



**HAL**  
open science

# Mécanisme d'assemblage des enveloppes de la spore en fonction de la température de sporulation : rôle de la protéine morphogénétique CotE chez *Bacillus cereus*

Christelle Bressuire-Isoard

► **To cite this version:**

Christelle Bressuire-Isoard. Mécanisme d'assemblage des enveloppes de la spore en fonction de la température de sporulation : rôle de la protéine morphogénétique CotE chez *Bacillus cereus*. Bactériologie. Université Montpellier, 2015. Français. NNT : 2015MONT088 . tel-01954620v2

**HAL Id: tel-01954620**

**<https://theses.hal.science/tel-01954620v2>**

Submitted on 13 Dec 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.

Délivré par l'**Université de Montpellier**

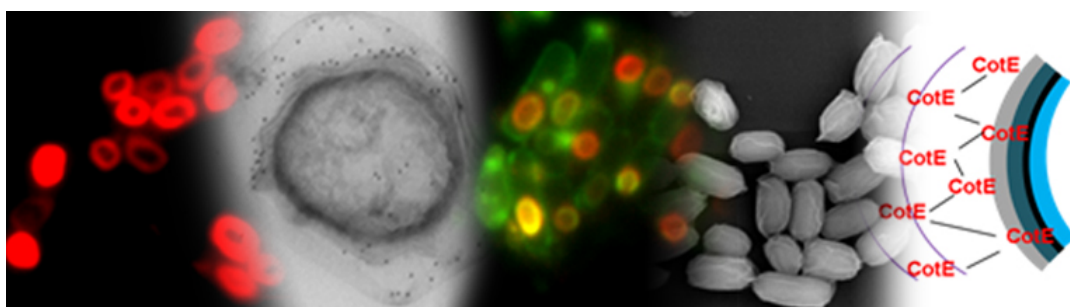
Préparée au sein de l'école doctorale ED 584 GAIA  
« Biodiversité, Agriculture, Alimentation, Environnement, Terre et Eau »

Et de l'UMR 408  
Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale  
Centre de recherche INRA PACA Avignon

Spécialité : **Biotechnologie, Microbiologie**

Présentée par **Christelle BRESSUIRE-ISOARD**

**Mécanisme d'assemblage des enveloppes de la spore en  
fonction de la température de sporulation: rôle de la  
protéine morphogénétique CotE chez *Bacillus cereus***



Soutenance prévue le 10 Décembre 2015 devant le jury composé de :

<b>M. Jacques MAHILLON</b> (Prof. Université Catholique de Louvain)	Rapporteur
<b>M. Stanley BRUL</b> (Prof. Université d'Amsterdam)	Rapporteur
<b>M. Mathieu SICARD</b> (Prof. Université Montpellier)	Examineur
<b>M. Adriano O. HENRIQUES</b> (Assistant-Prof. ITQB, Lisbonne)	Examineur
<b>M<sup>me</sup>. Véronique BROUSSOLLE</b> (CR1 INRA, PACA)	Co-directrice de thèse
<b>M. Frédéric CARLIN</b> (DR2 INRA, PACA)	Directeur de thèse



## Mécanisme d'assemblage des enveloppes de spores en fonction de la température de sporulation: rôle de la protéine morphogénétique CotE chez *Bacillus cereus*

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

### Résumé

*Bacillus cereus* est une bactérie sporulante pathogène largement disséminée dans la nature. Les propriétés de résistance de ses spores aux traitements appliqués dans la chaîne de transformation des aliments font de *B. cereus* un contaminant à l'origine de toxi-infections alimentaires. La température est considérée comme l'un des facteurs environnementaux majeurs influençant la résistance de la spore. La variabilité des propriétés des spores liée à des modifications profondes dans leur structure contribue à une incertitude sur l'efficacité des processus de décontamination. Ce travail de thèse avait pour objectif de caractériser le mécanisme d'assemblage des enveloppes de la spore en fonction de la température de sporulation, et en particulier le rôle de la protéine morphogénétique CotE chez *B. cereus*. La protéine CotE est retrouvée en plus grande abondance dans les spores produites à 20°C, que dans celles produites à 37°C, température optimale de croissance de la souche ATCC 14579. La protéine CotE est détectée dans les tuniques et l'exosporium, structures protectrices de la spore. L'observation de spores d'un mutant  $\Delta cotE$  en microscopie électronique à transmission révèle un défaut d'assemblage de l'exosporium à 37°C et à 20°C, mais également un défaut d'assemblage des tuniques à 20°C, ce qui suggère un rôle fondamental de CotE dans la mise en place de ces deux enveloppes. Ce mécanisme d'assemblage dépendrait de la température de sporulation. Par microscopie à fluorescence, nous avons étudié la cinétique de production de la protéine CotE au cours de la sporulation, ainsi que sa localisation finale dans la spore mature. Nos résultats suggèrent également que la protéine CotE assurerait la cohésion entre l'exosporium et les tuniques/cortex. Enfin, nous avons montré que la protéine CotE est impliquée dans la germination mais également dans la résistance à la fois physique et chimique des spores.

**Mots-clés** : structure, tuniques, exosporium, résistance, germination

---



## Mechanism of assembly of spore outer layers as a function of sporulation temperature: role of the morphogenetic protein CotE in *Bacillus cereus*

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

### **Abstract**

Spores of the pathogenic bacterium *Bacillus cereus* are widespread in the environment and responsible of foodborne poisonings. Spores are a major concern to public health because of high resistance to treatments applied in food processing operations. Sporulation temperature is a main environmental factor that influences spore resistance properties. The variability of the conditions in which spores are formed during the sporulation process deeply modifies their structure and consequently the efficiency of decontamination treatments. The aim of this work was to study the mechanism of spore layers assembly as a function of the sporulation temperature, and more precisely the role of the CotE protein in *B. cereus* strain ATCC 14579. This morphogenetic protein is more detected in spores formed at 20°C, a sub-optimal growth temperature, than at 37°C, the optimal growth temperature. Observations in transmission electronic microscopy of  $\Delta cotE$  spores revealed an assembly default of the spore exosporium at 37°C and 20°C, but also of the spore coat at 20°C. CotE has therefore a role in the assembly of both layers and this role depends on the sporulation temperature. By fluorescence microscopy, we studied the kinetics of CotE production during sporulation and CotE final localization in mature spores. Our results suggest that CotE links the exosporium to the coat and cortex structures. Finally, we showed that CotE also plays a role in germination and resistance properties of *B. cereus* spores to physical and chemical treatments.

**Keywords:** spore structure, coats, exosporium, resistance, germination

---

*A mes parents  
A ma famille  
A mon coach*

**« Chaque difficulté rencontrée doit être l'occasion d'un nouveau progrès »**  
*(Pierre de Coubertin)*



First of all, I would like to thank the members of my thesis defense: Jacques Mahillon and Stanley brul for accepting to read my thesis and giving me the honor to judge my work, and also Mathieu SICARD and Adriano O. Henriques, for accepting to attend my thesis defense in Avignon.

I would also like to express my gratitude to Adriano O. Henriques. Thanks for accepting three years ago to be a member of my PhD committee but most of all for allowing me the chance to work in your lab during 5 months (And to discover your beautiful country). It was a very rewarding opportunity for me to learn with a leading expert on *Bacillus* spores. Thank you for your continuous help, for make me feel like a member of your lab and for always being available. I learned a lot during this training period mainly thank to all our stimulating discussions and your endless source of ideas and I'm glad that you share with me your passion for science. Thanks also for all good moments passed with Vero in your city.

Je remercie également Mr Arnaud Chastanet pour avoir accepté d'être un membre de mon comité de thèse. Tes remarques, conseils et suggestions ont contribué à faire avancer ce travail.

Un grand merci à mon directeur et ma co-directrice de thèse : M. Frédéric Carlin et M<sup>me</sup> Véronique Broussolle. On y croyait pas forcément à cette bourse de Montpellier (surtout Fred) mais on l'a eu et "Quel expérience !". "Tel le feu et la glace", j'ai adoré être parfois au cœur de vos débats animés. Souvent jaloué par mes autres collègues thésards, je pense avoir eu le meilleur duo d'encadrant du labo. Différents mais complémentaires, vous avez tous les deux contribué, de la meilleure façon, à ma formation au cours de cette thèse. Grâce à vous, j'ai eu l'opportunité de réaliser de belles choses, de rencontrer du beau monde et d'apprendre énormément pendant ces 3 ans. Vous êtes clairement à l'origine du chercheur que je serai demain (comme ça, la pression repose sur vous) et pour cela merci ! Merci également à tous les deux pour m'avoir soutenu pendant cette année très difficile sur le plan personnel.

Fred, merci pour ta disponibilité, même si je t'ai trop peu sollicité à ton goût, j'ai toujours su que ton bureau serait ouvert pour moi. Merci pour ton encadrement, tous nos échanges, ton opinion (toujours franche) sur les plans A et B de ma thèse, nos discussions enflammées sur l'importance des statistiques. Tu m'as permis d'avoir un œil avisé sur les choix à faire au cours de ma thèse et pour mes travaux futurs. Et même si parfois, tes questions sur le pourquoi du comment ou l'évaluation des risques d'une manip ou encore la rédaction de compte rendu de réunion m'ont beaucoup ennuyé, je sais très bien que tout ceci était bienveillant.

---

Véro, je tiens à te remercier pour tout ce que tu m'as appris durant cette thèse. Je te remercie également de m'avoir donné cette chance de faire ce stage en M2 sans quoi rien de tout ceci ne serait arrivé. Toujours disponible tu m'as apporté un encadrement de qualité et j'ai apprécié également au fil des années la confiance que tu m'as accordée. Tu as vécu cette thèse, avec autant d'intensité que moi : à venir me relayer sur des manips le soir ou le week end, à corriger la deuxième version d'un document que j'aurai pu rédiger ou encore à venir me retrouver au Portugal (mais ça aussi bien pour toi que pour moi c'était loin d'être désagréable). Cette thèse semait d'embûches est une magnifique expérience mais je ne serais peut être pas allée au bout sans ton écoute, ta motivation et tes conseils. Au-delà d'être ta doctorante, tu m'as considéré comme une véritable collègue et j'ai pu apprécier chaque moment passé avec toi en dehors du boulot. J'espère cependant un jour que nous serons ré-ammener à collaborer ensemble.

J'aimerais remercier tous les "titulaires" du laboratoire de microbiologie : Mr Christophe N'guyen Thè et M<sup>me</sup> Catherine Duport pour vos conseils scientifiques avisés, Mr. Thierry Clavel, pour sa gentillesse et son intérêt, Mr Michel Jobin, Mr Philippe Schmitt, Mr Luc Dedieu et M<sup>me</sup> Marie-Hélène Guinebretière pour leur bonne humeur et tous les échanges qu'on a pu avoir. Un grand merci également à Alain Berberian, Sabine et Magali de l'équipe Claranor et Julien Brillard qui a depuis rejoint Montpellier.

Merci aux "filles" : Claire, Béné, Steph C. et Steph O. Merci pour toutes les fois où j'ai pu vous embêter avec mes manips foireuses, pour votre aide et votre soutien au cours de cette thèse. Mais également pour la bonne humeur que vous avez fait régner au sein de ce labo. Steph. C, un spécial merci à toi, en temps que témoin direct du chat noir que je suis, je te remercie pour ton amitié, ta gentillesse et tes conseils pour mes manips de BM. Ta disponibilité à grandement contribuer à la réussite de cette thèse.

Merci à toute l'équipe Fruit et Chimie pour tous les bons moments passés ensemble. Ce fut un plaisir de travailler parmi vous (en labo BM et Prot') pendant ces 3 années : Catherine R., Domi, Eric, Michèle, Waël, Romain, Aurélie, Pascale, Marie-Jo, Marielle, Jean-François, Sylvie M. Sylvie B., Sylvaine, Barbara L., Barbara G., Carine, David...

"Muito Obrigada para a equipe de Adriano para o seu bem-vindos". Thanks to Monica Serrano for her help, support and to be here for me anytime. Thanks to the three Catarina, Ines, Sara, Joao, Hugo and Wilson for their friendship, kindness, help and all good moments spent in Portugal.

---

Merci à tout ceux qui au fil de ces 3 ans ont cotoyé de près comme de loin la pièce "aquarium" des thésard et avec qui j'ai partagé de bons moments de rigolade: Benoît, Caroline, Amina, Sabrina, Ana-Paula, Gérémy, Aude, JP, Sara, Julien, Jordane, Hafsouati, Halimus, Hélène, Jean-Luc, KélétiGUI, Clément, Adeline et dernièrement Tiffany. Merci à mes compères d'infortunes, Cécile et Alizée. Merci les filles pour les délires et fous-rires qu'on a pu avoir, votre soutien, nos discussions sur nos manips, notre vie et notre future. C'est fou que ce soit déjà la fin.

Merci à mes amis les plus proches Cindy et JuJu. Merci pour les bons moments qu'on a pu passer ensemble qui m'ont permis d'oublier un peu les galères du quotidien. Des copains dans le même délire et qui compatissent c'est vitale ! Merci les amis pour votre soutien. Je vous kiffe !

Je remercie ma famille, aussi grande soit elle, les plus proches comme les plus éloignés. Merci à tous ceux qui m'ont soutenu pendant toutes ces années d'étude. D'ailleurs à tout ceux qui m'ont demandé, quand j'arrêterai d'être étudiante : On y est ! Merci à ma tatie Chantal pour son accueil à Paris, je ne serai pas là sans toi et merci à mon tonton Thierry pour sa présence pendant tout mon cursus.

Le noyau dur de la famille, les 14 ! Mes beaux parents, Régine et Michel, ma bels, Sev (merci pour les corrections), Ma double bels, Zazou, le beauf, Seb-Seb, les kikis, Anta et Adahy, mes sœurs chéris, Ana et Alis et mon frérot, John Snow. Merci "la familia" vous avez tous contribué à ma réussite ! Merci pour votre soutien pendant les moments difficiles, nos jeux du dimanche, nos sorties et repas en famille, nos fous-rires et toutes les petites choses qui m'ont permis de déconnecter un peu du boulot. Merci pour votre présence pendant ces derniers mois qui ont été difficiles pour moi. Je suis fière que nous formions une famille si unis. Je vous aime de trop.

Un grand merci à mes parents. Vous avez cru en moi pendant toutes ces années et votre soutien est indéfinissable. Même si on se dit souvent peu les choses je suis heureuse de faire votre fierté. Si j'ai réussi aujourd'hui c'est grâce à vous. Merci pour les sacrifices que vous avez pu faire pour me permettre de continuer mes études. J'espère un jour pouvoir vous rendre ce que vous avez fait pour moi. Merci aussi maman pour avoir relu mon charabia. Merci d'être des parents qui déchire, je vous aime si fort.

Pour finir, je tiens à remercier celui-ci sans qui, tout ne serait pas pareil. Présent quand tout va bien ou tout va mal, présent pour me motiver et me soutenir, présent pour m'aimer ou me gronder, tu as tout fait pour rendre ma vie meilleure. Ma motivation pendant cette thèse, je te la dois. Ma réussite dans la vie, je te la dois. Tu m'as toujours soutenu dans mes décisions même quand celle-ci

---

m'éloignait de toi. Tu as été pendant ces 3 ans, le témoin de mon investissement, de ma frustration, de mon stress, de mes colères et de mes larmes mais jamais tu ne m'as conseillé d'arrêter. Ta compréhension, ta patience et ta gestion du quotidien ont contribué à me faciliter la vie. Je m'excuse aussi pour toutes ces répétitions et pour ces dernières semaines de travail acharné où je n'ai pas été très présente pour toi. Pendant ces trois ans on a traversé ensemble de très bons moments, mais aussi des moments plus difficiles et toujours j'ai pu compter sur toi. Je suis heureuse de savoir que pour le reste de ma vie ça sera ainsi. Je t'aime à l'infini.

