décrit jusqu'à présent dans la bibliographie et que nous avons nommé *eps2*.

Notre approche expérimentale, dans un premier temps, fut d'analyser l'effet de la délétion de chacun de ces loci sur divers traits phénotypiques de la bactérie, et de déterminer leurs rôles respectifs dans la formation des biofilms. Par la suite, j'ai recherché les voies de régulation contrôlant la production des exopolysaccharides dépendants de ces loci et, par conséquent, impliqués dans la formation de biofilm. Cette partie porte plus particulièrement sur la régulation de la transcription de ces deux loci.

Résultats



Chapitre I

Caractérisation de deux loci impliqués dans la formation du biofilm chez *B.* *thuringiensis* : étude fonctionnelle

Des travaux antérieurs effectués à l'unité de Génétique Microbienne et Environnement (GME), ont montré qu'un mutant *eps* est affecté dans sa capacité d'être recruté par un biofilm formé à l'interface air-liquide aussi bien que par un biofilm immergé. Ce résultat intéressant nous a poussés à investir dans l'implication de ce locus dans la formation des biofilms chez le groupe *cereus*.

Les bactéries du groupe *cereus* possèdent un locus chromosomique de taille importante, le locus *eps* (Ivanova et al. 2003), de taille comparable au locus *epsA-O* responsable de la production des exopolysaccharides de la matrice du biofilm chez *B. subtilis*. Les deux loci présentent des similarités, comme la présence d'une séquence EAR (*eps*-associated RNA). EAR joue le rôle d'antitermateur de la transcription et permet ainsi la transcription intégrale du locus (Irnov and Winkler 2010). De plus, le locus *eps* inclut des enzymes potentiellement impliquées dans la synthèse, le transport et la modification des polysaccharides. Cependant, une étude récente a montré que le locus *eps* chez *B. cereus* n'a aucun rôle dans la formation de biofilm (Gao et al. 2015) alors que, la délétion du locus *epsA-O* entraîne une désorganisation et une fragilisation du biofilm chez *B. subtilis* (Branda et al. 2001). Le biofilm de *B. thuringiensis* à l'interface air-liquide et en tube en verre, est composé d'un anneau adhérant sur la surface et une pellicule flottante à la surface du milieu alors que celui de *B. subtilis* n'est formé que d'une pellicule (Majed et al. 2016, Fagerlund et al. 2014).

Nos travaux détaillés dans le cadre de l'article 1 de ce manuscrit montrent l'implication du locus *eps* dans la formation de l'anneau du biofilm et que sa délétion chez *B. thuringiensis* n'affecte pas l'architecture de la pellicule. Cependant, la délétion de ce locus entraîne une diminution de la composition en sucres de la matrice (Tableau 4).

Tableau 4. Composition de la matrice du biofilm chez *B. thuringiensis*.

	wt	$\Delta eps1$
Protéines	103 $\pm$ 4.9	103 $\pm$ 5.6
Sucres	439 $\pm$ 13	264 $\pm$ 14

Les protéines et les sucres sont exprimés en mg par unité de densité optique. Résultats présentés sont les moyennes de trois expériences indépendantes ($\pm$ écart-type).

Suite à cette observation, j'ai fait l'hypothèse qu'un ou plusieurs autres loci chromosomiques pouvaient être requis pour la production de la composante polysaccharidique de la matrice du biofilm chez *B. thuringiensis*. Comme les tyrosines kinases sont souvent associées aux loci impliqués dans la production des

exopolysaccharides, je les ai utilisées comme outil de recherche pour identifier, dans les génomes séquencés et annotés de *B. thuringiensis*, ce ou ces loci potentiels. Nous avons trouvé un 2ème locus *eps*, non identifié et non décrit au préalable, que nous avons nommé *eps2*. De ce fait, nous avons renommé *eps1* l'ancien locus « *eps* ». Le locus *eps2* est présent chez toutes les espèces du groupe *cereus* (Tableau 5). Il est de taille inférieure au locus *eps1* mais comprend l'ensemble des gènes codant pour les enzymes nécessaires pour la synthèse des exopolysaccharides. Le locus *eps2* est organisé en un seul opéron, contrairement à *eps1* qui comprend trois opérons.

Tableau 5. Distribution du locus *eps2* dans les différentes espèces du groupe *cereus*.

Espèces	Nb de souches présentant le locus <i>eps2</i> / Nb total de souches analysées
<i>B. thuringiensis</i>	16 /19
<i>B. cereus</i>	10/21
<i>B. anthracis</i>	14/14
<i>B. weihenstephanensis</i>	1/1
<i>B. bombysepticus</i>	1/1

Nous avons montré que le mutant *eps2* perd complètement sa capacité à former une pellicule à l'interface air-liquide mais qu'en contrepartie l'anneau persiste et est plus large, comparé à la souche sauvage. De plus, la délétion de *eps2* cause une augmentation dans la capacité des bactéries à adhérer sur les surfaces inertes et vivantes. En outre, nous avons mis en évidence que le locus *eps1* est responsable de la biosynthèse d'une capsule polysaccharidique qui favorise l'adhésion des bactéries sur les surfaces inertes (verre) et vivantes (HeLa). Nous avons également analysé le rôle des deux loci dans la mobilité bactérienne de type « swimming ». La délétion du locus *eps1* provoque une hyper-mobilité sur les géloses à 0,3 % d'agar tandis que, le mutant $\Delta eps2$ est complètement immobile sur cette surface (Figure 29). Ce comportement opposé entre les deux mutants peut être interprété par la présence *versus* l'absence de la capsule polysaccharidique. D'une part, la délétion du locus *eps1* entraîne une perte de la capsule et ainsi une suppression des forces de friction probablement induites par celles-ci sur des surfaces solides ou semi-solides. D'autre part, l'ensemble des résultats observés

suite à la délétion du locus *eps2* favorise l'hypothèse de la surproduction de polysaccharides dépendants du locus *eps1* dans le mutant $\Delta eps2$.

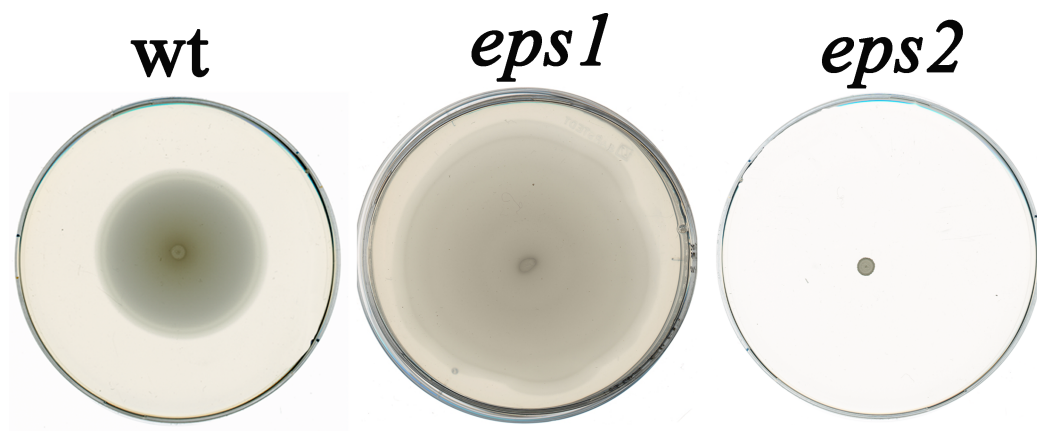


Figure 29. Un essai de "swimming" observé chez *B. thuringiensis* $\Delta eps1$ et $\Delta eps2$ comparé à la souche sauvage.

Les essais sont faits sur des boîtes de pétri contenant 25 mL de milieu LB à 0,3 % d'agar, incubées à 30 °C pendant la nuit.

Donc, chez *B. thuringiensis*/*B. cereus*, deux loci sont responsables de la formation du biofilm et agissent d'une façon complémentaire avec un rôle spécifique pour chacun. Ce qui nous amène à construire le modèle suivant : chez *B. thuringiensis*, les polysaccharides sont produits par 2 loci : *eps1* responsable de la production des polysaccharides pariétaux en formant une capsule polysaccharidique permettant à la bactérie d'adhérer sur les surfaces construisant ainsi l'anneau du biofilm ; *eps2* responsable de la production des polysaccharides qui seront libérés dans le milieu extracellulaire et qui participent à la formation de la pellicule qui va rejoindre l'anneau pré-formé. Ce modèle proposé ne ressemble pas à celui de *B. subtilis* qui possède un seul locus *epsA-O* responsable de la production de la totalité des composants polysaccharidiques du biofilm.

Bacterial subpopulations use specific tools to build separate regions of a biofilm

Majed R.^{1,2}, Bennaceur I.¹, Perchat S.¹, El Khoury N.^{1,2}, Ramarao N.¹, Aymerich S.¹,
Kallassy M.^{1,2}, Lereclus D.¹, Gohar M.^{1*}

¹ Micalis Institute, INRA, AgroParisTech, Université Paris-Saclay, 78350 Jouy-en-Josas, France.

² Université Saint-Joseph, Laboratoire de Biotechnologie, Unité de Recherche Technologies et Valorisation Alimentaire, Beirut, Lebanon.

*Correspondence to: michel.gohar@inra.fr

Abstract

Proteins or polysaccharides are required to keep the cohesion of biofilms and make them adherent to surfaces. Here, we investigated the roles of two exopolysaccharides, Eps1 and Eps2, in the formation of a floating biofilm in the bacterium *Bacillus thuringiensis*. We show that Eps1 forms an adherent capsule surrounding the bacterium, which is found exclusively in the periphery of the biofilm and which docks it to solid surfaces. In contrast, Eps2 is produced mainly in macrocolonies located in the central part of the biofilm and is an essential component of the biofilm matrix. Two distinct parts of the biofilm are therefore built by two subpopulations, each producing a different exopolysaccharide, in the same way as carpenters and bricklayers use specific tools to construct human houses.

Introduction

Isogenic communities of microorganisms, such as colonies or biofilms, usually display a heterogeneity in genes expression, leading to cell differentiation and, often, to task distribution. Exopolysaccharides are often used as tools by a fraction of the microorganism population when task distribution is observed. For example, in the same community, a subpopulation can secrete exopolysaccharides while another releases surfactants, both products acting in synergy to expand the colony (van Gestel, Vlamakis and Kolter 2015b, Kim, Levy and Foster 2016). Bacteria produce huge amounts of polysaccharides, which display a high variety of structures (Holst and Müller-Loennies 2007, Ruhmann, Schmid and Sieber 2015) and fulfill essential functions for their growth and survival. Polysaccharides are required for the building of cell walls (Lovering et al. 2012), the biosynthesis of secondary cell wall polymers (Schaffer and Messner 2005), the production of capsules, or the formation of biofilm matrices (Yother 2011, Sutherland 2001). Biofilm matrices, which also contain proteins and DNA (Flemming and Wingender 2010), are strongly involved in the biofilm adhesion to surfaces, and in its architecture, cohesion and resistance to various physical or chemical stresses, including antimicrobial treatments. In most cases, bacterial exopolysaccharides biosynthesis follows the Wzx/Wzy-dependent pathway, in which the growing polysaccharidic chain is elongated by the Wzy polymerase through the sequential addition of repeating units translocated outside the cell by the Wzx flippase (Islam and Lam 2014). Bacterial tyrosine kinases (BY-kinases) genes, which products were shown to activate exopolysaccharides biosynthesis (Mijakovic and Deutscher 2015), are usually located in the same genetic locus as *wzy*, *wzx* and glycosyltransferases genes (Bechet et al. 2009, Elsholz et al. 2014). To find the genetic loci putatively involved in exopolysaccharides production in strains of the *B. cereus* group, we searched BY-kinases genes in the sequenced genome of the entomopathogen *B. thuringiensis* strain 407. We found three BY-kinases, located upstream from two large chromosomal loci — *eps1* (20 kb) and *eps2* (8 kb) — putatively involved in exopolysaccharides (*eps*) biosynthesis. The *eps1* genes cluster, which has already been described in *B. cereus* (Ivanova et al. 2003), shares only one gene with the *B. anthracis* corresponding *sps* locus involved in SCWP (secondary cell wall polymers) synthesis (Schuch et al. 2013). In contrast, this work is the first to report on *eps2*. Here, we have investigated, in *B. thuringiensis*, the

function of these two loci in the bacterium physiology, and more specifically in its adhesive properties and in its ability to produce biofilms.

The genetic structures of *eps1* and *eps2* are similar, since both loci include genes coding for, in the reading order, the polysaccharide chain length modulator Wzz, a tyrosine kinase, an initiator glycosyltransferase, the flippase Wzx, the polymerase Wzy, and two (*eps2*) to six (*eps1*) glycosyltransferases (figure S1 and S2). However, *eps2* is transcribed as one single operon, whereas *eps1* contains three transcriptional units, the two first including genes coding for post-translational regulators and the last one including genes coding for enzymes (figure S1 and S2). The *eps1* locus - but not *eps2* - also includes *lcpC*, which product shows 74% identity with the *B. anthracis* *lcpC* gene product. LcpC belongs to the LytR-CspA-Psr (LCP) family, shown in different bacterial species - including *B. anthracis* - to be involved in the attachment of capsular polysaccharides, SCWP (secondary cell wall polymers) or teichoic acids to the cell wall (Liszewski Zilla et al. 2015a, Eberhardt et al. 2012, Chan et al. 2014). In addition, the *eps1* locus contains a small antitermination RNA sequence, named EAR (Irnov and Winkler 2010) and found only in *eps* loci similar to the *B. subtilis* *epsA-O* operon. Since *epsA-O* is required for the production of the polysaccharidic component of the biofilm matrix (Branda et al. 2004), *eps1* was expected to fulfill the same function in *B. cereus*, but was recently reported to have no effect on biofilm production in this species (Gao et al. 2015).

Results

To determine the functions of *eps1* and *eps2* in the bacterium physiology, we proceeded to the construction of two mutant strains. In the $\Delta eps1$ mutant, the deleted genes were included in the third *eps1* operon, and coded for the flippase, the polymerase and the glycosyltransferases (figure S1), making the production of polysaccharides from this locus impossible. In the $\Delta eps2$ mutant, the whole *eps2* locus was deleted. The two mutants $\Delta eps1$ and $\Delta eps2$ displayed the same growth curve as the wild type strain (wt) (figure S3). We then compared the ability of the three strains to produce biofilms. Biofilms produced in glass tubes by the wt strain appears as a pellicle floating on the culture medium and surrounded by a ring sticking to the tube walls (Majed et al. 2016). The deletion of *eps1* led to the absence of the biofilm ring and to an unchanged pellicle floating freely on the culture medium, unadherent to the tube walls. The deletion of *eps2* gave the exact reverse phenotype : the pellicle was absent but a thick ring sticking to the tube walls could be observed (figure 1a). A quantification of

the ring and of the pellicle in the three strains confirmed these results and showed that the ring biomass in the $\Delta eps2$ strain is 2.5 times greater than in the wt strain, which suggests a negative feedback control from *eps2* on *eps1*. Exopolysaccharides were indeed shown to interact with the chain length modulator Wzz (Elsholz et al. 2014), which itself activates the BY-kinase. The co-culture of both *eps1* and *eps2* mutant strains in a 1: 1 ratio restored the biofilm wt phenotype, with a ring sticking on the tube walls and a pellicle floating on the culture medium, giving thus direct evidence that both loci are necessary to produce the entire biofilm.

Our results suggested that Eps1, but not Eps2, was involved in biofilm adhesion on glass. Because adhesion is the first step in biofilm formation, and because the biofilm is initiated by planktonic bacteria, we reasoned that the effect of Eps1 should also be seen in planktonic bacteria. We therefore assayed the three strains - wt, $\Delta eps1$ and $\Delta eps2$ - in planktonic cultures for their adhesion capabilities on glass slides. We found that, in early stationary phase cultures, the wt strain adhered strongly on glass, and that this adhesion was strongly increased when the culture agitation was arrested for one hour prior to harvest. In these conditions, comparatively to the wt strain, the $\Delta eps1$ strain displayed a dramatic decrease in adhesion on glass (figure 1b). In contrast, the $\Delta eps2$ strain was more adherent than the wt strain, which supports the hypothesis of a negative feedback control of *eps2* on *eps1*. We then determined the effect of *eps1* or *eps2* deletion on the adhesion of the bacterium on HeLa cells. Similarly to what was observed on glass, the deletion of *eps1* led to a strong decrease in the adhesion of the bacterium to HeLa cells, while the deletion of *eps2* gave the reverse phenotype (figure 1c).

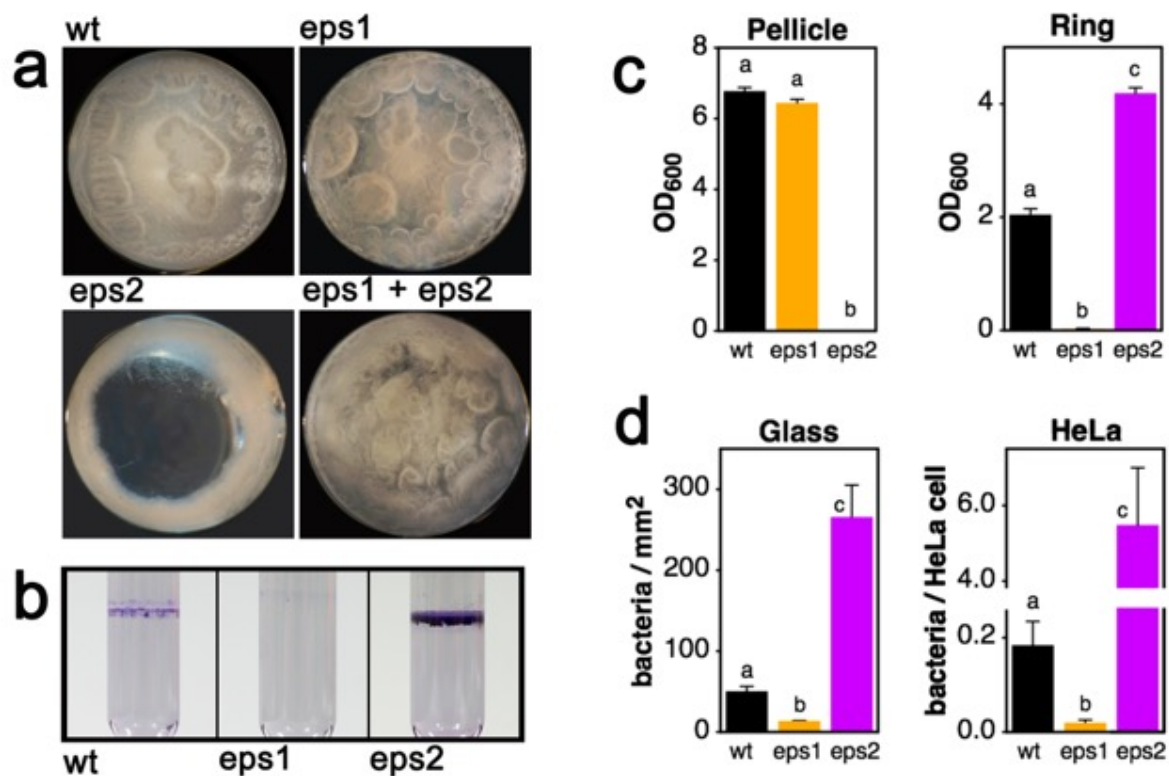


Fig. 1. Biofilm and adhesion phenotypes

a: Top-views of biofilms. Biofilms were grown in 48-wells polystyrene microtiter plates in HCT medium at 30 °C and observed in situ, after 48 h of incubation, with a stereomicroscope. Wells diameter is 20 mm. In the 'eps1 + eps2' condition, microtiter plates were seeded with a 1:1 combination of planktonic cultures of both mutant strains.

b : Side-views of biofilms. Biofilms were grown in glass tubes in HCT medium at 30 °C and observed in situ, after 48 h of incubation.

c: Determination of rings and pellicles amounts. Biofilms were grown for 48 h in 12 mm diameter glass tubes in HCT medium at 30°C. Both structures were harvested separately, recovered and dissociated in 1ml water. The OD₆₀₀ of the dissociated biofilms, previously shown to be highly correlated with cells or spores density (El-Khoury et al. 2016), was determined. Bars and bar errors represent the means and standard deviations of 4 to 6 independent experiments.

d: Adhesion assays. Planktonic cultures in early stationary phase (OD₆₀₀ of 6.0) were kept with no agitation on the bench for one hour before being assayed for their adhesion capabilities. Glass slides were incubated for a further 30 min at room temperature with the cultures, washed, stained with DAPI and observed with a fluorescence microscope. Views were analyzed with ImageJ, and results were expressed as the number of adherent bacteria per mm² of glass. Ten views were analyzed for each slide, and three to six independent experiments were performed. Adhesion assays on HeLa cells were performed as described previously (Ramarao and Lereclus 2006). Bacteria were incubated for 15 minutes at 37°C with confluent ATCC CCL-2 HeLa cells. Three replications were performed using three independent cultures. Bars and error bars represent means ± standard deviation of the means. Bars with different letters (a, b, c) on their top indicate significant differences in their mean values (P < 0.05, Wilcoxon test).

These results led us to hypothesize that the Eps1 polysaccharide was located at the cell surface. To search for the existence of an *eps1*-dependant layer, we observed, under an epifluorescence microscope, planktonic cultures of the three strains, kept before harvest with no agitation for one hour and treated with different lectins tagged with a fluorescent molecule (AlexaFluor594). We found that Concanavalin A (ConA) bound

specifically to a thin layer present in the wt strain and in the $\Delta eps2$ mutant, but not in the $\Delta eps1$ mutant (figure 2a). This polysaccharidic layer was also revealed by Indian ink staining (figure 2b). Together with the presence of *lcpC* in the *eps1* locus, which product is expected to link covalently the exopolysaccharides to the peptidoglycan, and to the persistence of this layer after thorough vortexing, this result suggests that the *eps1*-dependent layer is a polysaccharidic capsule. Capsules are often described as being involved in cell-cell interactions (Bazaka et al. 2011), and microscope observations (see figure 2) supported the hypothesis that the Eps1 capsule could play a role in such interactions.

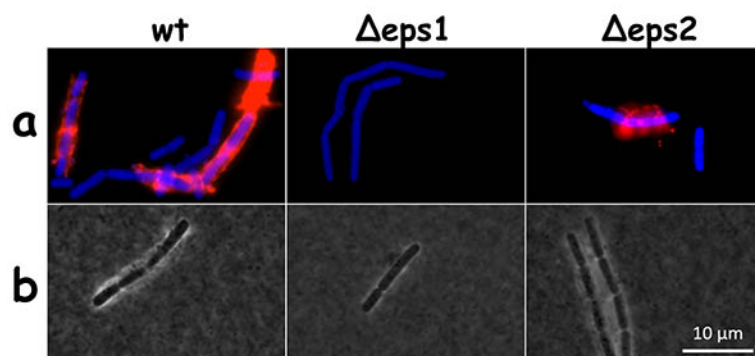


Fig. 2. Subcellular location of the Eps1.

Planktonic cultures of the wild type strain and the $\Delta eps1$ and the $\Delta eps2$ mutant strains were harvested at an OD_{600} of 6.0 and were kept on the bench (at room temperature) with no agitation for one hour. Cultures were subsequently stained with the Alexa595-labelled lectin Concanavalin A (red) and with DAPI (blue) and observed with a fluorescence microscope (a, overlay of the two views), or mixed with Indian ink and observed in phase contrast microscopy (b).

We therefore assessed the effect of this capsule in the bacterium co-aggregation. The wt strain, harvested in early stationary phase and kept for one hour with no agitation, displayed a strong aggregation phenotype, which was even greater in the $\Delta eps2$ mutant. This phenotype was not observed in the $\Delta eps1$ mutant (figure 3a) and was therefore a consequence of the presence of the capsule. In the wt strain, the capsule-dependent aggregation phenotype could be induced at optical densities equal or greater than 6 (figure 3b), suggesting that the capsule can be produced only in the stationary phase of growth. In early stationary phase, we needed to stop the culture agitation to obtain the Eps1 capsule production. We have found that hypoxia, rather than the absence of mechanical agitation by itself, was the inducer of capsule production (figure S4). In *Streptococcus pneumoniae* too, hypoxia induces capsular polysaccharides production (Weiser et al. 2001). *B. thuringiensis* batch cultures were reported to start with a very high specific oxygen uptake rate ($64 \text{ mmol} \cdot \text{g dry weight}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$), which decreased

continuously during the culture (Rowe, Margaritis and Wei 2003). We have monitored the dissolved oxygen content in our agitated cultures and found that this content dropped to undetectable values when the culture OD reached a value of 8 (figure S5), showing that the high oxygen consumption of *B. thuringiensis* exceeds the oxygen transfer rate when the bacterial density reaches high values. Therefore, at an OD of 8, aggregation occurs even when the culture agitation has not been arrested (figure 3c), suggesting that bacteria can produce the capsule in agitated late stationary cultures.

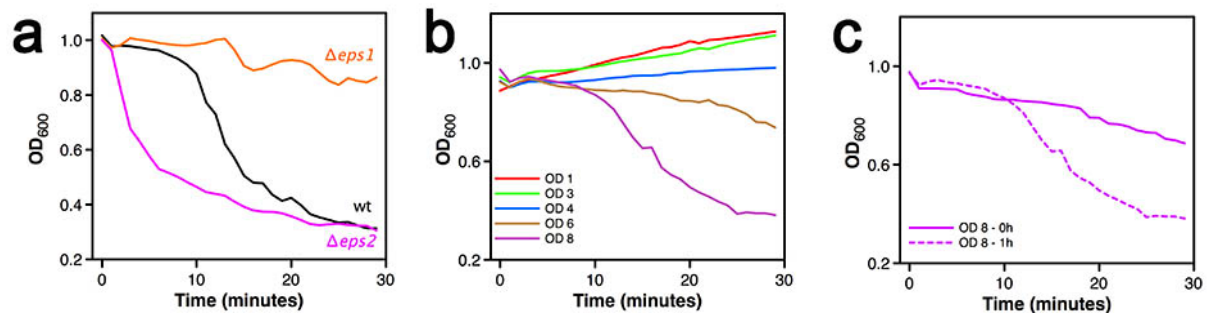


Fig. 3. Aggregation phenotype.

Aggregation was determined by recording the OD₆₀₀ of a bacterial suspension every minute for 30 minutes with a spectrophotometer.

a: Effect of *eps1* and *eps2* deletion on aggregation. Planktonic cultures of the wild type strain and the *Δeps1* mutant strain were harvested at an OD₆₀₀ of 6.0 and were kept on the bench (at room temperature) with no agitation for one hour. They were subsequently diluted to an OD₆₀₀ of 1.0 and transferred into a 1ml spectrophotometer cuvette for OD measurements.

b: Effect of bacteria growth state on aggregation. Planktonic cultures of the wild type strain were harvested at OD₆₀₀ of 1.0, 3.0, 4.0, 6.0 and 8.0, and were submitted to the same treatment as above.

c: Role of the incubation without agitation on aggregation. A planktonic culture of the wild type strain was harvested at an OD₆₀₀ of 8.0, and assayed for aggregation as above, but without the 1 h incubation (OD 8 - 0h, plain line), and compared to the result obtained after 1 h incubation (OD 8 - 1h, dotted line).

Our results demonstrated that Eps1 is required for the formation of the biofilm ring while Eps2 is necessary for the production of the biofilm pellicle. However, the two polysaccharides could either be distributed over the whole biofilm, or located in specific places of the structure. The location of Eps1 was determined in 48h-aged biofilms by using ConA, which binds to this polysaccharide but not to Eps2. The biofilm ring and the pellicle were harvested separately, homogenized and observed under an epifluorescence microscope. We found Eps1 only in the biofilm ring, included in huge aggregates of spores, whereas the pellicle contained uncapsulated chains of vegetative cells (figure 4a). An asymmetric distribution of spores in the 48h-aged biofilms has already been reported in *B. thuringiensis* (El-Khoury et al. 2016). Aggregates of spores embedded in Eps1 were also found in sporulated planktonic cultures of the wild type

strain, whereas spores remained unaggregated in the $\Delta eps1$ mutant strain, showing that Eps1 is required for this aggregation (figure 4b).

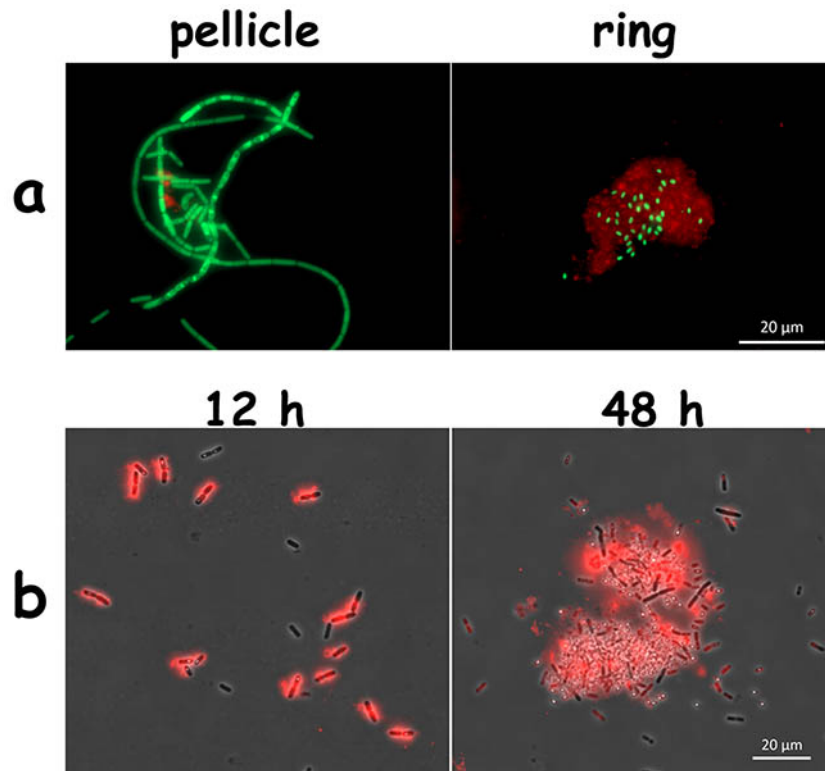


Fig. 4. Location of Eps1 in biofilm and in planktonic culture.

a: Location of Eps1 in biofilm. The ring (right) and the pellicle (left) of 48 h-aged biofilms produced by a GFP-tagged wild type strain in glass tubes in HCT medium at 30 °C were harvested separately, stained with Alexa595-labelled ConA, and observed with a fluorescence microscope. Vegetative cells and spores are colored in green, Eps1 revealed by ConA is colored in red. Pictures are an overlay of the two fluorescence observations

b: Location of Eps1 in planktonic culture. A planktonic cultures of the wild type strain was harvested after 12 h (left) or 48 h (right) of culture, stained with Alexa595-labelled ConA, and observed in phase-contrast microscopy. Pictures are an overlay of the fluorescence and of the phase-contrast views.

The absence of Eps1 in the biofilm pellicle can be explained if this polysaccharide is not produced together with Eps2, which is supported by the negative feedback control of *eps2* on *eps1* observed for different phenotypes. According to this hypothesis, there would be three subpopulations in the biofilm regarding the production of exopolysaccharides : one subpopulation would produce Eps1, another would produce Eps2, and the last would produce none of these. Yet, this hypothesis do not explain how the bacteria producing Eps1 or Eps2 find there way and remain in the place where the ring or the pellicle will be located. To answer this question, we performed biofilm assays using co-cultures, in a 1:1 ratio, of the $\Delta eps1$ and $\Delta eps2$ mutants constitutively expressing a gene coding for, respectively, the mCherry or the sGFP fluorescent protein. In 48h-aged biofilms obtained with these co-cultures, the $\Delta eps2$ mutant (producing only

Eps1) is exclusively present in the ring while the $\Delta eps2$ mutant (producing only Eps2) is located in the pellicle (figure 5a). Pictures of the biofilm taken at earlier times show that the $\Delta eps2$ mutant is present in the pellicle in 24h-aged biofilms but disappear progressively from it (figure 5b). To explain this result, we propose that the $\Delta eps2$ mutant moves randomly on the culture medium surface, though swimming motility, until it reaches the tube wall, where it could stick on glass or on $\Delta eps2$ mutants already lining the glass wall (figure 5c). Since the velocity of the *B. thuringiensis* strain used in this study is in average $7.3 \mu/s$ (26 mm/h) in 24h-aged biofilm (Houry et al. 2012), whereas the tube diameter is 12 mm, cells located at the center of the culture medium surface can fairly reach the tube edges in 24 h even if their movement is random. The adsorption of $\Delta eps2$ mutants on the tube walls would progressively concentrate this mutant in the ring and deplete the pellicle from it, making this pellicle a much more suitable place for the $\Delta eps1$ mutant growth.