## Table des matières

<b>Avant propos</b> .....	1
<b>Chapitre 1 : Introduction bibliographique</b> .....	7
1. De l'environnement à l'intoxication alimentaire.....	7
1.1. La découverte des spores .....	7
1.1.1. Les premières observations .....	7
1.1.2. Les propriétés de dormance et de longévité de spores .....	9
1.2. Les spores dans l'environnement .....	10
1.3. <i>Bacillus cereus</i> , un pathogène alimentaire .....	12
1.3.1. Généralités.....	12
1.3.2. Les voies de contamination des industries alimentaires .....	14
1.3.3. Les toxi-infections alimentaires.....	15
2. A l'origine des propriétés des spores: une structure originale .....	18
2.1. Etapes et mécanismes de la sporulation .....	18
2.1.1. L'initiation de la sporulation .....	18
2.1.2. Le cycle et la régulation génétique de la sporulation .....	20
2.1.3. La germination.....	22
2.2. Structures des spores bactériennes .....	24
2.2.1. Le cœur .....	25
2.2.2. La membrane interne .....	26
2.2.3. Le cortex .....	27
2.2.4. La membrane externe.....	27
2.2.5. Les tuniques.....	28
2.2.5.1. Structure et composition .....	28
2.2.5.2. Les protéines de tuniques.....	29
2.2.5.3. Surface des tuniques.....	31
2.2.6. L'exosporium .....	33
2.2.6.1. Structure et composition .....	33
2.2.6.2. Les protéines de l'exosporium .....	34
2.2.6.3. Surface de l'exosporium .....	36
2.3. Mécanismes d'assemblage des enveloppes de la spore .....	36
2.3.1. La protéine morphogénétique CotE.....	36
2.3.2. L'assemblage des tuniques .....	39
2.3.3. L'assemblage de l'exosporium .....	41
3. Impact des conditions de sporulation sur les propriétés et la structure des spores.....	42
3.1. Introduction .....	42
3.2. Revue: <i>Environment of sporulation impacts structure and properties of Bacillus spores</i> .....	42
3.2.1. Abstract.....	43
3.2.2. Introduction .....	43



3.2.3. The environment determines the sporulation efficacy and spore characteristics .....	45
3.2.3.1. Sporulation efficacy .....	45
3.2.3.2. Variations in spore structures in response to environmental conditions .....	49
3.2.3.3. Variations in spore water, minerals and protein composition .....	50
3.2.4. Modulation of spore structure and composition: consequences on spore resistance .....	52
3.2.4.1. Spore heat resistance.....	52
3.2.4.1.1. Factors of resistance .....	52
3.2.4.1.2. Impact of sporulation media.....	53
3.2.4.1.3. Impact of sporulation temperature .....	54
3.2.4.1.4. Impact of sporulation pH, $a_w$ and oxygen .....	56
3.2.4.2. Spore resistance to physical and chemical injuries .....	56
3.2.4.2.5. Spore resistance factors.....	56
3.2.4.2.6. Impact of sporulation media.....	57
3.2.4.2.7. Impact of sporulation temperature .....	59
3.2.4.2.8. Impact of sporulation pH, $a_w$ and oxygen .....	60
3.2.5. Impact of sporulation environment on spore germination.....	60
3.2.6. Conclusions.....	62
3.2.7. References.....	63
4. Présentation du sujet de thèse.....	70
<b>Chapitre 2 : Matériels et méthodes .....</b>	<b>75</b>
1. Milieux et conditions générales de croissance .....	75
2. Souches bactériennes .....	75
2.1. Souche d'étude <i>B. cereus</i> ATCC 14579 .....	75
2.2. Souche $\Delta cotE$ .....	76
2.2.1. Amplification de régions flanquant le gène <i>cotE</i> .....	76
2.2.2. Clonage .....	77
2.2.3. Transformation et recombinaison.....	78
2.2.4. Sélection des clones recombinants.....	78
2.3. Construction de la souche $\Delta cotEQcotE$ .....	78
2.4. Construction des souches CotE-SNAP et SNAP-CotE .....	78
2.5. Souches d' <i>E. coli</i> .....	79
3. Techniques de biologie moléculaire .....	79
3.1. Extraction et dosage ADN .....	79
3.2. Amplification des acides nucléiques .....	80
3.3. Electrophorèse d'ADN .....	80
3.4. Digestion enzymatique et ligature des fragments .....	80
3.5. Transformation par choc thermique .....	81
3.6. Electroporation de <i>B. cereus</i> .....	81
4. Amorces et plasmides.....	81
5. Production de spores .....	82
5.1.1. Sporulation en milieu mFNA.....	82

5.1.2. Sporulation en milieu SMB .....	82
6. Résistance des spores.....	83
6.1. Résistance à la chaleur humide.....	83
6.2. Résistance aux agents chimiques .....	83
6.2.1. Peroxyde d'hydrogène .....	83
6.2.2. Lysozyme et mutanolysine .....	83
6.3. Résistance aux UV-C et à la lumière pulsée.....	84
7. Germination des spores .....	84
8. Hydrophobicité des spores.....	84
9. Etude microscopique des spores .....	85
9.1. Microscopie électronique à transmission .....	85
9.2. Immunomicroscopie électronique .....	85
9.3. Microscopie à fluorescence .....	86
9.3.1. Prélèvements et marquages des échantillons .....	86
9.3.2. Observation microscopique et analyse d'image.....	86
10. Techniques biochimiques.....	86
10.1.1. Fractionnement des spores .....	86
10.1.2. Extraction de protéines de spores et électrophorèse.....	87
10.1.1. Visualisation de la fluorescence des protéines .....	87
10.1.2. Western Blot.....	87
10.1.3. Dosage de protéine selon la méthode de Bradford .....	88
10.1.4. Analyse protéomique .....	88
11. Analyse bioinformatique.....	88
12. Analyse statistique .....	88
<b>Chapitre 3 : Impact de la température de sporulation sur le rôle de la protéine CotE dans l'assemblage des structures externes de la spore de <i>B. cereus</i> .....</b>	<b>93</b>
1. Introduction à l'étude.....	93
2. Stratégies envisagées.....	94
3. Résultats et discussion .....	95
4. Article: <i>Sporulation temperature reveals a requirement for CotE in the assembly of both the coat and exosporium layers of Bacillus cereus spores</i> .....	96
4.1. Abstract.....	96
4.2. Introduction .....	97
4.3. Materials and Methods .....	100
4.3.1. Strains and general methods.....	100
4.3.2. Mutant construction .....	101
4.3.3. Spore production.....	102
4.3.4. Transmission electron microscopy (TEM) .....	103
4.3.5. Assessment of spore resistance to physical and chemical treatments .....	103
4.3.6. Spore hydrophobicity .....	104
4.3.7. Spore germination.....	104
4.3.8. Extraction and analysis of spore proteins.....	104
4.3.9. Statistical analysis.....	105
4.4. Results .....	106

4.4.1. Deletion of <i>cotE</i> strongly impacts the structure of the outer layers and the protein composition of <i>B. cereus</i> spores formed at 20°C .....	106
4.4.2. Deletion of <i>cotE</i> alters the protein composition of <i>B. cereus</i> spores formed at 20°C and at 37°C .....	108
4.4.3. Spore hydrophobicity and germination are affected by <i>cotE</i> deletion and not by sporulation temperature .....	111
4.4.4. Sporulation temperature and deletion of <i>cotE</i> affect the resistance of spores to physical insults .....	114
4.4.5. Sporulation temperature and <i>cotE</i> deletion affect the chemical resistance of spores...	115
4.5. Discussion.....	116
4.6. Acknowledgements .....	120
4.7. Funding information.....	120
4.8. Supplemental Materials .....	120
4.8.1. Table S1 .....	120
4.8.2. Determination of growth rates at 20°C and 37°C of WT and mutant strains.....	120
4.8.3. Figure S1 .....	121
4.9. References.....	121
5. Données supplémentaires à l'article .....	127
5.1. Impact de la surexpression du gène <i>cotE</i> dans les souches WT .....	127
5.1.1. Résistances physiques, chimiques et hydrophobicité des spores.....	127
5.1.2. Hydrophobicité.....	128
5.2. Germination spontanée des spores .....	129
<b>Chapitre 4 : Localisation de la protéine CotE et assemblage des structures de la spore.....</b>	<b>133</b>
1. Introduction à l'étude.....	133
2. Stratégies envisagées.....	134
3. Résultats et discussion .....	135
4. Article: <i>Localization of CotE protein during the assembly of coat and exosporium layers in B. cereus spores</i> .....	137
4.1. Abstract.....	137
4.2. Introduction .....	138
4.3. Materials and Methods .....	141
4.3.1. Strains and general methods.....	141
4.3.2. Translational SNAP fusions.....	142
4.3.3. Spore production.....	142
4.3.4. Assessment of spore resistance to lysozyme .....	143
4.3.5. Extraction and analysis of the spore protein fractions .....	143
4.3.6. SNAP labeling and analysis .....	144
4.3.7. Microcopy and image analysis.....	144
4.3.8. Immunoelectron microscopy of spore cryosections.....	144
4.3.9. Bioinformatics analysis .....	145
4.4. Results .....	145
4.4.1. Dynamic and subcellular localization of CotE during <i>B. cereus</i> sporulation .....	145
4.4.2. Localization of CotE in mature spores .....	148
4.4.3. CotE is present in both coat and exosporium fractions.....	150
4.5. Discussion.....	152

---

4.6. Acknowledgements .....	155
4.7. Supplemental Materials .....	156
4.8. References.....	156
5. Données supplémentaires .....	160
5.1. Assemblage et localisation de CotE dans la souche WT à 37°C .....	160
5.2. Assemblage et localisation de CotE dans la souche $\Delta cotE$ .....	160
<b>Conclusion et perspectives .....</b>	<b>165</b>
<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>173</b>
<b>Valorisation des travaux de thèse.....</b>	<b>195</b>

---

## Tables des illustrations

### Figures :

Figure 1: Photographies des premiers observateurs de spores .....	7
Figure 2 : Première microphotographie prise de <i>B. anthracis</i> par Robert Koch.....	8
Figure 3 : Photographie du cristal de sel du Rio Salado .....	10
Figure 4 : Niches écologiques d'une bactérie du groupe <i>B. cereus</i> .....	11
Figure 5 : Larve de <i>Caenorhabditis elegans</i> L2 portant des spores de <i>B. subtilis</i> fluorescentes .....	12
Figure 6 : Observation microscopique de <i>Bacillus cereus</i> au cours de sa sporulation .....	12
Figure 7 : Représentation des gammes de croissance des souches du groupe <i>Bacillus cereus</i> .....	13
Figure 8 : Voies de contamination des industries alimentaires par les spores .....	15
Figure 9 : Toxi-infection alimentaire à <i>B. cereus</i> .....	16
Figure 10 : Gestion bactérienne d'une carence nutritive chez les <i>Bacilli</i> .....	19
Figure 11 : Initiation de la sporulation chez les <i>Bacilli</i> .....	20
Figure 12 : Cycle de la sporulation et régulation génétique chez <i>Bacillus subtilis</i> .....	21
Figure 13 : Initiation de la germination des spores des <i>Bacilli</i> .....	23
Figure 14 : Observation microscopique de spores de <i>B. cereus</i> en cours de germination .....	24
Figure 15 : Observation et descriptif de la structure des spores de <i>Bacillus</i> .....	25
Figure 16 : Formule chimique du DPA.....	26
Figure 17 : Représentation schématique de la structure du peptidoglycane du cortex des <i>Bacilli</i> .....	27
Figure 18 : Observation microscopique de l'ultrastructure des spores de <i>Bacillus subtilis</i> .....	28
Figure 19 : Observation de la surface des spores de <i>B. subtilis</i> .....	31
Figure 20 : Observation de spores de <i>B. subtilis</i> en germination par microscopie à force atomique ...	32
Figure 21 : Spores $\Delta cotE$ de <i>B. subtilis</i> observées par microscopie à force atomique .....	32
Figure 22 : Ultrastructure de l'exosporium des spores.....	33
Figure 23 : Observation de la surface de l'exosporium de <i>B. thuringiensis</i> par microscopie à force atomique .....	36
Figure 24 : Observation des spores $\Delta cotE$ de <i>B. subtilis</i> .....	37
Figure 25 : Contrôle de l'expression du gène <i>cotE</i> chez <i>B. subtilis</i> .....	38
Figure 26 : Observation de spores $\Delta cotE$ de <i>B. anthracis</i> .....	38
Figure 27: Représentation schématique du réseau d'interactions des protéines de tuniques chez <i>B. subtilis</i> .....	40
Figure 28 : Représentation schématique de l'assemblage de l'exosporium chez les <i>Bacilli</i> .....	41
Figure 29 : Représentation schématique de la construction de la souche mutante $\Delta cotE$ de <i>B. cereus</i> ATCC 14579 .....	77
Figure 30 : Représentation schématique des fusions CotE-SNAP et SNAP-CotE .....	79
Figure 31 : Résistance physiques des spores .....	128
Figure 32 : Hydrophobicité des spores .....	128
Figure 33 : Germination spontanée des spores de <i>B. cereus</i> .....	129
Figure 34 : Cinétique d'assemblage de CotE dans les spores $\Delta cotE$ de <i>B. cereus</i> ATCC 14579.....	161
Figure 35 : Analyse des extraits protéiques des spores $\Delta cotE$ de <i>B. cereus</i> .....	162
Figure 36 : Modèle d'assemblage des tuniques et de l'exosporium de <i>B. cereus</i> .....	168

### Tableaux :

Tableau 1 : Caractéristiques des syndromes diarrhéique et émétique.....	17
Tableau 2 : Conservation des protéines de tuniques de <i>B. subtilis</i> .....	30
Tableau 3 : Conservation des protéines de l'exosporium de <i>B. anthracis</i> .....	35
Tableau 4 : Composition des milieux de culture .....	75
Tableau 5 : Souches d' <i>E. coli</i> utilisées dans cette étude .....	79
Tableau 6 : Amorces utilisées dans cette étude .....	81
Tableau 7 : Plasmides utilisés dans cette étude .....	82

**Avant propos**

---



## Avant propos

A l'origine de 2 millions de décès par an, les aliments contaminés par des bactéries, virus, parasites ou substances chimiques sont responsables de plus de 200 maladies, allant de la diarrhée aux cancers. La sécurité sanitaire des aliments qui garantit à tout consommateur l'innocuité des produits alimentaires est un aspect essentiel de la santé publique. Elle englobe toutes les politiques et mesures destinées à proposer des aliments aussi sûrs que possible. Ces mesures portent sur l'ensemble de la chaîne alimentaire, de la production à la consommation et passent par la réglementation et le contrôle des filières agroalimentaires.

L'objectif de ces contrôles porte notamment sur la détection de bactéries et de toxines microbiennes dans les aliments susceptibles d'engendrer diverses pathologies. Cependant, on constate une émergence des contaminations en Europe ces dernières années avec un nombre de foyers rapportés qui a presque doublé en 5 ans (EFSA 2013). En France, le pays le plus touché d'Europe (20 % des foyers en 2011), 1288 foyers de toxi-infections alimentaires collectives (TIAC) affectant 10258 personnes dont six décédées ont été notifiés en 2012 (INVS 2012; EFSA 2013).

Parmi les agents incriminés dans ces TIAC, on retrouve des pathogènes d'origine alimentaire tels que *Staphylococcus aureus* et *Bacillus cereus*, les premiers et seconds agents de TIAC en France (29 % et 21 % des foyers) ou d'autres plus rares mais souvent mortels tels que *Escherichia coli* entérohémorragique, impliqué en 2011 dans une épidémie lié à des graines germées (INVS 2011; INVS 2012). Cependant en France comme en Europe, les maladies alimentaires liées à *B. cereus* sont vraisemblablement sous-estimées du fait de la difficulté d'une enquête alimentaire et la similitude des symptômes avec ceux provoqués par d'autres espèces bactériennes (*Clostridium perfringens* et *S. aureus*).

*B. cereus* est une bactérie ubiquitaire dont les spores sont abondantes dans le sol. Retrouvées également dans d'autres niches écologiques (tubes digestifs des invertébrés et vertébrés, débris végétaux...), les spores, capables de s'adapter à de nombreux environnements, peuvent être en contact aussi bien avec les équipements de transformation qu'avec les matières premières. La résistance de *B. cereus* aux traitements de désinfection et sa capacité à se développer dans presque tous les aliments en fait un problème majeur pour les acteurs de l'industrie agro-alimentaire et un objet d'étude intéressant pour les équipes de recherche en microbiologie.



Les industries veillent alors à développer des technologies permettant de maîtriser au mieux cette contamination. La stérilisation est une technique de conservation des aliments employant de fortes températures et destinée à éliminer tous germes microbiens, y compris les spores. Cette technologie peut cependant faire perdre aux aliments leurs valeurs nutritionnelles, leurs saveurs, couleurs et textures. Ces dernières années ont vu émerger de nouvelles technologies de transformation des aliments qualifiées de « Minimal processing ». Ces technologies de transformation douce veillent à la préservation des qualités organoleptiques et nutritionnelles des aliments. Parmi les méthodes employées, on retrouve la diminution des traitements thermiques ou l'emploi de traitements à hautes pressions qui permettent d'éliminer les cellules végétatives mais pas les spores.

La résistance extrême des spores à la température et aux agents chimiques et physiques permet leur survie aux procédés de transformations alimentaires, leur persistance dans les produits finis et la multiplication bactérienne dans l'aliment du futur consommateur. Les capacités de survie et de retour à la vie végétative des spores s'acquièrent au cours du processus de sporulation et sont sous l'extrême dépendance des conditions physico-chimiques et environnementales dans lesquelles elles se sont formées. Cette variabilité des conditions de sporulation est une source d'incertitude sur l'efficacité antimicrobienne des procédés de transformation.

La compréhension de l'origine de ces variations de comportement induites par l'environnement de sporulation permettra une meilleure maîtrise des risques associés à la contamination des aliments par les spores bactériennes. En effet, appréhender la variété des contaminants permet d'ajuster les traitements et éliminer un large spectre de bactéries.

# **Chapitre 1**

## **Introduction bibliographique**

---



## Chapitre 1 : Introduction bibliographique

### 1. De l'environnement à l'intoxication alimentaire

#### 1.1. La découverte des spores

##### 1.1.1. Les premières observations

En 1838, Ehrenberg fut l'un des premiers à décrire la présence de corps réfractiles dans la cellule bactérienne. A la fin du 19<sup>ème</sup> siècle, Cohn, Koch et Tyndall découvrent indépendamment, l'existence de certaines espèces bactériennes capables de passer une partie de leur vie sous forme de structures cellulaires dormantes, aujourd'hui connues sous le nom de spores (Gould 2006; Dedet 2007; Logan 2012) (Figure 1).



**Figure 1: Photographies des premiers observateurs de spores**

A) Robert Koch fut le premier à décrire les spores de *B. anthracis*. Ferdinand Cohn (B) et John Tyndall (C) celles de *Bacillus subtilis*

Robert Koch fit la découverte des spores à travers son étude de la maladie du charbon en 1873 (Dedet 2007). Sans aucun moyen et équipé d'un microscope offert par sa femme, il confirma par observation microscopique du sang des animaux malades, la présence dans les filaments bactériens de petits points transparents (Figure 2).

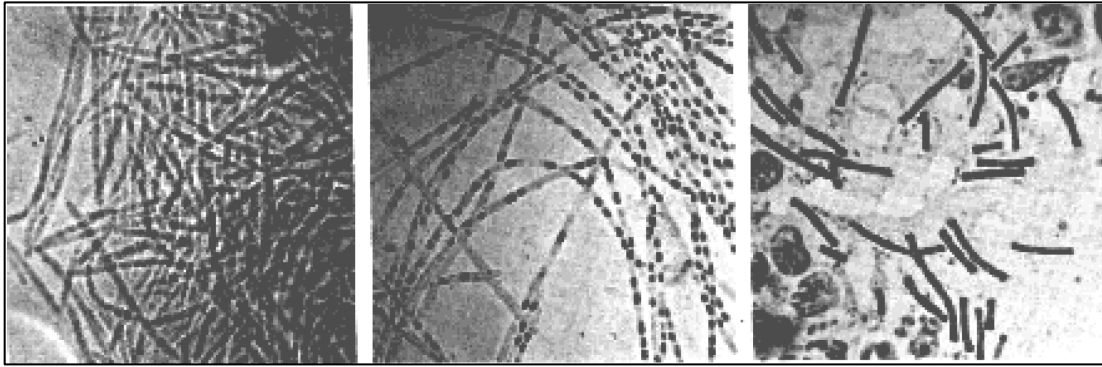


Figure 2 : Première microphotographie prise de *B. anthracis* par Robert Koch

Il essaya de cultiver cette bactérie qu'il nomma *Bacillus anthracis*, sur de l'humeur aqueuse de globes oculaires de bétail récupérés à l'abattoir. Un système ingénieux, utilisant un brûleur fonctionnant au kérosène, lui permit d'incuber à une température d'environ 30°C, ses boîtes de verre contenant son milieu de culture et scellées à la paraffine. A l'aide d'un nouveau microscope, il put observer sur des cultures vieilles, l'allongement progressif des bacilles et la formation de spores capables de redonner des bacilles dans une autre culture. Ces structures dormantes expliquaient à elles seules le cycle de la transmission de la maladie et la persistance des bactéries pendant des années dans les "champs maudits" où la maladie resurgissait régulièrement (Dedet 2007).

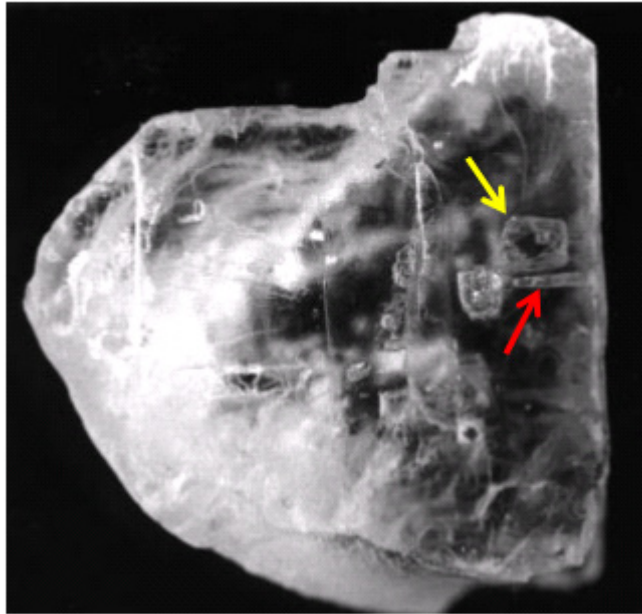
Parallèlement, Ferdinand Cohn se demandait pourquoi l'ébullition d'une infusion de foin ne suffisait pas à détruire les bactéries quand on sait que des températures largement inférieures à 100°C pendant quelques secondes sont suffisantes pour tuer la plupart des autres organismes vivants. Il observa en 1876 un corps fortement rétractile dans le contenu homogène des bâtonnets. Il s'avéra que ces structures ne pouvaient germer dans le liquide où elles avaient été formées mais uniquement dans une infusion fraîche de foin. Sans le savoir, Cohn fit la découverte des notions de germination et de germinants spécifiques qui seront étudiées beaucoup plus tard (Gould 2006; Dedet 2007).

En 1875, Koch rencontra Cohn et lui présenta ses résultats sur *Bacillus anthracis*. Cohn, enthousiaste, lui rapporta qu'il venait lui-même de découvrir une bactérie non pathogène, nommée *Bacillus subtilis*, présente dans les infusions de foin et capable de résister à l'ébullition. Koch utilisa *B. subtilis* comme témoin afin de montrer que la maladie du charbon était due uniquement à une seule et unique bactérie. Conjointement, en 1876 et 1878, le physicien John Tyndall montra également que les infusions de foin étaient beaucoup plus difficiles à stériliser du fait de la présence de spores bactériennes de *B. subtilis*, beaucoup plus résistantes à la chaleur que les autres microbes (Il fallait les faire bouillir parfois 5 heures et demi pour obtenir leur stérilisation) (Dedet 2007).

En 1888, Koch observa la sporulation de *B. anthracis* et d'autres bactéries formant des spores et fut le premier à décrire le cycle complet de sporulation et de germination (Dedet 2007). Dès lors et depuis les années 1950, de nombreux travaux ont été menés sur la sporulation comme modèle de différenciation cellulaire. En témoigne la mise en place en 1956 pour la première fois aux Etats-Unis de la "International Spore Conference" qui mobilisa la communauté scientifique autour de cette thématique. Dans les années 1970, *B. subtilis* apparaît comme le modèle de référence pour l'étude des spores bactériennes. En 1997, il est le premier organisme sporulé dont le génome est entièrement séquencé (Kunst et al. 1997). Après 140 ans de recherches sur les spores, Cohn et Koch seraient sans doute impressionnés par la complexité de la sporulation et par la richesse d'informations aujourd'hui acquises (Gould 2006).

### **1.1.2. Les propriétés de dormance et de longévité de spores**

Les spores sont souvent définies comme dormantes, inertes ou métaboliquement inactives. Cette activité métabolique extrêmement réduite des spores est à l'origine de leur extrême longévité (Segev et al. 2013). Le temps de réduction décimale des spores dans un sol sec est de 50 à 100 ans (Gould 2006). Quelques études ont rapporté l'association de spores à une variété d'échantillons anciens conservés, mais leur fiabilité est remise en question pour la qualité et la possible contamination des échantillons. Ainsi, Cano et al (1995) rapportent avoir isolé des spores de *Bacillus subtilis* à partir d'un insecte contenu dans un ambre dominicain datant de 25 à 40 millions d'années. En 2000, Vreeland et al affirment également avoir retrouvé des spores de *Bacillus* conservées 250 millions d'années dans une microscopique cavité d'eau, au cœur d'un cristal de sel hermétique trouvé sous terre dans le lit du Rio Salado au Nouveau-Mexique (Figure 3) (Vreeland et al. 2000). Selon les auteurs, il n'y avait aucune fissure ni trace de contamination. Après inoculation en conditions stériles, les spores ont reformé des cellules végétatives.



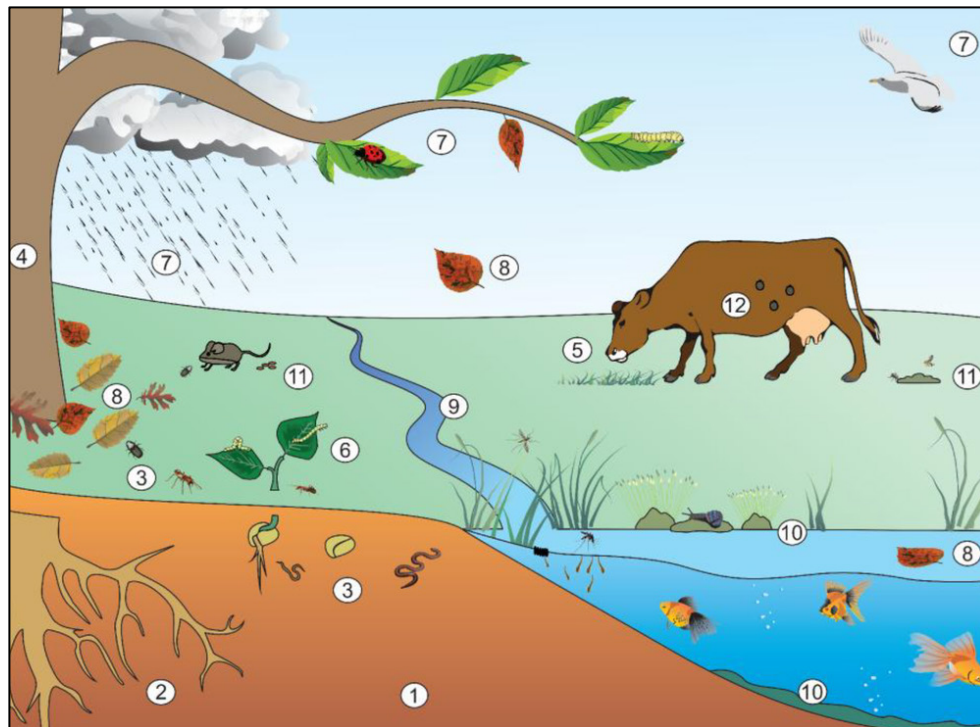
**Figure 3 : Photographie du cristal de sel du Rio Salado**

Cristal qui contient la souche de *B. subtilis* et qui mesure 3,5 x 3,5 x 2,5 cm. L'inclusion de 3 x 3 x 1 mm qui contient la bactérie est repérée par une flèche jaune et la brèche réalisée pour faire le prélèvement par une flèche rouge. D'après Vreeland et al (2000).

Des chercheurs ont montré que certaines spores pouvaient survivre pendant 18 mois exposées aux rayons cosmiques et aux variations de température dans le vide spatial. Ces spores protégées dans un biofilm ou dans une roche ont pu par la suite récupérer des dommages occasionnés par une telle exposition (Horneck et al. 2012).

## 1.2. Les spores dans l'environnement

Les spores sont, comme nous l'avons vu, des structures dormantes d'une extrême robustesse, et on peut se demander quel est leur rôle dans l'environnement ? La réponse est certainement la préservation du matériel génétique et l'assurance de la propagation bactérienne. Nous le détaillerons plus tard mais, la formation des spores est un mécanisme nécessaire à la bactérie pour échapper à des conditions locales défavorables à une croissance rapide (Nicholson et al 2000). Des échantillons de spores ont été retrouvés dans différentes localisations terrestres et jusqu'à 21000 m d'altitude dans l'atmosphère terrestre. Les spores du genre *Bacillus* sont généralement isolées du sol, de l'eau de la poussière ou de l'air (Figure 4) (Argôlo-Filho and Loguercio 2013; Brillard et al. 2015). Cependant, des études révèlent la présence de spores d'espèces du genre *Bacillus* dans l'intestin d'animal ou d'insecte (Hong et al. 2005).



**Figure 4 : Niches écologiques d'une bactérie du groupe *B. cereus***

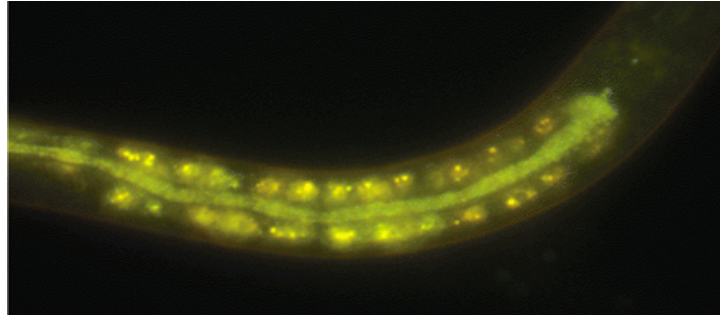
Les numéros de 1 à 12 représentent les niches potentielles. Le sol (1) est le plus grand réservoir des spores de *B. cereus*, elles peuvent ainsi contaminer la rhizosphère et se nourrir des substrats de racines (2). Si elles sont ingérées par des invertébrés (3) elles peuvent se retrouver dans leur intestin puis dans leur fèces ou bien tuer leur hôte et se nourrir de son cadavre. Leur présence près des racines peut favoriser leur contact avec les végétaux (4) qui sont ingérés par les herbivores (5 et 6). Les spores peuvent aussi atteindre la surface des plantes par les éclaboussures de pluie et les fèces d'animaux qui les transportent comme les insectes ou les oiseaux (7). Les feuilles infectées tombent et peuvent réintroduire les spores dans le sol et l'eau (8). La pluie peut aussi transporter les spores vers les plantes et le sol (9). Dans l'eau, les spores s'associent aux plantes aquatiques et aux sédiments et peuvent ainsi infecter les vertébrés et invertébrés (10). Les fèces des animaux qui se nourrissent de plantes ou d'insectes contaminés mais aussi leurs tiques et mites sont une source de spores (11 et 12). D'après d'Argôlo et al (2013).

Ces spores pourraient provenir du sol et être ingérées par leurs hôtes. Une nouvelle théorie, suggère l'existence d'espèce de *Bacillus* qui partagent une relation d'endosymbiose avec leur hôte (Jensen et al. 2003). Dans certains cas, l'endosymbiote devient un pathogène, utilisant les intestins comme portail d'entrée vers l'hôte (*Bacillus anthracis*) ou un site pour la synthèse d'entérotoxines (*B. cereus* et *B. thuringiensis*) tel que le montre la Figure 5 qui révèle la présence dans l'intestin d'un nématode de spores de *B. subtilis*, porteuses d'un marquage fluorescent (Jensen et al. 2003; Laaberki et al. 2008). Des spores du genre *Bacillus* ont été identifiées dans les fèces d'hommes ou d'autres mammifères, d'insectes et d'animaux aquatiques (Hong et al. 2005).

Les spores présentent une grande capacité de dispersion dans l'environnement (Nicholson et al 2002). Cette propriété peut expliquer la localisation parfois atypique de bactéries sporulantes dans des environnements qui semblent non adaptés à leur développement comme *Geobacillus*, une bactérie thermophile isolée de sol froid. Des études ont montré que cette localisation pouvait s'expliquer par la présence de conditions locales et ponctuelles favorables à leur développement et par leurs extrêmes résistances (Zeigler 2014). Au cours des périodes légèrement plus chaudes, la



glace contenant les spores peut fondre légèrement et assurer subitement leur développement (Cockell et al. 2015).



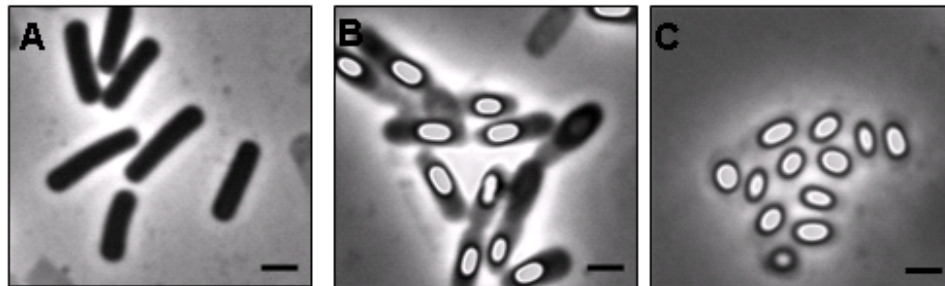
**Figure 5 : Larve de *Caenorhabditis elegans* L2 portant des spores de *B. subtilis* fluorescentes**

La larve de *Caenorhabditis elegans* L2 est nourrie de spores de *B. subtilis* marquées avec une protéine fluorescente verte (GFP). L'auto-fluorescence de la larve apparaît jaune ou orange et se distingue de la fluorescence verte des spores visible dans l'intestin.