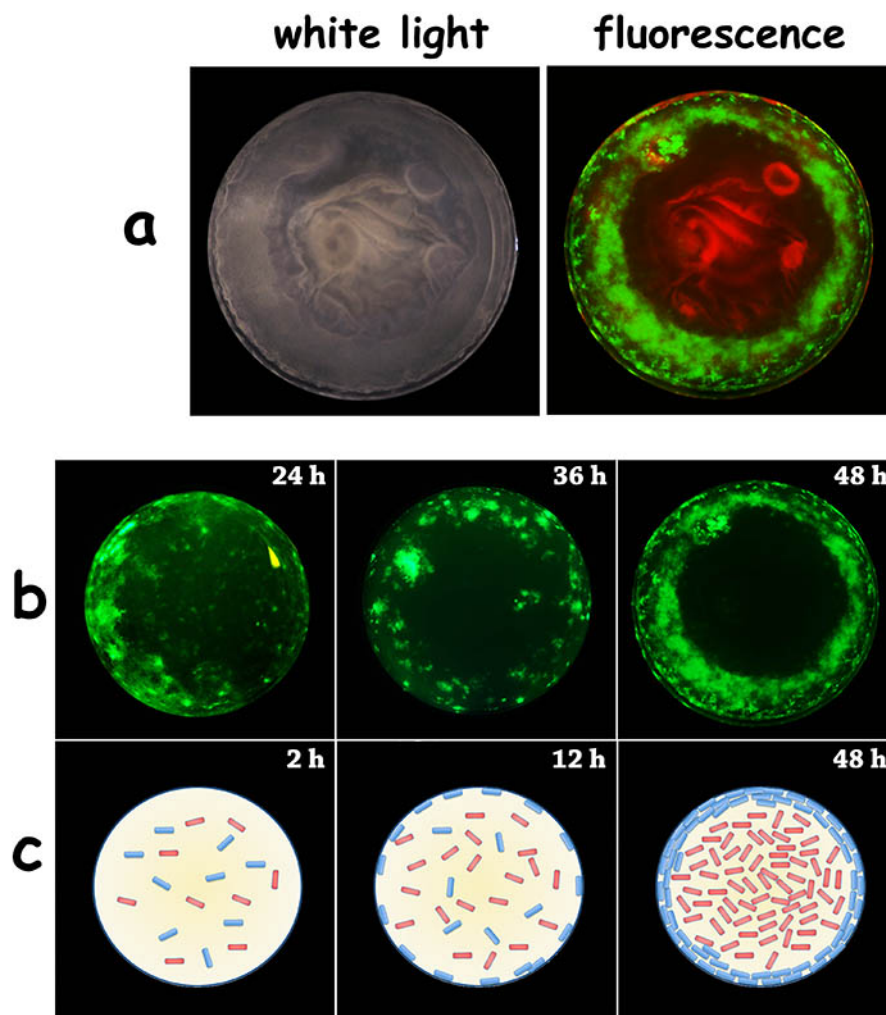


Fig. 5. Spatial distribution of $\Delta eps1$ and $\Delta eps2$ mutant strains co-cultured in biofilm.

The $\Delta eps1$ strain, producing only Eps2, was tagged with mCherry (in red) while the $\Delta eps2$ strain, producing only Eps1, was tagged with GFP (in green). Both strains were mixed in a 1:1 ratio and grown in biofilm in 48-wells polystyrene microtiter plate in HCT media at 30 °C, and observed in top-view with a fluorescence stereomicroscope.

a: Location of the two mutant strains in a 48 h-aged biofilm. Left panel, the biofilm architecture was observed in white light. Right panel, overlay of the two fluorescence views.

b: Distribution of the $\Delta eps2$ strain in the biofilm over time. Views were taken from 24 h-, 36 h- and 48 h-aged biofilms.

c: Schematic drawing showing the separation of the two mutants subpopulations in the biofilm. When the biofilm culture starts, the two subpopulations are homogeneously mixed (left panel). As biofilm ages, the density of the $\Delta eps2$ mutant increases at the biofilm edge (middle panel), and in 48 h-aged biofilms, the $\Delta eps2$ mutant subpopulation is located exclusively at the biofilm edge, while the $\Delta eps1$ mutant subpopulation is located mainly in the remaining area (right panel).

Discussion

We have shown in this work that the construction of a floating biofilm by *B. thuringiensis* requires two different polysaccharides : Eps1 cements the biofilm ring to the vessel wall while Eps2 forms a scaffold holding together bacteria in the biofilm pellicle. Spatially separated bacterial subpopulations, located in the precise place where each of the polysaccharides are required, produce either Eps1 or Eps2. Biosynthesis of Eps1 is induced by hypoxia and results in the formation of a capsule which confers to the bacterium high adhesion properties on both living and inert materials. In adhesion, expression of Eps1 results ultimately in aggregates of spores encapsulated in a polysaccharidic material and sticking to solid surfaces. Production of the two polysaccharides by different subpopulations located in different parts of the biofilm provide a nice example of division of labour (van Gestel, Vlamakis and Kolter 2015a) in the construction of a commune structure. The succession of events leading to this task distribution is summarized in the model depicted (figure 6). This assymetric distribution of polysaccharides results, in a mature biofilm, in the coexistence of spores sticking to the solid surface while vegetative cells float on the liquid phase. Disturbance of the biofilm will therefore result in the resistant spores remaining in the surface while vegetative cells are disseminating, which represents an exemple of bet-hedging (de Jong, Haccou and Kuipers 2011).

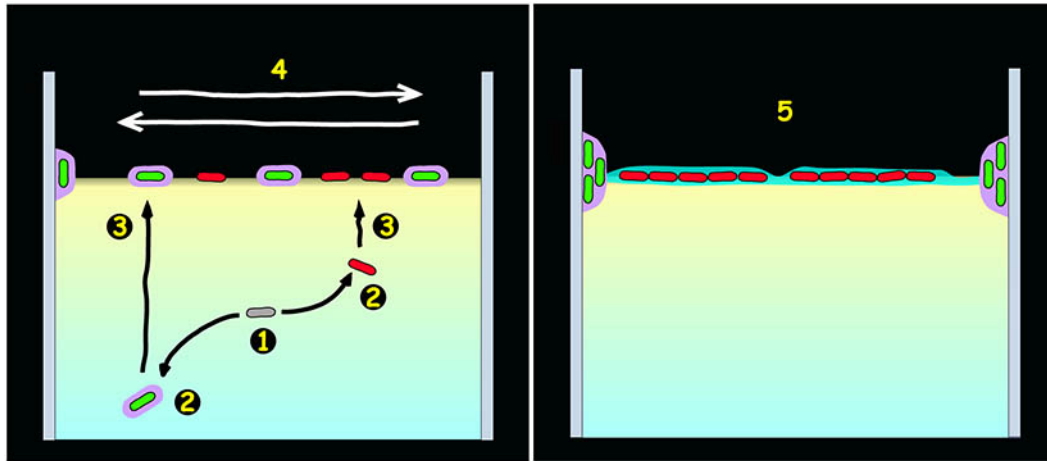


Fig. 6. Hypothetical model of floating biofilms formation in *B. thuringiensis*.

(1) During the planktonic phase preceding biofilm initiation, bacteria divide. Oxygen consumption by the growing bacterial population leads to the formation of an oxygen gradient. (2) Bacteria (in green) located in area of low oxygen concentration produce an Eps1 capsule (in purple), while other bacteria (in red) do not. (3) Bacteria move toward the oxygen concentration gradient and reach the liquid surface. (4) Once on the liquid surface, bacteria move randomly. Capsulated bacteria bind to solid surfaces upon reaching them, leading progressively to their accumulation at the biofilm edge and to the construction of the biofilm ring. (5) The central part of the biofilm, devoid of capsulated bacteria, becomes more favorable than the edge for uncapsulated bacteria growth. Uncapsulated bacteria produce exclusively Eps2, leading to the formation of the pellicle. Limitations of nutrient diffusion in the biofilm ring speeds up the sporulation process, resulting in a ring which includes mainly spores embedded in an Eps1 matrix, while the pellicle contains mostly vegetative cells embedded in an Eps2 matrix.

Supplementary Materials

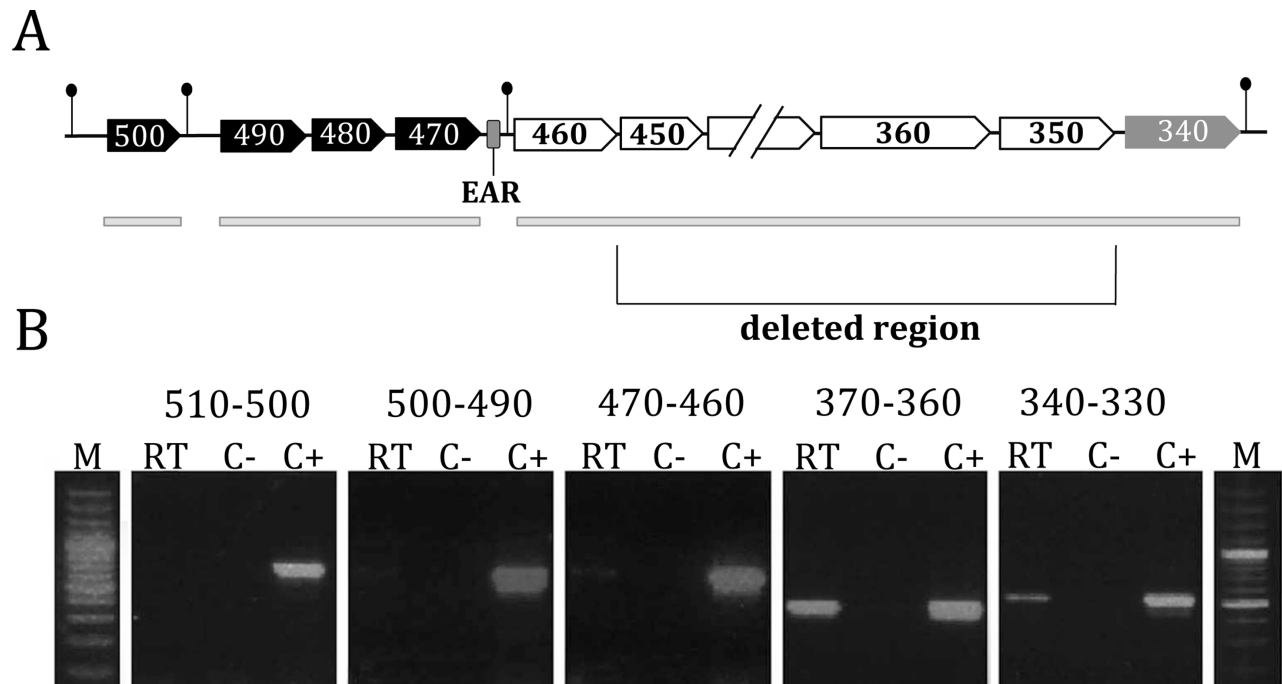


Fig. S1. Genomic analysis and transcriptional organization of the *eps1* gene cluster.

A :Schematic representation of the *eps1* locus. Numbers refer to the last three digits of the 407 strain sequenced genome locus tags (abbreviated tags). Full designation of the first gene of the locus is Bt0002_51500. EAR is a small antitermination RNA. Black lines and circles show putative rho-independent terminators. Genes are depicted by large arrows, in black when coding for tyrosine kinases and phosphatases, in white when coding for enzymes and transporters involved in exopolysaccharides biosynthesis, and in grey when coding for LytR. Grey bars below the *eps1* locus represent transcriptional units. Only part of the deleted region is shown.

B: RT-PCR showed that the *eps1* locus is composed of three operons. C+: Positive control (PCR using DNA of *B. thuringiensis* as template, C-: negative control (PCR using RNA as template) RT: PCR using cDNA as template. M : SmartLadder (Eurogentec).

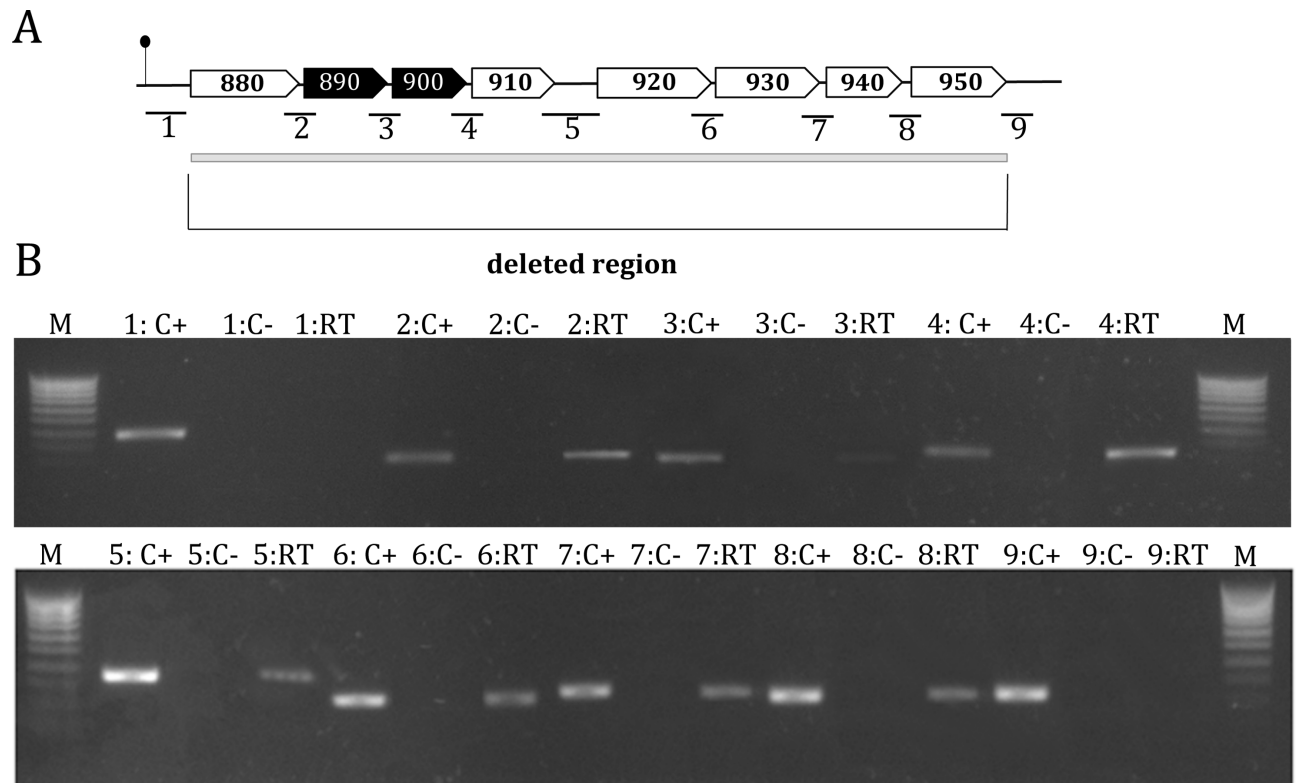


Fig. S2. Genomic analysis and transcriptional organization of the *eps2* gene cluster.

A: Schematic representation of the *eps2* locus. Numbers refer to the last three digits of the 407 strain sequenced genome locus tags (abbreviated tags). Full designation of the first gene of the locus is Bt0002_14860. Putative terminator is shown by black line and circle. Genes coding for tyrosine kinases and phosphatases are illustrated by black arrows. Grey bars represent transcriptional units. Black bars indicate primer pairs used for transcriptional analysis of the *eps2* operon (listed in Table S1 in the supplemental material). The deleted region is shown.

B: RT-PCR showed that the eight genes of the *eps2* locus are co-transcribed. C+: Positive control (PCR using DNA of *B. thuringiensis* as template, C-: negative control (PCR using RNA as template) RT: PCR using cDNA as template. M : SmartLadder (Eurogentec).

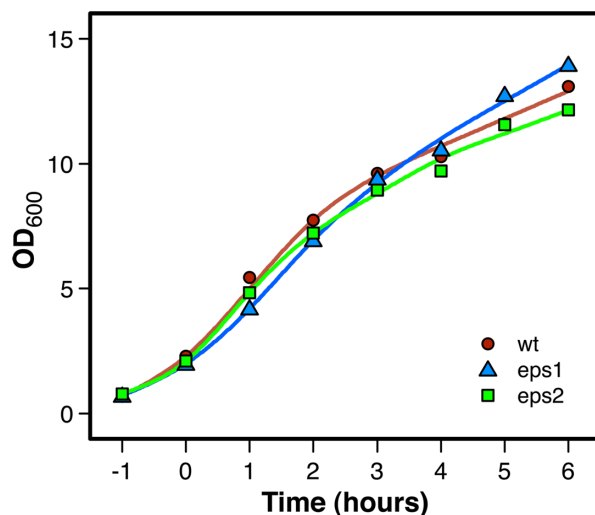


Fig. S3. Growth curves of *B. thuringiensis* wt, $\Delta eps1$, $\Delta eps2$.

A pre-culture is diluted into fresh LB medium to an OD_{600nm} of 0,05 and incubated at 30 °C and 175rpm shaking until T-1 (one hour before entry into stationary phase). After T-1, an OD_{600nm} measurement is performed every hour. Similar results were obtained for three independent replicates, of which only one is shown.

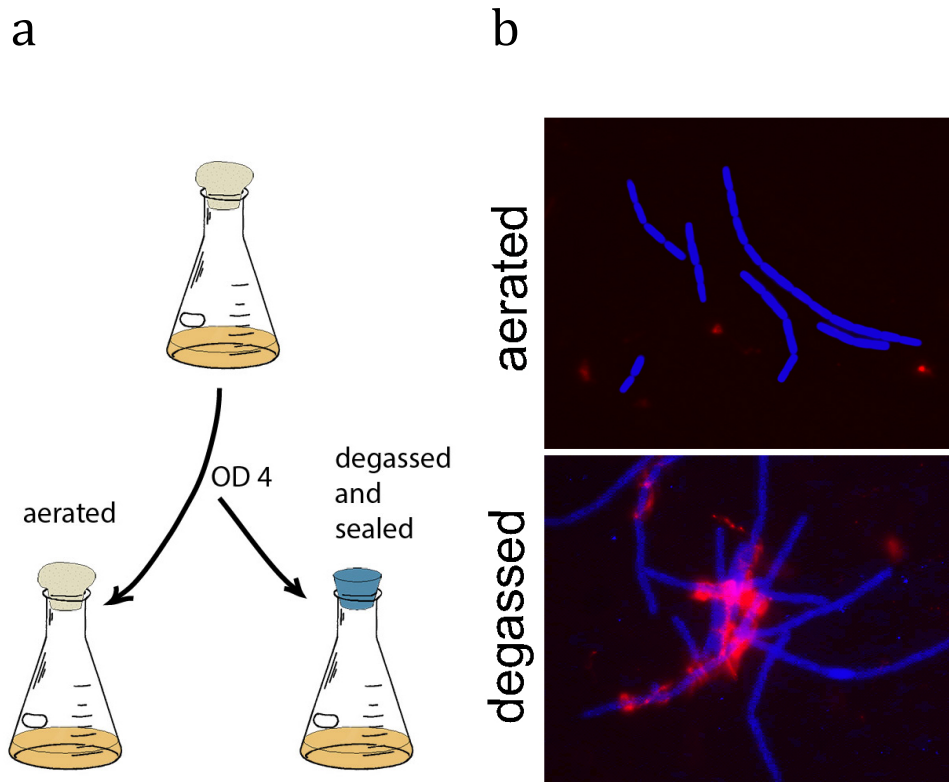


Fig. S4. Effect of mechanical agitation and hypoxia on capsule production.

a: A planktonic culture of the wild type strain was harvested at an OD_{600} of 4.0 and divided into two batches. One of the batches was degassed and hermetically closed while the other was kept in normal conditions. The two batches were then incubated at 30 °C with 175 rpm shaking for 1 hour.

b: Cultures were subsequently stained with the Alexa595-labelled lectin Concanavalin A (red) and with DAPI (blue) and observed with a fluorescence microscope (overlay of the two views).

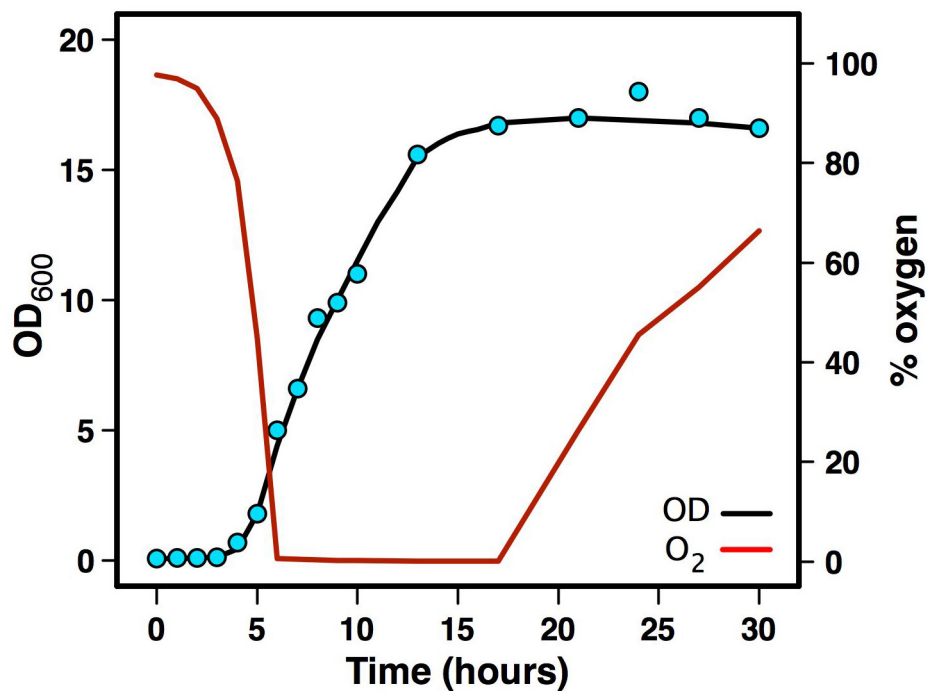


Fig. S5. Consumption of dissolved oxygen by the bacteria.

Oxygen concentration was measured with an oxygen electrode in a standard planktonic culture (LB medium, 30°C, 175 rpm) together with the OD at 600nm.

Materials and Methods

Strains

Strain 407 (Lereclus et al. 1989) is a *B. thuringiensis* strain (genome sequence at NCBI: NZ_CM000747) genetically close to *B. cereus* reference strain ATCC14579, and undistinguishable from *B. cereus* due to the loss of plasmids encoding insecticidal crystal toxins. *Escherichia coli* K-12 strain TG1 [$\Delta(lac-proAB)$ *supE thi hsd-5* (F' traD36 *proA+* *proB+* *lacI^q* *lacZ* Δ M15)] was used as a host for cloning experiments, and *E. coli* strain ET 12567 (F' *dam-13* : :Tn9 *dcm-6 hsdM hsdR recF143 zjj-202* : : Tn10 *galK2 galT22 ara14 pacY1 xyl-5 leuB6 thi-1*) was used to prepare DNA for *B. cereus* transformation.

DNA manipulation

Chromosomal DNA was extracted using the Puregene Yeast/Bact. Kit B (QIAGEN, France). Plasmid DNA was extracted using QIAprep spin columns (QIAGEN, France). Restriction enzymes (New England Biolabs, USA) and T4 DNA ligase (New England Biolabs, USA) were used in accordance with the manufacturer's recommendations. Oligonucleotide primers (Table S1) were synthesized by Sigma-Proligo (Paris, France). PCRs were performed in an Applied Biosystem 2720 Thermak cycler (Applied Biosystem, USA). Amplified fragments were purified using the QIAquick PCR purification Kit (QIAGEN, France). Digested DNA fragments were separated on 1% (w/V) agarose gels after digestion and extracted from gels using the QIAquick gel extraction Kit (QIAGEN, France). Nucleotide sequences were determined by Beckman Coulter Genomics (Takeley, UK).

Construction of *eps* mutants

The non-conserved region of the *eps1* gene cluster, was disrupted by insertion a kanamycin resistance (KmR) cassette. A 738 bp *Bam*HI–*Pst*I and a 864 bp *Xba*I–*Hind*III DNA fragment, corresponding to the chromosomal DNA regions upstream and downstream of the non conserved region, respectively, were generated by PCR using

the primer pairs GalU_6F - GalU_6R and LytR4_3F - LytR4_3R (Table S1). The KmR cassette was purified from plasmid pDG783 (Guerout-Fleury et al. 1995) as a 1.5 kb *PstI*-*XbaI* fragment. The amplified DNA fragments and the KmR cassette were cloned between the *HindIII* and the *BamHI* sites of plasmid pRN5101 (Lereclus et al. 1992).

The *eps2* locus in strain 407 was interrupted as follow. A 869 pb *BamHI/XbaI* DNA fragment and 929 bp *KpnI/SalI* DNA fragment, corresponding to the chromosomal region located upstream and downstream of *eps2* locus were amplified by PCR using as template the chromosomal DNA of *Bacillus thuringiensis* 407 cry- and Rach1F/Rach1R and Aval-Eps2-F/Aval-Eps2-R respectively as primers pairs (Table S1). An *XbaI/KpnI* spectinomycin resistance gene (*spc*) was purified as described previously (Dubois et al. 2012). The amplified DNA fragments and the *spc* cassette were inserted between the *BamHI* and *SalI* sites of thermosensitive plasmid pMAD (Arnaud, Chastanet and Debarbouille 2004).

The resulting two plasmids were transformed each into an independent *Bacillus thuringiensis* 407 wild type strain by electroporation and the selected regions were deleted and replaced with the respective cassette *via* allelic exchange by double homologous recombination as described previously (Lereclus et al. 1992).

Plasmids construction

A transcriptional PsarA-mCherry fusion was constructed by cloning the promoter of *sarA* gene (expressed constitutively in *B. thuringiensis*) between the *BamHI* and the *HindIII* sites of the replicative pHT304mCherry plasmid (Verplaetse et al. 2015). The *sarA* promoter region was generated by enzymatic digestion as a 251 bp *BamHI*-*HindIII* DNA fragment using as template the pCM11 plasmid (Lauderdale et al. 2010). The recombinant plasmid, designated pHT304mCherry- PsarA, was introduced into the *B. thuringiensis* 407 $\Delta eps1$ strain and pCM11 was introduced into *B. thuringiensis* 407 $\Delta eps2$ strain by electroporation.

Biofilms formation in polystyrene microtiter plates and glass tubes

For the biofilm formation, strains used in this study were cultivated until exponential phase in LB medium and thereafter diluted into HCT fresh medium to an OD_{600nm} of 0.01. 1,5 ml or 2ml, respectively, of the diluted culture were inoculated in 48-well

polystyrene microtiter plates (Costar 3548) or and 6 ml sterilized glass tubes. The microtiter plates and the glass tubes were incubated at 30 °C.

Both structures of the biofilm (pellicle and ring) were harvested separately, recovered and dissociated in 1ml water. The OD₆₀₀ of the dissociated biofilms, previously shown to be highly correlated with cells or spores density (El-Khoury et al. 2016).

Adhesion assays

Strains were grown in LB medium at 30 °C with 175 rpm shaking until the OD₆₀₀ reaches to 6.0. For adhesion assays on glass slides, the 407 wild type, *eps1* and *eps2* strains were tagged with the pCM11 plasmid (Lauderdale et al. 2010). Eight milliliter of the culture was immediately poured in a 10ml beaker containing a 20mm x 20mm cover slide for microscopy observations, held in vertical position. The culture was incubated for 1 hour at room temperature (22°C). The slide was then gently washed twice in PBS and observed under an epifluorescence microscopy. Pictures were taken at 200x magnification and analyzed with ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/index.html>) to determine the number of fluorescent bacteria present on the slide. Three replicates were performed and thirty pictures were taken and analyzed for each replicate. For adhesion assays on HeLa cells, the non-tagged wild type and mutant strains were used. The culture agitation was stopped after the OD_{600nm} reached a value of 6.0, and the culture was kept at room temperature (22°C) for 30 minutes. The culture was centrifuged at 2000 rpm for 3 minutes, and the pellet was resuspended in PBS to reach an OD_{600nm} of 3.0. HeLa cells infection and determination of the number of bacteria adherent to the cells was performed as previously described (Ramaraio and Lereclus 2006).

Aggregation assays

Strains were grown in LB medium at 30 °C with 175 rpm shaking until the OD₆₀₀ was equal to 1.0 to 8.0 depending on the experiment, and were incubated at room temperature with no agitation for one hour. After one hour, they were diluted to an OD_{600nm} of 1.0 and transferred into 2 ml spectrophotometer cuvette. The OD₆₀₀ of the diluted bacterial suspension was recorded every minute for 30 minutes with a spectrophotometer.

RT and RT-PCR.

RT-PCR was used to investigate the *eps1* and *eps2* transcript. *B. thuringiensis* cells

were grown in LB at 30 °C with 175 rpm shaking, until 5 h after the onset of transition phase (t₅) and a 2 mL sample was mixed with 2 mL of RNeasy lysis buffer (Life Technologies Ambion, USA) before storage at -20 °C. After gentle thawing, the sample was centrifuged and the pellet was resuspended in 1 mL of Trizol (Life Technologies Ambion, USA). Resuspended cells were disrupted by bead beating (Mini 0.1 mm zirconia/silica beads, Biospec Products) for 2 × 45 s at 6.5 M/s in a Fastprep 24 (MP Biomedicals). The supernatant was transferred to a clean tube and 100 µL of 1-bromo-3-chloropropane (Sigma-Aldrich) were added. The suspension was vortexed, incubated for 10 min at room temperature and centrifuged for 15 min at 12,000 × g at 4 °C. The aqueous phase was then transferred to a clean tube to which 0.1 volume of sodium acetate and 0.7 volume of isopropanol were added. The suspension was mixed and incubated at 4 °C for 30 min to precipitate nucleic acids. Nucleic acids were then pelleted by centrifugation (20 min at 12,000 × g at 4 °C), washed twice with 75% ethanol, air-dried and resuspended in water. Contaminating DNA was removed by DNase treatment (Thermo Scientific) by following the manufacturer's instructions. RNA quantity and integrity was assessed via A260/A280 and A260/A230 (NanoDrop 2000, Thermo Scientific). Total RNA was reverse-transcribed into cDNA with RevertAid first strand cDNA synthesis (Thermo Scientific). In 12 µl, 500 ng of total RNA, 5 µmol Random primer and completed to 12 µl by water were incubated at 65°C for 5 min. 8 µl of RT mix (4 µl 5× RT buffer, 1 µl 10 mM each dNTP, 200 U RevertAid Reverse transcriptase, 20 U RiboLock RNase Inhibitor (Thermo Scientific) was added to the mixture cooled on an ice bath, and the reaction mix was incubated at 25°C for 5 minutes, and at 42°C for 1 hour before inactivation at 70°C for 5 minutes. For negative controls, reverse transcriptase was omitted. Subsequent PCRs using a 2-µl RT reaction volume (template), with 0.2 µmol of each primer (Rach4F/4R/Rach12F/12R) (510-500F/R/320-310F/R) (Table S1) in final PCR volume of 25 µl were carried out as described above. Fragments were amplified using the Taq DNA Polymerase, Recombinant (Thermo Scientific) by following the manufacturer's instructions.

Microscopy observations of polysaccharide capsule

The wild type, the *eps1* and the *eps2* mutant strains were grown as described for the adhesion assay, until OD₆₀₀ reached a value of 4.0 or 6.0. The culture agitation was then stopped for 1 hour.

For Indian ink staining, 2 ml of Indian ink were spotted on a microscope slide next to a 5 ml drop of the culture, and the drops were covered with a glass slide. The slides were observed under a contrast phase microscopy and pictures were taken in the mixing area of the culture and the Indian ink. For lectins staining, 25 µl of the culture were incubated for 5 minutes with 1 µl of an Alexa-594 tagged lectin at 1 mg/ml and washed twice in PBS. The culture of each sample was then centrifuged at 2000 rpm for 3 minutes and the pellet was recovered in PBS. Stained bacteria were then observed under an epifluorescence microscopy.