### 1.3. *Bacillus cereus*, un pathogène alimentaire

#### 1.3.1. Généralités

Le groupe *Bacillus cereus sensu lato* est composé de bactéries à Gram positif, aérobie-anaérobie facultatives, capables de produire des spores ovoïdes non déformantes en position centrale ou sub-terminale, à raison d'une spore par cellule (Figure 6).



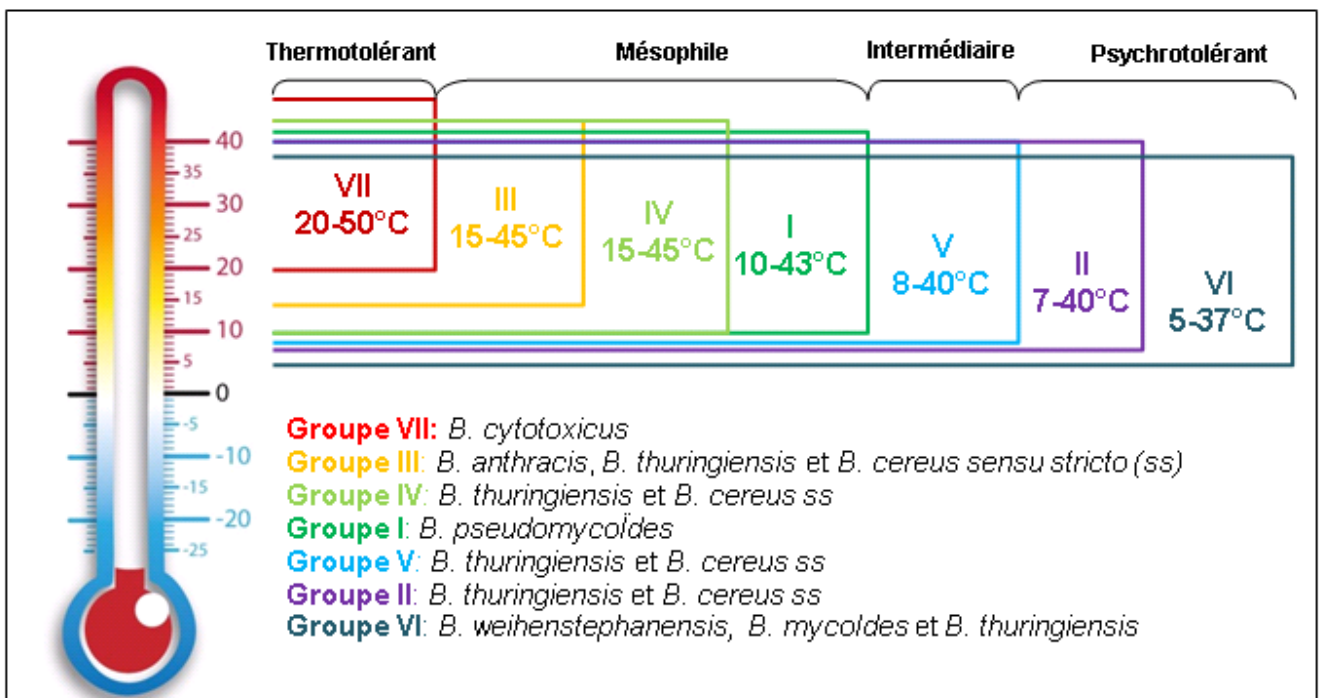
**Figure 6 : Observation microscopique de *Bacillus cereus* au cours de sa sporulation**

Les cellules végétatives (A), endospores (B) et spores (C) ont été observées au laboratoire de l'équipe de microbiologie de l'INRA d'Avignon au microscope optique en contraste de phase (X 100). Ces observations ont été réalisées au cours de la sporulation en milieu mFNA à 37°C au début de l'inoculation pour les cellules végétatives, puis 24 h après incubation pour les endospores et 72h pour les spores. Barres d'échelle : 1µM.

Sept espèces apparentées sont regroupées dans ce groupe taxonomique : *B. thuringiensis*, entomopathogène utilisé en agriculture comme agent de lutte biologique contre les insectes (Aronson and Shai 2001), *B. anthracis*, pathogène de l'homme et de l'animal, responsable de la maladie du charbon (Mock and Fouet 2001), *B. mycoides* et *B. pseudomycoides*, espèces caractérisées par la formation de rhizoïdes (Nakamura 1998), *B. weihenstephanensis*, qui réunit des espèces

psychrotrophes capables de croître en dessous de 7°C (Lechner et al. 1998), *B. cytotoxicus*, nouvelle espèce thermotolérante (Guinebretiere et al. 2013) et *Bacillus cereus sensu stricto*, agent de toxi-infections alimentaires mais aussi impliqué dans certains cas de surinfections locales (Logan 2012).

Les souches du groupe *Bacillus cereus sensu lato* sont capables de s'adapter à différents types d'habitats, d'environnements froid à chaud, de sol tempéré à alpin et d'aliments réfrigérés à déshydratés (Guinebretiere et al. 2008). En conséquence, on peut observer une large gamme de températures de croissance qui varie de 4°C à 50°C, avec un optimum compris entre 30°C et 45°C (Guinebretiere et al. 2008; Guinebretiere et al. 2013) (Figure 7). Ces 7 groupes sont classés en fonction de leur capacité de croissance à différentes températures en 4 thermotypes : 3 groupes mésophiles (I, III, et IV), un groupe thermotolérant (VI), 2 groupes psychrotolérants (II et VI) et un groupe intermédiaire entre mésophile et psychrotolérant (V). Certaines souches sont restreintes à un seul groupe comme c'est le cas pour *B. cytotoxicus* (VII), *B. weihenstephanensis* (VI), *B. anthracis* (III) et *B. pseudomycolides* (I) et d'autres comme *B. cereus ss*, *B. thuringiensis* et *B. mycolides* sont réparties dans plusieurs groupes (Guinebretiere et al. 2008; Carlin and Nguyen The 2013).



**Figure 7 : Représentation des gammes de croissance des souches du groupe *Bacillus cereus***

Répartition des 7 groupes de *B. cereus* et leurs espèces en fonction de leur gamme de température et leurs thermotypes. D'après Guinebretière et al (2008).

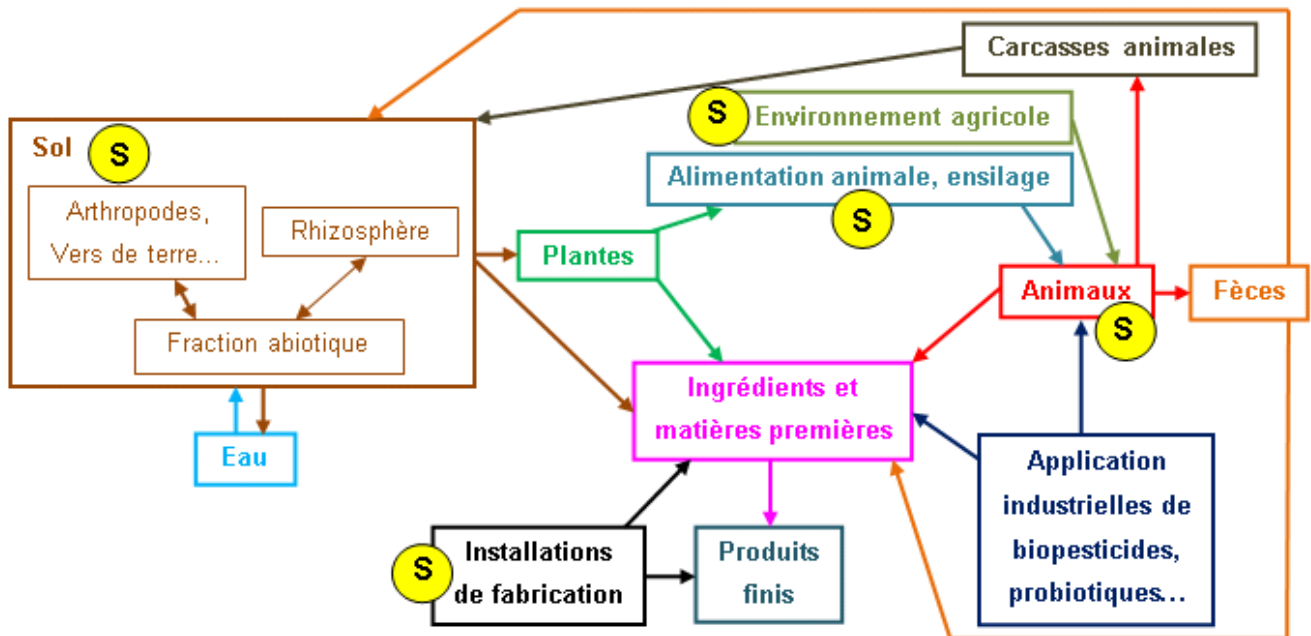
Cette diversité au sein du groupe de *B. cereus* est favorisée par des différences dans l'organisation et la plasticité du génome bactérien. En effet certaines espèces possèdent des éléments génétiques mobiles comme les plasmides, les séquences d'insertions, les transposons et/ou les intégrons qui leur confèrent des propriétés spécifiques de virulence, d'adaptation ou de nouvelles fonctions cataboliques et symbiotiques (Mahillon et al. 1999). Les souches de *B. anthracis*, *B. thuringiensis* et *B. cereus* possèdent des plasmides respectifs absent dans d'autres espèces du groupe *B. cereus* et qui sont à l'origine de leur pathogénicité (Jensen et al. 2003; Hoton et al. 2005; Rasko et al. 2005). Les variations de la taille du génome (3,4 à 6 Mbp) peuvent également expliquer cette diversité de propriétés et de niches écologiques observées au sein du groupe de *B. cereus* (Papazisi et al. 2011).

Largement répandue dans la nature (eau, sol, poussière et végétaux), certaines espèces de *B. cereus* ont été retrouvées dans le tube digestif d'insectes, d'arthropodes, de lombrics et d'autres animaux (Margulis et al. 1998; Hong et al. 2005). Ces bactéries sont également capables de se multiplier et de produire des spores, qui leur permettent de persister dans le sol où elles sont extrêmement représentées ( $10^5$  -  $10^6$  spores par gramme de sol) (Guinebretiere and Nguyen-The 2003; Vilain et al. 2006; Brillard et al. 2015).

### **1.3.2. Les voies de contamination des industries alimentaires**

Contaminants de nombreuses filières de l'industrie agro-alimentaire, *B. cereus* a été mis en évidence dans divers produits tels que le riz, les légumes, les matières premières laitières et certaines viandes animales (Andersson et al. 1995; Valero et al. 2002; Carlin and Nguyen The 2013). Définies comme ubiquitaires, les spores empruntent différentes voies d'entrée dans les environnements agricoles et industriels, dont les principales sont décrites dans la Figure 8.

On distingue un cycle de contamination via, par exemple, les spores présentes sur les matières premières en contact direct ou indirect avec le sol, celles issues du tractus intestinal d'invertébrés, de l'eau, des animaux ou des équipements agricoles (fourrages pour animaux, trayons des vaches laitières...) (Slaghuis et al. 1997; Scheldeman et al. 2005; Vilain et al. 2006; Magnusson et al. 2007; Carlin 2011). Les spores de *B. cereus* sont très résistantes à la chaleur et capables d'adhérer fortement à de nombreuses surfaces, y compris l'acier inoxydable (Tauveron et al. 2006; Faille et al. 2007). De plus, les cellules végétatives peuvent former des biofilms au sein desquels se forment des spores qui se libèrent au cours du processus de préparation d'aliments (Wijman et al. 2007). Elles sont, de ce fait, très difficiles à éliminer des tuyaux et canalisations des industries alimentaires.



**Figure 8 : Voies de contamination des industries alimentaires par les spores**

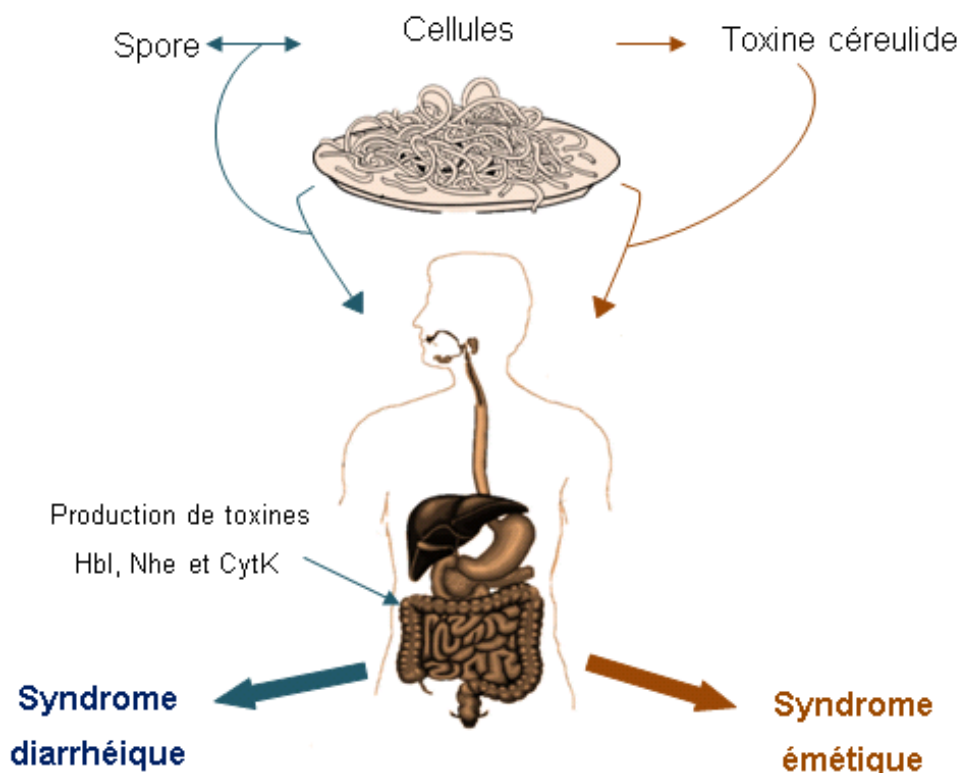
Le cercle avec la lettre S représente les environnements potentiels de sporulation. D'après Carlin et al (2011)

Ces propriétés permettent aux spores de survivre tout au long de la chaîne de fabrication des aliments traités thermiquement. Les emballages, l'air et l'eau sont également d'éventuelles sources de contamination et re-contamination des aliments après pasteurisation (Pirttijarvi et al. 2000; Oomes et al. 2007; Scott et al. 2007). De nombreuses études décrivent la présence de *B. cereus* dans les produits finis : aliments cuisinés réfrigérés, dérivés laitiers (crème glacées, lait en poudre...), épices, soupes et ovo-produits (Guinebretiere and Nguyen-The 2003; Iurlina et al. 2006; Witkowska et al. 2011). La transmission de ces bactéries à l'homme se fait alors principalement par voie alimentaire.

### 1.3.3. Les toxi-infections alimentaires

*B. cereus sensu stricto* est une bactérie pathogène responsable de toxi-infections alimentaires collectives (TIAC). En 2012, *B. cereus* a été identifié en France dans 21 % des foyers pour lesquels un agent a été confirmé ou suspecté contre 29 % pour l'entérotoxine staphylococcique et 19 % pour *Salmonella* (INVS 2012). A l'échelle de l'Europe en 2011, *Salmonella* est le principal agent de TIAC (26,6 %) puis on retrouve en seconde position les toxines bactériennes dont celles de *B. cereus* (12,6 %) et en troisième place *Campylobacter* (10,6 %) (EFSA 2013). On distingue deux types de syndromes : émétique et diarrhéique (Figure 9).

Le syndrome émétique fait suite à l'ingestion de toxine, le ceréulide, préformé dans l'aliment contaminé au cours de la croissance bactérienne, par des souches portant un locus de gènes dédiés à la synthèse non-ribosomale du ceréulide, qui est un cyclo-dodecadepsipeptide cyclique (Toh et al. 2004; Carlin and Nguyen The 2013; Ehling-Schulz et al. 2015). L'ingestion de ceréulide entraîne dans les 30 min à 6 h l'apparition de nausées, vomissements et douleurs abdominales (Schoeni and Wong 2005; Stenfors Arnesen et al. 2008; Logan 2012).



**Figure 9 : Toxi-infection alimentaire à *B. cereus***

Les aliments contaminés par les spores, les cellules végétatives et/ou la toxine ceréulide sont ingérés. Les cellules passent la barrière intestinale et produisent au niveau de l'intestin grêle des toxines à l'origine du syndrome diarrhéique: l'entérotoxine hémolytique Hbl, l'entérotoxine non hémolytique Nhe et la cytotoxine CytK. La toxine ceréulide très résistante est à l'origine du syndrome émétique.