Oxygen consumption

The *B. thuringiensis* wild type strain was cultivated until exponential phase in LB medium and thereafter were diluted into LB fresh medium to an OD_{600nm} of 0.01 in final volume of 100 ml incubated at 30 °C with 175 rpm shaking in an erlenmeyer of 1 L. The OD₆₀₀ of the culture measurements were recorded every hour for 30 hours using a spectrophotometer and the concentration of dissolved oxygene was measured continuously for 30 hours using an oxygen eletrode.

Table S1. List of primers used in this study.

Primer name	Nucleotide sequence (5'-3')	Restriction site*
Rach1F	CGCGGATCCCTGTACTAGAAAATGTAG	<i>Bam</i> HI
Rach1R	TGCTCTAGAAACCAATTTCAACCTCG	<i>Xba</i> I
Aval-Eps2-F	CGGGGTACCTGACCGGGTAGGTCGTTTGT	<i>Kpn</i> I
Aval-Eps2-R	GGTCGACAGGTAGTTACGATGCGAATTAGAAG	<i>Sal</i> I
galU 6F	CGGGATCCCGGCTGCGGGACTGGGGACAAGG	<i>Bam</i> HI
galU 6R	AACTGCAGAACCAACCCCAACATCGTAACGCGTACC	<i>Pst</i> I
lytR4 3F	GGAAGCTTGCAGGATATTAGGAATTATAGGAATCC	<i>Hind</i> III
lytR4 3R	CCGGAATTCGGGGACATAGTAGTACCAAATACCATC	<i>Eco</i> RI
Rach4F	AAACGACATGTAGCATATAGTGGTG	-
Rach4R	GAGTCCAATTCTTCGTATCTCTTCA	-
Rach5F	TGCATTCAGAGTCGGAAGTAT	-
Rach5R	AAGCGGTAAACAACACATCGT	-
Rach6F	CAACAGTCTCTGTTATTGGTCACA	-
Rach6R	TTCCAGATTTTCTCAGCTCGT	-
Rach7F	AAATGCGATGGAATGGTCTTAG	-
Rach7R	CAAACAAGCGTTTTACACTTCG	-
Rach8F	GGCTGGACATCCGTATTTTATG	-

Rach8R	CTAAATCTGCTCCATCCTTTGC	-
Rach9F	TGGTGTAACCTTTATTGGAGTGC	-
Rach9R	AGAAGAATAATCCATCCCATCG	-
Rach10F	AAGGAAGGGGAAAGATAGATGG	-
Rach10R	AGCTTTAGCAGCACCAACATTT	-
Rach11F	ACAAGAACGACTGAATTCGATG	-
Rach11R	CCATCACCTGCAGCTGTATAAAT	-
Rach12R	CAATGTGAACGCTACTTTCTGG	-
Rach12F	GATTGAAAGCACGAGAGAAAGC	-
510-500-F	CGATTGGAAAAGGAAAAGCA	-
510-500-R	CATCACCTGGATCTGCTGAA	-
500-490-F	CGAAGTGAAAAGACGGAAAAA	-
500-490-R	GCCTTCTTGCTTCTTCTGGT	-
490-480-F	TGTAGCAATCGCTTTTGTCTG	-
490-480-R	CATTTGATGCATTGCTGGTT	-
480-470-F	CGCACAAATTATGGCAAATG	-
480-470-R	ATCTCTTGCCCCGGTAAAAT	-
470-460-F	TCATTTAGCGGAAAGCTATGAA	-
470-460-R	AGCACGTTTTCTTTTCCAG	-
460-450-F	GAAATTCAGCGTGTGTTTGC	-
460-450-R	GCATCAATTACCATGGAACG	-
450-440-F	CTGGCAGGTTAGTGGAAGAAG	-
450-440-R	ACCCTTAAACGGTGTTGGAA	-
440-430-F	CCCGAAAGATTTAGTGGATAAAGA	-
440-430-R	CCCAAGTGTTGCAATGATGA	-
430-420-F	TTTGCAATTGGAGCAGTAAA	-
430-420-R	TGCTACATCTGATGCCATTAAAA	-
420-410-F	GGGAACAAGGGATAGAGGTAAAA	-
420-410-R	CAAATCCTACCTTCTCCATAAAGG	-
410-400-F	TCTGGTGGATCGAAATGAGA	-
410-400-R	AAAACCATAGCCATAAGTGCAT	-
400-390-F	TGGGCTTAAGAGGTGGGAAT	-
400-390-R	GGGTATCCGAGTTTATTCCAATG	-
390-380-F	TGGAAAGAGCTGGAATTAATAAATAG	-
390-380-R	TACCTGCTCCCTTTCCATGT	-
380-370-F	CCGAGATATTGTGGAACATGG	-
380-370-R	TCCTTTTGCTACAGCATGTGA	-
370-360-F	TCATGAGAAACCGACTGGTCT	-

370-360-R	AGCAATAACTGCATCATTTTCAA	-
360-350-F	TGGACAATTGTAAAAGGTGAAGG	-
360-350-R	TGTTCATCCCACAGTTGCTT	-
350-340-F	TCAGCAAAATCAACCATTTC	-
350-340-R	TTTCGTTGATCACTTCCCATT	-
340-330-F	TGGTGACGTGTTAAAAGCAA	-
340-330-R	AGATGGCTTCGCATCTTGTT	-
330-320-F	TATCCGAAAGCGATTGAAGC	-
330-320-R	CTAAAGAATCCGCTGCGAAA	-
320-310-F	GGGAGATCCAGCACGTTTAG	-
320-310-R	TCCTCGTCTGATGCATAGCTT	-

* Bold letters show restricted site

Acknowledgments

The authors would like to thank the National Council for Scientific Research Lebanon (CNRS-L), as well as the French Institute-Campus France for the financial support of Racha Majed.

References

- Arnaud, M., A. Chastanet & M. Debarbouille (2004) New vector for efficient allelic replacement in naturally nontransformable, low-GC-content, gram-positive bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 6887-6891.
- Bazaka, K., R. J. Crawford, E. L. Nazarenko & E. P. Ivanova (2011) Bacterial extracellular polysaccharides. *Adv Exp Med Biol*, 715, 213-26.
- Bechet, E., S. Guiral, S. Torres, I. Mijakovic, A. J. Cozzzone & C. Grangeasse (2009) Tyrosine-kinases in bacteria: from a matter of controversy to the status of key regulatory enzymes. *Amino Acids*, 37, 499-507.
- Branda, S. S., J. E. Gonzalez-Pastor, E. Dervyn, S. D. Ehrlich, R. Losick & R. Kolter (2004) Genes involved in formation of structured multicellular communities by *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*, 186, 3970-3979.
- Chan, Y. G., H. K. Kim, O. Schneewind & D. Missiakas (2014) The capsular polysaccharide of *Staphylococcus aureus* is attached to peptidoglycan by the LytR-CpsA-Psr (LCP) family of enzymes. *J Biol Chem*, 289, 15680-90.
- de Jong, I. G., P. Haccou & O. P. Kuipers (2011) Bet hedging or not? A guide to proper classification of microbial survival strategies. *Bioessays*, 33, 215-23.
- Dubois, T., K. Faegri, S. Perchat, C. Lemy, C. Buisson, C. Nielsen-LeRoux, M. Gohar, P. Jacques, N. Ramarao, A. B. Kolsto & D. Lereclus (2012) Necrotrophism is a quorum-sensing-regulated lifestyle in *Bacillus thuringiensis*. *PLoS Pathog*, 8, e1002629.
- Eberhardt, A., C. N. Hoyland, D. Vollmer, S. Bisle, R. M. Cleverley, O. Johnsborg, L. S. Havarstein, R. J. Lewis & W. Vollmer (2012) Attachment of capsular polysaccharide to the cell wall in *Streptococcus pneumoniae*. *Microb Drug Resist*, 18, 240-55.
- El-Khoury, N., R. Majed, S. Perchat, M. Kallassy, D. Lereclus & M. Gohar (2016) Spatio-Temporal Evolution of Sporulation in *Bacillus thuringiensis* Biofilm. *Front Microbiol*, 7, 1222.
- Elsholz, A. K., S. A. Wacker & R. Losick (2014) Self-regulation of exopolysaccharide production in *Bacillus subtilis* by a tyrosine kinase. *Genes Dev*, 28, 1710-20.
- Flemming, H.-C. & J. Wingender (2010) The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*, 8, 623-633.
- Gao, T., L. Foulston, Y. Chai, Q. Wang & R. Losick (2015) Alternative modes of biofilm formation by plant-associated *Bacillus cereus*. *Microbiologyopen*, 4, 452-64.
- Guerout-Fleury, A. M., K. Shazand, N. Frandsen & P. Stragier (1995) Antibiotic-resistance cassettes for *Bacillus subtilis*. *Gene*, 167, 335-336.
- Holst, O. & S. Müller-Loennies. 2007. Microbial Polysaccharide Structures. In *Introduction to Glycoscience; Synthesis of Carbohydrates*, ed. J. P. Kamerling.
- Houry, A., M. Gohar, J. Deschamps, E. Tischenko, S. Aymerich, A. Gruss & R. Briandet (2012) Bacterial swimmers that infiltrate and take over the biofilm matrix. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109, 13088-93.
- Irnov, I. & W. C. Winkler (2010) A regulatory RNA required for antitermination of biofilm and capsular polysaccharide operons in *Bacillales*. *Mol. Microbiol.*, 76, 559-75.
- Islam, S. T. & J. S. Lam (2014) Synthesis of bacterial polysaccharides via the Wzx/Wzy-dependent pathway 1. *Canadian journal of microbiology*, 60, 697-716.

- Ivanova, N., A. Sorokin, I. Anderson, N. Galleron, B. Candelon, V. Kapatral, A. Bhattacharyya, G. Reznik, N. Mikhailova, A. Lapidus, L. Chu, M. Mazur, E. Goltsman, N. Larsen, M. D'Souza, T. Walunas, Y. Grechkin, G. Pusch, R. Haselkorn, M. Fonstein, E. S. Dusko, R. Overbeek & N. Kyrpides (2003) Genome sequence of *Bacillus cereus* and comparative analysis with *Bacillus anthracis*. *Nature*, 423, 87-91.
- Kim, W., S. B. Levy & K. R. Foster (2016) Rapid radiation in bacteria leads to a division of labour. *Nat Commun*, 7, 10508.
- Lauderdale, K. J., C. L. Malone, B. R. Boles, J. Morcuende & A. R. Horswill (2010) Biofilm dispersal of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* on orthopedic implant material. *J Orthop Res*, 28, 55-61.
- Lereclus, D., O. Arantes, J. Chaufaux & M. Lecadet (1989) Transformation and expression of a cloned delta-endotoxin gene in *Bacillus thuringiensis*. *FEMS Microbiology Letters*, 51, 211-217.
- Lereclus, D., M. Vallade, J. Chaufaux, O. Arantes & S. Rambaud (1992) Expansion of insecticidal host range of *Bacillus thuringiensis* by in vivo genetic recombination. *Biotechnology (N Y)*, 10, 418-21.
- Liszewski Zilla, M., Y. G. Chan, J. M. Lunderberg, O. Schneewind & D. Missiakas (2015) LytR-CpsA-Psr enzymes as determinants of *Bacillus anthracis* secondary cell wall polysaccharide assembly. *J Bacteriol*, 197, 343-53.
- Lovering, A. L., S. S. Safadi & N. C. Strynadka (2012) Structural perspective of peptidoglycan biosynthesis and assembly. *Annu Rev Biochem*, 81, 451-78.
- Majed, R., C. Faille, M. Kallassy & M. Gohar (2016) *Bacillus cereus* Biofilms-Same, Only Different. *Front Microbiol*, 7, 1054.
- Mijakovic, I. & J. Deutscher (2015) Protein-tyrosine phosphorylation in *Bacillus subtilis*: a 10-year retrospective. *Front Microbiol*, 6, 18.
- Ramarao, N. & D. Lereclus (2006) Adhesion and cytotoxicity of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* to epithelial cells are FlhA and PlcR dependent, respectively. *Microbes.Infect.*, 8, 1483-1491.
- Rowe, G. E., A. Margaritis & N. Wei (2003) Specific oxygen uptake rate variations during batch fermentation of *Bacillus thuringiensis* subspecies *kurstaki* HD-1. *Biotechnol Prog*, 19, 1439-43.
- Ruhmann, B., J. Schmid & V. Sieber (2015) Methods to identify the unexplored diversity of microbial exopolysaccharides. *Front Microbiol*, 6, 565.
- Schaffer, C. & P. Messner (2005) The structure of secondary cell wall polymers: how Gram-positive bacteria stick their cell walls together. *Microbiology*, 151, 643-51.
- Schuch, R., A. J. Pelzek, A. Raz, C. W. Euler, P. A. Ryan, B. Y. Winer, A. Farnsworth, S. S. Bhaskaran, C. E. Stebbins, Y. Xu, A. Clifford, D. J. Bearss, H. Vankayalapati, A. R. Goldberg & V. A. Fischetti (2013) Use of a bacteriophage lysin to identify a novel target for antimicrobial development. *PLoS One*, 8, e60754.
- Sutherland, I. (2001) Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology*, 147, 3-9.
- van Gestel, J., H. Vlamakis & R. Kolter (2015a) Division of Labor in Biofilms: the Ecology of Cell Differentiation. *Microbiol Spectr*, 3, MB-0002-2014.
- van Gestel, J., H. Vlamakis & R. Kolter (2015b) From cell differentiation to cell collectives: *Bacillus subtilis* uses division of labor to migrate. *PLoS Biol*, 13, e1002141.

- Verplaetse, E., L. Slamti, M. Gohar & D. Lereclus (2015) Cell Differentiation in a *Bacillus thuringiensis* Population during Planktonic Growth, Biofilm Formation, and Host Infection. *MBio*, 6.
- Weiser, J. N., D. Bae, H. Epino, S. B. Gordon, M. Kapoor, L. A. Zenewicz & M. Shchepetov (2001) Changes in availability of oxygen accentuate differences in capsular polysaccharide expression by phenotypic variants and clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun*, 69, 5430-9.
- Yother, J. (2011) Capsules of *Streptococcus pneumoniae* and other bacteria: paradigms for polysaccharide biosynthesis and regulation. *Annu Rev Microbiol*, 65, 563-81.

Chapitre II

**Etude transcriptionnelle des loci
impliqués dans la formation du biofilm
chez *B. thuringiensis*.**

La formation des biofilms est un processus étroitement contrôlé. Après avoir caractérisé la fonction de deux loci *eps* dans la formation du biofilm chez *B. thuringiensis*, nous avons voulu regarder i) l'expression de ces loci dans plusieurs conditions, ii) leur régulation au niveau transcriptionnel et iii) leur régulation post-traductionnelle.

Pour conduire ces études, nous avons construit une fusion transcriptionnelle entre le promoteur situé en amont du locus *eps2* et le gène rapporteur *lacZ*. Cette fusion montre que *eps2* est surexprimé en culture planctonique en milieu de sporulation HCT ou en biofilm, comparativement à une culture planctonique en milieu LB.

Contrairement à *eps2*, *eps1* est organisé en 3 opérons et le troisième opéron de ce locus contient les gènes qui codent pour les glycosyltransférases, acétyltransférases et des enzymes impliquées dans l'élongation et l'export de la chaîne polysaccharidique. Une fusion transcriptionnelle entre le promoteur de ce troisième opéron et *lacZ* montre une très faible expression, 20 fois inférieure à celle observée pour *eps2*, sans surexpression en biofilm. Compte tenu du faible niveau d'expression de l'opéron 3 de *eps1*, et afin de pouvoir étudier cette transcription dans différentes conditions, nous avons eu recours à la qRT-PCR plutôt qu'à la fusion transcriptionnelle de son promoteur avec *lacZ* pour la quantifier.

En utilisant ces fusions transcriptionnelles ou la qRT-PCR, nous avons déterminé l'effet de différents régulateurs sur la transcription de *eps1* et *eps2*. Ces régulateurs ont été sélectionnés pour leur effet connu chez *B. subtilis* sur la production des exopolysaccharides de la matrice du biofilm, et pour leur disponibilité dans la collection de mutants dont nous disposons au laboratoire. Nos résultats montrent que les deux loci *eps* de *B. thuringiensis* sont régulés d'une façon similaire. Leur transcription est réprimée par AbrB, stimulée par Spo0A, et réprimée en phase exponentielle ou stimulée en phase stationnaire par CodY. SinR, en revanche, n'a aucun effet sur la transcription de ces loci

La régulation post-traductionnelle de la production des exopolysaccharides chez différentes espèces bactériennes à Gram positif et Gram négatif fait appel à des tyrosines kinases. Le locus *eps1* présente deux tyrosines kinases, une tyrosine phosphatase et un modulateur, alors que le locus *eps2*, plus simple, ne possède qu'une seule tyrosine kinase, un modulateur et pas de tyrosine phosphatase. J'ai donc, pour

déterminer le rôle des tyrosines kinases dans la formation de biofilms, choisi d'étudier ce rôle en priorité pour le locus *eps2*. La délétion de la tyrosine kinase et le double mutant (tyrosine kinase + modulateur) n'affectent pas la formation du biofilm chez *B. thuringiensis*, contrairement à ce qui a été observé chez *B. subtilis* (Mijakovic and Deutscher 2015, Elsholz et al. 2014). De plus, chez ces deux mutants la mobilité bactérienne sur une gélose à 0,3 % d'agar, comparée celle de la souche sauvage, n'a pas été affectée.

Transcriptional regulation of two loci *eps1* and *eps2* involved in the formation of *B. thuringiensis* biofilm

Majed R.^{1,2}, Bennaceur I.¹, Perchat S.¹, Lereclus D.¹, Kallassy M.^{1,2}, Gohar M.^{1*}

¹ Micalis Institute, INRA, AgroParisTech, Université Paris-Saclay, 78350 Jouy-en-Josas, France.

² Université Saint-Joseph, Laboratoire de Biotechnologie, Unité de Recherche Technologies et Valorisation Alimentaire, Beirut, Lebanon.

*Correspondence to: michel.gohar@inra.fr

Abstract

A biofilm is a multicellular community of surface-associated bacteria assembled and encased in a self-produced matrix usually composed of proteins, extracellular DNA and exopolysaccharides. In *B. thuringiensis*, two loci are involved in the production of the exopolysaccharides component of the matrix: *eps1* and *eps2*. This study aims to investigate the transcriptional regulation of the two loci by analysing the role of four transition-state regulators on their transcription: SinR, AbrB, Spo0A and CodY. As a matter of fact, their effects on the *eps* expression were evaluated, after several hours at 30 °C on a Luria Bertani medium (LB). By using transcriptional fusion between the *eps2* promoter and the *lacZ* gene and qRT-PCR techniques, our data showed that the *eps* loci are regulated identically by the same set of regulators. While SinR had no role on the transcription of the *eps* loci, this transcription was activated by Spo0A and repressed by AbrB. Moreover, CodY inhibited their expression in late exponential phase but promoted it in late stationary phase.

Keywords: *Bacillus thuringiensis*; Biofilm matrix; gene expression.

Introduction

In nature, most bacteria live in communities called biofilms (Costerton et al. 1995). Biofilms, which stick to solid surfaces or float on liquid environments, are heterogeneous structures with specific architectures, and can include a single or multiple microbial species in various physiological states. In biofilms, bacteria are encased in a self-produced matrix composed mainly of proteins, extracellular DNA and exopolysaccharides. The production of this matrix is tightly regulated.

Bacillus subtilis, a Gram-positive bacterium, shares several regulation pathways with *B. thuringiensis*, and includes two operons involved in the production of the biofilm matrix. In this species, the protein component of the matrix requires the *tapA-sipW-tasA* operon while the production of the polysaccharidic component of the matrix is dependent on the *epsA-O* locus. Expression of *epsA-O* is controlled by a number of regulators (Vlamakis et al. 2013), including Spo0A, AbrB and SinR (Branda et al. 2001, Kearns et al. 2005, Hamon and Lazazzera 2001). Spo0A, the master sporulation regulator, is activated by a quorum sensing system and by a phosphorylation cascade. The level of Spo0A phosphorylation (Spo0A~P) determines the bacterium commitment into specific differentiation programs. Low to intermediate levels of Spo0A~P activate the transcription of *tapA-sipW-tasA* and *epsA-O* and trigger the formation of biofilm, whereas higher level of Spo0A~P drives the bacterium into the sporulation process. The positive effect of Spo0A~P on biofilm formation is exerted through the two repressors SinR and AbrB, which both inhibits the transcription of the two operons *tapA-sipW-tasA* and *epsA-O* (Verhamme et al. 2009, Kearns et al. 2005). Spo0A~P represses the transcription of *abrB* and promotes the expression of *sinI*, which codes for SinI, an antagonist of SinR (Lewis et al. 1996).

The regulation of biofilm formation in *B. thuringiensis* displays similarities and differences with *B. subtilis* (Majed et al. 2016). Two homologues of *tasA* are found in the *B. thuringiensis* sequenced genome, all located in the same chromosomal locus, which includes the three transcriptional units *sipW-tasA*, BC1280 (which product is a protein of unknown function) and *calY*. CalY and TasA are required for biofilm formation, and the transcription of the whole locus is regulated by Spo0A~P, SinR and AbrB in the same way as it is in *B. subtilis* (Caro-Astorga et al. 2014, Pflughoeft et al. 2011, Fagerlund

et al. 2014). Yet, how is regulated the production of the polysaccharidic component of the matrix in *B. thuringiensis* is still unknown. We have recently shown that two *eps* loci, *eps1* and *eps2*, are required for the formation of biofilms in *B. thuringiensis* (Majed et al. 2017, submitted). Each locus is responsible for the construction of a specific structure of the biofilm, namely the ring for *eps1* and the pellicle for *eps2*. In this work, we have investigated the role of Spo0A, AbrB and SinR in *eps1* and *eps2* transcription. We added to these regulators CodY. Indeed, the pleiotropic regulator CodY, which senses the energy and the nutriment state of the bacteria (Sonenshein 2005), has been reported to promote biofilm formation in *B. cereus* UW101C (Hsueh et al. 2008) and to repress biofilm formation in *B. cereus* ATCC14579 strain (Lindback et al. 2012).

Results

Transcription of *eps1* and *eps2*

The *eps1* locus is composed of three operons (Majed et al. 2017, submitted). The two first include genes coding for post-transcriptional regulators, whereas the last one include genes involved in polysaccharides synthesis and export. A transcriptional fusion between the region located upstream the last *eps1* operon (*eps1*₃) and *lacZ* revealed that the transcription of this operon in planktonic cultures increased throughout the exponential phase and peaked 4 hours after entry into stationary phase (Figure 1a). In biofilm, the transcription of *eps1*₃ increased until 48 h of culture, but remained slightly under the level recorded for planktonic cultures (Figure 1a), suggesting that, in contrast to the *epsA-O* locus of *B. subtilis* (Kearns et al. 2005), *eps1*₃ is not overexpressed in biofilm. This result was confirmed by qRT-PCR (Figure S1). Contrarily to *eps1*, *eps2* includes only one operon. The transcription of *eps2* in planktonic culture and in LB was more than 20 times higher when compared to *eps1*, and was even greater, by a 4-fold ratio, when the culture was conducted in the sporulation medium HCT (Figure S2). This expression started at the end of the exponential phase and increased throughout the stationary phase to reach a maximum at T13 (13 hours after the entry to the stationary phase) (Figure 1b). In biofilms, *eps2* was overexpressed when compared to planktonic cultures. The expression of *eps2* in biofilms increased to reach a maximum after 24 h of culture, and decreased subsequently to become stable after 72 h of culture (Figure 1b).

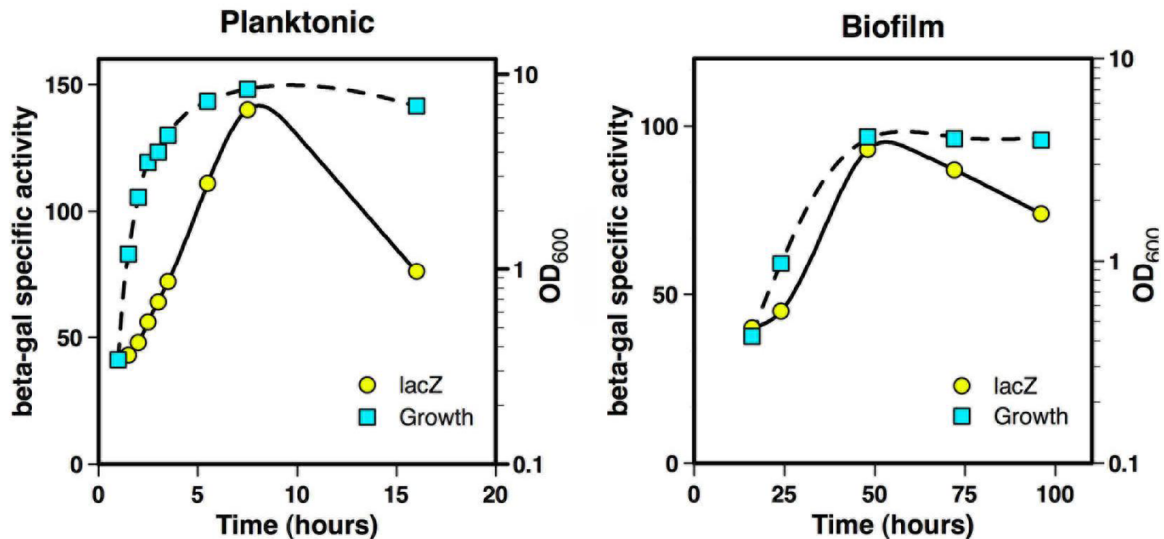


Figure 1a. Transcriptional analysis of the *eps1* gene cluster.

Expression of *eps1₃* operon as measured by a *lacZ* fusion, in planktonic culture and in biofilm. Planktonic culture growth in flask was monitored for 16 hours and biofilm growth in glass tube was recorded for 96 hours. Similar results were obtained for two replicates, of which only one is shown. Blue squares: growth curve. Yellow circles: beta-galactosidase specific activity.

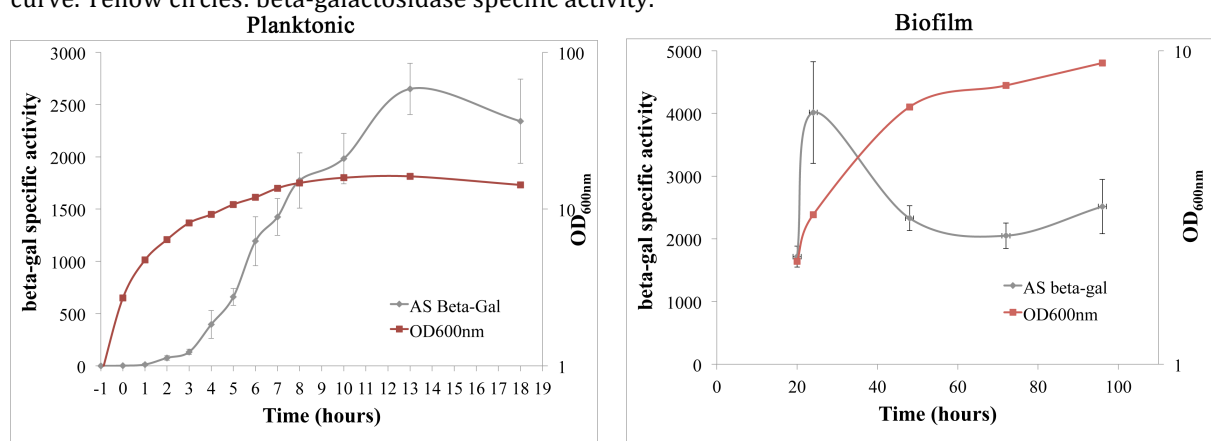


Figure 1b. Transcriptional analysis of the *eps2* gene cluster.

Expression of the *eps2* operon as measured by a *lacZ* fusion, in planktonic culture and in biofilm. Planktonic culture growth in Erlenmeyer was monitored for 18 hours and biofilm growth in glass tube was recorded for 96 hours. Similar results were obtained for three independent replicates, of which only one is shown. Red squares: growth curve. Grey triangles: beta-galactosidase specific activity.

Regulation of *eps1* and *eps2* transcription

The effect of regulators on *eps1₃* expression was determined with a *lacZ* fusion, while the regulation of *eps1₃* was analyzed by using qRT-PCR, because of the low expression level of this operon.

Our results showed that the expression of the two *eps* loci is widely dependent on *spo0A*, *abrB* and *codY*. Transcription of *eps2* in *spo0A* deficient strains was similar to that in the wild-type strain until early stationary phase, a point when the two transcription curves

started to diverge (Figure 2), leading to a 12-fold reduction in *eps2* transcription 5 hours after the entry into stationary phase (Figure 2). The *eps1₃* expression was also decreased in the *spo0A* mutant strain in stationary phase, while its transcription was slightly increased in late exponential phase (Table 1). Therefore, the deletion of *spo0A* significantly downregulated *eps2* and *eps1₃* transcription in stationary phase.

In contrast, the deletion of *abrB* led to a strong upregulation of transcription of *eps2*, which was 10 times more expressed than the wild type strain at T5 (Figure 2). The expression of *eps1₃* in the *abrB* mutant was significantly upregulated throughout the stationary phase but the effect of AbrB was maximum at T8, a time where the expression of *eps1₃* was 72-fold upregulated (Table 1). These observations show that AbrB acts as a strong negative regulator of both *eps* loci.

While, SinR represses the *epsA-O* operon in *B. subtilis*, this regulator has no significant effect on the regulation of the *eps2* locus. Indeed, the expression of *eps2* was at similar levels in both the wild type strain and the *sinI* mutant strain (Figure 2). It was recently reported that the SinR regulon includes none of the *eps* loci (Fagerlund et al. 2014), and we confirm here this finding.

We also measured the expression of the *eps1* and *eps2* loci in the *codY* mutant by qRT-PCR. We used this method for both loci because the *codY* mutant was hardly transformable by a plasmid. Interestingly, the pleiotropic regulator CodY represses the expression of both *eps* loci in late exponential phase (T-1) and activates their expression in late stationary phase (T8). In late exponential phase, the expressions of *eps2* and *eps1* are, respectively, 15-fold and ~5-fold upregulated in the *codY* mutant (Table 1). However, in stationary phase the expressions of *eps2* and *eps1* are respectively, 63-fold and 13-fold downregulated in the *codY* mutant (Table 1). The effect of CodY in the regulation of the *eps* loci is more important for *eps2* than for *eps1*.

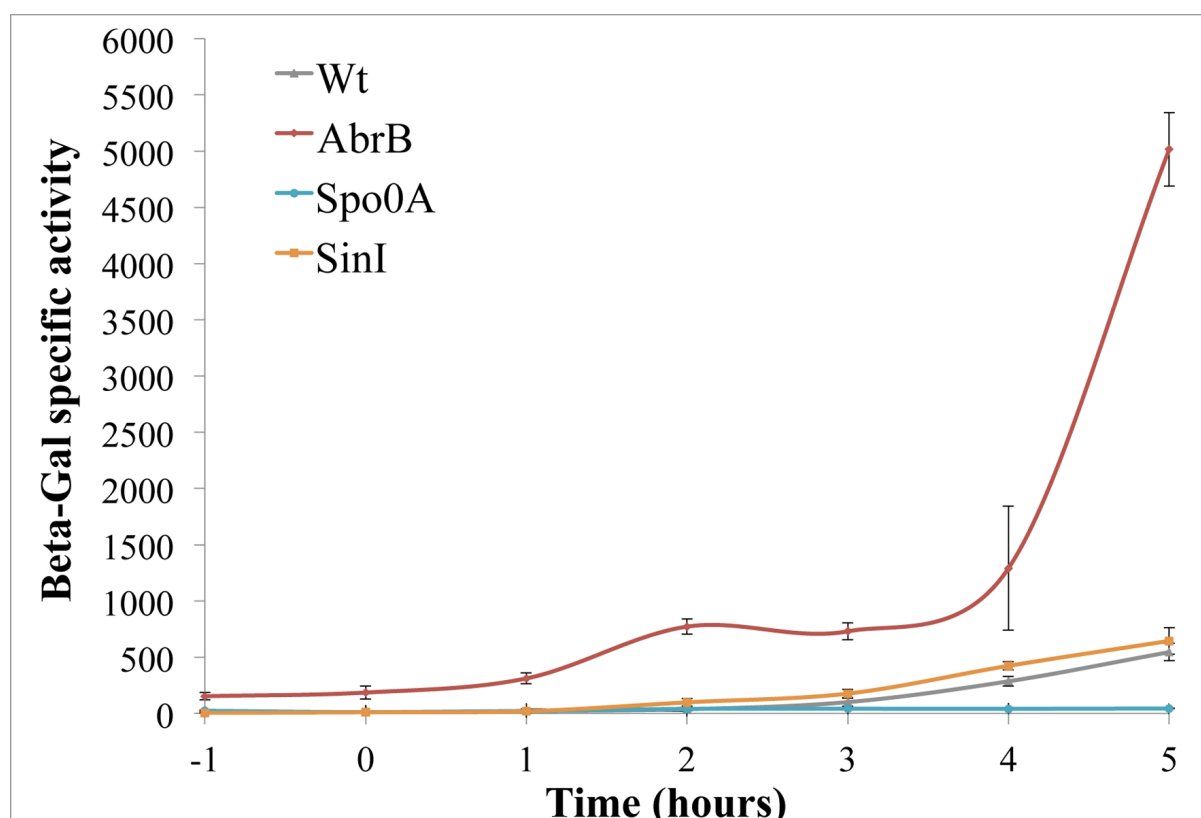


Figure 2. Expression of *eps2* locus in different mutant strains of *B. thuringiensis*.