Le ceréulide est thermorésistant (30 min à 121°C), résistant aux protéases et à une large gamme de pH (2 à 11) (Granum and Lund 1997; Lund and Granum 1997; Rajkovic et al. 2008). Bien que limitée, sa synthèse est possible en condition d'anaérobiose et sous une large gamme de températures (Finlay et al. 2000; Jääskeläinen et al. 2004; Carlin et al. 2006; Apetroaie-Constantin et al. 2008). Compte tenu de ses propriétés, la toxine qui peut se former au cours de la réfrigération d'un plat n'est ni détruite par la cuisson de l'aliment, ni par les enzymes digestives de l'estomac. La dose suffisante pour provoquer ces symptômes serait de l'ordre de 5 à 10 µg/kg de masse corporelle. Les aliments associés à ce syndrome sont principalement le lait, le riz et les pâtes (Ehling-Schulz et al. 2004; Logan 2012; Carlin and Nguyen The 2013).

Le syndrome diarrhéique est causé par l'ingestion de bactéries et/ou de spores de *B. cereus* suivie d'une production d'entérotoxines dans l'intestin grêle. Crampes abdominales et diarrhées profuses apparaissent entre 8 à 16 h suivant l'ingestion de l'aliment incriminé (Carlin et al. 2006; Logan 2012; Carlin and Nguyen The 2013). Les entérotoxines Hbl, Nhe et CytK, responsables de cette forme diarrhéique, sont sensibles à la chaleur, aux acides et aux protéases du tube digestif (Lapidus et al. 2008). Une contamination par ces toxines nécessite alors la survie de quelques spores et/ou de cellules végétatives à la cuisson et la digestion de l'aliment (Clavel et al. 2004). Après un transit d'au moins 4 h, une reprise de croissance au niveau de l'intestin grêle et l'adhésion des bactéries aux cellules intestinales permet une production de toxines localisée (Granum 1994). Cette affection est le plus souvent associée à la consommation d'un aliment contenant au moins  $10^5$  UFC/g d'aliments. Ces aliments sont généralement des produits à base de viande, les légumes, les produits déshydratés et les produits laitiers pasteurisés (Stenfors Arnesen et al. 2008; Logan 2012).

Les symptômes des deux types de maladies disparaissent au bout de 24 h (Tableau 1). Cependant dans certains cas, il est possible d'observer des complications, telle que diarrhée hémorragique, encéphalopathie et insuffisance hépatique pouvant causer la mort (De Buyser et al. 2001; Naranjo et al. 2011).

**Tableau 1 : Caractéristiques des syndromes diarrhéique et émétique**

Caractéristiques	Syndrome diarrhéique	Syndrome émétique
Contaminants ingérés	Cellules végétatives et/ou spores	Toxine préformée
Toxines impliquées	Entérotoxines Hbl, Nhe et CytK : sensibles à la chaleur, aux acides et aux protéases du tube digestif	Ceréulide : résistante à la chaleur, aux enzymes digestives et aux acides
Lieu de production	Intestin grêle de l'hôte	Aliment
Dose infectieuse	$10^5$ - $10^8$ UFC (totale)	$10^5$ - $10^8$ UFC/g Céréulide : 5 à 10 µg/kg de masse corporelle
Temps d'incubation	8 à 16 h	30 min à 6 h
Durée de l'infection	12 à 24 h	6 à 24 h
Symptômes	Diarrhées aqueuses, douleurs abdominales, nausées occasionnelles	Nausées, vomissements, malaises, diarrhées et douleurs abdominales occasionnelles

## 2. A l'origine des propriétés des spores: une structure originale

### 2.1. Etapes et mécanismes de la sporulation

#### 2.1.1. L'initiation de la sporulation

Les bactéries des genres *Bacillus* et *Clostridium* ont la capacité de sporuler. La sporulation est un mécanisme de différenciation cellulaire, qui aboutit à la formation de spores, permettant aux bactéries de survivre à des conditions environnementales extrêmes (de Hoon et al. 2010; Galperin et al. 2012; Higgins and Dworkin 2012; Paredes-Sabja et al. 2014; Al-Hinai et al. 2015; Talukdar et al. 2015). La capacité à former des spores repose sur la conservation d'un ensemble d'au moins 60 gènes (Stragier 2002; Onyenwoke et al. 2004). Malgré la conservation de la plupart de ces gènes, le mécanisme de sporulation des *Bacilli* et *Clostridia* est différent. Ceci peut s'expliquer par leurs différences de conditions de croissance, les bactéries du genre *Bacillus* sporulent généralement en aérobiose alors que celles du genre *Clostridium* en anaérobiose (Talukdar et al. 2015).

Chez les *Bacilli*, la sporulation se met généralement en place en fin de phase exponentielle, lorsque les nutriments se raréfient et deviennent limitant pour la croissance bactérienne (Al-Hinai et al. 2015). Cependant, convertir une cellule en spore est un mécanisme élaboré et coûteux en énergie qui contrairement aux autres systèmes de réponse cellulaire devient irréversible deux heures après son initiation. La sporulation est ainsi une solution de dernier recours dont l'initiation complexe est la conséquence de l'échec des mécanismes de réponses alternatifs existants. En effet, chez certaines bactéries du genre *Bacillus* en cas de stress nutritif, les bactéries possèdent d'autres moyens de défense (Figure 10) (Mirouze and Dubnau 2013).

Dans un premier temps la synthèse de flagelles et l'activation des systèmes de chimiotactisme permettent aux cellules de rechercher d'autres sources de nutriments dans le milieu (Harshey 2003; Amati et al. 2004; Mirouze and Dubnau 2013). Si le stress se prolonge, une sécrétion d'enzymes, comme des protéases, peut assurer la libération de nutriments normalement difficiles d'accès ou bien la mise en place de biofilms, dans lesquels un système de coopération peut se développer (Amati, Bisicchia et al. 2004; Mirouze and Dubnau 2013; Wenbo, Agnese et al. 2014). En parallèle, dans le cas de compétition avec d'autres micro-organismes, on peut observer le développement de phénomène de compétence pour intégrer de l'ADN exogène, la production et la libération d'antibiotiques ou de toxines, ou un phénomène de cannibalisme afin de se sacrifier ou bien éliminer d'autres cellules pour se nourrir (Gonzalez-Pastor, Hobbs et al. 2003; Hamoen, Venema et al. 2003; Amati, Bisicchia et al. 2004; Stragier 2006; Mirouze and Dubnau 2013).



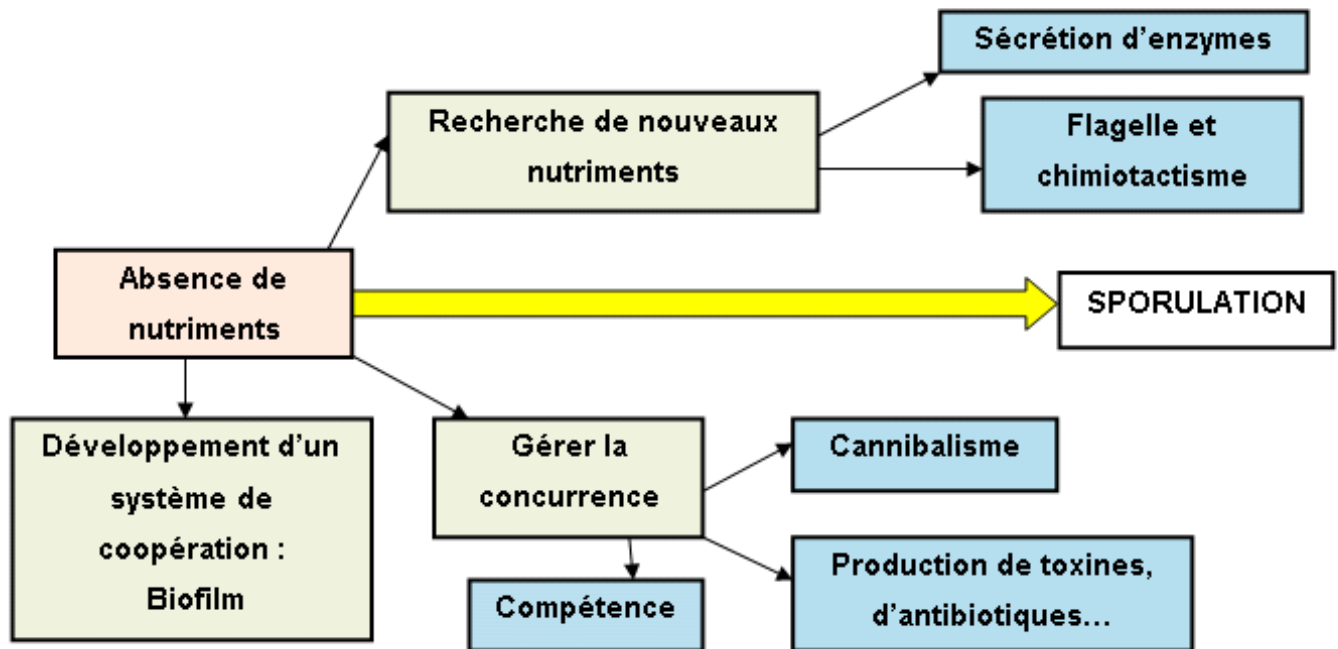


Figure 10 : Gestion bactérienne d'une carence nutritive chez les *Bacilli*

En condition limitante en nutriment avant la sporulation, les bactéries peuvent rechercher de nouveaux nutriments, éliminer la concurrence et former des biofilms

Si ces réponses sont insuffisantes pour permettre une reprise de la croissance bactérienne, la sporulation est initiée selon un mécanisme qui diffère chez les *Bacilli* et *Clostridia* (Durre 2011; Higgins and Dworkin 2012; Edwards and McBride 2014; Fimlaid and Shen 2015). Chez les *Bacilli*, l'induction fait intervenir un système de phosphorelais qui implique des signaux environnementaux liés au déficit en nutriments, la densité cellulaire et au stade du cycle cellulaire. Le signal nutritionnel initiant la sporulation pourrait être une diminution importante du niveau de GTP/GDP interne (Errington 1993; Hilbert and Piggot 2004). Lorsque la densité cellulaire augmente, on observe une accumulation de peptides sécrétés par les bactéries. A travers des récepteurs à la surface des cellules, ces peptides activent la production du facteur de différenciation Spo0A~P à l'origine de la formation des spores (Grossman and Losick 1988; Jiang et al. 2000; Sonenshein 2000; Rai et al. 2015). En plus de ces conditions extracellulaires, l'entrée en sporulation ne peut se faire qu'à un moment précis dans le cycle de division cellulaire. L'activation du phosphorelais de la sporulation ne peut se faire qu'après la réplication de l'ADN et en l'absence de signaux caractéristiques de dommages à l'ADN (Ireton and Grossman 1994; Errington 1996; Narula et al. 2015).

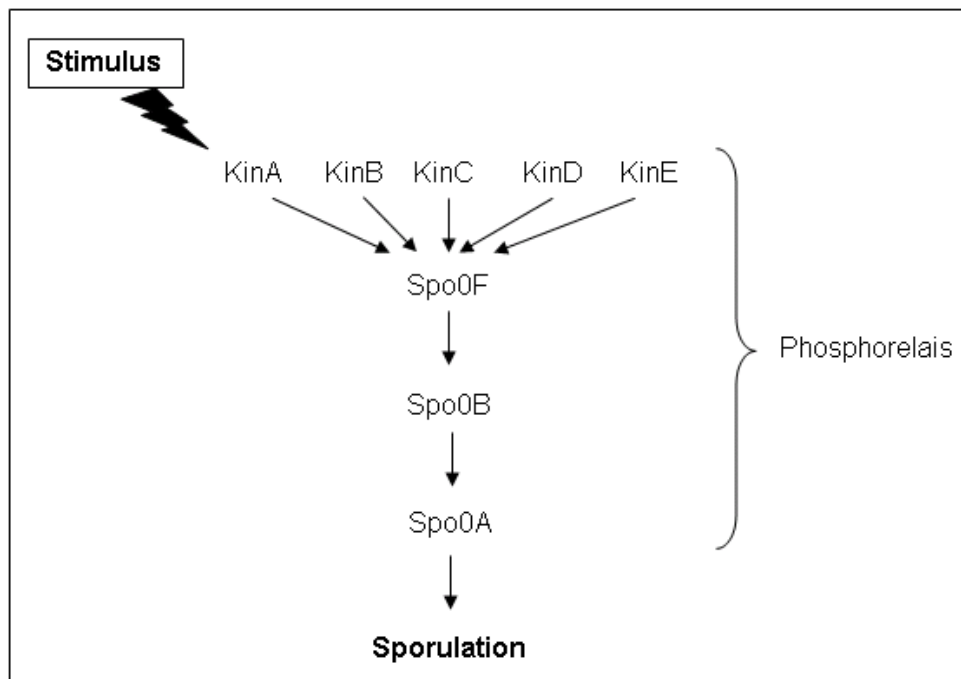
Chez les *Clostridia*, les gènes codant pour les composants du phosphorelais décrits chez les *Bacilli* sont absents suggérant une initiation différente (Al-Hinai et al. 2015). Le signal qui déclenche la



sporulation des *Clostridia* n'a pas encore été identifié mais il pourrait être lié à un stimulus environnemental comme un déficit en nutriments, un *quorum sensing* ou d'autres conditions de stress (réduction d'acides, de solvants...) (Durre 2011; Steiner et al. 2012; Paredes-Sabja et al. 2014).

### 2.1.2. Le cycle et la régulation génétique de la sporulation

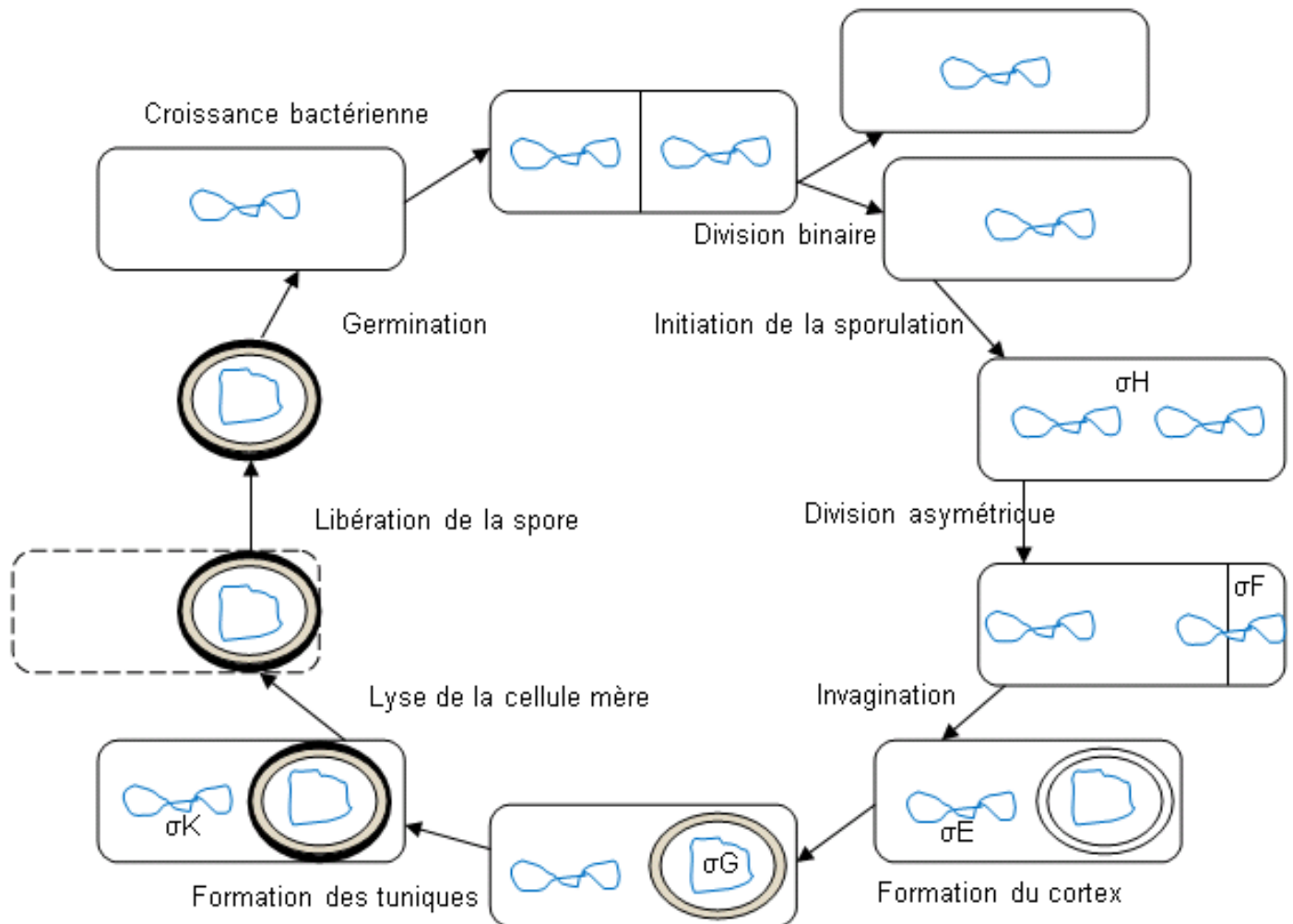
L'initiation de la sporulation module de façon complexe et irréversible l'expression des gènes qui entraîne de profonds bouleversements physiologiques et moléculaires. En réponse à un certain nombre de signaux, une cascade de phosphorylation ou phosphorelais faisant intervenir des kinases, des protéines phosphorylables et des enzymes est activée chez les espèces du genre *Bacillus* (Figure 11) (de Hoon et al. 2010; Mirouze and Dubnau 2013). En réponse à un stimulus non identifié à ce jour, cinq kinases, KinA-E s'autophosphorylent et transfèrent leur groupement phosphate au régulateur de réponse intermédiaire Spo0F. Ce dernier le transmet alors à la protéine Spo0B capable d'activer le régulateur majeur de la sporulation Spo0A. Chez les *Clostridia*, la phosphorylation de Spo0A se fait directement par les histidines kinases (Paredes-Sabja et al. 2014; Al-Hinai et al. 2015; Fimlaid and Shen 2015). La phosphorylation de Spo0A, le point crucial de l'initiation de la sporulation, induit une multitude de voies métaboliques, en activant l'expression directe ou indirecte d'au moins 500 gènes spécifiques à l'origine de la sporulation (Jiang et al. 2000; Molle et al. 2003; Piggot and Hilbert 2004; de Hoon et al. 2010; Higgins and Dworkin 2012; Al-Hinai et al. 2015; Fimlaid and Shen 2015).



**Figure 11 : Initiation de la sporulation chez les *Bacilli***

Suite à un stimulus ressenti par des histidines kinases (KinA à KinE), une cascade de phosphorylation conduit à l'activation de Spo0A et l'initiation de la sporulation. D'après Piggot et al (2004).

Les étapes morphologiques de la formation des spores sont similaires chez toutes les bactéries sporulantes (Talukdar et al. 2015). La sporulation chez les *Bacilli* et *Clostridia* débute après un cycle complet de réplication de l'ADN (Figure 12). Au cours d'une division cellulaire asymétrique, un septum assure la séparation entre deux compartiments de tailles différentes : la préspore de petite taille, qui possède une copie du chromosome et la cellule mère.



**Figure 12 : Cycle de la sporulation et régulation génétique chez *Bacillus subtilis***

L'activité spatio-temporelle des 4 principaux facteurs sigma de la sporulation ( $\sigma$ ) est représentée. Pendant la croissance bactérienne, l'ADN se réplique, puis la cellule se divise symétriquement et donne deux cellules filles. La sporulation initiée est visible par la mise en place d'un septum asymétrique séparant les deux copies du chromosome en deux compartiments : une cellule mère et une préspore où  $\sigma^F$  devient actif. Après l'invagination le facteur  $\sigma^E$  est actif dans la cellule mère puis le cortex se met en place parallèlement à l'activation de  $\sigma^G$  dans la préspore. Le facteur  $\sigma^K$  devient actif et les tuniques se mettent en place autour de l'endospore. Après lyse cellulaire, la spore est libérée et peut redonner une cellule par germination. D'après De Hoon et al (2010)

Deux programmes d'expression génique parallèles se mettent en place dans chaque compartiment, sous le contrôle spatial et temporel de quatre facteurs transcriptionnels :  $\sigma^F$  le premier

activé dans la préspore,  $\sigma^E$  le régulateur précoce de la cellule mère,  $\sigma^G$  et  $\sigma^K$  activés tardivement dans la préspore et dans la cellule mère respectivement. La formation de membranes internes et externes par migration permet ensuite l'invagination de la préspore dans la cellule mère. L'espace entre ces deux membranes est alors comblé par le développement d'une couche de peptidoglycane modifié appelé cortex. Par la suite, une structure complexe de nature protéique se construit autour du cortex formant ainsi les tuniques. Chez certaines bactéries, on peut distinguer l'apparition de deux types de couches externes supplémentaires qui couvrent les tuniques: l'exosporium et le crust. La présentation de ces structures sera détaillée pour les *Bacilli* dans le paragraphe 2.2.

Ces modifications structurales sont suivies par un processus de maturation au cours duquel se développent les propriétés de résistance, et de dormance. La dernière étape correspond à la lyse de la cellule mère et la libération de la spore (Piggot and Hilbert 2004; de Hoon et al. 2010; Higgins and Dworkin 2012; Bate et al. 2014; Sella et al. 2014; Tan and Ramamurthi 2014; Al-Hinai et al. 2015; Fimlaid and Shen 2015).

### 2.1.3. La germination

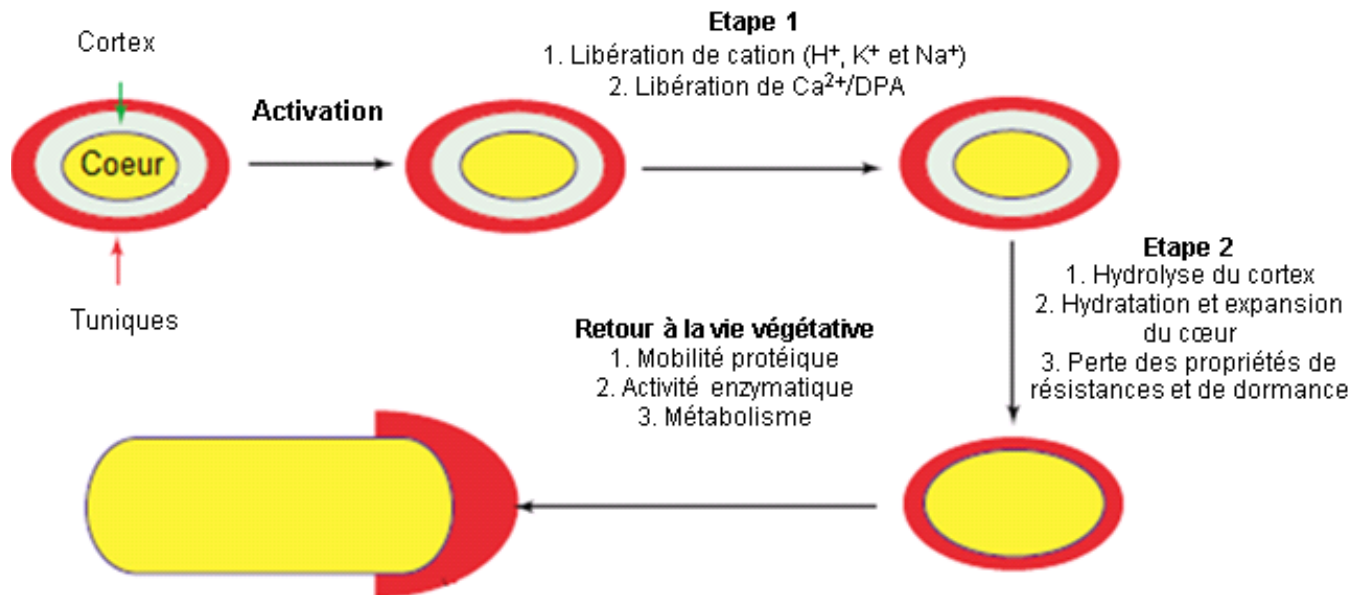
Les spores peuvent survivre et résister dans un état de dormance aux stress environnementaux pendant des années (Vreeland et al. 2000; Gould 2006; Setlow 2014). Lorsque les conditions sont favorables, sous l'influence d'un stimulus chimique, physique, et/ou mécanique, la germination est activée et les spores perdent leurs propriétés de dormance et de résistance (Moir et al. 2002; Moir 2006; Setlow 2014).

Il existe deux types d'inducteurs de germination : des germinants de type nutriments (acides aminés, sucres et ribosides) et divers autres (haute pression, agents chimiques et surfactants). Les germinants sont sensiblement différents d'une espèce à une autre. On distingue une meilleure réponse à la L-alanine et au mélange AGFK (L-asparagine, fructose, glucose et KCl) chez *B. subtilis*, aux acides aromatiques et L-alanine chez *B. anthracis*, l'inosine et la L-alanine chez *B. cereus* et *B. thuringiensis* (Ireland and Hanna 2002; Moir et al. 2002; Setlow et al. 2003; Moir 2006; Broussolle et al. 2008; Abee et al. 2011; Paredes-Sabja and Sarker 2011; Setlow 2013; Setlow 2014).

Les germinants interagissent avec leurs récepteurs GerA, GerB ou GerK localisés sur la membrane interne des spores (Moir et al. 2002; Moir 2006; Ross and Abel-Santos 2010; Paredes-Sabja and Sarker 2011; Setlow 2014). Chez les *Bacilli*, la germination des spores : par la L-alanine se fait via le récepteur GerA, par AGFK via les récepteurs GerB et GerK. Un traitement à haute pression (200 - 400 Mpa) active la germination via les récepteurs GerA, GerB et GerK (Paredes-Sabja and

Sarker 2011; Reineke et al. 2013; Setlow 2014). Chez certaines espèces du genre *Clostridia* comme *Clostridium difficile*, la germination est activée par un mélange de glycine et de sels biliaires (Sorg and Sonenshein 2008).

Le processus de germination se déroule en deux étapes (Figure 13) (Moir et al. 2002; Moir 2006; Abee et al. 2011; Paredes-Sabja and Sarker 2011; Setlow 2013; Setlow 2014).

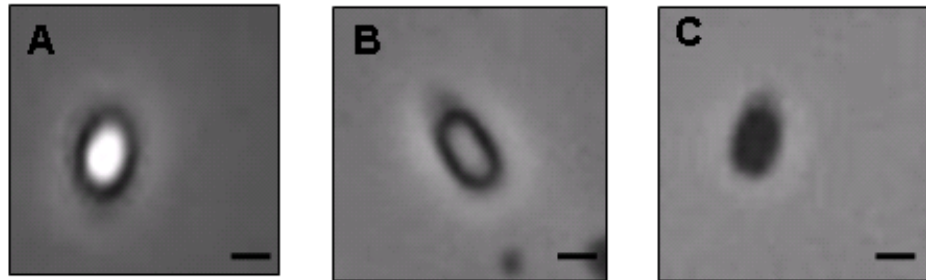


**Figure 13 : Initiation de la germination des spores des *Bacilli***  
 Les grandes étapes de la germination des spores avec un germinant de type nutriment sont représentées. Suite à l'activation, l'étape 1 est marquée par la libération de cations monovalents et d'acide dipicolinique (DPA). Puis l'étape 2 correspond à une forte hydratation du cœur et à la perte des propriétés sporales. On observe ensuite un retour à la vie végétative avec la réactivation du métabolisme. D'après Setlow et al (2003 et 2015).

- **Etape 1 :** Après activation de la germination, les cations  $H^+$ ,  $K^+$  et  $Na^+$  sont libérés via les canaux formés par la protéine SpoVA. Cette libération entraîne une augmentation du pH du cœur de la spore de 6,5 à 7,7. La spore libère également un composé chimique, l'acide dipicolinique ou acide pyridine-2,6 di carboxylique (DPA) associé majoritairement aux cations  $Ca^{2+}$ .
- **Etape 2 :** La libération des cations et du DPA entraîne un léger afflux d'eau qui a pour conséquence la perte de certaines propriétés dont la résistance à la chaleur. L'augmentation du pH permet l'activation des enzymes lytiques du cortex comme CwlJ et SleB. L'hydrolyse du cortex a pour conséquence une forte hydratation du cœur et son expansion. Ce nouvel afflux d'eau permet la restauration de la mobilité protéique, de

l'activité enzymatique et l'activation du métabolisme mais entraîne la perte des propriétés de dormance et de résistances des spores.

Au cours de la germination la spore perd ses propriétés de réfringence. En microscopie à contraste de phase, les cellules en cours de germination apparaissent grises puis noires. (Figure 14).

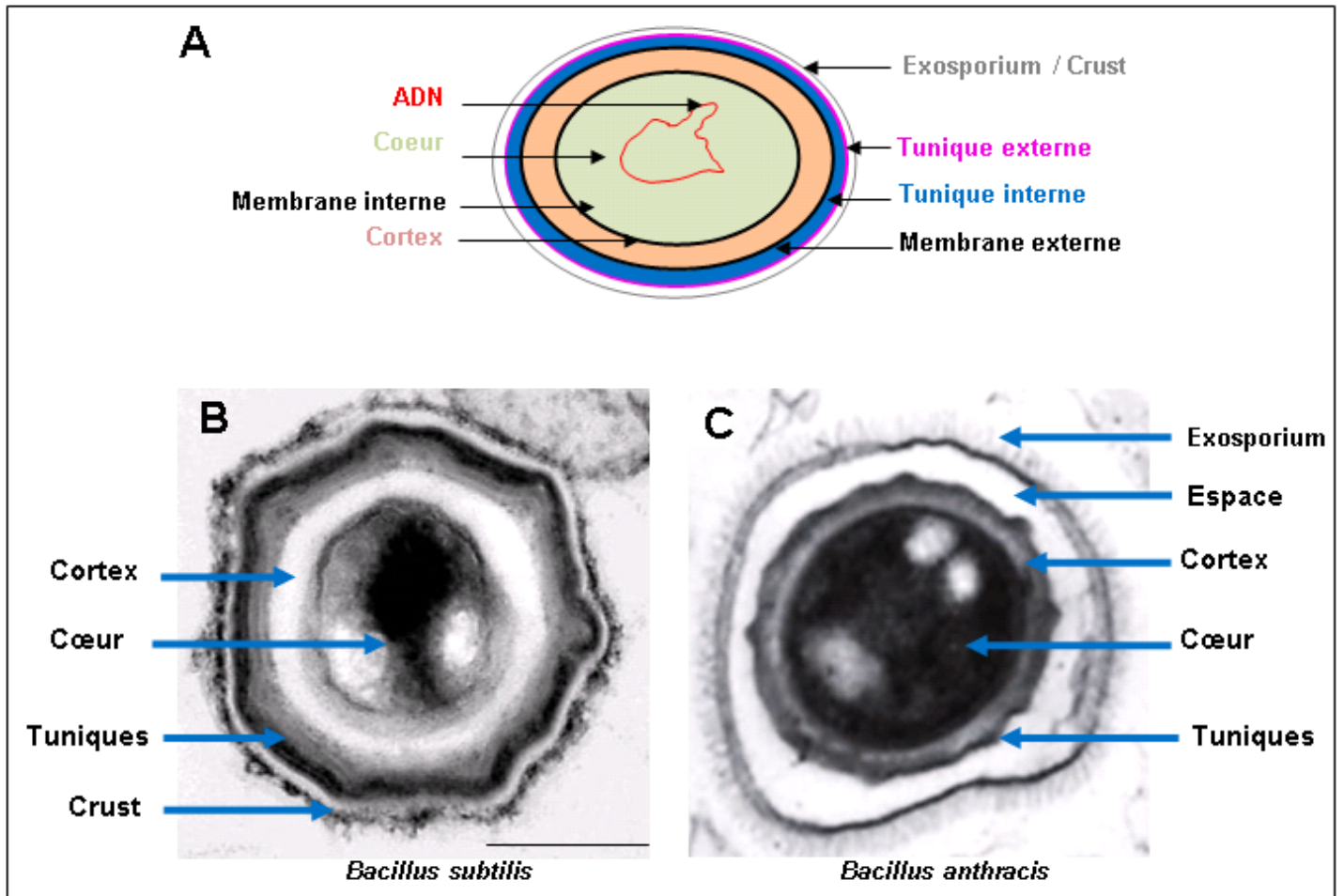


**Figure 14 : Observation microscopique de spores de *B. cereus* en cours de germination**

Une spore réfringente (A), une spore germée « grise » (B) et spore germée noire (C) ont été observées au laboratoire de l'équipe de microbiologie de l'INRA d'Avignon au microscope optique en contraste de phase (X 100). Ces observations ont été réalisées à partir de spores produites en milieu mFNA à 37°C et mises en contact avec une solution d'inosine (0,5 mM) pendant 15 min (B) et 1 h (C). Echelle : 0,5  $\mu$ M

## 2.2. Structures des spores bactériennes

Les spores ont une structure différente des cellules végétatives et qui peut varier en fonction des espèces (Figure 15) (McKenney et al. 2010; McKenney et al. 2013; Sella et al. 2014).