Transcription of *eps2* locus was monitored in planktonic cultures in Luria Bertani medium (LB) for the wild type strain (grey triangle), for the *abrB* strain (red lozenge), for the *spo0A* strain (blue circle) and *sinI* strain (orange square). Each circle is the mean of three replications and the error bars represent standard deviation of the mean.

Table 1. Normalized relative expression of *eps* loci in mutant strains of *B. thuringiensis* after different hours of culture.

<i>eps1</i>				
Conditions	T-1	T2	T4	T8
Regulators	Relative expression			
<i>spo0A</i>	2,7*	0,25*	0,17*	0,23*
<i>abrB</i>	25,7*	31,24*	72,77*	6*
<i>codY</i>	4,75 *	0,815	1,65	0,076*

<i>eps2</i>				
Conditions	T-1	T2	T4	T8
Regulators	Relative expression			
<i>codY</i>	15,16*	1	1,60	0,0158*

Normalized gene expression of the following loci: *eps1* and *eps2* in the Luria Bertani Medium (LB) after

several hours of culture at 30 °C. The results were calculated by the delta-delta Cq approximation, where the expression level of the target genes was normalized by the expression of the reference gene (*tpi*) and was expressed relative to the control (the wild-type strain). Statistical analysis was made using the GraphPad prism 6 software (version 6.07 for windows, 2015, GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). Data with (*) = significant difference ($p < 0.05$).

Discussion

The matrix is a key element of biofilms, in which they account for more than 90% of the biomass, and polysaccharides represent the major part of it (Flemming and Wingender 2010). Two polysaccharides, Eps1 and Eps2, are involved in the construction of the *B. thuringiensis* biofilm (Majed et al. 2017, submitted), but the regulation pathways leading to their production is unknown (Majed et al. 2016). While SinR was shown to repress matrix polysaccharides production in *B. subtilis* (Kearns et al. 2005), this regulator does not control the exopolysaccharides production in *B. thuringiensis*, as shown previously (Fagerlund et al. 2014) and in the present work. Therefore, we sought, in this study, to investigate how *B. thuringiensis* regulates the transcription of the two independent loci *eps1* and *eps2*, involved in the exopolysaccharides biosynthesis required for biofilm formation.

Transcription of the two *eps* loci displayed differences, which might reflect their different roles in the bacterium physiology. The *eps1* locus was transcribed at low level both in planktonic culture and in biofilm, in contrast to *eps2*, which was highly expressed in planktonic culture and overexpressed in biofilm. While Eps1 polysaccharides are bound to the cell wall, Eps2 polysaccharides are diluted in much higher volumes - the extracellular space in planktonic culture or the matrix in biofilm. Therefore, the amount of Eps2 required to reach the concentration needed to fulfill their physiological role - building the matrix for example - is likely to be much higher than for Eps1. However, the transcription of the two loci peaked in the stationary phase of culture, suggesting that they both might be controlled by transition-state regulators.

We indeed found that three transition-state regulators, Spo0A, AbrB and CodY, are involved in the regulation of *eps1* and *eps2* transcription. Within these regulators, AbrB has the greatest effect, with a repression ratio over 10 for both loci. AbrB was already described as a repressor of the *epsA-O* locus in *B. subtilis* (Hamon and Lazazzera 2001) and represses also the expression of the proteic component of the biofilm matrix in *B.*

subtilis (Hamon et al. 2004) and in *B. thuringiensis* (Fagerlund et al. 2014). AbrB transcription is under the negative control of Spo0A (Strauch et al. 1990). The positive effect of Spo0A on *eps1* and *eps2* transcriptions can therefore be explained, at least in part, by the negative effect of this regulator on AbrB transcription. However, the kinetic of Spo0A and AbrB effects on the *eps* loci transcriptions along the growth curve are different, which suggests that Spo0A act on the *eps* loci transcription by other means than through AbrB. This hypothesis is supported by the observation that the transcription ratio induced by *spo0A* deletion is much lower than the transcription ratio obtained after *abrB* deletion, at least for *eps1*. Also, the increased transcription of *eps2* in the sporulation medium HCT is likely to be explained by the positive effect of Spo0A on this transcription, since the level of activated Spo0A increases in sporulation media (Fujita and Losick 2005).

CodY is a pleiotropic regulator that monitors the general nutritional state of the bacteria by sensing the intracellular pool of GTP and branched-chain amino acids (Sonenshein 2005). In rich growth conditions, when GTP and branched-chain amino acids (BCAA) are abundant, CodY is activated and acts as a repressor of stationary phase genes. At the onset of the stationary phase, the intracellular drop of GTP and BCAA availability inactivates CodY and thereby induces expression of the CodY-repressed genes. In *B. thuringiensis*, NprR induces necrotrophism (Dubois et al. 2012) and PlcR controls most virulence genes (Gohar et al. 2008). In the same species and in *B. cereus*, CodY represses NprR transcription in exponential phase (Dubois et al. 2013) while it triggers PlcR transcription in stationary phase (Frenzel et al. 2012, Lindback et al. 2012) by promoting the production of a transporter required for the import of the PlcR activating peptide, PapR (Slamti et al. 2015). We showed that CodY also reduces the transcription of the *eps* loci in late exponential phase, and activates strongly this transcription in late stationary phase, connecting the transcription of these loci to the nutritional state of the bacteria. The activating effect of CodY on the *eps* loci transcriptions is likely to be mediated by other regulators included in the CodY regulon.

Materiel and method

Strains

Strain 407 (Lereclus et al. 1989) is a *B. thuringiensis* strain (genome sequence at NCBI: NZ_CM000747) genetically close to *B. cereus* reference strain ATCC14579, and undistinguishable from *B. cereus* due to the loss of plasmids encoding insecticidal crystal toxins. All the mutant strains used in this study *Escherichia E. coli* K-12 strain TG1 [$\Delta(lac-proAB)$ *supE thi hsd-5* (F' traD36 *proA+ proB+ lacIq lacZ*ΔM15)] was used as a host for cloning experiments, and *E. coli* strain ET 12567 (F- *dam-13* : :Tn9 *dcm-6 hsdM hsdR recF143 zjj-202* : : Tn10 *galK2 galT22 ara14 pacY1 xyl-5 leuB6 thi-1*) was used to prepare DNA for *B. thuringiensis* transformation.

DNA manipulation

Chromosomal DNA was extracted using the Puregene Yeast/Bact. Kit B (QIAGEN, France). Plasmid DNA was extracted using QIAprep spin columns (QIAGEN, France). Restriction enzymes (New England Biolabs, USA) and T4 DNA ligase (New England Biolabs, USA) were used in accordance with the manufacturer's recommendations. Oligonucleotide primers (Table 2) were synthesized by Sigma-Prologo (Paris, France). PCRs were performed in an Applied Biosystem 2720 Thermal cycler (Applied Biosystem, USA). Amplified fragments were purified using the QIAquick PCR purification Kit (QIAGEN, France). Digested DNA fragments were separated on 1 % (w/V) agarose gels after digestion and extracted from gels using the QIAquick gel extraction Kit (QIAGEN, France). Nucleotide sequences were determined by GATC Biotech (Constance, Germany).

Transcriptional fusions and beta-galactosidase assays

Putative terminators were searched using ARNold online software (<http://rna.igmors.u-psud.fr/toolbox/arnold/index.php#Principles>). Expression of the *eps1* variable region was monitored using a transcriptional fusion between the P3 promoter region and *lacZ*. A 969 bp DNA sequence containing the P3 promoter was amplified using primers PgalU1_F and PgalU1_R (Table 2) and inserted between the *PstI* and *XbaI* sites of pHT304-18Z (Perchat et al. 2011), to give pHT304-18ΩP3eps1'-*lacZ*. This plasmid was transferred into the 407 wild type strain. For *eps2*, a 281 bp DNA sequence containing the putative promoter was amplified by PCR using primers Rach3F and Rach3R (Table 2) and inserted between the *PstI* and *XbaI* sites of pHT304-18Z, to obtain pHT304-18ΩPeps2'-*lacZ*. This plasmid was transferred into the 407 wild type strain and several mutants of the 407.

For Beta-galactosidase activity measurement, biofilms were obtained from glass tubes, and the biofilm ring and pellicle were washed twice with PBS to eliminate planktonic cells present in the culture medium. The bacterial cells were recovered by centrifugation from planktonic cultures and from biofilms. Cells were lysed using the FastPrep-24 MP (Biomedicals); Beta-galactosidase specific activities were measured as described previously (Bouillaut et al. 2005), and expressed in units of Beta-galactosidase per mg protein (Miller units). Three independent assays were performed for each culture condition.

RT and qRT-PCR assays.

B. thuringiensis cells were grown LB at 30 °C with 175 rpm shaking, where samples were harvested at several points of the culture (T-1, T2, T4 and T8). The samples were centrifuged and the pellets were resuspended in 1 mL of Tri-Reagent (Sigma-Aldrich) and stored at -20 °C for 24 hours. Resuspended cells were disrupted by bead beating (Mini 0.1 mm zirconia/silica beads, Biospec Products) for 2 × 45 s at 6.5 M/s in a Fastprep 24 (MP Biomedicals). The total RNA was isolated from the supernatant by following the manufacturer's instructions (Sigma-Aldrich). Contaminating DNA was removed by DNase treatment (Thermo Scientific) by following the manufacturer's instructions. RNA quantity and integrity was assessed via A260/A280 and A260/A230 (NanoDrop 2000, Thermo Scientific). cDNA was synthesized using RevertAid first strand cDNA synthesis (Thermo Scientific). In 12 µl reaction volume, 500 ng of total RNA and 5 µmol of Random primer were incubated at 65°C for 5 min. After ice chill, 8 µl of RT mix (4 µl 5× RT buffer, 1 µl 10 mM each dNTP, 200 U RevertAid Reverse transcriptase, 20 U RiboLock RNase Inhibitor (Thermo Scientific) were added, and the reaction mix was incubated at 25°C for 5 min, at 42°C for 1 h before inactivation at 70°C for 5 min. For negative controls, reverse transcriptase was omitted.

For qRT-PCR

Primers were added (Table 2) to a final concentration of 1 µM. A volume of 7.5 µl iTaq Universal SYBR Green I Supermix (BioRad) was added, and the volume was adjusted to 15 µl. Primers were designed to give PCR products around 100 bp. The reference gene, *tpi* (BTB_c53280), was included on every plate.

The reactions were held using CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System Bio-Rad (Bio-Rad Diagnostics, Dreieich, Germany). Cycling conditions were 95 °C for 3 minutes

followed by 40 cycles at 95 °C for 30 seconds, 57 °C for 30 seconds. Cp values were determined using 2nd derivative max, and are means of two technical replicates and three biological replicates. The results were calculated by the delta-delta Cq approximation, where the expression level of the target genes was normalized by the expression of the reference gene (*tpi*) and was expressed relative to the control (the wild-type strain).

Table 2. Primers used in this study.

Primer name	Nucleotide Sequence	Restriction site*	Amplicon size (bp)	Efficiency
Rach3F	AACTGCAGTTG AAAAACGCT ATTCATC	<i>PstI</i>	281	-
Rach3R	TGCTCTAGACTTTTACATCA ACTCC	<i>XbaI</i>		
PgalU1_F	AACTGCAGTTA ACGCAAGTAA CGGCAG	<i>PstI</i>	969	-
PgalU1_R	TGCTCTAGATCCATCAATTGG CGTAAACATG	<i>XbaI</i>		
qRT-PCR-Oper3-F	GCAATTATCCCAGCCGCTGG	-	90	96,4%
qRT-PCR-Oper3-R	CGGTTTATCGACGATAGGTAAC ATTTC	-		
qRT-PCR-eps2-F	GGTTTAATCGCTCATGGACGAT TG	-	112	108,9%
qRT-PCR-eps2-R	ACAAGCGACCAAATCACACCG	-		
Tpi-F	TACGGCGGTAGCGTAAACCA	-	115	90,6%
Tpi-R	CCCCAGAAGACCTAAGAACGAA GC	-		

* Bold letters show restricted site

Supplementary data

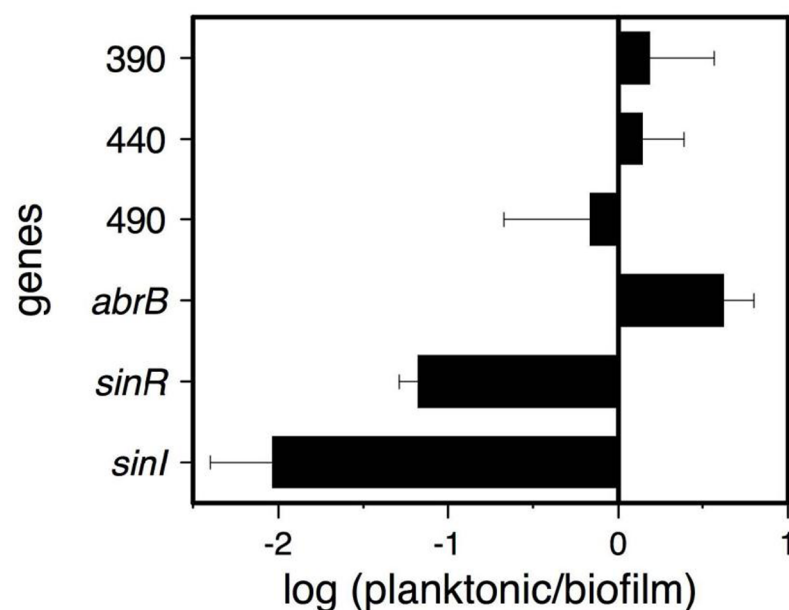


Figure S1. qRT-PCR from mRNA prepared from biofilms and planktonic cultures.

Genes (Bthur0002_51390, Bthur0002_51440 and Bthur0002_51490) from the *eps1* locus are expressed at a similar level in biofilms and in planktonic cultures, whereas *sinI* and *sinR* are overexpressed in biofilms, and *abrB* is downregulated in biofilms.

Methods: An overnight culture of strain 407 was grown in LB medium at 30 C with shaking at 220rpm. The culture was diluted 1:200 in 200 ml bactopectone medium and added to a 1-litre baffled Erlenmeyer-bottle containing 2.0 g glass wool (dry-sterilized). The culture was grown for 25 hours at 30 C with slow shaking at 50rpm. The glass wool was then quickly washed twice in fresh bactopectone medium prewarmed at 30 C, and excess culture medium was gently squeezed off. The washed glass wool was then transferred to ice-cold 60% methanol. The cells were removed from the glass wool by vigorous shaking, the glass wool removed and the cells collected by centrifugation. RNA was isolated using the RNeasy Midi Kit (Qiagen), using a Precellys bead beater for cell lysis. Planktonic cells were prepared from an exponential phase culture grown in bactopectone medium at 30 C and 220rpm for 3 hours after 1:100 dilution of overnight culture. Bars represent the mean $\pm$ standard deviation of the mean of three independent experiments.

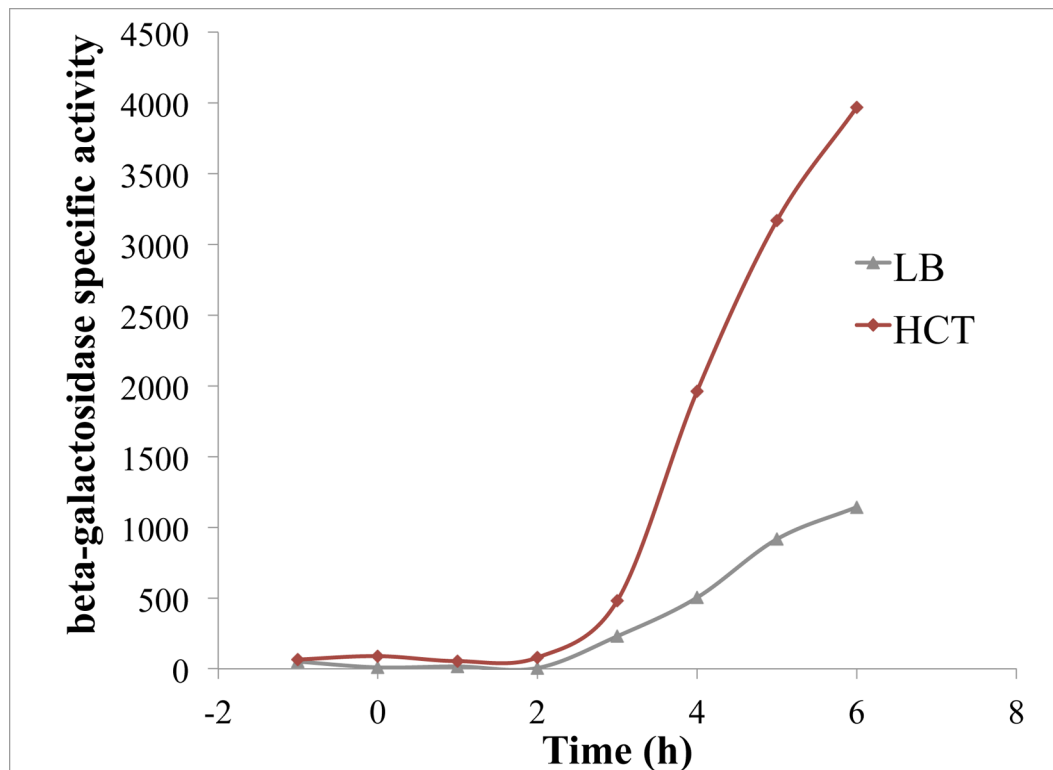


Figure S2. Transcriptional analysis of the *eps2* gene cluster in LB and HCT medium.

Transcription of *eps2* locus was monitored by *lacZ* fusion, in planktonic cultures in Luria Bertani medium (LB) and Hydrolysate Caseine Tryptone medium (HCT). Similar results were obtained for three independent replicates, of which only one is shown

Acknowledgments

The authors would like to thank the National Council for Scientific Research Lebanon (CNRS-L), as well as the French Institute-Campus France for the financial support of Racha Majed.

References

- Bouillaud, L., N. Ramarao, C. Buisson, N. Gilois, M. Gohar, D. Lereclus & C. Nielsen-Leroux (2005) FlhA Influences *Bacillus thuringiensis* PlcR-Regulated Gene Transcription, Protein Production, and Virulence. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 8903-8910.
- Branda, S. S., J. E. Gonzalez-Pastor, S. Ben-Yehuda, R. Losick & R. Kolter (2001) Fruiting body formation by *Bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 11621-6.
- Caro-Astorga, J., A. Perez-Garcia, A. de Vicente & D. Romero (2014) A genomic region involved in the formation of adhesin fibers in *Bacillus cereus* biofilms. *Front Microbiol*, 5, 745.
- Costerton, J. W., Z. Lewandowski, D. E. Caldwell, D. R. Korber & H. M. Lappin-Scott (1995) Microbial biofilms. *Annu.Rev.Microbiol.*, 49, 711-745.
- Dubois, T., K. Faegri, S. Perchat, C. Lemy, C. Buisson, C. Nielsen-LeRoux, M. Gohar, P. Jacques, N. Ramarao, A. B. Kolsto & D. Lereclus (2012) Necrotrophism is a quorum-sensing-regulated lifestyle in *Bacillus thuringiensis*. *PLoS Pathog*, 8, e1002629.
- Dubois, T., S. Perchat, E. Verplaetse, M. Gominet, C. Lemy, M. Aumont-Nicaise, R. Grenha, S. Nessler & D. Lereclus (2013) Activity of the *Bacillus thuringiensis* NprR-NprX cell-cell communication system is co-ordinated to the physiological stage through a complex transcriptional regulation. *Mol Microbiol*, 88, 48-63.
- Fagerlund, A., T. Dubois, O. A. Okstad, E. Verplaetse, N. Gilois, I. Bennaceur, S. Perchat, M. Gominet, S. Aymerich, A. B. Kolsto, D. Lereclus & M. Gohar (2014) SinR controls enterotoxin expression in *Bacillus thuringiensis* biofilms. *PLoS One*, 9, e87532.
- Flemming, H.-C. & J. Wingender (2010) The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*, 8, 623-633.
- Frenzel, E., V. Doll, M. Pauthner, G. Lucking, S. Scherer & M. Ehling-Schulz (2012) CodY orchestrates the expression of virulence determinants in emetic *Bacillus cereus* by impacting key regulatory circuits. *Molecular Microbiology*, 85, 67-88.
- Fujita, M. & R. Losick (2005) Evidence that entry into sporulation in *Bacillus subtilis* is governed by a gradual increase in the level and activity of the master regulator Spo0A. *Genes Dev.*, 19, 2236-2244.
- Gohar, M., K. Faegri, S. Perchat, S. Ravnum, O. A. Okstad, M. Gominet, A. B. Kolsto & D. Lereclus (2008) The PlcR virulence regulon of *Bacillus cereus*. *PLoS One*, 3, e2793.
- Hamon, M. A. & B. A. Lazazzera (2001) The sporulation transcription factor Spo0A is required for biofilm development in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.*, 42, 1199-1210.
- Hamon, M. A., N. R. Stanley, R. A. Britton, A. D. Grossman & B. A. Lazazzera (2004) Identification of AbrB-regulated genes involved in biofilm formation by *Bacillus subtilis* *Molecular Microbiology*, 52, 847-860.
- Hsueh, Y. H., E. B. Somers & A. C. Wong (2008) Characterization of the codY gene and its influence on biofilm formation in *Bacillus cereus*. *Arch Microbiol*, 189, 557-68.
- Kearns, D. B., F. Chu, S. S. Branda, R. Kolter & R. Losick (2005) A master regulator for biofilm formation by *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.*, 55, 739-749.
- Lereclus, D., O. Arantes, J. Chaufaux & M. Lecadet (1989) Transformation and expression of a cloned delta-endotoxin gene in *Bacillus thuringiensis*. *FEMS Microbiology Letters*, 51, 211-217.

- Lewis, R. J., J. A. Brannigan, I. Smith & A. J. Wilkinson (1996) Crystallisation of the *Bacillus subtilis* sporulation inhibitor SinR, complexed with its antagonist, SinI. *FEBS Lett*, 378, 98-100.
- Lindback, T., M. Mols, C. Basset, P. E. Granum, O. P. Kuipers & A. T. Kovacs (2012) CodY, a pleiotropic regulator, influences multicellular behaviour and efficient production of virulence factors in *Bacillus cereus*. *Environ. Microbiol.*, 14, 13.
- Majed, R., C. Faille, M. Kallassy & M. Gohar (2016) *Bacillus cereus* Biofilms-Same, Only Different. *Front Microbiol*, 7, 1054.
- Molle, V., M. Fujita, S. T. Jensen, P. Eichenberger, J. E. Gonzalez-Pastor, J. S. Liu & R. Losick (2003) The Spo0A regulon of *Bacillus subtilis* *Mol Microbiol*, 50, 1683-1701.
- Perchat, S., T. Dubois, S. Zouhir, M. Gominet, S. Poncet, C. Lemy, M. Aumont-Nicaise, J. Deutscher, M. Gohar, S. Nessler & D. Lereclus (2011) A cell-cell communication system regulates protease production during sporulation in bacteria of the *Bacillus cereus* group. *Mol Microbiol*, 82, 619-33.
- Pflughoeft, K. J., P. Sumby & T. M. Koehler (2011) *Bacillus anthracis* *sin* locus and regulation of secreted proteases. *J. Bacteriol.*, 193, 631-9.
- Slamti, L., C. Lemy, C. Henry, A. Guillot, E. Huillet & D. Lereclus (2015) CodY Regulates the Activity of the Virulence Quorum Sensor PlcR by Controlling the Import of the Signaling Peptide PapR in *Bacillus thuringiensis*. *Front Microbiol*, 6, 1501.
- Sonenshein, A. L. (2005) CodY, a global regulator of stationary phase and virulence in Gram-positive bacteria. *Curr.Opin.Microbiol.*, 8, 203-207.
- Strauch, M., V. Webb, G. Spiegelman & J. A. Hoch (1990) The Spo0A protein of *Bacillus subtilis* is a repressor of the *abrB* gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 1801-5.
- Verhamme, D. T., E. J. Murray & N. R. Stanley-Wall (2009) DegU and Spo0A jointly control transcription of two loci required for complex colony development by *Bacillus subtilis* *Journal of Bacteriology*, 191, 100-108.
- Vlamakis, H., Y. Chai, P. Beauregard, R. Losick & R. Kolter (2013) Sticking together: building a biofilm the *Bacillus subtilis* way. *Nat Rev Microbiol*, 11, 157-68.

Conclusion et discussion générale



L'origine des exopolysaccharides impliqués dans la formation du biofilm chez les bactéries du groupe *B. cereus* restait, jusqu'à présent, inconnue. Trois espèces de ce groupe, *B. cereus sensu stricto*, *B. thuringiensis* et *B. mycoides* – mais pas *B. anthracis* – possèdent un locus chromosomique similaire au locus *epsA-O* responsable de la production des exopolysaccharides chez *B. subtilis* (Rasko et al. 2004). Cependant, une étude récente menée chez *B. cereus* conclut que ce locus n'a aucun rôle dans la formation des biofilms (Gao et al. 2015), bien que la matrice du biofilm de *B. thuringiensis* soit particulièrement riche en sucre (Houry et al. 2012). J'ai montré, pendant mes travaux de thèse, que deux exopolysaccharides sont requis pour la formation de deux parties spatialement distinctes du biofilm. L'exopolysaccharide Eps1, dont la biosynthèse est dépendante du locus *eps1* similaire au locus *epsA-O* de *B. subtilis*, est nécessaire pour la formation de l'anneau du biofilm, qui adhère fortement aux parois du récipient contenant le milieu de culture. L'exopolysaccharide dépendant du locus *eps2*, dont c'est ici la première description, est impliqué dans la production de la matrice du biofilm, et est nécessaire pour la formation de la pellicule flottant sur le milieu de culture, remplissant de la sorte une fonction équivalente au locus *epsA-O* de *B. subtilis*. La présence de deux loci dont chacun est nécessaire pour la formation d'une partie spécifique du biofilm n'a jamais été décrite chez d'autres espèces bactériennes. De plus, le locus *eps2* est très conservé, ce qui suggère que la composition de la matrice du biofilm en exopolysaccharides est assez peu variable parmi les bactéries du groupe *B. cereus*. En revanche, le troisième opéron du locus *eps1*, qui contient l'essentiel des glycosyltransférases du locus, est extrêmement variable, ce qui pourrait signifier qu'il existe, parmi les différents isolats de *B. cereus*, *B. thuringiensis* ou *B. mycoides*, des différences importantes entre les polysaccharides dépendants de ce locus (des 'glycotypes'). Ces glycotypes pourraient être en relation avec la niche écologique des différentes souches de *B. cereus* ou de *B. thuringiensis*.

En recherchant la fonction, chez la bactérie, de ces polysaccharides *eps1*-dépendants, nous avons montré qu'ils présentent des propriétés adhésives importantes sur des surfaces biotiques et abiotiques, et nous avons mis en évidence leur localisation à la surface bactérienne. Cette localisation, qui résiste à une agitation mécanique forte, ainsi que la présence dans le locus *eps1* d'un gène dont le produit est la protéine LcpC, présentant 74 % d'identité avec la LcpC de *B. anthracis* (Liszewski Zilla et al. 2015a),

font penser que les polysaccharides Eps1 forment une capsule. La famille des protéines LCP (LytR-CspA-Psr) est en effet décrite chez plusieurs espèces bactériennes comme étant impliquée dans l'attachement de la capsule polysaccharidique à l'acide N-acétylmuramique du peptidoglycane de la paroi via des liaisons phosphodiester (Eberhardt et al. 2012, Chan et al. 2014) et dans l'attachement des SCWP (Secondary Cell Wall Polymers) à la paroi bactérienne (Liszewski Zilla et al. 2015a). Une question intéressante soulevée par cette observation est de savoir si les capsules représentent une forme particulière de ces SCWP. L'existence d'une capsule dépendante du locus chromosomique *eps1*, a priori présente chez l'ensemble des souches de *B. cereus* et *B. thuringiensis*, est ici décrite pour la première fois. L'existence d'une capsule polysaccharidique avait bien été mentionnée auparavant, mais cette dernière est dépendante d'un locus plasmidique et n'a été mentionnée que chez une seule souche de *B. cereus* (Oh et al. 2011). Beaucoup de bactéries produisent des capsules, notamment *S. aureus*, *E. coli* et *S. pneumoniae* (Whitfield 2006, Yother 2011, O'Riordan and Lee 2004). Chez certaines bactéries pathogènes, la capsule est impliquée dans le pouvoir pathogène, en favorisant l'échappement à la réponse immunitaire de l'organisme hôte ou en induisant l'adhésion sur les tissus de l'hôte (Bacon et al. 2001, Soell et al. 1995, Corbett and Roberts 2009, Guerry and Szymanski 2008, Bazaka et al. 2011). L'implication de la capsule *eps1*-dépendante dans l'adhésion de *B. thuringiensis* aux cellules HeLa, nous incite à considérer cette capsule comme un nouveau facteur de virulence chez *B. thuringiensis*. Ainsi, cette capsule pourrait être bifonctionnelle, en étant à la fois impliquée dans la formation du biofilm et dans la virulence bactérienne. De façon intéressante, un autre composant du biofilm chez *B. thuringiensis*, la protéine CalY, est également impliquée à la fois dans l'adhésion sur les tissus de l'hôte et dans la formation de la matrice du biofilm (Candela *et al.*, soumis pour publication), ce qui suggère que le biofilm, dans son ensemble, pourrait être un élément du pouvoir pathogène de *B. thuringiensis* ou de *B. cereus*.

L'hétérogénéité phénotypique de populations bactériennes isogéniques a déjà été décrite, notamment dans les biofilms de *B. thuringiensis* (Verplaetse et al. 2016, Verplaetse et al. 2015). Cependant, nos résultats montrent que cette hétérogénéité est fortement organisée chez cette espèce, dans le sens où les deux exopolysaccharides Eps1 et Eps2 sont produits par deux sous-populations bactériennes différentes, chacune étant localisée à l'endroit même du biofilm où la fonction remplie par chacun de ces

exopolysaccharides est requise. Pour expliquer cette séparation des deux sous-populations, nous faisons l'hypothèse que les phénomènes de mobilité et d'adhésion conduisent à la concentration de la population produisant la capsule au contact de la surface solide, libérant ainsi un espace pour la multiplication de la population produisant l'exopolysaccharide Eps2 de la matrice.

La régulation de la transcription des loci *eps* chez *B. thuringiensis* fait intervenir divers régulateurs de la transition entre les phases exponentielle et stationnaire de la croissance bactérienne. Ainsi, Spo0A, AbrB et CodY contrôlent la transcription de *eps1* et de *eps2* (Figure 30). Ces mêmes régulateurs contrôlent également la transcription des gènes impliqués dans la production de la composante protéique de la matrice du biofilm, ce qui permet une coordination dans la synthèse de ces deux composantes, polysaccharidique et protéique, pendant la formation du biofilm (Figure 30). Cependant, la régulation des composantes protéiques et polysaccharidique présente aussi des différences puisqu'un autre régulateur de la phase de transition, SinR, contrôle la transcription de *sipW-tasA* et de *calY* mais pas celle de *eps1* ou *eps2*.