**Figure 15 : Observation et descriptif de la structure des spores de *Bacillus***

(A) Représentation schématique d'une spore. Les multiples couches des spores servent à protéger leur génome (rouge) dans un espace central déshydraté, le cœur (vert). La membrane interne (noire) peut être visible sur des coupes de spores mais la membrane externe (noire) l'est plus rarement. Le cœur est protégé par le cortex (orange) et les tuniques qui se séparent en deux couches la tunique interne (bleue) et la tunique externe (rose). Selon les espèces un exosporium ou un crust (gris) entourent les tuniques. Observation au microscope électronique à transmission (MET) de coupes de spores de *B. subtilis* marquées au rouge de ruthénium pour visualiser le crust (B) et *B. anthracis* marquées au tétroxide d'osmium (C). L'exosporium constitué d'une base et de projections aériennes est séparé des tuniques par un espace (C). (B) D'après McKenney et al (2010), échelle : 0,125 nm et (C) d'après McKenney et al (2013), échelle non précisée.

### 2.2.1. Le cœur

Le cœur, qui représente la partie centrale de la spore, contient l'ADN, les ARN, les ribosomes et la majorité des enzymes de la spore. Le cœur ne contient que 25 à 50 % d'eau, ce qui réduit considérablement les mouvements de macromolécules et l'activité enzymatique. Les propriétés de dormance, de résistance à la chaleur et de certains agents chimiques sont directement liées à cette déshydratation (Setlow 2006).

Certains composants sont spécifiquement retrouvés au cœur de la spore : l'acide dipicolinique (DPA) et les protéines « Small Acid-Soluble Spore Proteins » (SASP). L'acide dipicolinique ou acide

pyridine-2,6 di carboxylique, présent en très grande quantité dans la spore, chélate les cations divalents, principalement les ions  $\text{Ca}^{2+}$  selon un ratio 1:1 (Huang et al. 2007) (Figure 16).

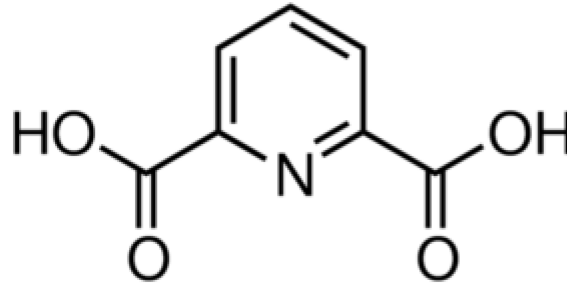


Figure 16 : Formule chimique du DPA

Le DPA est synthétisé dans la cellule mère au cours de la sporulation par une enzyme appelée Dipicolinate synthase, composée de deux sous-unités DpaA et DpaB, qui catalysent la conversion du dihydrodipicolinate en dipicolinate (Errington 1993). Son accumulation dans l'endospore est à l'origine de la réduction du contenu en eau de la future spore. Dans les premières minutes de la germination, en parallèle de l'afflux d'eau, on observe une excrétion de DPA (Leggett et al. 2012).

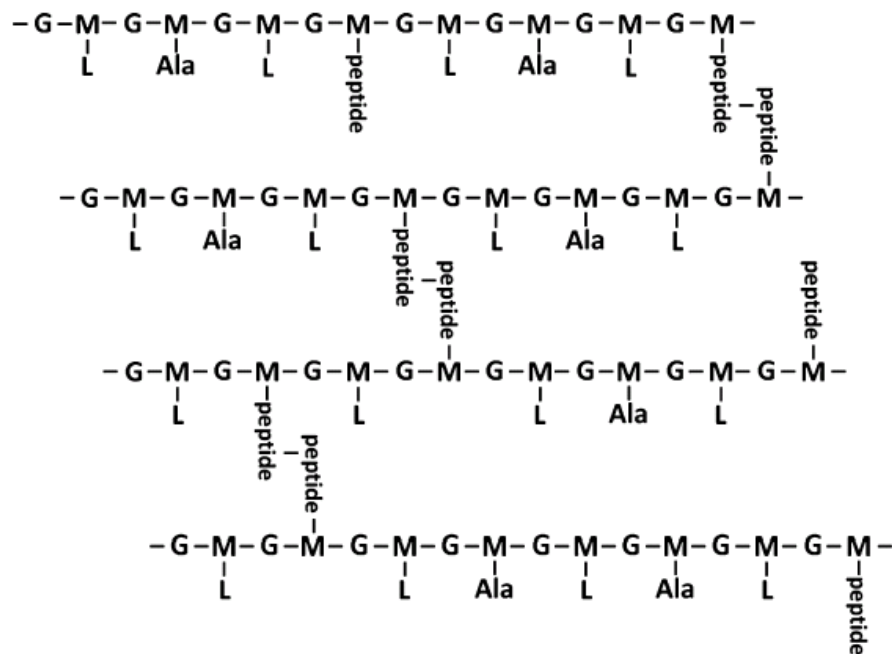
L'ADN des spores est saturé par les protéines SASP de type  $\alpha/\beta$ . Ces protéines de faibles poids moléculaires (6 à 9 kDa) représentent 3 à 6 % des protéines totales de la spore. Protectrices de l'ADN, elles sont synthétisées tardivement au cours de la sporulation, dégradées dès le début de la germination et utilisées comme source d'acides aminés pour la croissance bactérienne (Sella et al. 2014).

### 2.2.2. La membrane interne

De nombreuses études ont démontré l'imperméabilité des spores aux petites molécules. Cette caractéristique est liée à la membrane phospholipidique interne qui recouvre le cœur. A l'état compressé dans la spore dormante, elle est capable de doubler de taille au moment de la germination. Sa faible perméabilité n'est pas due à sa composition lipidique, qui est similaire à celle de la cellule végétative, mais à l'immobilité de ses lipides. Cette immobilité peut venir : i) de la compression de la membrane interne par le cortex; ii) de la faible teneur en eau qui limite les mouvements des lipides ; iii) du fait que la membrane contient des lipides particuliers à mobilité réduite (Cowan et al. 2004). Sa composition protéique, quant à elle, diffère de celle des cellules végétatives. En effet, la membrane interne est le siège des récepteurs protéiques de germination (Moir et al. 2002; Moir 2006; Leggett et al. 2012; Setlow 2014).

### 2.2.3. Le cortex

Le cortex est composé de peptidoglycane modifié par rapport à celui des cellules végétatives spore : i) environ 1/4 des résidus NAM (N-acetylmuramique) sont remplacés par de petits peptides, ce qui a pour conséquence que le cortex possède un plus faible degré de cross-linking que le peptidoglycane de la cellule végétative ; ii) environ 25 % des résidus NAM porte une chaîne latérale L-alanine; iii) un résidus NAM est converti en acide muramique  $\gamma$ -lactame (MAL) (Figure 17) (Sella et al. 2014). Selon Popham et al (2002), c'est le faible niveau de cross-linking du cortex qui assure le maintien de la déshydratation du cœur (Popham 2002). Au cours de la germination, la dégradation du cortex par les enzymes lytiques de la spore permet l'expansion et la croissance de la future cellule végétative (Moir et al. 2002; Moir 2006; Leggett et al. 2012; Setlow 2014). Chez les espèces du genre *Bacilli*, les enzymes lytiques majoritaires sont CwlJ et SleB tandis que chez les *Clostridia*, une seule enzyme est nécessaire, SleC qui nécessite une activation préalable par des protéases (Setlow 2014).



**Figure 17 : Représentation schématique de la structure du peptidoglycane du cortex des *Bacilli***

G: N-acetylglucosamine, M: N-acetylmuramique, M-L: muramique  $\gamma$ -lactame, peptide: chaînes latérales tri-ou tétrapeptides. D'après Leggett et al (2012)

### 2.2.4. La membrane externe

Souvent peu visible sur des coupes de spores observées en microscopie électronique à transmission, il existe des preuves fonctionnelles et biochimiques de sa présence dans les spores matures. En effet, certaines cytochromes et enzymes de la chaîne de transport des électrons,

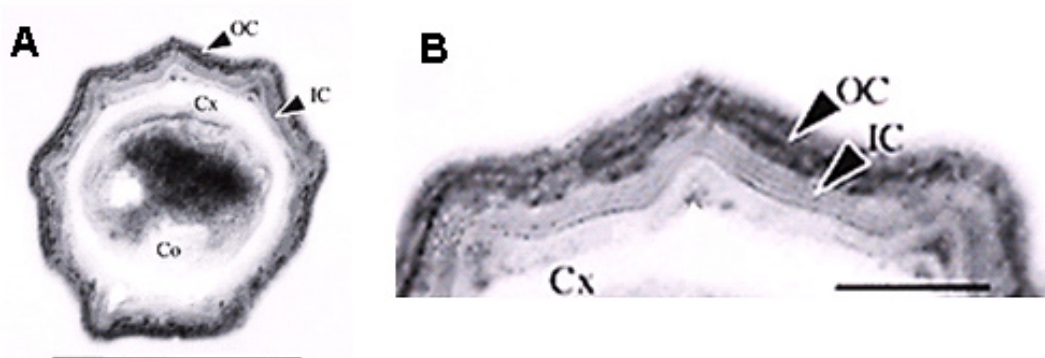


présents dans les membranes bactériennes ont été identifiés dans les structures externes des spores. De plus, une membrane entre les tuniques et le cortex empêche l'entrée de méthacrylate dans les spores de *Bacillus megaterium* (Leggett et al. 2012). Cette membrane, perméable aux petites molécules, permet le passage de germinants vers leurs récepteurs situés dans la membrane interne (Leggett et al. 2012; Setlow 2014). Cependant, sa fonction réelle demeure à ce jour incertaine.

## 2.2.5. Les tuniques

### 2.2.5.1. Structure et composition

La structure et la composition biochimique des tuniques de spores diffèrent entre espèces, voire même entre souches d'une même espèce, mais sont généralement majoritairement composées de protéines (50 to 80 %), et d'une faible teneur en glucides (6 %) (Leggett et al. 2012; Plomp et al. 2014). Chez *B. subtilis*, les tuniques se décomposent en deux structures : i) une tunique interne formée de la juxtaposition de trois à six structures lamellaires larges de 20 à 30 nm et ii) une tunique externe constituée de quatre à cinq couches striées, denses en électrons d'une épaisseur de 40 à 90 nm et parallèles au reste de la surface de la spore (Figure 15) (Sahin et al. 2012; Jiang et al. 2015).



**Figure 18 : Observation microscopique de l'ultrastructure des spores de *Bacillus subtilis***

La coupe de spores de *B. subtilis* est observée au microscope électronique à transmission (A) et un agrandissement de la même photo est proposé permettant de mieux visualiser la tunique interne lamellaire (IC) et la tunique externe dense (OC) (B). On repère également le cortex (Cx) et le cœur (Co). La barre d'échelle correspond à 500 nm (A) et 100 nm (B). D'après Sahin et al (2012).

Une couche plus externe peut être observée entre la tunique interne et la tunique externe appelée le « crust » (Henriques and Moran 2007; McKenney et al. 2010; Leggett et al. 2012; McKenney et al. 2013).

### 2.2.5.2. Les protéines de tuniques

Chez *B. subtilis*, les tuniques forment un réseau protéique composé d'au moins 90 protéines, ayant une masse moléculaire comprise entre 6 et 70 kDa (Henriques and Moran 2007; Abhyankar et al. 2013; Plomp et al. 2014). Ces protéines, qui représentent entre 50 à 80 % des protéines totales de la spore, sont majoritairement solubles (70 %), la partie insoluble étant constituée de protéines riches en résidus cystéine, permettant la formation de ponts disulfures. Sur les 90 protéines de tuniques identifiées chez *B. subtilis*, au moins cinquante sont également retrouvées chez *B. anthracis* et *B. cereus* et seulement vingt ont des orthologues chez les espèces du genre *Clostridium* (Tableau 2) (Giorno et al. 2007; Henriques and Moran 2007; Abhyankar et al. 2011; Abhyankar et al. 2013).

Le rôle spécifique de la plupart des protéines des tuniques n'est pas connu. Cependant, on définit un groupe particulier de protéines dites morphogénétiques qui jouent un rôle important dans la formation de la structure des spores. Chez *B. subtilis*, *B. anthracis* et *B. cereus*, ces protéines sont les protéines SpoIVA, CotE, CotO, SafA (ExsA), SpoVM, SpoVID, CotH et CotG (Henriques and Moran 2000; Driks 2002; Takamatsu and Watabe 2002; Henriques and Moran 2007; McKenney et al. 2013).

Tableau 2 : Conservation des protéines de tuniques de *B. subtilis*

Fonction	Protéine	<i>B. s</i>	<i>B. a</i>	<i>B. c</i>	<i>B. t</i>	<i>C. p</i>	<i>C. d</i>
Enzymes	CotI (YtaA)	+	+	+	+	+	+
	CotJC	+	+	+	+	+	+
	CotS	+	+	+	+	+	-
	CotSA	+	+	+	+	+	+
	CwlJ	+	+	+	+	+	+
	SodA	+	+	+	+	+	+
	YaaH	+	+	+	+	-	+
	YabG	+	+	+	+	+	-
	YcsK (LipC)	+	+	+	-	-	+
	CotA	+	+	+	+	-	-
	CotQ (YvdP)	+	-	+	-	+	-
	CotR (YvdO)	+	-	-	-	-	+
Protéines morphogénétiques	SpoIVA	+	+	+	+	+	+
	CotE	+	+	+	+	-	-
	CotO (YbjX)	+	+	+	+	-	-
	SafA	+	+	+	+	-	-
	SpoVM	+	-	-	-	-	-
	SpoVID	+	+	+	+	-	-
	CotH	+	+	+	+	+	+
Non définie	CotG	+	-	-	-	-	-
	CotF	+	+	+	+	-	-
	CotU	+	-	-	-	-	-
	CotT	+	-	-	-	-	-
	GerQ	+	+	+	+	-	-
	CotB	+	-	+	+	-	-
	CotC	+	-	-	-	-	-
	CotW	+	+	-	-	-	-
	CotX	+	+	+	-	-	-
	CotY	+	+	+	+	-	-
	CotZ	+	+	+	+	+	-
	CotJA	+	+	+	+	-	-
CotJB	+	+	+	+	+	+	

*B.s* : *Bacillus subtilis* 168, *B.a* : *B. anthracis* Sterne, *B.c* : *B. cereus* ATCC 10987, *B.t* : *B. thuringiensis* 97-27, *C.p* : *Clostridium perfringens* ATCC 13124, *C.d* : *Clostridium difficile* 32g58

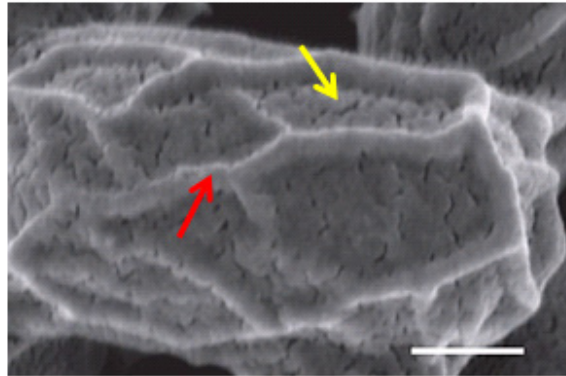
+ : Orthologue present

- : Orthologue absent

D'après Henriques et al (2007) et Abhyankar et al (2013)

### 2.2.5.3. Surface des tuniques

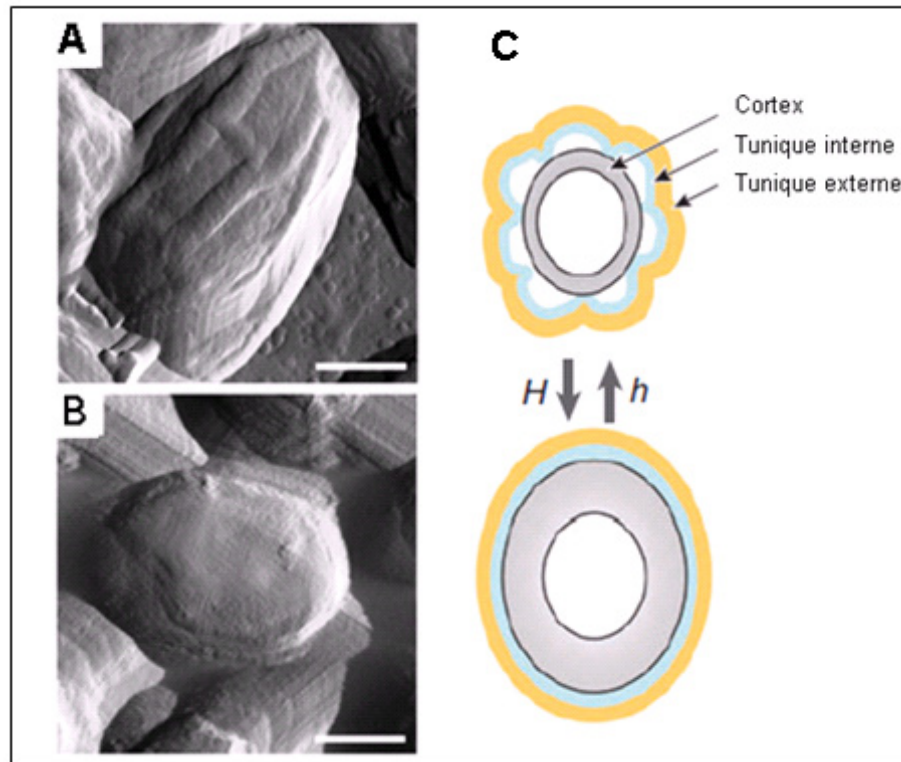
Des travaux utilisant la microscopie à force atomique (MFA), révèlent la présence de crêtes de 85 nm d'épaisseur et 12 nm de haut à la surface des spores de *B. subtilis* (Figure 19) (Chada et al. 2003; Sahin et al. 2012). On observe également à l'intérieur des crêtes, des bosses circulaires d'un diamètre de 7 à 20 nm (Chada et al. 2003; Henriques and Moran 2007; Plomp et al. 2014).