L'analyse de la transcription des différents loci *eps* montre que le locus *eps2* est nettement plus exprimé que le locus *eps1* en culture planctonique et en biofilm. Deux hypothèses peuvent expliquer cette observation:

- i. Les conditions utilisées au laboratoire ne sont pas adéquates pour l'expression du locus *eps1* et par la suite, on se retrouve avec une faible expression de ce locus.
- ii. Le locus *eps2* est exprimé par une sous-population plus importante que le locus *eps1*. En effet, nous avons remarqué que la proportion de bactéries capsulées, en biofilm ou en culture planctonique, est faible comparativement à la proportion de bactéries non capsulées

Néanmoins, le locus *eps2*, qui ressemble au locus *epsA-O* de *B. subtilis* par sa fonction, est loin de lui être similaire par son niveau d'expression. L'expression du locus *eps2* est détectée en biofilm et en culture planctonique alors que l'expression du locus *epsA-O* de *B. subtilis* n'est détectée qu'en biofilm.

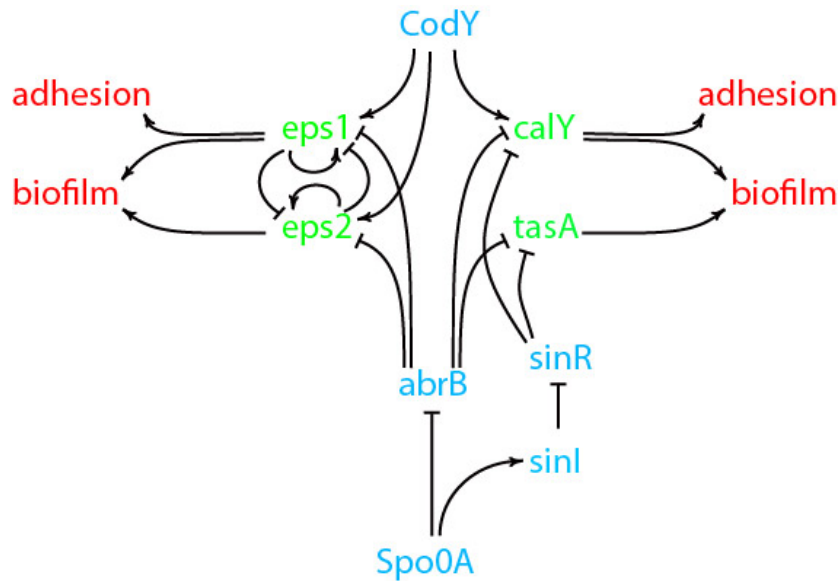


Figure 30. Schéma récapitulatif montrant les voies de régulation des loci impliqués dans la formation de la matrice du biofilm chez *B. cereus*/*B. thuringiensis*.

Nous avons noté que l'hypoxie est une condition nécessaire à la formation de la capsule polysaccharidique chez *B. thuringiensis*. L'hypoxie favorise la production d'une capsule polysaccharide chez d'autres espèces bactériennes, notamment chez *S. pneumoniae* (Weiser et al. 2001). Cependant les mécanismes moléculaires permettant de capter la concentration en oxygène et de transmettre le signal à des régulateurs restent inconnus. Ces mécanismes pourraient être générateurs d'une hétérogénéité dans les populations planctoniques ou sessiles et se traduire soit par l'absence de l'expression du locus *eps1* dans une fraction de la population planctonique, soit par une inactivation de la protéine Lcp signal, entraînant l'absence d'ancrage de polysaccharides capsulaires Eps1 au peptidoglycane. Les polysaccharides *eps1*-dépendants seraient alors libérés dans le milieu extracellulaire ou dans la matrice du biofilm.

Les loci *eps* contiennent généralement un système de régulation post-traductionnelle qui fait intervenir une protéine à activité kinase (tyrosine kinase) avec son modulateur. Ce système a été rapporté comme étant responsable de la phosphorylation des enzymes impliquées dans la synthèse des polysaccharides (Bechet et al. 2009, Mijakovic and Deutscher 2015, Elsholz et al. 2014). Chez *B. subtilis*, la production des exopolysaccharides est régulée par une tyrosine kinase, qui phosphoryle la glycosyltransférase EpsE (Elsholz et al. 2014). Une protéine associée à cette tyrosine kinase, le modulateur de la tyrosine kinase, reconnaît les exopolysaccharides produits par les enzymes du même locus et active la tyrosine kinase, formant une boucle de

rétroaction positive. On peut imaginer le même phénomène chez *B. thuringiensis*, où une boucle de rétroaction positive permettrait d'augmenter la production d'un des exopolysaccharides et d'inhiber la production de l'autre. Cette inhibition pourrait s'expliquer si le polysaccharide surproduit sature le modulateur de la tyrosine kinase de l'autre polysaccharide, empêchant la fixation de celui-ci sur son récepteur. Il s'ensuivrait une bascule ne permettant la production que de l'un des deux polysaccharides dans la même cellule bactérienne. À l'appui de cette hypothèse, la délétion du locus *eps2* entraîne une surproduction des polysaccharides *eps1*-dépendants, que nous avons mis en évidence en visualisant la capsule polysaccharidique, ou en observant les phénotypes induits, comme la formation de l'anneau du biofilm ou l'adhésion sur surface biotiques ou abiotiques.

En conclusion, le modèle de formation des biofilms et de production des exopolysaccharides observé chez *B. thuringiensis* est remarquablement différent de tous ceux décrits dans la littérature jusque là, tant au niveau des phénotypes observés que de la régulation de la production de ces exopolysaccharides.

Perspectives



Nous avons montré que le locus *eps1* est impliqué dans la formation d'une capsule qui favorise fortement l'adhésion de la bactérie sur des cellules épithéliales, suggérant un rôle de ce locus dans le pouvoir pathogène de la bactérie. Il serait donc intéressant d'étudier l'effet du locus *eps1* dans le pouvoir pathogène et dans la persistance de *B. thuringiensis* dans un modèle d'insecte tel que *Galleria melonella* ou *Drosophila melanogaster*. De plus, l'analyse de l'activation des réponses immunitaires de l'hôte par la souche mutante $\Delta eps1$, comparativement à la souche sauvage, permettrait de préciser si la capsule induit un échappement aux réponses immunitaires, comme cela a été décrit pour d'autres capsules bactériennes. En outre, vu la spécificité du rôle du locus *eps2* dans la formation du biofilm, celui-ci constitue un marqueur spécifique de ce phénotype. De ce fait, la délétion ou la surexpression du locus *eps2* permettrait d'étudier le rôle du biofilm dans le pouvoir pathogène de la bactérie, sans effets avoir les effets parasites que pourraient entraîner, par exemple, la délétion de régulateurs sur d'autres phénotypes. Après une administration par voie orale de spores de souches mutantes $\Delta eps1$ et $\Delta eps2$ à l'insecte modèle, la présence de la capsule et des exopolysaccharides du biofilm dans les différentes régions du tube digestif pourrait être poursuivie par immunohistochimie, à l'aide de lectines spécifiques et distinctes pour chacun des exopolysaccharides (*eps1*-dépendants et *eps2*-dépendants). De plus, la cinétique de production des deux exopolysaccharides pourrait être déterminée au niveau du biofilm entier *in situ*, ainsi qu'au niveau de la cellule seule. Nos résultats préliminaires montrent que *eps1* est transcrit uniquement au niveau de l'anneau, tandis que *eps2* est transcrit essentiellement au niveau de la pellicule. Ces résultats suggèrent une régulation bimodale de l'expression des deux loci, qui devrait être précisée à l'aide d'un plasmide portant les fusions transcriptionnelles pour les promoteurs de ces deux loci, et d'une analyse par cytométrie en flux. Les résultats préliminaires montrent également que, lorsque des co-cultures sont réalisées avec les mutants *eps1* et *eps2*, les bactéries ne produisant que les polysaccharides *eps1*-dépendants sont localisés uniquement dans l'anneau, et celles ne produisant que les polysaccharides *eps2*-dépendants sont localisés uniquement dans la pellicule. Nous avons fait l'hypothèse que cette différenciation spatiale dépend de la mobilité et de la capacité d'adhésion des bactéries. La construction d'un modèle mathématique dans lequel serait introduit des variables décrivant la division cellulaire, la mobilité, l'adhésion, ou la densité bactérienne, pourrait permettre de valider cette hypothèse. Une étude de l'évolution au cours du

temps de la structure tridimensionnelle d'un biofilm flottant, avec identification des polysaccharides capsulaires ou matriciels, serait également très informative à ce sujet.

En ce qui concerne les régulateurs contrôlant la transcription de *eps1* et *eps2*, il serait intéressant de déterminer si leur action est directe ou indirecte, par exemple en regardant leur fixation sur la région promotrice de ces deux loci. D'autre part, il serait très complémentaire de s'investir dans la recherche des régulateurs non décrits au préalable en effectuant une mutagenèse aléatoire, puis un criblage de la banque de mutants ainsi obtenue pour une altération dans la transcription de ces loci, afin de trouver de nouveaux régulateurs potentiels impliqués dans la régulation des loci *eps*.

Par ailleurs, une étude de la prévalence de la capsule dans le groupe *cereus* serait indispensable afin de déterminer si la présence de cette capsule corrèle avec l'origine des souches (environnementale ou clinique). Pour se faire, il serait judicieux d'investir dans une cinquantaine de souches d'origine clinique ou environnementale et d'utiliser les techniques d'imagerie cellulaire associée au marquage par des lectines fluorescentes spécifiques de certains sucres, ou la spectroscopie FTIR qui permettrait de caractériser les empreintes moléculaires relatives aux sucres.

La production de la capsule polysaccharidique est induite en condition de microaérobiose. Ce résultat suggère qu'un signal, dépendant de la concentration d'oxygène dissout dans le milieu de culture, agit sur des régulateurs modulant la production de la capsule. Ces régulateurs peuvent agir sur la transcription du locus ou sur la modification post-traductionnelle du produit de ces gènes. A l'aide de fusions transcriptionnelles, entre les régions promotrices présumées et un gène rapporteur (*lacZ* ou *gfp*), l'expression des différents opérons du locus pourrait être déterminée au cours de la croissance et en fonction des conditions de culture.

En amont du locus *eps1* sont présents quatre gènes codant pour des tyrosines kinases et des phosphatases, susceptibles de contrôler la production des exopolysaccharides, comme c'est le cas chez d'autres espèces bactériennes. L'effet sur la production de la capsule de la délétion et de la complémentation d'un ou de plusieurs des gènes codant pour ces kinases et phosphatases pourrait être étudié, en présence et en absence d'oxygène. De plus, des techniques de phosphoprotéomique permettraient de déterminer les cibles de ces kinases et leur rôle dans la transduction du signal oxygène.

Enfin, il serait très intéressant de déterminer la composition des exopolysaccharides *eps1*- et *eps2*-dépendants, ainsi que, le rôle de chacune des différentes glycosyltransférases présentes dans ces loci.

Références



References

- Abee, T., A. T. Kovacs, O. P. Kuipers & S. van der Veen (2011) Biofilm formation and dispersal in Gram-positive bacteria. *Curr Opin Biotechnol*, 22, 172-9.
- Absalon, C., K. Van Dellen & P. I. Watnick (2011) A communal bacterial adhesin anchors biofilm and bystander cells to surfaces. *PLoS Pathog.*, 7, e1002210.
- Agata, N., M. Mori, M. Ohta, S. Suwan, I. Ohtani & M. Isobe (1994) A novel dodecadepsi-peptide, cereulide, isolated from *Bacillus cereus* causes vacuole formation in HEp-2 cells. *FEMS Microbiology Letters*, 121, 31-34.
- Agata, N., M. Ohta & M. Mori (1995) The bceT gene of *Bacillus cereus* encodes an enterotoxin protein. *Microbiology*, 141, 983-988.
- Allesen-Holm, M., K. B. Barken, L. Yang, M. Klausen, J. S. Webb, S. Kjelleberg, S. Molin, M. Givskov & T. Tolker-Nielsen (2006) A characterization of DNA release in *Pseudomonas aeruginosa* cultures and biofilms. *Molecular Microbiology*, 59, 1114-1128.
- An, D. & M. R. Parsek (2007) The promise and peril of transcriptional profiling in biofilm communities. *Curr Opin Microbiol*, 10, 292-6.
- An, Y. H., R. B. Dickinson & R. J. Doyle. 2000. Mechanisms of bacterial adhesion and pathogenesis of implant and tissue infections. In *Handbook of Bacterial Adhesion*, 1-27. Springer.
- Anderson, G. G. & G. A. O'Toole (2008) Innate and induced resistance mechanisms of bacterial biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol*, 322, 85-105.
- Arbeit, R. D., W. W. Karakawa, W. F. Vann & J. B. Robbins (1984) Predominance of two newly described capsular polysaccharide types among clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2, 85-91.
- Arizono, T., A. Umeda & K. Amako (1991) Distribution of capsular materials on the cell wall surface of strain Smith diffuse of *Staphylococcus aureus*. *Journal of bacteriology*, 173, 4333-4340.
- Arnaud, M., A. Chastanet & M. Debarbouille (2004) New vector for efficient allelic replacement in naturally nontransformable, low-GC-content, gram-positive bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 6887-6891.
- Ash, C., J. A. Farrow, M. Dorsch, E. Stackebrandt & M. D. Collins (1991) Comparative analysis of *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and related species on the basis of reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. *Int.J.Syst.Bacteriol.*, 41, 343-346.
- Auger, S., E. Krin, S. Aymerich & M. Gohar (2006) Autoinducer 2 affects biofilm formation by *Bacillus cereus*. *Appl Environ Microbiol*, 72, 937-41.
- Avery, O. T. & R. Dubos (1931) The Protective Action of a Specific Enzyme against Type Iii Pneumococcus Infection in Mice. *J Exp Med*, 54, 73-89.
- Bacon, D. J., C. M. Szymanski, D. H. Burr, R. P. Silver, R. A. Alm & P. Guerry (2001) A phase-variable capsule is involved in virulence of *Campylobacter jejuni* 81-176. *Molecular Microbiology*, 40, 769-77.
- Baird-Parker, T. C., G. W. Gould & B. M. Lund. 2000. *The microbiological safety and quality of food*. Aspen Publishers.
- Bavykin, S. G., Y. P. Lysov, V. Zakhariev, J. J. Kelly, J. Jackman, D. A. Stahl & A. Cherni (2004) Use of 16S rRNA, 23S rRNA, and gyrB gene sequence analysis to determine phylogenetic relationships of *Bacillus cereus* group microorganisms. *J Clin.Microbiol*, 42, 3711-3730.

- Bazaka, K., R. J. Crawford, E. L. Nazarenko & E. P. Ivanova (2011) Bacterial extracellular polysaccharides. *Adv Exp Med Biol*, 715, 213-26.
- Bechet, E., S. Guiral, S. Torres, I. Mijakovic, A. J. Cozzzone & C. Grangeasse (2009) Tyrosine-kinases in bacteria: from a matter of controversy to the status of key regulatory enzymes. *Amino Acids*, 37, 499-507.
- Beecher, D. J. & J. D. Macmillan (1991) Characterization of the components of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. *Infect Immun*, 59, 1778-84.
- Beecher, D. J., T. W. Olsen, E. B. Somers & A. C. L. Wong (2000) Evidence for contribution of tripartite hemolysin BL, phosphatidylcholine-preferring phospholipase C, and collagenase to virulence of *Bacillus cereus* endophthalmitis. *Infection and Immunity*, 68, 5269-5276.
- Beecher, D. J., J. L. Schoeni & A. C. Wong (1995) Enterotoxic activity of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. *Infect. Immun.*, 63, 4423-8.
- Beecher, D. J. & A. C. Wong (1994) Identification and analysis of the antigens detected by two commercial *Bacillus cereus* diarrheal enterotoxin immunoassay kits. *Applied and Environmental Microbiology*, 60, 4614-4616.
- Bender, M. H., R. T. Cartee & J. Yother (2003) Positive correlation between tyrosine phosphorylation of CpsD and capsular polysaccharide production in *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of bacteriology*, 185, 6057-6066.
- Bentley, S. D., D. M. Aanensen, A. Mavroidi, D. Saunders, E. Rabinowitsch, M. Collins, K. Donohoe, D. Harris, L. Murphy & M. A. Quail (2006a) Genetic analysis of the capsular biosynthetic locus from all 90 pneumococcal serotypes. *PLoS genetics*, 2, e31.
- Bentley, S. D., D. M. Aanensen, A. Mavroidi, D. Saunders, E. Rabinowitsch, M. Collins, K. Donohoe, D. Harris, L. Murphy, M. A. Quail, G. Samuel, I. C. Skovsted, M. S. Kaltoft, B. Barrell, P. R. Reeves, J. Parkhill & B. G. Spratt (2006b) Genetic analysis of the capsular biosynthetic locus from all 90 pneumococcal serotypes. *PLoS Genet*, 2, e31.
- Billings, N., A. Birjiniuk, T. S. Samad, P. S. Doyle & K. Ribbeck (2015) Material properties of biofilms-a review of methods for understanding permeability and mechanics. *Rep Prog Phys*, 78, 036601.
- Blair, K. M., L. Turner, J. T. Winkelman, H. C. Berg & D. B. Kearns (2008) A molecular clutch disables flagella in the *Bacillus subtilis* biofilm. *Science*, 320, 1636-1638.
- Bobrov, A. G., O. Kirillina, S. Forman, D. Mack & R. D. Perry (2008) Insights into *Yersinia pestis* biofilm development: topology and co-interaction of Hms inner membrane proteins involved in exopolysaccharide production. *Environ Microbiol*, 10, 1419-32.
- Boles, B. R. & A. R. Horswill (2008) Agr-mediated dispersal of *Staphylococcus aureus* biofilms. *PLoS Pathog*, 4, e1000052.
- Bouillaut, L., N. Ramarao, C. Buisson, N. Gilois, M. Gohar, D. Lereclus & C. Nielsen-Leroux (2005) FlhA Influences *Bacillus thuringiensis* PlcR-Regulated Gene Transcription, Protein Production, and Virulence. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 8903-8910.
- Bowden, M. G. & H. B. Kaplan (1998) The *Myxococcus xanthus* lipopolysaccharide O-antigen is required for social motility and multicellular development. *Mol Microbiol*, 30, 275-84.
- Branda, S. S., F. Chu, D. B. Kearns, R. Losick & R. Kolter (2006) A major protein component of the *Bacillus subtilis* biofilm matrix. *Mol Microbiol*, 59, 1229-38.

- Branda, S. S., J. E. Gonzalez-Pastor, S. Ben Yehuda, R. Losick & R. Kolter (2001) Fruiting body formation by *Bacillus subtilis*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 98, 11621-11626.
- Branda, S. S., J. E. Gonzalez-Pastor, E. Dervyn, S. D. Ehrlich, R. Losick & R. Kolter (2004) Genes involved in formation of structured multicellular communities by *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*, 186, 3970-3979.
- Branda, S. S., S. Vik, L. Friedman & R. Kolter (2005) Biofilms: the matrix revisited. *Trends Microbiol*, 13, 20-6.
- Bratcher, P. E., K. H. Kim, J. H. Kang, J. Y. Hong & M. H. Nahm (2010) Identification of natural pneumococcal isolates expressing serotype 6D by genetic, biochemical and serological characterization. *Microbiology*, 156, 555-60.
- Bravo, A., S. S. Gill & M. Soberon (2007) Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon*, 49, 423-35.
- Bravo, A., R. Quintero, C. Diaz, A. J. Martinez & M. Soberon (1993) Efficiency of insecticidal crystal protein production in a *Bacillus thuringiensis* mutant with derepressed expression of the terminal oxidase aa3, during sporulation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 39, 558-562.
- Briles, D., M. Crain, B. M. Gray, C. Forman & J. Yother (1992) Strong association between capsular type and virulence for mice among human isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Infection and immunity*, 60, 111-116.
- Brown, II & C. C. Hase (2001) Flagellum-independent surface migration of *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 183, 3784-90.
- Caggianiello, G., M. Kleerebezem & G. Spano (2016) Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria: from health-promoting benefits to stress tolerance mechanisms. *Appl Microbiol Biotechnol*, 100, 3877-86.
- Callegan, M. C., S. T. Kane, D. C. Cochran, M. S. Gilmore, M. Gominet & D. Lereclus (2003) Relationship of plcR-regulated factors to *Bacillus endophthalmitis* virulence. *Infect.Immun.*, 71, 3116-3124.
- Campbell, R. E., R. F. Sala, I. van de Rijn & M. E. Tanner (1997) Properties and kinetic analysis of UDP-glucose dehydrogenase from group A streptococci. Irreversible inhibition by UDP-chloroacetol. *J Biol Chem*, 272, 3416-22.
- Campos, M. A., M. A. Vargas, V. Regueiro, C. M. Llompарт, S. Albertí & J. A. Bengoechea (2004) Capsule polysaccharide mediates bacterial resistance to antimicrobial peptides. *Infection and immunity*, 72, 7107-7114.
- Candela, T., M. Mock & A. Fouet (2005) CapE, a 47-amino-acid peptide, is necessary for *Bacillus anthracis* polyglutamate capsule synthesis. *Journal of bacteriology*, 187, 7765-7772.
- Candela, T., M. Moya, M. Haustant & A. Fouet (2009) *Fusobacterium nucleatum*, the first Gram-negative bacterium demonstrated to produce polyglutamate. *Canadian journal of microbiology*, 55, 627-632.
- Carlson, C. R., D. A. Cagant & A. B. Kolsto (1994) Genotypic diversity among *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 60, 1719-1725.
- Caro-Astorga, J., A. Perez-Garcia, A. de Vicente & D. Romero (2014) A genomic region involved in the formation of adhesin fibers in *Bacillus cereus* biofilms. *Front Microbiol*, 5, 745.
- Carpentier, B. & O. Cerf (1993) Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry. *J Appl Bacteriol*, 75, 499-511.

- Cartee, R. T., W. T. Forsee, J. W. Jensen & J. Yother (2001) Expression of the *Streptococcus pneumoniae* type 3 synthase in *Escherichia coli*. Assembly of type 3 polysaccharide on a lipid primer. *J Biol Chem*, 276, 48831-9.
- Cartee, R. T., W. T. Forsee & J. Yother (2005) Initiation and synthesis of the *Streptococcus pneumoniae* type 3 capsule on a phosphatidylglycerol membrane anchor. *Journal of bacteriology*, 187, 4470-4479.
- Chai, Y., P. B. Beauregard, H. Vlamakis, R. Losick & R. Kolter (2012) Galactose metabolism plays a crucial role in biofilm formation by *Bacillus subtilis*. *MBio*, 3, e00184-12.
- Chai, Y., R. Kolter & R. Losick (2009) Paralogous antirepressors acting on the master regulator for biofilm formation in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, 74, 876-87.
- Chai, Y., R. Kolter & R. Losick (2010a) Reversal of an epigenetic switch governing cell chaining in *Bacillus subtilis* by protein instability. *Molecular microbiology*, 78, 218-229.
- Chai, Y., T. Norman, R. Kolter & R. Losick (2010b) An epigenetic switch governing daughter cell separation in *Bacillus subtilis*. *Genes Dev*, 24, 754-65.
- Chan, Y. G., M. B. Frankel, V. Dengler, O. Schneewind & D. Missiakas (2013) *Staphylococcus aureus* mutants lacking the LytR-CpsA-Psr family of enzymes release cell wall teichoic acids into the extracellular medium. *J Bacteriol*, 195, 4650-9.
- Chan, Y. G., H. K. Kim, O. Schneewind & D. Missiakas (2014) The capsular polysaccharide of *Staphylococcus aureus* is attached to peptidoglycan by the LytR-CpsA-Psr (LCP) family of enzymes. *J Biol Chem*, 289, 15680-90.
- Characklis, W. G. (1973) Attached microbial growths—II. Frictional resistance due to microbial slimes. *Water Research*, 7, 1249-1258.
- Chen, M. L. & H. Y. Tsen (2002) Discrimination of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* with 16S rRNA and *gyrB* gene based PCR primers and sequencing of their annealing sites. *J Appl Microbiol*, 92, 912-9.
- Cherif, A., L. Brusetti, S. Borin, A. Rizzi, A. Boudabous, H. Khyami-Horani & D. Daffonchio (2003) Genetic relationship in the 'Bacillus cereus group' by rep-PCR fingerprinting and sequencing of a *Bacillus anthracis*-specific rep-PCR fragment. *J Appl Microbiol*, 94, 1108-19.
- Chu, F., D. B. Kearns, S. S. Branda, R. Kolter & R. Losick (2006) Targets of the master regulator of biofilm formation in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.*, 59, 1216-1228.
- Chu, F., D. B. Kearns, A. McLoon, Y. Chai, R. Kolter & R. Losick (2008) A novel regulatory protein governing biofilm formation in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.*, 68, 1117-27.
- Colvin, K. M., Y. Irie, C. S. Tart, R. Urbano, J. C. Whitney, C. Ryder, P. L. Howell, D. J. Wozniak & M. R. Parsek (2012) The *Pel* and *Psl* polysaccharides provide *Pseudomonas aeruginosa* structural redundancy within the biofilm matrix. *Environmental Microbiology*, 14, 1913-28.
- Corbett, D. & I. S. Roberts (2009) The role of microbial polysaccharides in host-pathogen interaction. *F1000 Biol Rep*, 1, 30.
- Costerton, J. W., G. G. Geesey & K. J. Cheng (1978) How bacteria stick. *Sci Am*, 238, 86-95.
- Costerton, J. W., R. T. Irvin & K. J. Cheng (1981) The bacterial glycocalyx in nature and disease. *Annu Rev Microbiol*, 35, 299-324.
- Costerton, J. W., Z. Lewandowski, D. E. Caldwell, D. R. Korber & H. M. Lappin-Scott (1995) Microbial biofilms. *Annu.Rev.Microbiol.*, 49, 711-745.

- Costerton, J. W., P. S. Stewart & E. P. Greenberg (1999) Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, 284, 1318-1322.
- Coutinho, P. M., E. Deleury, G. J. Davies & B. Henrissat (2003) An evolving hierarchical family classification for glycosyltransferases. *Journal of molecular biology*, 328, 307-317.
- Cramton, S. E., C. Gerke, N. F. Schnell, W. W. Nichols & F. Gotz (1999) The intercellular adhesion (ica) locus is present in *Staphylococcus aureus* and is required for biofilm formation. *Infect.Immun.*, 67, 5427-5433.
- Crickmore, N., D. R. Zeigler, J. Feitelson, E. Schnepf, J. Vanrie, D. Lereclus, J. Baum & D. H. Dean (1998) Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.*, 62, 807.
- Cuthbertson, L., I. L. Mainprize, J. H. Naismith & C. Whitfield (2009) Pivotal roles of the outer membrane polysaccharide export and polysaccharide copolymerase protein families in export of extracellular polysaccharides in gram-negative bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 73, 155-177.
- Dahl, M. K., T. Msadek, F. Kunst & G. Rapoport (1992) The phosphorylation state of the DegU response regulator acts as a molecular switch allowing either degradative enzyme synthesis or expression of genetic competence in *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem*, 267, 14509-14.
- Das, P. K. & D. D. Amalraj (1997) Biological control of malaria vectors. *Indian Journal of Medical Research*, 106, 174-197.
- Davies, D. G., A. M. Chakrabarty & G. G. Geesey (1993) Exopolysaccharide production in biofilms: substratum activation of alginate gene expression by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol*, 59, 1181-6.
- Davies, D. G. & G. G. Geesey (1995) Regulation of the alginate biosynthesis gene *algC* in *Pseudomonas aeruginosa* during biofilm development in continuous culture. *Appl Environ Microbiol*, 61, 860-7.
- de Jong, I. G., P. Haccou & O. P. Kuipers (2011) Bet hedging or not? A guide to proper classification of microbial survival strategies. *Bioessays*, 33, 215-23.
- Declerck, N., L. Bouillaut, D. Chaix, N. Rugani, L. Slamti, F. Hoh, D. Lereclus & S. T. Arold (2007) Structure of PlcR: Insights into virulence regulation and evolution of quorum sensing in Gram-positive bacteria. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 104, 18490-18495.
- Diggle, S. P., R. E. Stacey, C. Dodd, M. Camara, P. Williams & K. Winzer (2006) The galactophilic lectin, LecA, contributes to biofilm development in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ Microbiol*, 8, 1095-104.
- Doshi, R. & H. W. van Veen (2013) Substrate binding stabilizes a pre-translocation intermediate in the ATP-binding cassette transport protein MsbA. *J Biol Chem*, 288, 21638-47.
- Drobniowski, F. A. (1993) *Bacillus cereus* and related species. *Clin.Microbiol.Rev.*, 6, 324-338.
- Duanis-Assaf, D., D. Steinberg, Y. Chai & M. Shemesh (2016) The LuxS Based Quorum Sensing Governs Lactose Induced Biofilm Formation by *Bacillus subtilis*. *Front Microbiol*, 6, 1517.
- Dubois, T., K. Faegri, S. Perchat, C. Lemy, C. Buisson, C. Nielsen-LeRoux, M. Gohar, P. Jacques, N. Ramarao, A. B. Kolsto & D. Lereclus (2012) Necrotrophism is a quorum-sensing-regulated lifestyle in *Bacillus thuringiensis*. *PLoS Pathog*, 8, e1002629.

- Dubois, T., S. Perchat, E. Verplaetse, M. Gominet, C. Lemy, M. Aumont-Nicaise, R. Grenha, S. Nessler & D. Lereclus (2013) Activity of the *Bacillus thuringiensis* NprR-NprX cell-cell communication system is co-ordinated to the physiological stage through a complex transcriptional regulation. *Mol Microbiol*, 88, 48-63.
- Eberhardt, A., C. N. Hoyland, D. Vollmer, S. Bisle, R. M. Cleverley, O. Johnsborg, L. S. Havarstein, R. J. Lewis & W. Vollmer (2012) Attachment of capsular polysaccharide to the cell wall in *Streptococcus pneumoniae*. *Microb Drug Resist*, 18, 240-55.
- Ehling-Schulz, M., E. Frenzel & M. Gohar (2015) Food-bacteria interplay: pathometabolism of emetic *Bacillus cereus*. *Front Microbiol*, 6, 704.
- Ehling-Schulz, M., M. Fricker, H. Grallert, P. Rieck, M. Wagner & S. Scherer (2006) Cereulide synthetase gene cluster from emetic *Bacillus cereus*: structure and location on a mega virulence plasmid related to *Bacillus anthracis* toxin plasmid pXO1. *BMC Microbiol*, 6, 20.
- Ehling-Schulz, M., B. Svensson, M. H. Guinebretiere, T. Lindback, M. Andersson, A. Schulz, M. Fricker, A. Christiansson, P. E. Granum, E. Martlbauer, C. Nguyen-The, M. Salkinoja-Salonen & S. Scherer (2005) Emetic toxin formation of *Bacillus cereus* is restricted to a single evolutionary lineage of closely related strains. *Microbiology*, 151, 183-197.
- El-Khoury, N., R. Majed, S. Perchat, M. Kallassy, D. Lereclus & M. Gohar (2016) Spatio-Temporal Evolution of Sporulation in *Bacillus thuringiensis* Biofilm. *Front Microbiol*, 7, 1222.
- El-Refai, H. A., A. F. Abdel-Fattah & F. A. Mostafa (2009) Enzymic synthesis of levan and fructo-oligosaccharides by *Bacillus circulans* and improvement of levansucrase stability by carbohydrate coupling. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25, 821-827.
- Elsholz, A. K., S. A. Wacker & R. Losick (2014) Self-regulation of exopolysaccharide production in *Bacillus subtilis* by a tyrosine kinase. *Genes Dev*, 28, 1710-20.
- Enos-Berlage, J. L. & L. L. McCarter (2000) Relation of capsular polysaccharide production and colonial cell organization to colony morphology in *Vibrio parahaemolyticus*. *J Bacteriol*, 182, 5513-20.
- Espinosa-Urgel, M., A. Salido & J.-L. Ramos (2000) Genetic analysis of functions involved in adhesion of *Pseudomonas putida* to seeds. *Journal of bacteriology*, 182, 2363-2369.
- Evreux, F., B. Delaporte, N. Leret, C. Buffet-Janvresse & A. Morel (2007) [A case of fatal neonatal *Bacillus cereus* meningitis]. *Arch Pediatr*, 14, 365-8.
- Fagerlund, A., T. Dubois, O. A. Okstad, E. Verplaetse, N. Gilois, I. Bennaceur, S. Perchat, M. Gominet, S. Aymerich, A. B. Kolsto, D. Lereclus & M. Gohar (2014) SinR controls enterotoxin expression in *Bacillus thuringiensis* biofilms. *PLoS One*, 9, e87532.
- Faille, C., G. Tauveron, C. Le Gentil-Lelievre & C. Slomianny (2007) Occurrence of *Bacillus cereus* spores with a damaged exosporium: consequences on the spore adhesion on surfaces of food processing lines. *Journal of Food Protection*, 70, 2346-2353.
- Flemming, H.-C. & J. Wingender (2010) The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*, 8, 623-633.
- Flemming, H. C., T. R. Neu & D. J. Wozniak (2007) The EPS matrix: the "house of biofilm cells". *J Bacteriol*, 189, 7945-7.
- Flemming, H. C., J. Wingender, U. Szewzyk, P. Steinberg, S. A. Rice & S. Kjelleberg (2016) Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nat Rev Microbiol*, 14, 563-75.

- Forsee, W. T., R. T. Cartee & J. Yother (2006) Role of the carbohydrate binding site of the *Streptococcus pneumoniae* capsular polysaccharide type 3 synthase in the transition from oligosaccharide to polysaccharide synthesis. *J Biol Chem*, 281, 6283-9.
- Frenzel, E., V. Doll, M. Pauthner, G. Lucking, S. Scherer & M. Ehling-Schulz (2012) CodY orchestrates the expression of virulence determinants in emetic *Bacillus cereus* by impacting key regulatory circuits. *Molecular Microbiology*, 85, 67-88.
- Fujita, M., J. E. Gonzalez-Pastor & R. Losick (2005) High- and low-threshold genes in the Spo0A regulon of *Bacillus subtilis* *Journal of Bacteriology*, 187, 1357-1368.
- Fujita, M. & R. Losick (2005) Evidence that entry into sporulation in *Bacillus subtilis* is governed by a gradual increase in the level and activity of the master regulator Spo0A. *Genes Dev.*, 19, 2236-2244.
- Fux, C. A., J. W. Costerton, P. S. Stewart & P. Stoodley (2005) Survival strategies of infectious biofilms. *Trends Microbiol*, 13, 34-40.
- Gao, T., L. Foulston, Y. Chai, Q. Wang & R. Losick (2015) Alternative modes of biofilm formation by plant-associated *Bacillus cereus*. *Microbiologyopen*, 4, 452-64.
- Garrison-Schilling, K. L., Z. M. Kaluskar, B. Lambert & G. S. Pettis (2014) Genetic analysis and prevalence studies of the brp exopolysaccharide locus of *Vibrio vulnificus*. *PLoS One*, 9, e100890.
- Gaur, N. K., E. Dubnau & I. Smith (1986) Characterization of a cloned *Bacillus subtilis* gene that inhibits sporulation in multiple copies. *J Bacteriol*, 168, 860-9.
- Gelis-Jeanvoine, S., A. Canette, M. Gohar, T. Caradec, C. Lemy, M. Gominet, P. Jacques, D. Lereclus & L. Slamti (2016) Genetic and functional analyses of krs, a locus encoding kurstakin, a lipopeptide produced by *Bacillus thuringiensis*. *Res Microbiol*.
- Geno, K. A., G. L. Gilbert, J. Y. Song, I. C. Skovsted, K. P. Klugman, C. Jones, H. B. Konradsen & M. H. Nahm (2015) Pneumococcal Capsules and Their Types: Past, Present, and Future. *Clin Microbiol Rev*, 28, 871-99.
- Gilbert, I. (1931) Dissociation in an encapsulated staphylococcus. *Journal of bacteriology*, 21, 157.
- Gilbert, R. J. & J. M. Kramer (1986) *Bacillus cereus* food poisoning. In Progress in Our Knowledge of Foodborne Disease During the Life of the Food Research Institute. *Progress in Food Safety (Proceedings of Symposium)*, pp. 85-93.
- Gohar, M., K. Faegri, S. Perchat, S. Ravnum, O. A. Okstad, M. Gominet, A. B. Kolsto & D. Lereclus (2008) The PlcR virulence regulon of *Bacillus cereus*. *PLoS One*, 3, e2793.
- Gohar, M., N. Gilois, R. Graveline, C. Garreau, V. Sanchis & D. Lereclus (2005) A comparative study of *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus anthracis* extracellular proteomes. *Proteomics*, 5, 3696-3711.
- Gohar, M., O. A. Okstad, N. Gilois, V. Sanchis, A. B. Kolsto & D. Lereclus (2002) Two-dimensional electrophoresis analysis of the extracellular proteome of *Bacillus cereus* reveals the importance of the PlcR regulon. *Proteomics*, 2, 784-791.
- Goller, C. C. & P. C. Seed (2010) Revisiting the *Escherichia coli* polysaccharide capsule as a virulence factor during urinary tract infection: contribution to intracellular biofilm development. *Virulence*, 1, 333-337.
- Gonzalez-Pastor, J. E. (2011) Cannibalism: a social behavior in sporulating *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol Rev*, 35, 415-24.
- Gonzalez-Pastor, J. E., E. C. Hobbs & R. Losick (2003) Cannibalism by sporulating bacteria. *Science*, 301, 510-513.
- Gotz, F. (2002) Staphylococcus and biofilms. *Molecular Microbiology*, 43, 1367-1378.

- Grangeasse, C., A. J. Cozzone, J. Deutscher & I. Mijakovic (2007) Tyrosine phosphorylation: an emerging regulatory device of bacterial physiology. *Trends Biochem Sci*, 32, 86-94.
- Grangeasse, C., S. Nessler & I. Mijakovic (2012) Bacterial tyrosine kinases: evolution, biological function and structural insights. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 367, 2640-55.
- Grangeasse, C., B. Obadia, I. Mijakovic, J. Deutscher, A. J. Cozzone & P. Doublet (2003) Autophosphorylation of the *Escherichia coli* protein kinase Wzc regulates tyrosine phosphorylation of Ugd, a UDP-glucose dehydrogenase. *J Biol Chem*, 278, 39323-9.
- Grangeasse, C., R. Terreux & S. Nessler (2010) Bacterial tyrosine-kinases: structure-function analysis and therapeutic potential. *Biochim Biophys Acta*, 1804, 628-34.
- Granum, P. E. & T. Lund (1997) *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiology Letters*, 157, 223-228.
- Guerout-Fleury, A. M., K. Shazand, N. Frandsen & P. Stragier (1995) Antibiotic-resistance cassettes for *Bacillus subtilis*. *Gene*, 167, 335-336.
- Gueerry, P. & C. M. Szymanski (2008) *Campylobacter* sugars sticking out. *Trends Microbiol*, 16, 428-35.
- Guidolin, A., J. K. Morona, R. Morona, D. Hansman & J. C. Paton (1994) Nucleotide sequence analysis of genes essential for capsular polysaccharide biosynthesis in *Streptococcus pneumoniae* type 19F. *Infection and immunity*, 62, 5384-5396.
- Guinebretiere, M. H., S. Auger, N. Galleron, M. Contzen, B. De Sarrau, M. L. De Buyser, G. Lamberet, A. Fagerlund, P. E. Granum, D. Lereclus, P. De Vos, C. Nguyen-The & A. Sorokin (2013) *Bacillus cytotoxicus* sp. nov. is a novel thermotolerant species of the *Bacillus cereus* Group occasionally associated with food poisoning. *Int J Syst Evol Microbiol*, 63, 31-40.
- Guinebretiere, M. H., F. L. Thompson, A. Sorokin, P. Normand, P. Dawyndt, M. Ehling-Schulz, B. Svensson, V. Sanchis, C. Nguyen-The, M. Heyndrickx & P. De Vos (2008) Ecological diversification in the *Bacillus cereus* Group. *Environ Microbiol*, 10, 851-65.
- Gulig, P. A., K. L. Bourdage & A. M. Starks (2005) Molecular Pathogenesis of *Vibrio vulnificus*. *J Microbiol*, 43 Spec No, 118-31.
- Habimana, O., M. Meyrand, T. Meylheuc, S. Kulakauskas & R. Briandet (2009) Genetic features of resident biofilms determine attachment of *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol*, 75, 7814-21.
- Hall-Stoodley, L. & P. Stoodley (2009) Evolving concepts in biofilm infections. *Cell Microbiol*, 11, 1034-43.
- Hammer, B. K. & B. L. Bassler (2003) Quorum sensing controls biofilm formation in *Vibrio cholerae*. *Mol Microbiol*, 50, 101-4.
- Hamon, M. A. & B. A. Lazazzera (2001) The sporulation transcription factor Spo0A is required for biofilm development in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.*, 42, 1199-1210.
- Hamon, M. A., N. R. Stanley, R. A. Britton, A. D. Grossman & B. A. Lazazzera (2004) Identification of AbrB-regulated genes involved in biofilm formation by *Bacillus subtilis* *Molecular Microbiology*, 52, 847-860.
- Hara, T. & S. Ueda (1981) A Study on the Mechanism of DNA Excretion from *P. aeruginosa* KYU-1—Effect of Mitomycin C on Extracellular DNA Production—. *Agricultural and Biological Chemistry*, 45, 2457-2461.

- Hardy, G. G., A. D. Magee, C. L. Ventura, M. J. Caimano & J. Yother (2001) Essential role for cellular phosphoglucomutase in virulence of type 3 *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun*, 69, 2309-17.
- Harshey, R. M. (2003) Bacterial motility on a surface: many ways to a common goal. *Annu Rev Microbiol*, 57, 249-73.
- Hayrapetyan, H., M. Tempelaars, M. Nierop Groot & T. Abee (2015) *Bacillus cereus* ATCC 14579 RpoN (Sigma 54) Is a Pleiotropic Regulator of Growth, Carbohydrate Metabolism, Motility, Biofilm Formation and Toxin Production. *PLoS One*, 10, e0134872.
- Helgason, E., D. A. Caugant, M. M. Lecadet, Y. H. Chen, J. Mahillon, A. Lovgren, I. Hegna, K. Kvaloy & A. B. Kolsto (1998) Genetic diversity of *Bacillus cereus* B-thuringiensis isolates from natural sources. *Current Microbiology*, 37, 80-87.
- Helgason, E., O. A. Okstad, D. A. Caugant, H. A. Johansen, A. Fouet, M. Mock, I. Hegna & A. B. Kolsto (2000) *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis* - One species on the basis of genetic evidence. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66, 2627-2630.
- Helgason, E., N. J. Tourasse, R. Meisal, D. A. Caugant & A. B. Kolsto (2004) Multilocus sequence typing scheme for bacteria of the *Bacillus cereus* group. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70, 191-201.
- Henrichsen, J. (1995) Six newly recognized types of *Streptococcus pneumoniae*. *J Clin Microbiol*, 33, 2759-62.
- Heydorn, A., A. T. Nielsen, M. Hentzer, C. Sternberg, M. Givskov, B. K. Ersboll & S. Molin (2000) Quantification of biofilm structures by the novel computer program COMSTAT. *Microbiology*, 146 (Pt 10), 2395-407.
- Hill, K. K., L. O. Ticknor, R. T. Okinaka, M. Asay, H. Blair, K. A. Bliss, M. Laker, P. E. Pardington, A. P. Richardson, M. Tonks, D. J. Beecher, J. D. Kemp, A. B. Kolsto, A. C. Wong, P. Keim & P. J. Jackson (2004) Fluorescent amplified fragment length polymorphism analysis of *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis* isolates. *Appl Environ Microbiol*, 70, 1068-80.
- Hinsa, S. M., M. Espinosa-Urgel, J. L. Ramos & G. A. O'Toole (2003) Transition from reversible to irreversible attachment during biofilm formation by *Pseudomonas fluorescens* WCS365 requires an ABC transporter and a large secreted protein. *Molecular Microbiology*, 49, 905-918.
- Hobley, L., C. Harkins, C. E. MacPhee & N. R. Stanley-Wall (2015) Giving structure to the biofilm matrix: an overview of individual strategies and emerging common themes. *FEMS Microbiol Rev*, 39, 649-69.
- Hobley, L., A. Ostrowski, F. V. Rao, K. M. Bromley, M. Porter, A. R. Prescott, C. E. MacPhee, D. M. van Aalten & N. R. Stanley-Wall (2013) BslA is a self-assembling bacterial hydrophobin that coats the *Bacillus subtilis* biofilm. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A*, 110, 13600-5.
- Hoffmaster, A. R., R. T. Novak, C. K. Marston, J. E. Gee, L. Helsel, J. M. Pruckler & P. P. Wilkins (2008) Genetic diversity of clinical isolates of *Bacillus cereus* using multilocus sequence typing. *BMC Microbiol*, 8, 191.
- Holst, O. & S. Müller-Loennies. 2007. Microbial Polysaccharide Structures. In *Introduction to Glycoscience; Synthesis of Carbohydrates*, ed. J. P. Kamerling.
- Houry, A., R. Briandet, S. Aymerich & M. Gohar (2010) Involvement of motility and flagella in *Bacillus cereus* biofilm formation. *Microbiology*, 156, 1009-18.

- Houry, A., M. Gohar, J. Deschamps, E. Tischenko, S. Aymerich, A. Gruss & R. Briandet (2012) Bacterial swimmers that infiltrate and take over the biofilm matrix. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109, 13088-93.
- Hsueh, Y. H., E. B. Somers, D. Lereclus & A. C. Wong (2006) Biofilm formation by *Bacillus cereus* is influenced by PlcR, a pleiotropic regulator. *Appl Environ Microbiol*, 72, 5089-92.
- Hsueh, Y. H., E. B. Somers & A. C. Wong (2008) Characterization of the *codY* gene and its influence on biofilm formation in *Bacillus cereus*. *Arch Microbiol*, 189, 557-68.
- Hubbard, C., J. T. McNamara, C. Azumaya, M. S. Patel & J. Zimmer (2012) The hyaluronan synthase catalyzes the synthesis and membrane translocation of hyaluronan. *J Mol Biol*, 418, 21-31.
- Hubscher, J., L. Luthy, B. Berger-Bachi & P. Stutzmann Meier (2008) Phylogenetic distribution and membrane topology of the LytR-CpsA-Psr protein family. *BMC Genomics*, 9, 617.
- Hyams, C., E. Camberlein, J. M. Cohen, K. Bax & J. S. Brown (2010) The *Streptococcus pneumoniae* capsule inhibits complement activity and neutrophil phagocytosis by multiple mechanisms. *Infect Immun*, 78, 704-15.
- Irie, Y., B. R. Borlee, J. R. O'Connor, P. J. Hill, C. S. Harwood, D. J. Wozniak & M. R. Parsek (2012) Self-produced exopolysaccharide is a signal that stimulates biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109, 20632-6.
- Irie, Y., M. Starkey, A. N. Edwards, D. J. Wozniak, T. Romeo & M. R. Parsek (2010) *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix polysaccharide Psl is regulated transcriptionally by RpoS and post-transcriptionally by RsmA. *Mol Microbiol*, 78, 158-72.
- Irnov, I. & W. C. Winkler (2010) A regulatory RNA required for antitermination of biofilm and capsular polysaccharide operons in *Bacillales*. *Mol. Microbiol.*, 76, 559-75.
- Islam, S. T. & J. S. Lam (2013) Wzx flippase-mediated membrane translocation of sugar polymer precursors in bacteria. *Environmental Microbiology*, 15, 1001-15.
- Islam, S. T. & J. S. Lam (2014) Synthesis of bacterial polysaccharides via the Wzx/Wzy-dependent pathway 1. *Canadian journal of microbiology*, 60, 697-716.
- Ivanova, N., A. Sorokin, I. Anderson, N. Galleron, B. Candelon, V. Kapatral, A. Bhattacharyya, G. Reznik, N. Mikhailova, A. Lapidus, L. Chu, M. Mazur, E. Goltsman, N. Larsen, M. D'Souza, T. Walunas, Y. Grechkin, G. Pusch, R. Haselkorn, M. Fonstein, E. S. Dusko, R. Overbeek & N. Kyrpides (2003) Genome sequence of *Bacillus cereus* and comparative analysis with *Bacillus anthracis*. *Nature*, 423, 87-91.
- Izano, E. A., M. A. Amarante, W. B. Kher & J. B. Kaplan (2008) Differential roles of poly-N-acetylglucosamine surface polysaccharide and extracellular DNA in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Appl Environ Microbiol*, 74, 470-6.
- Jadeau, F., E. Bechet, A. J. Cozzzone, G. Deleage, C. Grangeasse & C. Combet (2008) Identification of the idiosyncratic bacterial protein tyrosine kinase (BY-kinase) family signature. *Bioinformatics*, 24, 2427-30.
- Jadeau, F., C. Grangeasse, L. Shi, I. Mijakovic, G. Deleage & C. Combet (2012) BYKdb: the Bacterial protein tYrosine Kinase database. *Nucleic Acids Res*, 40, D321-4.
- Jann, K. & B. Jann (1992) Capsules of *Escherichia coli*, expression and biological significance. *Can J Microbiol*, 38, 705-10.

- Jennings, L. K., K. M. Storek, H. E. Ledvina, C. Coulon, L. S. Marmont, I. Sadovskaya, P. R. Secor, B. S. Tseng, M. Scian & A. Filloux (2015) Pel is a cationic exopolysaccharide that cross-links extracellular DNA in the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112, 11353-11358.
- Jones, C. J., C. R. Ryder, E. E. Mann & D. J. Wozniak (2013) AmrZ modulates *Pseudomonas aeruginosa* biofilm architecture by directly repressing transcription of the *psl* operon. *J Bacteriol*, 195, 1637-44.
- Jones, H., I. Roth & W. Sanders (1969) Electron microscopic study of a slime layer. *Journal of bacteriology*, 99, 316-325.
- Jucker, B. A., H. Harms & A. J. Zehnder (1996) Adhesion of the positively charged bacterium *Stenotrophomonas* (*Xanthomonas*) *maltophilia* 70401 to glass and Teflon. *J Bacteriol*, 178, 5472-9.
- Kaneko, T., R. Nozaki & K. Aizawa (1978) Deoxyribonucleic acid relatedness between *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol Immunol*, 22, 639-41.
- Kaplan, J. B., K. Velliyagounder, C. Ragunath, H. Rohde, D. Mack, J. K. Knobloch & N. Ramasubbu (2004) Genes involved in the synthesis and degradation of matrix polysaccharide in *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Actinobacillus pleuropneumoniae* biofilms. *J Bacteriol*, 186, 8213-20.
- Karatan, E. & P. Watnick (2009) Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms. *Microbiol Mol Biol Rev*, 73, 310-47.
- Kawai, Y., J. Marles-Wright, R. M. Cleverley, R. Emmins, S. Ishikawa, M. Kuwano, N. Heinz, N. K. Bui, C. N. Hoyland, N. Ogasawara, R. J. Lewis, W. Vollmer, R. A. Daniel & J. Errington (2011) A widespread family of bacterial cell wall assembly proteins. *EMBO J*, 30, 4931-41.
- Kearns, D. B., F. Chu, S. S. Branda, R. Kolter & R. Losick (2005) A master regulator for biofilm formation by *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.*, 55, 739-749.
- Keenleyside, W. J. & C. Whitfield (1996) A novel pathway for O-polysaccharide biosynthesis in *Salmonella enterica* serovar Borreze. *J Biol Chem*, 271, 28581-92.
- Keim, P., A. Kalif, J. Schupp, K. Hill, S. E. Travis, K. Richmond, D. M. Adair, M. Hugh-Jones, C. R. Kuske & P. Jackson (1997) Molecular evolution and diversity in *Bacillus anthracis* as detected by amplified fragment length polymorphism markers. *Journal of Bacteriology*, 179, 818-824.
- Kendall, F. E., M. Heidelberger & M. H. Dawson (1937) A serologically inactive polysaccharide elaborated by mucoid strains of group A hemolytic streptococcus. *Journal of Biological Chemistry*, 118, 61-69.
- Kim, J. O. & J. N. Weiser (1998) Association of intrastrain phase variation in quantity of capsular polysaccharide and teichoic acid with the virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *J Infect Dis*, 177, 368-77.
- Kim, W., S. B. Levy & K. R. Foster (2016) Rapid radiation in bacteria leads to a division of labour. *Nat Commun*, 7, 10508.
- Klein, M. I., G. Hwang, P. H. Santos, O. H. Campanella & H. Koo (2015) *Streptococcus mutans*-derived extracellular matrix in cariogenic oral biofilms. *Front Cell Infect Microbiol*, 5, 10.
- Klemm, P. & M. A. Schembri (2000) Bacterial adhesins: function and structure. *Int J Med Microbiol*, 290, 27-35.
- Kobayashi, K. (2007a) *Bacillus subtilis* pellicle formation proceeds through genetically defined morphological changes. *Journal of Bacteriology*, 189, 4920-4931.

- Kobayashi, K. (2007b) Gradual activation of the response regulator DegU controls serial expression of genes for flagellum formation and biofilm formation in *Bacillus subtilis*. *Molecular microbiology*, 66, 395-409.
- Kobayashi, K. (2008) SlrR/SlrA controls the initiation of biofilm formation in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.*, 69, 1399-1410.
- Kobayashi, K. & M. Iwano (2012) BslA(YuaB) forms a hydrophobic layer on the surface of *Bacillus subtilis* biofilms. *Mol Microbiol*, 85, 51-66.
- Kocianova, S., C. Vuong, Y. Yao, J. M. Voyich, E. R. Fischer, F. R. DeLeo & M. Otto (2005) Key role of poly- γ -DL-glutamic acid in immune evasion and virulence of *Staphylococcus epidermidis*. *The Journal of clinical investigation*, 115, 688-694.
- Koller, C. N., L. S. Bauer & R. M. Hollingworth (1992) Characterization of the pH-mediated solubility of *Bacillus thuringiensis* var. san diego native delta-endotoxin crystals. *Biochem Biophys Res Commun*, 184, 692-9.
- Kolodkin-Gal, I., D. Romero, S. Cao, J. Clardy, R. Kolter & R. Losick (2010) D-amino acids trigger biofilm disassembly. *Science*, 328, 627-9.
- Kotiranta, A., K. Lounatmaa & M. Haapasalo (2000) Epidemiology and pathogenesis of *Bacillus cereus* infections. *Microbes Infect*, 2, 189-98.
- Kramer, J. M. & R. J. Gilbert (1989) *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species. *Foodborne bacterial pathogens*, 19, 21-70.
- Lacour, S., E. Bechet, A. J. Cozzzone, I. Mijakovic & C. Grangeasse (2008) Tyrosine phosphorylation of the UDP-glucose dehydrogenase of *Escherichia coli* is at the crossroads of colanic acid synthesis and polymyxin resistance. *PLoS One*, 3, e3053.
- Lauderdale, K. J., B. R. Boles, A. L. Cheung & A. R. Horswill (2009) Interconnections between Sigma B, agr, and proteolytic activity in *Staphylococcus aureus* biofilm maturation. *Infect Immun*, 77, 1623-35.
- Lauderdale, K. J., C. L. Malone, B. R. Boles, J. Morcuende & A. R. Horswill (2010) Biofilm dispersal of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* on orthopedic implant material. *J Orthop Res*, 28, 55-61.
- Lawrence, J. R., G. D. Swerhone, U. Kuhlicke & T. R. Neu (2007) In situ evidence for microdomains in the polymer matrix of bacterial microcolonies. *Can J Microbiol*, 53, 450-8.
- Lee, J. C., M. J. Betley, C. A. Hopkins, N. E. Perez & G. B. Pier (1987) Virulence studies, in mice, of transposon-induced mutants of *Staphylococcus aureus* differing in capsule size. *Journal of Infectious Diseases*, 156, 741-750.
- Lee, V. T., J. M. Matewish, J. L. Kessler, M. Hyodo, Y. Hayakawa & S. Lory (2007) A cyclic-di-GMP receptor required for bacterial exopolysaccharide production. *Mol Microbiol*, 65, 1474-84.
- Lei, Y., T. Oshima, N. Ogasawara & S. Ishikawa (2013) Functional analysis of the protein Veg, which stimulates biofilm formation in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol*, 195, 1697-705.
- Lemon, K. P., A. M. Earl, H. C. Vlamakis, C. Aguilar & R. Kolter (2008) Biofilm development with an emphasis on *Bacillus subtilis* *Curr.Top.Microbiol.Immunol.*, 322, 1-16.
- Lereclus, D., O. Arantes, J. Chaufaux & M. Lecadet (1989) Transformation and expression of a cloned delta-endotoxin gene in *Bacillus thuringiensis*. *FEMS Microbiology Letters*, 51, 211-217.

- Lereclus, D., M. Vallade, J. Chaufaux, O. Arantes & S. Rambaud (1992) Expansion of insecticidal host range of *Bacillus thuringiensis* by in vivo genetic recombination. *Biotechnology (N Y)*, 10, 418-21.
- Lewis, R. J., J. A. Brannigan, I. Smith & A. J. Wilkinson (1996) Crystallisation of the *Bacillus subtilis* sporulation inhibitor SinR, complexed with its antagonist, SinI. *FEBS Lett*, 378, 98-100.
- Li, H. & M. S. Ullrich (2001) Characterization and Mutational Analysis of Three Allelic lsc Genes Encoding Levansucrase in *Pseudomonas syringae*. *Journal of bacteriology*, 183, 3282-3292.
- Li, M., A. E. Villaruz, V. Vadyvaloo, D. E. Sturdevant & M. Otto (2008) AI-2-dependent gene regulation in *Staphylococcus epidermidis*. *BMC Microbiol*, 8, 4.
- Li, Z. & S. K. Nair (2012) Quorum sensing: how bacteria can coordinate activity and synchronize their response to external signals? *Protein Sci*, 21, 1403-17.
- Liang, X., Y. Y. Chen, T. Ruiz & H. Wu (2011) New cell surface protein involved in biofilm formation by *Streptococcus parasanguinis*. *Infect Immun*, 79, 3239-48.
- Limoli, D. H., C. J. Jones & D. J. Wozniak (2015) Bacterial Extracellular Polysaccharides in Biofilm Formation and Function. *Microbiol Spectr*, 3.
- Lindback, T., A. Fagerlund, M. S. Rodland & P. E. Granum (2004) Characterization of the *Bacillus cereus* Nhe enterotoxin. *Microbiology*, 150, 3959-67.
- Lindback, T., M. Mols, C. Basset, P. E. Granum, O. P. Kuipers & A. T. Kovacs (2012) CodY, a pleiotropic regulator, influences multicellular behaviour and efficient production of virulence factors in *Bacillus cereus*. *Environ. Microbiol.*, 14, 13.
- Liszewski Zilla, M., Y. G. Chan, J. M. Lunderberg, O. Schneewind & D. Missiakas (2015a) LytR-CpsA-Psr enzymes as determinants of *Bacillus anthracis* secondary cell wall polysaccharide assembly. *J Bacteriol*, 197, 343-53.
- Liszewski Zilla, M., J. M. Lunderberg, O. Schneewind & D. Missiakas (2015b) *Bacillus anthracis* lcp Genes Support Vegetative Growth, Envelope Assembly, and Spore Formation. *J Bacteriol*, 197, 3731-41.
- Llobet, E., J. M. Tomás & J. A. Bengoechea (2008) Capsule polysaccharide is a bacterial decoy for antimicrobial peptides. *Microbiology*, 154, 3877-3886.
- Lopez, D., M. A. Fischbach, F. Chu, R. Losick & R. Kolter (2009a) Structurally diverse natural products that cause potassium leakage trigger multicellularity in *Bacillus subtilis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106, 280-5.
- Lopez, D. & R. Kolter (2010) Extracellular signals that define distinct and coexisting cell fates in *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol Rev*, 34, 134-49.
- Lopez, D., H. Vlamakis & R. Kolter (2010) Biofilms. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2, a000398.
- Lopez, D., H. Vlamakis, R. Losick & R. Kolter (2009b) Cannibalism enhances biofilm development in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol*, 74, 609-18.
- López, D., H. Vlamakis, R. Losick & R. Kolter (2009) Paracrine signaling in a bacterium. *Genes & development*, 23, 1631-1638.
- Lovering, A. L., S. S. Safadi & N. C. Strynadka (2012) Structural perspective of peptidoglycan biosynthesis and assembly. *Annu Rev Biochem*, 81, 451-78.
- Lu, A., K. Cho, W. P. Black, X. Y. Duan, R. Lux, Z. Yang, H. B. Kaplan, D. R. Zusman & W. Shi (2005) Exopolysaccharide biosynthesis genes required for social motility in *Myxococcus xanthus*. *Mol Microbiol*, 55, 206-20.
- Lund, T., M. L. De Buyser & P. E. Granum (2000) A new cytotoxin from *Bacillus cereus* that may cause necrotic enteritis. *Mol Microbiol*, 38, 254-61.

- Lund, T. & P. E. Granum (1996) Characterisation of a non-haemolytic enterotoxin complex from *Bacillus cereus* isolated after a foodborne outbreak. *FEMS Microbiology Letters*, 141, 151-156.
- Lund, T. & P. E. Granum (1997) Comparison of biological effect of the two different enterotoxin complexes isolated from three different strains of *Bacillus cereus*. *Microbiology*, 143, 3329-3336.
- Mac, L. C. & M. R. Kraus (1950) Relation of virulence of pneumococcal strains for mice to the quantity of capsular polysaccharide formed in vitro. *J Exp Med*, 92, 1-9.
- Mack, D., W. Fischer, A. Krokotsch, K. Leopold, R. Hartmann, H. Egge & R. Laufs (1996) The intercellular adhesin involved in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* is a linear beta-1,6-linked glucosaminoglycan: purification and structural analysis. *J Bacteriol*, 178, 175-83.
- Magee, A. D. & J. Yother (2001) Requirement for capsule in colonization by *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun*, 69, 3755-61.
- Magnusson, K. E. (1989) Physicochemical properties of bacterial surfaces. *Biochem Soc Trans*, 17, 454-8.
- Mah, T. F. & G. A. O'Toole (2001) Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol.*, 9, 34-39.
- Majed, R., C. Faille, M. Kallassy & M. Gohar (2016) *Bacillus cereus* Biofilms-Same, Only Different. *Front Microbiol*, 7, 1054.
- Makino, S.-I., I. Uchida, N. Terakado, C. Sasakawa & M. Yoshikawa (1989) Molecular characterization and protein analysis of the cap region, which is essential for encapsulation in *Bacillus anthracis*. *Journal of Bacteriology*, 171, 722-730.
- Marlow, V. L., F. R. Cianfanelli, M. Porter, L. S. Cairns, J. K. Dale & N. R. Stanley-Wall (2014) The prevalence and origin of exoprotease-producing cells in the *Bacillus subtilis* biofilm. *Microbiology*, 160, 56-66.
- Marvasi, M., P. T. Visscher & L. Casillas Martinez (2010) Exopolymeric substances (EPS) from *Bacillus subtilis*: polymers and genes encoding their synthesis. *FEMS Microbiol Lett*, 313, 1-9.
- McCarter, L. L. (1998) OpaR, a homolog of *Vibrio harveyi* LuxR, controls opacity of *Vibrio parahaemolyticus*. *J Bacteriol*, 180, 3166-73.
- McClelland, M., K. E. Sanderson, J. Spieth, S. W. Clifton, P. Latreille, L. Courtney, S. Porwollik, J. Ali, M. Dante, F. Du, S. Hou, D. Layman, S. Leonard, C. Nguyen, K. Scott, A. Holmes, N. Grewal, E. Mulvaney, E. Ryan, H. Sun, L. Florea, W. Miller, T. Stoneking, M. Nhan, R. Waterston & R. K. Wilson (2001) Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. *Nature*, 413, 852-6.
- Mielich-Suss, B. & D. Lopez (2015) Molecular mechanisms involved in *Bacillus subtilis* biofilm formation. *Environ Microbiol*, 17, 555-65.
- Mijakovic, I. & J. Deutscher (2015) Protein-tyrosine phosphorylation in *Bacillus subtilis*: a 10-year retrospective. *Front Microbiol*, 6, 18.
- Mika, F. & R. Hengge (2014) Small RNAs in the control of RpoS, CsgD, and biofilm architecture of *Escherichia coli*. *RNA Biol*, 11, 494-507.
- Minic, Z., C. Marie, C. Delorme, J. M. Faurie, G. Mercier, D. Ehrlich & P. Renault (2007) Control of EpsE, the phosphoglycosyltransferase initiating exopolysaccharide synthesis in *Streptococcus thermophilus*, by EpsD tyrosine kinase. *J Bacteriol*, 189, 1351-7.
- Molin, S. & T. Tolker-Nielsen (2003) Gene transfer occurs with enhanced efficiency in biofilms and induces enhanced stabilisation of the biofilm structure. *Curr Opin Biotechnol*, 14, 255-61.

- Molle, V., M. Fujita, S. T. Jensen, P. Eichenberger, J. E. Gonzalez-Pastor, J. S. Liu & R. Losick (2003) The Spo0A regulon of *Bacillus subtilis* *Mol Microbiol*, 50, 1683-1701.
- Morgan-Sagastume, F., P. Larsen, J. L. Nielsen & P. H. Nielsen (2008) Characterization of the loosely attached fraction of activated sludge bacteria. *Water Res*, 42, 843-54.
- Morona, J. K., D. C. Miller, R. Morona & J. C. Paton (2004) The effect that mutations in the conserved capsular polysaccharide biosynthesis genes *cpsA*, *cpsB*, and *cpsD* have on virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *J Infect Dis*, 189, 1905-13.
- Morona, J. K., R. Morona, D. C. Miller & J. C. Paton (2003) Mutational analysis of the carboxy-terminal (YGX)₄ repeat domain of CpsD, an autophosphorylating tyrosine kinase required for capsule biosynthesis in *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol*, 185, 3009-19.
- Morona, J. K., R. Morona & J. C. Paton (2006) Attachment of capsular polysaccharide to the cell wall of *Streptococcus pneumoniae* type 2 is required for invasive disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103, 8505-8510.
- Moscoso, M., E. Garcia & R. Lopez (2006) Biofilm formation by *Streptococcus pneumoniae*: role of choline, extracellular DNA, and capsular polysaccharide in microbial accretion. *J Bacteriol*, 188, 7785-95.
- Mulcahy, H., L. Charron-Mazenod & S. Lewenza (2010) *Pseudomonas aeruginosa* produces an extracellular deoxyribonuclease that is required for utilization of DNA as a nutrient source. *Environ Microbiol*, 12, 1621-9.
- Nagorska, K., A. Ostrowski, K. Hinc, I. B. Holland & M. Obuchowski (2010) Importance of *eps* genes from *Bacillus subtilis* in biofilm formation and swarming. *Journal of applied genetics*, 51, 369-81.
- Nakamura, L. K. (1998) *Bacillus pseudomycoides* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol*, 48 Pt 3, 1031-5.
- O'Riordan, K. & J. C. Lee (2004) *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharides. *Clin Microbiol Rev*, 17, 218-34.
- Oh, S. Y., J. M. Budzik, G. Garufi & O. Schneewind (2011) Two capsular polysaccharides enable *Bacillus cereus* G9241 to cause anthrax-like disease. *Molecular microbiology*, 80, 455-70.
- Ophir, T. & D. L. Gutnick (1994) A role for exopolysaccharides in the protection of microorganisms from desiccation. *Appl Environ Microbiol*, 60, 740-5.
- Oppermann-Sanio, F. B. & A. Steinbuchel (2002) Occurrence, functions and biosynthesis of polyamides in microorganisms and biotechnological production. *Naturwissenschaften*, 89, 11-22.
- Pan, Y., F. Breidt, Jr. & S. Kathariou (2006) Resistance of *Listeria monocytogenes* biofilms to sanitizing agents in a simulated food processing environment. *Appl Environ Microbiol*, 72, 7711-7.
- Parker, M. W. & S. C. Feil (2005) Pore-forming protein toxins: from structure to function. *Prog Biophys Mol Biol*, 88, 91-142.
- Paton, A. (1960) The role of *Pseudomonas* in plant disease. *Journal of Applied Bacteriology*, 23, 526-532.
- Perchat, S., C. Buisson, J. Chaufaux, V. Sanchis, D. Lereclus & M. Gohar (2005) *Bacillus cereus* produces several nonproteinaceous insecticidal exotoxins. *Journal of Invertebrate Pathology*.
- Perchat, S., T. Dubois, S. Zouhir, M. Gominet, S. Poncet, C. Lemy, M. Aumont-Nicaise, J. Deutscher, M. Gohar, S. Nessler & D. Lereclus (2011) A cell-cell communication system regulates protease production during sporulation in bacteria of the *Bacillus cereus* group. *Mol Microbiol*, 82, 619-33.

- Perez, C., L. E. Fernandez, J. Sun, J. L. Folch, S. S. Gill, M. Soberon & A. Bravo (2005) *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* Cyt1Aa synergizes Cry11Aa toxin by functioning as a membrane-bound receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 18303-8.
- Pflughoeft, K. J., P. Sumby & T. M. Koehler (2011) *Bacillus anthracis* *sin* locus and regulation of secreted proteases. *J. Bacteriol.*, 193, 631-9.
- Pinchuk, G. E., C. Ammons, D. E. Culley, S. M. Li, J. S. McLean, M. F. Romine, K. H. Nealson, J. K. Fredrickson & A. S. Beliaev (2008) Utilization of DNA as a sole source of phosphorus, carbon, and energy by *Shewanella* spp.: ecological and physiological implications for dissimilatory metal reduction. *Appl Environ Microbiol*, 74, 1198-208.
- Putker, F., M. P. Bos & J. Tommassen (2015) Transport of lipopolysaccharide to the Gram-negative bacterial cell surface. *FEMS Microbiol Rev*, 39, 985-1002.
- Qin, Z., Y. Ou, L. Yang, Y. Zhu, T. Tolker-Nielsen, S. Molin & D. Qu (2007) Role of autolysin-mediated DNA release in biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis*. *Microbiology*, 153, 2083-92.
- Raetz, C. R. & C. Whitfield (2002) Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu Rev Biochem*, 71, 635-700.
- Rahman, M. M., J. Guard-Petter, K. Asokan, C. Hughes & R. W. Carlson (1999) The structure of the colony migration factor from pathogenic *Proteus mirabilis*. A capsular polysaccharide that facilitates swarming. *J Biol Chem*, 274, 22993-8.
- Ramarao, N. & D. Lereclus (2006) Adhesion and cytotoxicity of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* to epithelial cells are FlhA and PlcR dependent, respectively. *Microbes.Infect.*, 8, 1483-1491.
- Rasko, D. A., J. Ravel, O. A. Okstad, E. Helgason, R. Z. Cer, L. Jiang, K. A. Shores, D. E. Fouts, N. J. Tourasse, S. V. Angiuoli, J. Kolonay, W. C. Nelson, A. B. Kolsto, C. M. Fraser & T. D. Read (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, 977-988.
- Raymond, B., P. R. Johnston, C. Nielsen-Leroux, D. Lereclus & N. Crickmore (2010) *Bacillus thuringiensis*: an impotent pathogen? *Trends Microbiol.*
- Renelli, M., V. Matias, R. Y. Lo & T. J. Beveridge (2004) DNA-containing membrane vesicles of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 and their genetic transformation potential. *Microbiology*, 150, 2161-9.
- Robbins, J., R. Schneerson, W. Egan, W. Vann & D. Liu (1980) Virulence properties of bacterial capsular polysaccharides-unanswered questions. *The molecular basis of microbial pathogenicity*, 115-132.
- Roberts, I. S. (1995) Bacterial polysaccharides in sickness and in health. The 1995 Fleming Lecture. *Microbiology*, 141 (Pt 9), 2023-31.
- Roberts, I. S., F. K. Saunders & G. J. Boulnois (1989) Bacterial capsules and interactions with complement and phagocytes. *Biochem Soc Trans*, 17, 462-4.
- Romero, D., H. Vlamakis, R. Losick & R. Kolter (2011) An accessory protein required for anchoring and assembly of amyloid fibres in *B. subtilis* biofilms. *Mol. Microbiol.*, 80, 1155-68.
- Ron, E. Z. & E. Rosenberg (2001) Natural roles of biosurfactants. *Environ Microbiol*, 3, 229-36.
- Roux, D., C. Cywes-Bentley, Y. F. Zhang, S. Pons, M. Konkol, D. B. Kearns, D. J. Little, P. L. Howell, D. Skurnik & G. B. Pier (2015) Identification of Poly-N-acetylglucosamine

- as a Major Polysaccharide Component of the *Bacillus subtilis* Biofilm Matrix. *J Biol Chem*, 290, 19261-72.
- Rowe, G. E., A. Margaritis & N. Wei (2003) Specific oxygen uptake rate variations during batch fermentation of *Bacillus thuringiensis* subspecies kurstaki HD-1. *Biotechnol Prog*, 19, 1439-43.
- Ruhmann, B., J. Schmid & V. Sieber (2015) Methods to identify the unexplored diversity of microbial exopolysaccharides. *Front Microbiol*, 6, 565.
- Rutherford, S. T. & B. L. Bassler (2012) Bacterial quorum sensing: its role in virulence and possibilities for its control. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2.
- Ryder, C., M. Byrd & D. J. Wozniak (2007) Role of polysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Curr Opin Microbiol*, 10, 644-8.
- Ryu, J. H. & L. R. Beuchat (2005) Biofilm formation and sporulation by *Bacillus cereus* on a stainless steel surface and subsequent resistance of vegetative cells and spores to chlorine, chlorine dioxide, and a peroxyacetic acid-based sanitizer. *J Food Prot*, 68, 2614-22.
- Salamitou, S., F. Ramisse, M. Brehelin, D. Bourguet, N. Gilois, M. Gominet, E. Hernandez & D. Lereclus (2000) The plcR regulon is involved in the opportunistic properties of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus* in mice and insects. *Microbiology*, 146, 2825-2832.
- Saville, R. M., S. Rakshe, J. A. Haagensen, S. Shukla & A. M. Spormann (2011) Energy-dependent stability of *Shewanella oneidensis* MR-1 biofilms. *J Bacteriol*, 193, 3257-64.
- Schaffer, C. & P. Messner (2005) The structure of secondary cell wall polymers: how Gram-positive bacteria stick their cell walls together. *Microbiology*, 151, 643-51.
- Schnepf, E., N. Crickmore, J. Van Rie, D. Lereclus, J. Baum, J. Feitelson, D. R. Zeigler & D. H. Dean (1998) *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.*, 62, 775-806.
- Schuch, R., A. J. Pelzek, A. Raz, C. W. Euler, P. A. Ryan, B. Y. Winer, A. Farnsworth, S. S. Bhaskaran, C. E. Stebbins, Y. Xu, A. Clifford, D. J. Bearss, H. Vankayalapati, A. R. Goldberg & V. A. Fischetti (2013) Use of a bacteriophage lysin to identify a novel target for antimicrobial development. *PLoS One*, 8, e60754.
- Serra, D. O., A. M. Richter & R. Hengge (2013) Cellulose as an architectural element in spatially structured *Escherichia coli* biofilms. *J Bacteriol*, 195, 5540-54.
- Shenoy, A. T. & C. J. Orihuela (2016) Anatomical site-specific contributions of pneumococcal virulence determinants. *Pneumonia (Nathan)*, 8.
- Shukla, S. K. & T. S. Rao (2013) Effect of calcium on *Staphylococcus aureus* biofilm architecture: a confocal laser scanning microscopic study. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 103, 448-54.
- Slamti, L., C. Lemy, C. Henry, A. Guillot, E. Huillet & D. Lereclus (2015) CodY Regulates the Activity of the Virulence Quorum Sensor PlcR by Controlling the Import of the Signaling Peptide PapR in *Bacillus thuringiensis*. *Front Microbiol*, 6, 1501.
- Slamti, L., S. Perchat, E. Huillet & D. Lereclus (2014) Quorum sensing in *Bacillus thuringiensis* is required for completion of a full infectious cycle in the insect. *Toxins (Basel)*, 6, 2239-55.
- Soell, M., M. Diab, G. Haan-Archipoff, A. Beretz, C. Herbelin, B. Poutrel & J. P. Klein (1995) Capsular polysaccharide types 5 and 8 of *Staphylococcus aureus* bind specifically to human epithelial (KB) cells, endothelial cells, and monocytes and induce release of cytokines. *Infection and Immunity*, 63, 1380-6.

- Sonenshein, A. L. (2005) CodY, a global regulator of stationary phase and virulence in Gram-positive bacteria. *Curr.Opin.Microbiol.*, 8, 203-207.
- Sorokin, A., B. Candelon, K. Guilloux, N. Galleron, N. Wackerow-Kouzova, S. D. Ehrlich, D. Bourguet & V. Sanchis (2006) Multiple-locus sequence typing analysis of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* reveals separate clustering and a distinct population structure of psychrotrophic strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 1569-1578.
- Spormann, A. M. (2008) Physiology of microbes in biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol*, 322, 17-36.
- Stenfors Arnesen, L. P., A. Fagerlund & P. E. Granum (2008) From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiol. Rev.*, 32, 579-606.
- Stingle, F., J. R. Neeser & B. Mollet (1996) Identification and characterization of the eps (Exopolysaccharide) gene cluster from *Streptococcus thermophilus* Sfi6. *J Bacteriol*, 178, 1680-90.
- Stoodley, P. & P. Dirckx. 2003. Biofilm formation in 3 steps.
- Strauch, M., V. Webb, G. Spiegelman & J. A. Hoch (1990) The Spo0A protein of *Bacillus subtilis* is a repressor of the *abrB* gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 1801-5.
- Strauch, M. A., B. G. Bobay, J. Cavanagh, F. Yao, A. Wilson & Y. Le Breton (2007) Abh and AbrB control of *Bacillus subtilis* antimicrobial gene expression. *J. Bacteriol.*, 189, 7720-32.
- Sutherland, I. (2001) Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology*, 147, 3-9.
- Thomas, V. C. & L. E. Hancock (2009) Suicide and fratricide in bacterial biofilms. *Int J Artif Organs*, 32, 537-44.
- Thorsen, L., B. M. Hansen, K. F. Nielsen, N. B. Hendriksen, R. K. Phipps & B. B. Budde (2006) Characterization of emetic *Bacillus weihenstephanensis*, a new cereulide-producing bacterium. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 5118-5121.
- Ticknor, L. O., A. B. Kolsto, K. K. Hill, P. Keim, M. T. Laker, M. Tonks & P. J. Jackson (2001) Fluorescent Amplified Fragment Length Polymorphism Analysis of Norwegian *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* Soil Isolates. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 4863-4873.
- Toguchi, A., M. Siano, M. Burkart & R. M. Harshey (2000) Genetics of swarming motility in *Salmonella enterica* serovar typhimurium: critical role for lipopolysaccharide. *J Bacteriol*, 182, 6308-21.
- Toledo-Arana, A., J. Valle, C. Solano, M. J. Arrizubieta, C. Cucarella, M. Lamata, B. Amorena, J. Leiva, J. R. Penades & I. Lasa (2001) The enterococcal surface protein, Esp, is involved in *Enterococcus faecalis* biofilm formation. *Appl Environ Microbiol*, 67, 4538-45.
- Tolker-Nielsen, T., U. C. Brinch, P. C. Ragas, J. B. Andersen, C. S. Jacobsen & S. Molin (2000) Development and dynamics of *Pseudomonas* sp. biofilms. *J Bacteriol*, 182, 6482-9.
- Tomcsik, J. 1956. Bacterial capsules and their relation to the cell wall. In *Symp. Soc. Gen. Microbiol*, 41-67.
- Tourasse, N. J., E. Helgason, A. Klevan, P. Sylvestre, M. Moya, M. Haustant, O. A. Okstad, A. Fouet, M. Mock & A. B. Kolsto (2011) Extended and global phylogenetic view of the *Bacillus cereus* group population by combination of MLST, AFLP, and MLEE genotyping data. *Food Microbiol*, 28, 236-44.

- Tran, L. S., T. Nagai & Y. Itoh (2000) Divergent structure of the ComQXPA quorum-sensing components: molecular basis of strain-specific communication mechanism in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol*, 37, 1159-71.
- Uchida, I., S. Makino, C. Sasakawa, M. Yoshikawa, C. Sugimoto & N. Terakado (1993) Identification of a novel gene, *dep*, associated with depolymerization of the capsular polymer in *Bacillus anthracis*. *Molecular microbiology*, 9, 487-496.
- van Gestel, J., H. Vlamakis & R. Kolter (2015a) Division of Labor in Biofilms: the Ecology of Cell Differentiation. *Microbiol Spectr*, 3, MB-0002-2014.
- van Gestel, J., H. Vlamakis & R. Kolter (2015b) From cell differentiation to cell collectives: *Bacillus subtilis* uses division of labor to migrate. *PLoS Biol*, 13, e1002141.
- van Kranenburg R, M. J., van Swan II, Willem NJ, de Vos WM (1997) Molecular characterization of the plasmid-encoded *eps* gene cluster essential for exopolysaccharide biosynthesis in *Lactococcus lactis*. *Mol. Microbiol* 24, 387-97.
- Van Rie, J., S. Jansens, H. Hofte, D. Degheele & H. Van Mellaert (1990) Receptors on the Brush Border Membrane of the Insect Midgut as Determinants of the Specificity of *Bacillus thuringiensis* Delta- Endotoxins. *Applied and Environmental Microbiology*, 56, 1378-1385.
- Vandamme, P., B. Pot, M. Gillis, P. de Vos, K. Kersters & J. Swings (1996) Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol Rev*, 60, 407-38.
- Vaningelgem, F., M. Zamfir, F. Mozzi, T. Adrian, M. Vancanneyt, J. Swings & L. De Vuyst (2004) Biodiversity of exopolysaccharides produced by *Streptococcus thermophilus* strains is reflected in their production and their molecular and functional characteristics. *Appl Environ Microbiol*, 70, 900-12.
- Veening, J. W., O. A. Igoshin, R. T. Eijlander, R. Nijland, L. W. Hamoen & O. P. Kuipers (2008) Transient heterogeneity in extracellular protease production by *Bacillus subtilis*. *Mol Syst Biol*, 4, 184.
- Verbrugh, H., P. Peterson, B. Nguyen, S. Sisson & Y. Kim (1982) Opsonization of encapsulated *Staphylococcus aureus*: the role of specific antibody and complement. *The Journal of Immunology*, 129, 1681-1687.
- Verhamme, D. T., E. J. Murray & N. R. Stanley-Wall (2009) DegU and Spo0A jointly control transcription of two loci required for complex colony development by *Bacillus subtilis* *Journal of Bacteriology*, 191, 100-108.
- Verplaetse, E., L. Slamti, M. Gohar & D. Lereclus (2015) Cell Differentiation in a *Bacillus thuringiensis* Population during Planktonic Growth, Biofilm Formation, and Host Infection. *MBio*, 6.
- Verplaetse, E., L. Slamti, M. Gohar & D. Lereclus (2016) Two distinct pathways lead *Bacillus thuringiensis* to commit to sporulation in biofilm. *Research in microbiology*.
- Vilain, S., J. M. Pretorius, J. Theron & V. S. Brozel (2009) DNA as an adhesin: *Bacillus cereus* requires extracellular DNA to form biofilms. *Appl Environ Microbiol*, 75, 2861-8.
- Vilas-Boas, G. T., A. P. Peruca & O. M. Arantes (2007) Biology and taxonomy of *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis*, and *Bacillus thuringiensis*. *Can J Microbiol*, 53, 673-87.
- Vlamakis, H., C. Aguilar, R. Losick & R. Kolter (2008) Control of cell fate by the formation of an architecturally complex bacterial community. *Genes Dev.*, 22, 945-953.
- Vlamakis, H., Y. Chai, P. Beauregard, R. Losick & R. Kolter (2013) Sticking together: building a biofilm the *Bacillus subtilis* way. *Nat Rev Microbiol*, 11, 157-68.

- von Eiff, C., K. L. Taylor, A. Mellmann, A. I. Fattom, A. W. Friedrich, G. Peters & K. Becker (2007) Distribution of capsular and surface polysaccharide serotypes of *Staphylococcus aureus*. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 58, 297-302.
- Vuong, C., C. Gerke, G. A. Somerville, E. R. Fischer & M. Otto (2003) Quorum-sensing control of biofilm factors in *Staphylococcus epidermidis*. *J Infect Dis*, 188, 706-18.
- Vuong, C., H. L. Saenz, F. Gotz & M. Otto (2000) Impact of the agr quorum-sensing system on adherence to polystyrene in *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dis*, 182, 1688-93.
- Wang, X., J. F. Preston, 3rd & T. Romeo (2004) The pgaABCD locus of *Escherichia coli* promotes the synthesis of a polysaccharide adhesin required for biofilm formation. *J Bacteriol*, 186, 2724-34.
- Ward, A., C. L. Reyes, J. Yu, C. B. Roth & G. Chang (2007) Flexibility in the ABC transporter MsbA: Alternating access with a twist. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 19005-10.
- Weiser, J. N., D. Bae, H. Epino, S. B. Gordon, M. Kapoor, L. A. Zenewicz & M. Shchepetov (2001) Changes in availability of oxygen accentuate differences in capsular polysaccharide expression by phenotypic variants and clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun*, 69, 5430-9.
- Welkos, S. (1991) Plasmid-associated virulence factors of non-toxigenic (pX01-) *Bacillus anthracis*. *Microbial pathogenesis*, 10, 183-198.
- Whitchurch, C. B., T. Tolker-Nielsen, P. C. Ragas & J. S. Mattick (2002) Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science*, 295, 1487.
- Whitfield, C. (2006) Biosynthesis and assembly of capsular polysaccharides in *Escherichia coli*. *Annu Rev Biochem*, 75, 39-68.
- Wijman, J. G., P. P. de Leeuw, R. Moezelaar, M. H. Zwietering & T. Abee (2007) Air-liquid interface biofilms of *Bacillus cereus* : formation, sporulation, and dispersion. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 1481-1488.
- Wilkinson, B. J. (1983) Staphylococcal capsules and slime. *Staphylococci and staphylococcal infections*, 2, 481-523.
- Williams, P. & M. Cámara (2009) Quorum sensing and environmental adaptation in *Pseudomonas aeruginosa*: a tale of regulatory networks and multifunctional signal molecules. *Current opinion in microbiology*, 12, 182-191.
- Wingender, J., M. Strathmann, A. Rode, A. Leis & H. C. Flemming (2001) Isolation and biochemical characterization of extracellular polymeric substances from *Pseudomonas aeruginosa*. *Methods Enzymol*, 336, 302-14.
- Wugeditsch, T., A. Paiment, J. Hocking, J. Drummelsmith, C. Forrester & C. Whitfield (2001) Phosphorylation of Wzc, a tyrosine autokinase, is essential for assembly of group 1 capsular polysaccharides in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 276, 2361-71.
- Xiao, J., M. I. Klein, M. L. Falsetta, B. Lu, C. M. Delahunty, J. R. Yates, 3rd, A. Heydorn & H. Koo (2012) The exopolysaccharide matrix modulates the interaction between 3D architecture and virulence of a mixed-species oral biofilm. *PLoS Pathog*, 8, e1002623.
- Xu, L., H. Li, C. Vuong, V. Vadyvaloo, J. Wang, Y. Yao, M. Otto & Q. Gao (2006) Role of the luxS quorum-sensing system in biofilm formation and virulence of *Staphylococcus epidermidis* *Infect.Immun.*, 74, 488-496.
- Yang, L., K. B. Barken, M. E. Skindersoe, A. B. Christensen, M. Givskov & T. Tolker-Nielsen (2007) Effects of iron on DNA release and biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*, 153, 1318-28.

- Yother, J. (1999) Common themes in the genetics of streptococcal capsular polysaccharides. *Genetics of bacterial polysaccharides*. CRC Press, Boca Raton, Fla, 161-184.
- Yother, J. (2011) Capsules of *Streptococcus pneumoniae* and other bacteria: paradigms for polysaccharide biosynthesis and regulation. *Annu Rev Microbiol*, 65, 563-81.
- Yu, S., Q. Wei, T. Zhao, Y. Guo & L. Z. Ma (2016) A Survival Strategy for *Pseudomonas aeruginosa* That Uses Exopolysaccharides To Sequester and Store Iron To Stimulate Psl-Dependent Biofilm Formation. *Appl Environ Microbiol*, 82, 6403-6413.
- Zanchetta, P., N. Lagarde & J. Guezennec (2003) A new bone-healing material: a hyaluronic acid-like bacterial exopolysaccharide. *Calcif Tissue Int*, 72, 74-9.
- Zogaj, X., M. Nimtz, M. Rohde, W. Bokranz & U. Romling (2001) The multicellular morphotypes of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* produce cellulose as the second component of the extracellular matrix. *Mol Microbiol*, 39, 1452-63.

Annexes





Spatio-Temporal Evolution of Sporulation in *Bacillus thuringiensis* Biofilm

Nay El-Khoury¹, Racha Majed^{1,2}, Stéphane Perchat¹, Mireille Kallassy², Didier Lereclus¹ and Michel Gohar^{1*}

¹ Micalis Institute, Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), AgroParisTech, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Université Paris-Saclay, Jouy-en-Josas, France, ² Laboratoire de Biotechnologie, Unité de Recherche Technologies et Valorisation Alimentaire, Université Saint-Joseph, Beirut, Lebanon

OPEN ACCESS

Edited by:

Akos T. Kovacs,
University of Jena, Germany

Reviewed by:

Toril Lindbäck,
Norwegian University of Life Sciences,
Norway
Ezio Ricca,
University of Naples Federico II, Italy
Ganesh Babu Malli Mohan,
National Aeronautics and Space
Administration (NASA), USA

*Correspondence:

Michel Gohar
michel.gohar@jouy.inra.fr

Specialty section:

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

Received: 31 May 2016

Accepted: 22 July 2016

Published: 03 August 2016

Citation:

El-Khoury N, Majed R, Perchat S,
Kallassy M, Lereclus D and Gohar M
(2016) Spatio-Temporal Evolution
of Sporulation in *Bacillus thuringiensis*
Biofilm. *Front. Microbiol.* 7:1222.
doi: 10.3389/fmicb.2016.01222

Bacillus thuringiensis can produce a floating biofilm which includes two parts: a ring and a pellicle. The ring is a thick structure which sticks to the culture container, while the pellicle extends over the whole liquid surface and joins the ring. We have followed over time, from 16 to 96 h, sporulation in the two biofilm parts. Sporulation was followed *in situ* in 48-wells polystyrene microtiterplates with a fluorescence binocular stereomicroscope and a *spoIID*-yfp transcriptional fusion. Sporulation took place much earlier in the ring than in the pellicle. In 20 h-aged biofilms, *spoIID* was expressed only in the ring, which could be seen as a green fluorescent circle surrounding the non-fluorescent pellicle. However, after 48 h of culture, the pellicle started to express *spoIID* in specific area corresponding to protrusions, and after 96 h both the ring and the whole pellicle expressed *spoIID*. Spore counts and microscopy observations of the ring and the pellicle harvested separately confirmed these results and revealed that sporulation occurred 24 h-later in the pellicle comparatively to the ring, although both structures contained nearly 100% spores after 96 h of culture. We hypothesize that two mechanisms, due to microenvironments in the biofilm, can explain this difference. First, the ring experiences a decreased concentration of nutrients earlier than the pellicle, because of a lower exchange area with the culture medium. An second, the ring is exposed to partial dryness. Both reasons could speed up sporulation in this biofilm structure. Our results also suggest that spores in the biofilm display a phenotypic heterogeneity. These observations might be of particular significance for the food industry, since the biofilm part sticking to container walls – the ring – is likely to contain spores and will therefore resist both to washing and to cleaning procedures, and will be able to restart a new biofilm when food production has resumed.

Keywords: *Bacillus*, *thuringiensis*, biofilm, phenotypic heterogeneity, sporulation, food microbiology

INTRODUCTION

Phenotypic heterogeneity in isogenic bacterial populations has been described in several species and for a wide range of phenotypes, including quorum-sensing dependent phenotypes, flagellins expression, response to antibiotics, evasion to host immune response, occurrence of persister cells, and heat resistance (Abda et al., 2015; Ackermann, 2015; Grote et al., 2015). Stochastic noise in

gene expression is thought to be one of the main mechanisms giving rise to this heterogeneity, but a number of other molecular mechanisms can also lead to phenotypic variations (Ackermann, 2015). In *B. subtilis* planktonic cultures, phenotypic variation in sporulation is a consequence of a bistable sporulation gene regulation (Veening et al., 2005).

In biofilms, spatial differentiation is observed in addition to phenotypic heterogeneity. This differentiation is mainly a consequence of the biofilm matrix presence. The biofilm matrix often includes a scaffold of protein fibers (Fong and Yildiz, 2015), and a gel-like structure constituted of polysaccharides (Limoli et al., 2015). The matrix's low diffusion coefficient limits nutrients exchanges, creates microenvironments within the biofilm, and decreases bacterial motility, which hinders populations remixing. In *B. subtilis* biofilms, the sporulation process was found to occur in specific area described as 'fruiting bodies' located at the tip of biofilm protrusions, in which preferential transcription of sporulation genes took place (Branda et al., 2001). Similarly, in colonies grown on agar plates, sporulation, as revealed by transcriptional fusions with reporter genes encoding fluorescent proteins, occurs only in bundles at the upper layers of the colony (Veening et al., 2006). Bacteria located elsewhere in the colony express genes involved in other functions, such as biofilm matrix biosynthesis or motility (Vlamakis et al., 2008).

Bacillus thuringiensis is an insect pathogen sharing with *B. subtilis* a number of regulation pathways leading to biofilm formation (Fagerlund et al., 2014). Most strains of this species are able to form biofilms floating on the culture medium (Wijman et al., 2007; Auger et al., 2009). These floating biofilms have a specific architecture, since they include a thick ring which sticks to the container wall and circles the floating pellicle, on which protrusions can be seen (Fagerlund et al., 2014). Floating biofilms of *B. thuringiensis* display a high heterogeneity in genes expression profile, greater than for other growth conditions such as standard agitated cultures, or even during the insect infection (Verplaetse et al., 2015). At least four cell types, which differ within them for the expression of the virulence, necrotrophism, or sporulation regulons, can coexist when the biofilm is produced in an LB-like culture medium (Verplaetse et al., 2015), and three cell types have been observed in HCT, a sporulation culture medium (Verplaetse et al., 2016). Interestingly, sporulation occurs almost exclusively in cells in which the necrotrophism regulon has been activated (Verplaetse et al., 2015). Necrotrophic cells produce a high quantity of degradative enzymes able to degrade the tissues of the host after its death, and therefore to provide the bacterium with nutrients required to achieve the sporulation process (Perchat et al., 2011; Dubois et al., 2012).

Production of spores have been extensively documented in *B. cereus* biofilms (Majed et al., 2016), a species genetically very close to *B. thuringiensis*, from which it differs mainly by the presence in the latter species of Cry plasmids involved in virulence against invertebrates (Jensen et al., 2003). Indeed, spores and biofilms are the main causes of *B. cereus* persistent contamination of industrial food processing lines, which can lead to food spoilage and economical losses, particularly in the dairy industry (Flach et al., 2014). However, the floating biofilm of *B. cereus* or of *B. thuringiensis* have, up to now, always been

considered as a whole. Here, we have investigated sporulation in the two main structures of the floating biofilm, the ring and the pellicle. We found differences in the two structures sporulation process, leading to spatial heterogeneity in spore formation in the *B. thuringiensis* biofilm. The consequences of this spatial heterogeneity for the bacterium life and for food industry contamination by *B. cereus* are discussed.

MATERIALS AND METHODS

Strains and Culture Conditions

The strains used in this study were the 407 strain and the 407 pHT304-18Ω*PspoIID-yfp* strain. The 407 strain is a *B. thuringiensis* strain cured of its Cry plasmid (Lereclus et al., 1989). The 407 pHT304-18Ω*PspoIID-yfp* was obtained after transformation of the 407 strain with the pHT304-18Ω*PspoIID-yfp* which construction has been described earlier (Verplaetse et al., 2015). Strains were plated on LB-agar plates and grown overnight at 37°C. One colony from these plates was used to inoculate precultures, of 10 ml of LB medium in 50 ml flasks. Precultures were grown at 30°C with agitation until OD₆₀₀ of 1 was reached. For strain 407 pHT304-18Ω*PspoIID-yfp*, the LB agar plate and the preculture medium were supplemented with 10 µg/mL erythromycin.

spoIID Gene Transcription Assay

Transcription assays in biofilms were performed with the 407 pHT304-18Ω*PspoIID-yfp* strain (Verplaetse et al., 2015). Precultures were diluted in HCT medium (Lecadet and Martouret, 1967) at a final OD₆₀₀ of 0.01, and 1.5 ml of this solution were distributed in 48-wells polystyrene microtiter plates. The microtiter plates were incubated at 30°C without shaking until observation. Plates were observed after 16, 20, 24, 36, 48, 72, and 96 h of culture with a Leica MZ FLIII fluorescence stereomicroscope (Leica microsystems GmbH, Wetzlar) equipped with a GFP filter (Leica 10446223). Pictures were taken with a CCD camera (Sony NEX5). Fluorescence-white light overlay pictures were obtained with ImageJ 2.0 (Schneider et al., 2012) and annotated or assembled in panels with Photoshop CS6 (Adobe). The wild-type strain displays no autofluorescence background in biofilms produced in HCT (Verplaetse et al., 2016).

Pellicle and Ring Recovery

The 407 wild type strain was grown in glass tubes, in HCT medium at 30°C without shaking, as described elsewhere (Fagerlund et al., 2014). Biofilms were recovered after 16, 20, 24, 48, 72, and 96 h of culture, and the ring and the pellicle were harvested as follows. The culture medium beneath the pellicle was carefully removed with a Pasteur pipette. In this way, the pellicle was detached from the ring, and layed down at the bottom of the tube (Figure 1). The pellicle was finally recovered with 1 ml of PBS, and subsequently transferred in a 2 ml microcentrifuge tube. The glass tube without the pellicle was filled with 1ml of PBS, and the ring was scraped with a 1ml pipette cone and recovered in the PBS solution. Both suspensions (the ring and the pellicle)

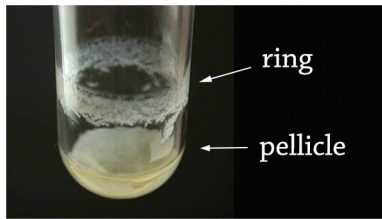


FIGURE 1 | Ring and pellicle of a 48 h-old *Bacillus thuringiensis* floating biofilm. The biofilm was formed in a glass tube at 30°C in HCT medium. The culture medium was slowly discarded by pipetting, resulting in a separation of the ring sticking to the tube wall, and of the pellicle laying at the tube bottom.

were homogenized by aspirating/pushing ten times through a 26-gauge needle, and their OD₆₀₀ was determined. Suspensions of spores and of vegetative cells display similar absorbances (see Supplementary Figure S1), and the OD₆₀₀ is proportional to the number of cells and spores (see Supplementary Figure S2).

Spores Count Assay

Counts of CFU were performed on heated/unheated suspensions by plating serial dilutions triplicates ranging from 10² to 10⁷ spores/ml on LB agar plates, which were subsequently incubated overnight at 30°C. The pellicle and the ring suspensions were heated at 80°C for 12 min to eliminate vegetative cells. Results were expressed as spores percentages relatively to the whole bacterial population.

Microscope Observations

The presence of spores in the pellicle and the ring fractions of the biofilm were observed with a Zeiss AxioObserver.Z1 microscope, using a phase contrast and oil immersion 100x objective. Pictures were taken with a Zeiss AxioCam MRm CCD camera, annotated with the Zen software (Carl Zeiss Microimaging GmbH, Göttingen) and assembled in panels with Photoshop CS6 (Adobe).

Statistics

The results are expressed as the mean of 3 to 4 independent experiments, all performed at different days. Means are given with their standard errors.

RESULTS

Biofilm Growth

The ring and the pellicle growth curves were determined by the OD₆₀₀ of each fraction suspensions. As depicted **Figure 2**, the ring OD₆₀₀ could be measured as early as after 16 h of culture, while the pellicle OD₆₀₀ could be detected only after 20 h of culture, a time where its structure was stable enough to allow its harvest. After 20 h of culture, the pellicle OD₆₀₀ increased more rapidly than the ring OD₆₀₀, and both growth curves reached a steady state at 48 to 72 h of culture, although the pellicle OD₆₀₀

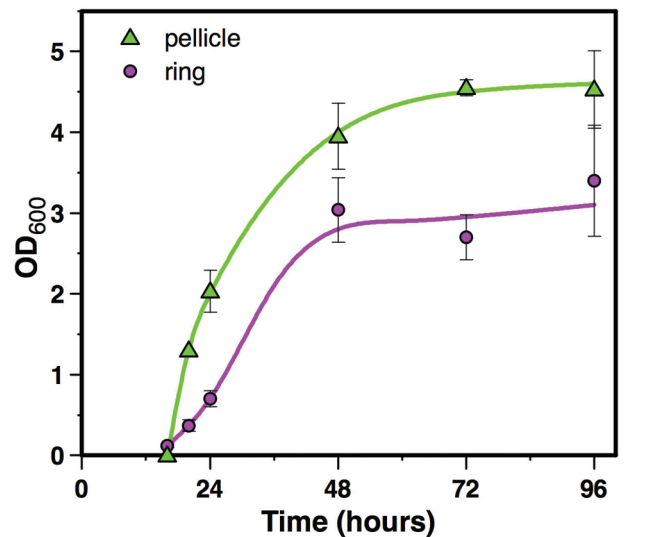
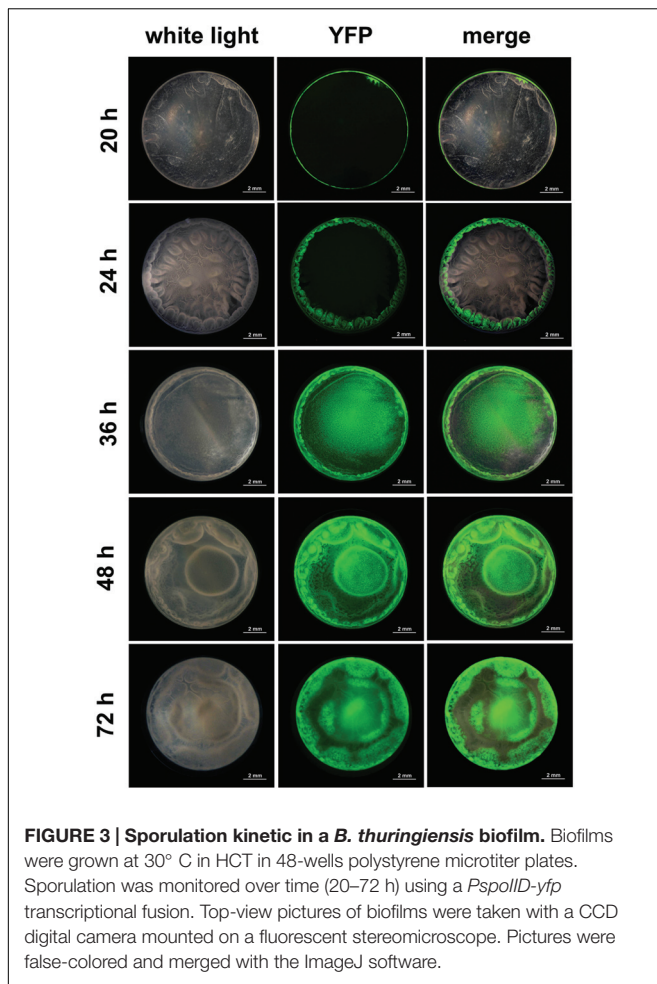


FIGURE 2 | Biofilm growth. Biofilm growth in HCT medium at 30°C in glass tubes was recorded by OD₆₀₀ of ring and pellicle suspensions recovered in 1 ml water. Symbols represent the mean of 3 to 4 experiments, and bar errors represent the standard error on the mean.

was 1.7 times higher than the ring OD₆₀₀ during the plateau (between 72 and 96 h). Therefore, the pellicle grew more rapidly than the ring and reached higher OD₆₀₀ values in the mature biofilm.

Sporulation in the Biofilm

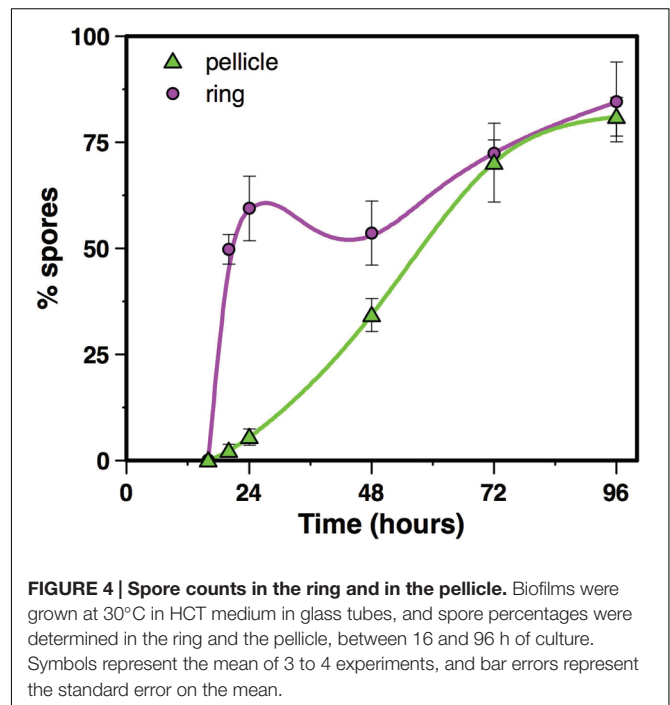
Sporulation kinetics, between 16 and 96 h of culture, was determined in the undisturbed floating biofilm formed in 48-wells microtiter plates using a transcriptional fusion between the reporter gene *yfp* and the promoter of *spoIID*, a gene directly controlled by the sigma factor σ^E active only when cells are irreversibly engaged into sporulation (Fimlaid and Shen, 2015). After 16 h of culture, the pellicle and the ring were not visible in the biofilm top view, although a faint layer of cells lining the microtiter plate could be seen in a lateral view (not shown). No fluorescence could be observed at this time of the culture, indicating that sporulation in the biofilm had not yet started. Furthermore, the culture medium or the plate did not display any autofluorescence background. Four hours later, at 20 h of culture, a thin pellicle floating on the culture medium surrounded by a ring could be seen (**Figure 3**). A thin circle of fluorescence overlapping the ring was observed and no fluorescence was seen at the pellicle place, showing that sporulation was restricted to the ring at this time of the biofilm growth. After 24 h of culture, the biofilm was well formed and displayed a typical architecture, with a thick ring and a pellicle displaying dense protrusions. Fluorescence overlapped the whole ring but was still absent from the pellicle. However, after 36 h of culture and later on (48 and 72 h), fluorescence had invaded the whole biofilm, although it was, in the pellicle, restricted to specific areas). These results indicated that the



sporulation was initiated in the ring long before it started in the pellicle.

Spore Formation in the Biofilm

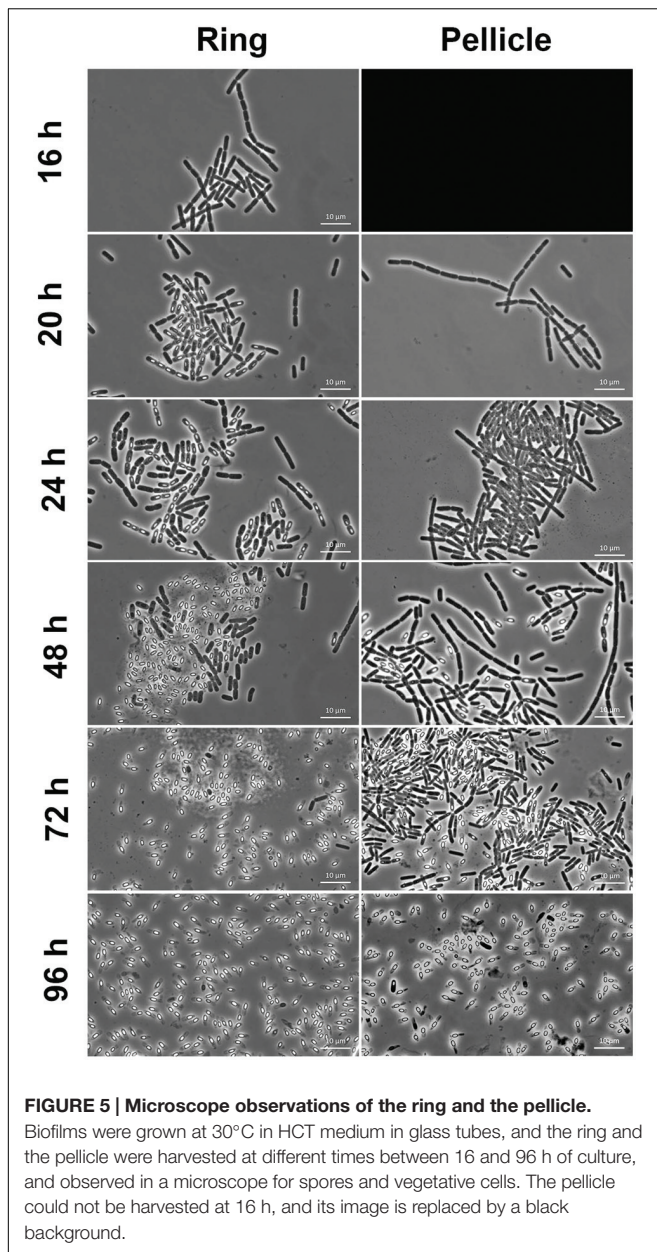
Spores count in the pellicle was very low (below 5.5% spores) before 24 h of culture and increased slowly thereafter to reach 34% spores after 48 h of culture and 81% after 96 h of culture (Figure 4). In contrast, spores count in the ring, which level was at 0.2% after 16 h of culture, increased steeply to reach 60% after 24 h of culture (Figure 4). The percentage of spores in the ring decreased slightly after that time, between 24 and 48 h of culture, and increased again after 48 h of culture, to parallel the pellicle spores count curve between 72 and 96 h of culture (Figure 4). Thus, there is at least a 24 h-delay between the ring and the pellicle for spore formation. We then used microscope observations of the resuspended biofilm to confirm this result. In the ring harvested at 16 h of culture only vegetative cells without spores were present (Figure 5). However, after 20 or 24 h of culture, about 50% of the ring vegetative cells included spores, whereas almost no spores could be observed inside the pellicle vegetative cells. Spores were not seen in the pellicle until 48 h of culture, a time at which they represented less than half of the bacteria, whereas a high number of free



spores could be observed in the ring at that time (Figure 5). After 72 h of culture and later, spores made nearly 100% of bacteria in the ring, while in the pellicle the percentage of spores increased from about 60% after 72 h to 80% after 96 h (Figure 5).

DISCUSSION

Despite similar growth curve shapes displayed by the *B. thuringiensis* biofilm ring and pellicle, this study showed that the two structures behaved quite differently regarding the sporulation process. In the ring, sporulation could be observed after 20 h of culture, and more than half of the ring bacterial population had already sporulated after 24 h of culture. In contrast, sporulation in the pellicle biofilm started after 36 h and resulted in about 35% of spores after 48 h. Thus, the sporulation kinetic was delayed by more than 24 h in the pellicle comparatively to the ring. Early nutrients deprivation in the ring compared to the pellicle could explain this difference in the sporulation kinetics of the two structures. Indeed, while the pellicle is thin and bathed by the culture medium on half of its surface, the ring is thick and in contact with the culture medium on roughly 1/4th of its surface, thus limiting nutrients exchanges. In addition, the ring is submitted to partial dryness because it extends above the culture medium surface as a consequence of two phenomenons. First, a meniscus at the air-glass-liquid interface allows an initial adhesion of bacterial cells above the average culture medium surface. Second, a slight evaporation decreases the liquid height in the glass tube as time elapses – but the ring, which sticks to the tube walls, stays in the same place. Dryness has been shown to favor sporulation in *B. cereus*



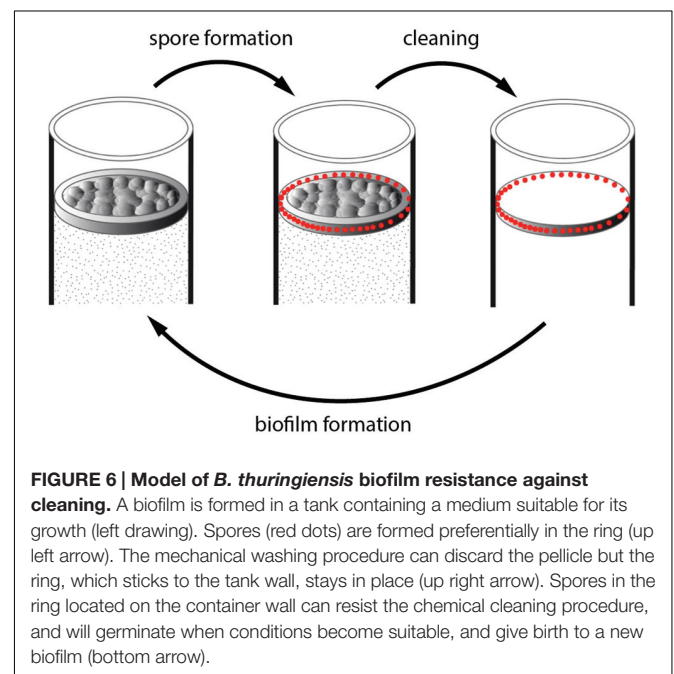
biofilms (Ryu and Beuchat, 2005; Hayrapetyan et al., 2016) and could therefore play a role in the early sporulation of the ring.

The early sporulation in the ring – representing about 2/3rd of the pellicle for the number of cells – might warrant the bacterial population survival in case of changes in the environmental conditions, while the delayed sporulation in the pellicle would allow a continuation in the bacterial population growth – reminding bet-hedging strategies found in several cases of phenotypic heterogeneity (van Gestel et al., 2015). In food industry equipments, for instance, environmental changes are frequent. Biofilm formed in these equipments are regularly submitted to high pressure washing followed by chemical cleaning procedures (Majed et al., 2016). The biofilm ring, which

adheres strongly to the recipient walls, is likely to remain in place after the washing procedures while the pellicle will be discarded. Spores in the ring will be resistant to the cleaning procedure, and will germinate and give birth to a new biofilm when conditions are suitable again (Figure 6).

While the ring and the pellicle spore percentage of 96 h -aged biofilms was around 80% when measured by plating, this percentage was close to 100% according to microscopy observations. This difference can be explained if a proportion of the spores found in the biofilm exhibit a decreased resistance to heat, suggesting that phenotypic heterogeneity is also displayed in the properties of biofilm spores. Spores from planktonic cultures were shown to be less heat resistant compared to spores from biofilms (Veening et al., 2006), and other spore properties, such as resistance to various stresses or sensitivity to germinants, are dependent on the culture conditions met by bacteria during sporulation (Hornstra et al., 2006; Broussolle et al., 2008; Planchon et al., 2011). As a consequence, spores produced in the biofilm ring could be different for their properties from spores produced in the biofilm pellicle.

The slight decrease in the ring spore counts at 48 h of culture, compared to 24 h of culture, has been observed earlier in a microtiter plate assay for the *B. cereus* strain ATCC10987 (Hayrapetyan et al., 2016). This decrease is not subsequent to a decrease in the biofilm biomass, since both the biofilm ring and pellicle biomasses increase continuously with time. It might rather be due to a transient and limited germination of spores in the ring. Microscope images show that vegetative cells are still present in the ring at 48 h of culture, although in small proportion. This germination could be consecutive to cell lysis in a fraction of the ring population, which would deliver germinants to spores.



AUTHOR CONTRIBUTIONS

NE-K performed the work and wrote the manuscript RM and SP performed the work and designed experiments MK and DL designed experiments MG designed experiments and wrote the manuscript.

FUNDING

Researches were funded by Campus France, the University St Joseph of Beirut and the Conseil National de la Recherche Scientifique (CNRS-L, Lebanon). These agencies had no role in this work (study design, data analysis, manuscript writing).

REFERENCES

- Abda, E. M., Krysiak, D., Krohn-Molt, I., Mamat, U., Schmeisser, C., Forstner, K. U., et al. (2015). Phenotypic heterogeneity affects *Stenotrophomonas maltophilia* K279a colony morphotypes and beta-lactamase expression. *Front. Microbiol.* 6:1373. doi: 10.3389/fmicb.2015.01373
- Ackermann, M. (2015). A functional perspective on phenotypic heterogeneity in microorganisms. *Nat. Rev. Microbiol.* 13, 497–508. doi: 10.1038/nrmicro3491
- Auger, S., Ramarao, N., Faille, C., Fouet, A., Aymerich, S., and Gohar, M. (2009). Biofilm formation and cell surface properties among pathogenic and nonpathogenic strains of the *Bacillus cereus* group. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 6616–6618. doi: 10.1128/AEM.00155-09
- Branda, S. S., Gonzalez-Pastor, J. E., Ben Yehuda, S., Losick, R., and Kolter, R. (2001). Fruiting body formation by *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 11621–11626. doi: 10.1073/pnas.191384198
- Broussolle, V., Gauillard, F., Nguyen-The, C., and Carlin, F. (2008). Diversity of spore germination in response to inosine and L-alanine and its interaction with NaCl and pH in the *Bacillus cereus* group. *J. Appl. Microbiol.* 105, 1081–1090. doi: 10.1111/j.1365-2672.2008.03847.x
- Dubois, T., Faegri, K., Perchat, S., Lemy, C., Buisson, C., Nielsen-Leroux, C., et al. (2012). Necrotrophism is a quorum-sensing-regulated lifestyle in *Bacillus thuringiensis*. *PLoS Pathog.* 8:e1002629. doi: 10.1371/journal.ppat.1002629
- Fagerlund, A., Dubois, T., Okstad, O. A., Verplaetse, E., Gilois, N., Bennaceur, I., et al. (2014). SinR controls enterotoxin expression in *Bacillus thuringiensis* biofilms. *PLoS ONE* 9:e87532. doi: 10.1371/journal.pone.0087532
- Fimlaid, K. A., and Shen, A. (2015). Diverse mechanisms regulate sporulation sigma factor activity in the Firmicutes. *Curr. Opin. Microbiol.* 24, 88–95. doi: 10.1016/j.mib.2015.01.006
- Flach, J., Grzybowski, V., Toniazio, G., and Corcao, G. (2014). Adhesion and production of degrading enzymes by bacteria isolated from biofilms in raw milk cooling tanks. *Food Sci. Technol.* 34, 571–576.
- Fong, J. N., and Yildiz, F. H. (2015). Biofilm matrix proteins. *Microbiol. Spectr.* 3, 1–16. doi: 10.1128/microbiolspec.MB-0004-2014
- Grote, J., Krysiak, D., and Streit, W. R. (2015). Phenotypic heterogeneity, a phenomenon that may explain why quorum sensing does not always result in truly homogenous cell behavior. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 5280–5289. doi: 10.1128/AEM.00900-15
- Hayrapetyan, H., Abee, T., and Nierop Groot, M. (2016). Sporulation dynamics and spore heat resistance in wet and dry biofilms of *Bacillus cereus*. *Food Control* 60, 493–499. doi: 10.1016/j.foodcont.2015.08.027
- Hornstra, L. M., De Vries, Y. P., De Vos, W. M., and Abee, T. (2006). Influence of sporulation medium composition on transcription of ger operons and the germination response of spores of *Bacillus cereus* ATCC 14579. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 3746–3749. doi: 10.1128/AEM.72.5.3746-3749.2006
- Jensen, G. B., Hansen, B. M., Eilenberg, J., and Mahillon, J. (2003). The hidden lifestyles of *Bacillus cereus* and relatives. *Environ. Microbiol.* 5, 631–640. doi: 10.1046/j.1462-2920.2003.00461.x

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank the Lebanese National Council for Scientific Research (CNRS-L), the Grant research program 01-08-15 and the Scholarship Programs 2014–2015 for supporting Racha Majed. In addition our gratitude is also extended to the Research Council of Saint-Joseph University: CNRS-FS81 et FS 84.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2016.01222>

- Lecadet, M. M., and Martouret, D. (1967). Enzymatic hydrolysis of the crystals of *Bacillus thuringiensis* by the proteases of *Pieris brassicae* II. Toxicity of the different fractions of the hydrolysate for larvae of *Pieris brassicae*. *J. Invertebr. Pathol.* 9, 322–330. doi: 10.1016/0022-2011(67)90066-3
- Lereclus, D., Arantes, O., Chauvaux, J., and Lecadet, M. (1989). Transformation and expression of a cloned delta-endotoxin gene in *Bacillus thuringiensis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 60, 211–217. doi: 10.1016/0378-1097(89)90511-9
- Limoli, D. H., Jones, C. J., and Wozniak, D. J. (2015). Bacterial extracellular polysaccharides in biofilm formation and function. *Microbiol. Spectr.* 3, 1–19. doi: 10.1128/microbiolspec.MB-0011-2014
- Majed, R., Faille, C., Kallassy, M., and Gohar, M. (2016). *Bacillus cereus* biofilms – same, only different. *Front. Microbiol.* 7:1054. doi: 10.3389/fmicb.2016.01054
- Perchat, S., Dubois, T., Zouhir, S., Gominet, M., Poncet, S., Lemy, C., et al. (2011). A cell–cell communication system regulates protease production during sporulation in bacteria of the *Bacillus cereus* group. *Mol. Microbiol.* 82, 619–633. doi: 10.1111/j.1365-2958.2011.07839.x
- Planchon, S., Dargaignaratz, C., Levy, C., Ginies, C., Broussolle, V., and Carlin, F. (2011). Spores of *Bacillus cereus* strain KBAB4 produced at 10 degrees C and 30 degrees C display variations in their properties. *Food Microbiol.* 28, 291–297. doi: 10.1016/j.fm.2010.07.015
- Ryu, J. H., and Beuchat, L. R. (2005). Biofilm formation and sporulation by *Bacillus cereus* on a stainless steel surface and subsequent resistance of vegetative cells and spores to chlorine, chlorine dioxide, and a peroxyacetic acid-based sanitizer. *J. Food Prot.* 68, 2614–2622.
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., and Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods* 9, 671–675. doi: 10.1038/nmeth.2089
- van Gestel, J., Vlamakis, H., and Kolter, R. (2015). Division of labor in biofilms: the ecology of cell differentiation. *Microbiol. Spectr.* 3:MB-0002-2014. doi: 10.1128/microbiolspec.MB-0002-2014
- Veening, J. W., Hamoen, L. W., and Kuipers, O. P. (2005). Phosphatases modulate the bistable sporulation gene expression pattern in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* 56, 1481–1494. doi: 10.1111/j.1365-2958.2005.04659.x
- Veening, J. W., Kuipers, O. P., Brul, S., Hellingwerf, K. J., and Kort, R. (2006). Effects of phosphorelay perturbations on architecture, sporulation, and spore resistance in biofilms of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 188, 3099–3109. doi: 10.1128/JB.188.8.3099-3109.2006
- Verplaetse, E., Slamti, L., Gohar, M., and Lereclus, D. (2015). Cell differentiation in a *Bacillus thuringiensis* population during planktonic growth, biofilm formation, and host infection. *MBio* 6:e00138-15. doi: 10.1128/mBio.00138-15
- Verplaetse, E., Slamti, L., Gohar, M., and Lereclus, D. (2016). Two distinct pathways lead *Bacillus thuringiensis* to commit to sporulation in biofilm. *Res. Microbiol.* doi: 10.1016/j.resmic.2016.03.006 [Epub ahead of print].
- Vlamakis, H., Aguilar, C., Losick, R., and Kolter, R. (2008). Control of cell fate by the formation of an architecturally complex bacterial community. *Genes Dev.* 22, 945–953. doi: 10.1101/gad.1645008

Wijman, J. G., De Leeuw, P. P., Moezelaar, R., Zwietering, M. H., and Abee, T. (2007). Air-liquid interface biofilms of *Bacillus cereus*: formation, sporulation, and dispersion. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 1481–1488. doi: 10.1128/AEM.01781-06

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

Copyright © 2016 El-Khoury, Majed, Perchat, Kallassy, Lereclus and Gohar. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Titre : Etude de Eps1 et Eps2, deux exopolysaccharides du biofilm chez *Bacillus thuringiensis*.

Mots clés : *Bacillus thuringiensis*, Biofilm, Matrice, exopolysaccharides

Résumé: Les exopolysaccharides - des polymères de sucres exportés - sont impliqués dans des fonctions essentielles de la physiologie bactérienne. Ce sont en effet des composants majeurs, respectivement, de la paroi bactérienne, des polymères secondaires attachés à cette paroi, des capsules, et de la matrice du biofilm. *Bacillus thuringiensis* est une bactérie entomopathogène, appartenant au groupe *Bacillus cereus*, capable de former un biofilm à l'interface air-liquide. Ce biofilm comporte deux structures distinctes: une pellicule flottant sur le milieu de culture et, en périphérie, en continuité avec celle-ci, un anneau adhérent sur les surfaces solides. Pour identifier les exopolysaccharides constitutifs de la matrice du biofilm chez cette bactérie, j'ai recherché, dans le génome séquencé de la souche 407 de *B. thuringiensis*, les différents loci chromosomiques susceptibles d'être impliqués dans la production de ces exopolymères. Deux loci ont été identifiés, que nous avons appelé *eps1* et *eps2*. Le locus *eps1* avait déjà été décrit comme n'ayant aucun rôle dans la formation des biofilms chez *B. cereus* et sa fonction était restée inconnue. Nous avons montré que l'exopolysaccharide Eps1, dépendant du locus *eps1*, forme une capsule en phase stationnaire et en condition d'hypoxie. Cette capsule, qui présente des propriétés adhésives importantes sur des surfaces biotiques et abiotiques, permet l'adhésion du biofilm sur les surfaces solides et est requise pour la formation de l'anneau du biofilm. En accord avec ces résultats, nous avons observé que Eps1 n'est présent que dans l'anneau du biofilm. En revanche, l'exopolysaccharide Eps2 dépendant du locus *eps2* est un élément essentiel de la matrice du biofilm et est nécessaire pour la formation de la pellicule. Enfin, à l'aide de marqueurs fluorescents, nous avons montré que deux souches mutantes capables de ne produire, respectivement, que Eps1 ou Eps2, se distribuent de façon hétérogène dans le biofilm lorsqu'elles sont mises en co-culture. En effet, la souche ne produisant que Eps1 est localisée dans l'anneau tandis que la souche ne produisant que Eps2 est localisée dans la pellicule.

Title : Eps1 and Eps2, two exopolysaccharides of *Bacillus thuringiensis* biofilm, a functional study

Keywords : *Bacillus thuringiensis*, Biofilm, Matrix, exopolysaccharides

Abstract: Exopolysaccharides - and abiotic surfaces, allows adhesion of polymers of exported sugars - are the biofilm to the solid surfaces, thus involved in essential functions of forming of the biofilm ring. Consistently bacterial physiology. Exopolysaccharides with these results, we observed that are in fact major components, of the Eps1 is present only in the biofilm ring. bacterial wall, secondary polymers We found that Eps2 exopolysaccharide attached to this wall, the capsules, and depending on the *eps2* locus is an finally the biofilm's matrix. *Bacillus* essential element of the biofilm matrix *thuringiensis* is an entomopathogenic and is necessary for the formation of the bacterium of the *cereus* group, capable of pellicle. We have shown using forming a biofilm at the air-liquid fluorescent markers that two mutant interface. This biofilm has two distinct strains capable of producing only type of structures: a floating pellicle on the exopolysaccharides Eps1 or Eps2 are culture medium and, at the periphery, in distributed heterogeneously in the continuity with the pellicle, a ring biofilm when they are cocultured. The adhering to the solid surfaces. To mutant strain producing only Eps1 is identify the exopolysaccharides, which localized in the ring while the mutant constitute the biofilm matrix in *B.* strain producing only Eps2 is located in *thuringiensis*, I investigated the various the pellicle. chromosomal loci in the sequenced genome of *B. thuringiensis* strain 407. Two loci have been identified and were called *eps1* and *eps2*. To date, no role in the formation of biofilms in *B. thuringiensis* had been attributed to *eps1* locus. Our data showed that the exopolysaccharide Eps1, depending on the *eps1* locus, forms a capsule in the stationary phase and in hypoxic conditions. This capsule, which has significant adhesive properties on biotic