**Figure 19 : Observation de la surface des spores de *B. subtilis***

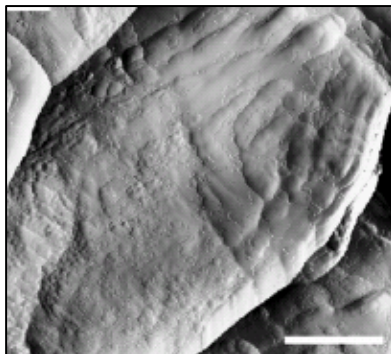
Les spores de *B. subtilis* sont observées au microscope à force atomique. Les flèches rouges montrent les crêtes et les jaunes les bosses circulaires de la surface. La barre d'échelle correspond à 250 nm. D'après Sahin et al (2012).

En fonction de l'humidité du milieu de sporulation, on observe des modifications de la surface et de la taille des spores. Chez *B. thuringiensis*, plus l'humidité du milieu est élevée plus la taille des spores est grande (Westphal et al. 2003). De plus, pendant la germination et l'afflux d'eau, la surface des tuniques s'étend pour suivre l'expansion du cortex et/ou du cœur de la spore, ce qui est visualisé en microscopie de force atomique par une disparition des crêtes à la surface des spores (Figure 20) (Chada et al. 2003; Henriques and Moran 2007; Sahin et al. 2012). Ces observations suggèrent que les tuniques peuvent s'accommoder aux changements physiques (gonflement et rétrécissement de la spore) causés par la contraction ou l'expansion du cortex et/ou du cœur de la spore (Driks 2003; Plomp et al. 2014).



**Figure 20 : Observation de spores de *B. subtilis* en germination par microscopie à force atomique**

Observation de spores  $\Delta cotE$  de *B. subtilis* en MFA. La surface de la spore apparaît lisse et irrégulière endroit. La barre d'échelle correspond à 350 nm. D'après Chada et al (2003).



**Figure 21 : Spores  $\Delta cotE$  de *B. subtilis* observées par microscopie à force atomique**

Spores de *B. subtilis* dormantes (A) et germées (B) en MFA et en représentation schématique (C). H : influx d'eau, h : déshydratation du cœur. Barres d'échelle A : 125 nm, B : 583 nm. D'après Henriques et al (2007) et Chada et al (2003)

L'absence chez *B. subtilis* de la protéine CotE qui joue un rôle dans l'assemblage de la tunique externe entraîne la disparition des crêtes et bosses de la surface des spores (Figures 21) (Chada et al. 2003; Plomp et al. 2014).

L'observation de coupes de ces spores au microscope électronique à transmission montre que les tuniques ne sont plus accolées au cortex (Bauer et al. 1999; Driks 1999). Ces résultats suggèrent que ces aspérités de surface sont liées en grande partie à la tunique externe et que CotE pourrait jouer un rôle dans le maintien de ses propriétés d'élasticité (Chada et al. 2003).

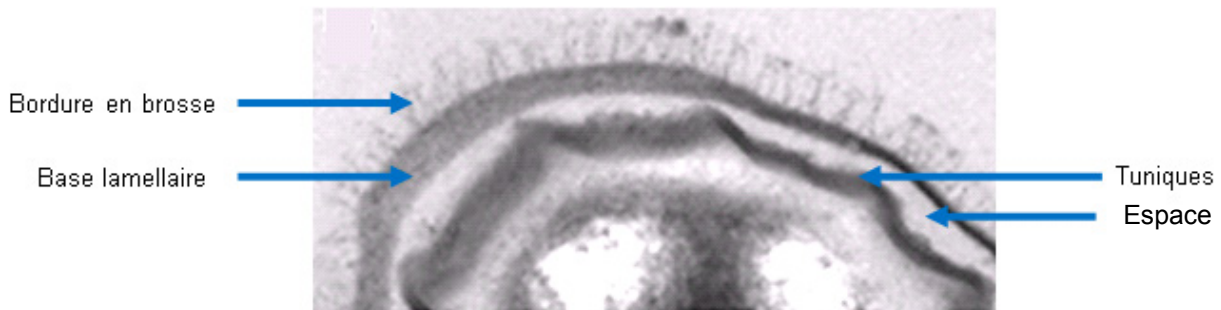
## 2.2.6. L'exosporium

### 2.2.6.1. Structure et composition

Les spores de *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. anthracis*, and *B. mycoides*, et certaines espèces du genre *Clostridium* ont une couche externe appelée l'exosporium. Chez *B. subtilis* cette structure la plus externe est différente et appelée le *crust* (Leggett et al. 2012).

De nature perméable et hydrophobe, l'exosporium est de composition chimiquement complexe. Chez les bactéries du genre *Bacillus*, l'exosporium est composé principalement de protéines (43 - 52 %) mais aussi de lipides (15 - 18 %), de glucides (20 - 22 %), ainsi qu'un composé mineur (4 %), décrit sous forme de cendre contenant du calcium, du magnésium et des composés indéterminés (Leggett et al. 2012).

L'exosporium est décrit, chez les *Bacilli* et certaines espèces des *Clostridia*, comme une masse transparente souple qui ne semble pas être attachée au reste de la surface de la spore. D'une épaisseur de 25 à 40 nm, il est composé d'une partie inférieure lamellaire d'une épaisseur de 190 Å et d'une partie supérieure plus aérienne composée d'appendice de 10 nm de diamètre formant une bordure en brosse (Figure 22) (Sylvestre et al. 2003; Plomp et al. 2005; Henriques and Moran 2007; Lequette(b) et al. 2011).



**Figure 22 : Ultrastructure de l'exosporium des spores**

Agrandissement d'une coupe de spores de *B. cereus* observée en microscopie électronique à transmission (MET). Barre d'échelle : 100 nm. D'après Lequette et al (2011)

Chez certaines espèces des genres *Bacilli* et *Clostridia*, de longs appendices ont pu être observé à la surface de l'exosporium et contribuent aux propriétés d'hydrophobicité et d'adhérence des spores (Plomp et al. 2005; Tauveron et al. 2006; Henriques and Moran 2007). Chez *B. cereus* et *B. anthracis*, l'exosporium est à une distance de 10 à 20 nm de la surface de la tunique externe. Cette distance varie autour de la spore suggérant l'élasticité de l'exosporium (Henriques and Moran 2007). L'analyse par microscopie électronique à transmission de l'espace entre ces deux structures ne révèle aucun matériel visible pouvant le combler (Giorno et al. 2007).

#### 2.2.6.2. Les protéines de l'exosporium

Les filaments de la bordure en brosse de l'exosporium sont principalement constitués de la protéine BclA, mais aussi de la protéine BclB en plus petite quantité (Sylvestre et al. 2002; Thompson and Stewart 2008). La protéine BclA est composée de trois domaines : un domaine N-terminale (NTD) impliqué dans l'ancrage de la protéine dans la base lamellaire de l'exosporium, un domaine C-terminale (CTD) formant la région finale des filaments et une région centrale (CLR) (Boydston et al. 2005; Thompson and Stewart 2008; Lequette(b) et al. 2011).

Parmi les protéines de la base lamellaire, on retrouve les protéines, ExsFA et ExsFB qui participent à l'ancrage de la protéine BclA (Steichen et al. 2005; Sylvestre et al. 2005). Au total, une vingtaine de protéines a été identifiée dans l'exosporium de *B. cereus* et *B. anthracis* mais peu d'information existe sur leurs fonctions (Steichen et al. 2003; Todd et al. 2003; Liu et al. 2004; Redmond et al. 2004; Henriques and Moran 2007; Abhyankar et al. 2013). Parmi celles dont on connaît le rôle, on retrouve les protéines ExsY et CotY, orthologues de CotY et CotZ chez *B. subtilis*, qui sont nécessaires à l'assemblage de l'exosporium autour de la spore de *B. anthracis* et *B. cereus* (Redmond et al. 2004; Boydston et al. 2006; Johnson et al. 2006; Steichen et al. 2007; Kailas et al. 2011). Quelques études, suggèrent la présence de protéines de l'exosporium dans l'espace le séparant de la tunique externe, dont les protéines ExsK, ExsFB et lunH (Giorno et al. 2009; Severson et al. 2009).

Certaines de ces protéines telles BxpA, BxpB (ou ExsFA), BxpC, ExsC, ExsD, ExsE, ExsFB et ExsG sont uniquement retrouvées chez les bactéries du groupe *B. cereus* (Steichen et al. 2003; Todd et al. 2003; Steichen et al. 2005; Sylvestre et al. 2005). Ces données suggèrent que les autres espèces possèdent un ensemble de protéines qui leur est propre (Tableau 3) (Henriques and Moran 2007; Abhyankar et al. 2013).

Tableau 3 : Conservation des protéines de l'exosporium de *B. anthracis*

Fonction	Protéine	<i>B. a</i>	<i>B. c</i>	<i>B. s</i>	<i>B. t</i>	<i>C. p</i>	<i>C. d</i>
Enzymes	Alr	+	+	+	+	+	+
	Fe/Mn-SOD	+	+	+	+	+	+
	InH	+	+	-	+	+	+
Non définie	BclA	+	+	-	+	-	-
	ExsY	+	+	+	+	-	-
	CotY	+	+	+	+	-	-
	CotB	+	+	+	+	-	-
	ExsB	+	+	-	+	-	-
	ExsC	+	+	-	+	-	-
	ExsD	+	-	-	+	-	-
	ExsE	+	+	-	+	-	-
	BxpB (ExsFB)	+	+	-	+	-	-
	ExsG	+	+	-	+	-	-
	ExsJ	+	+	-	+	-	-
	ExsK	+	+	-	+	-	-
	ExsFA	+	+	-	+	-	-

*B. a* : *B. anthracis* Sterne, *B. c* : *B. cereus* ATCC 10987, *B. s* : *Bacillus subtilis* 168, *B. t* : *B. thuringiensis* 97-27, *C. p* : *Clostridium perfringens* ATCC 13124, *C. d* : *Clostridium difficile* 32g58

+ = Orthologue présent

- = Orthologue absent

D'après Henriques et al (2007) et Abhyankar et al (2013)

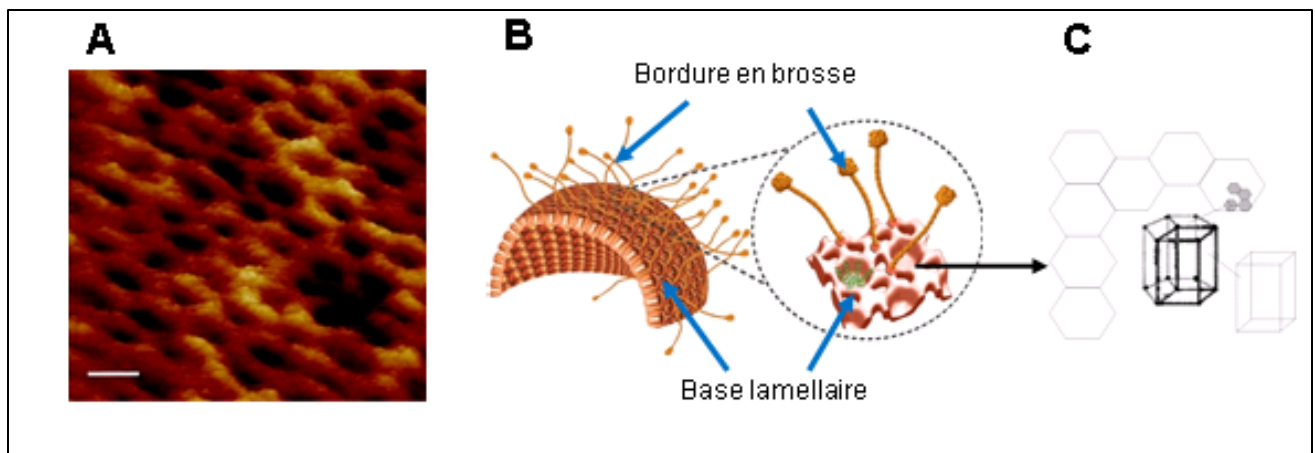
Des orthologues de protéines, impliquées dans l'assemblage des tuniques chez *B. subtilis*, sont présentes chez *B. cereus* et jouent un rôle dans la formation de l'exosporium : ExsA, orthologue de SafA, CotE, ExsB, une protéine phosphorylée orthologue de CotY de *B. anthracis* et CotG de *B. subtilis*, CotB, CotY, ExsY et ExsK orthologues de CotZ et CotX, qui sont avec CotY des protéines du crust chez *B. subtilis* (Todd et al. 2003; Redmond et al. 2004; Bailey-Smith et al. 2005; Henriques and Moran 2007).

Bien que de nombreuses protéines aient été identifiées dans l'exosporium des spores de *B. cereus* et *B. anthracis*, la fonction exacte de certaines d'entre elles dans la spore n'est pas connue. Cependant, certaines sont des enzymes, telles que l'alanine racémase Alr, l'inosine hydrolase InH et la superoxyde dismutase SOD [Fe/Mn] (Steichen et al. 2003; Todd et al. 2003; Redmond et al. 2004). La localisation de ces enzymes dans la structure de l'exosporium n'a pas encore été déterminée mais elles pourraient être présentes dans la bordure en brosse ou dans la base lamellaire et avoir directement accès à leurs substrats depuis cette localisation.



### 2.2.6.3. Surface de l'exosporium

Visualisé par microscopie de force atomique, l'exosporium possède une surface composée de motifs de forme hexagonale (Plomp et al. 2005; Ball et al. 2008; Kailas et al. 2011). Ces protubérances, de 3 nm d'épaisseur et de 20 à 30 nm de large, forment la base de filaments fins (1 nm) et courts (50 à 60 nm) caractéristiques de la bordure en brosse (Figure 23) (Dromigny 2008; Kailas et al. 2011). L'interprétation schématique de l'ultrastructure de la membrane basale de l'exosporium permet de représenter une unité parallélépipédique qui mesure de 0,75 nm à 0,78 nm de large et 1,18 nm à 1,20 nm de long. Une unité hexagonale correspond alors à l'assemblage de 48 de ces unités parallélépipédiques.



**Figure 23 : Observation de la surface de l'exosporium de *B. thuringiensis* par microscopie à force atomique**

Grossissement de la surface d'une spore de *B. thuringiensis* 4D11 observée en MFA (A). Représentation schématique de la surface de l'exosporium avec la base lamellaire et la bordure en brosse (B) et d'une unité parallélépipédique composant cette structure (C). Barre d'échelle : 10 nm. D'après Kailas et al (2011) et Dromigny et al (2008)

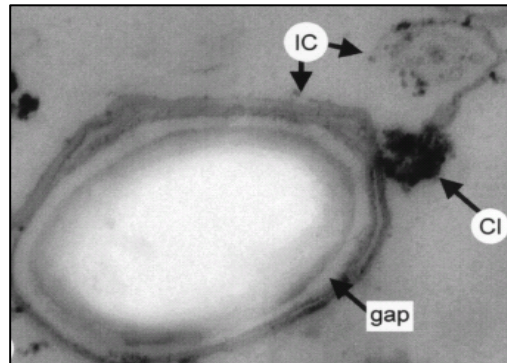
## 2.3. Mécanismes d'assemblage des enveloppes de la spore

### 2.3.1. La protéine morphogénétique CotE

CotE est une protéine morphogénétique de 24 kDa initialement caractérisée chez *B. subtilis* comme régulant la déposition de protéines de tunique externe et certaines protéines de tunique interne (Zheng et al. 1988). La mutation du gène *cotE* ne modifie pas l'expression des gènes codant pour des protéines de tuniques. Cependant, certaines protéines telles que CotS, CotA et CotC ne sont pas retrouvées dans les spores d'une souche  $\Delta cotE$  (Zheng et al. 1988; Takamatsu et al. 1998). CotE contrôle l'assemblage direct ou indirect de la plupart des protéines de tuniques (Bauer et al. 1999; Driks 1999; Little and Driks 2001; Takamatsu and Watabe 2002; Henriques and Moran 2007; Abel-Santos 2012; Plomp et al. 2014). Elle est alors capable d'interagir directement avec certaines

protéines de tuniques dont CotC, CotU et SpoVID mais également avec elle-même en formant des multimères (Isticato et al. 2001; Abhyankar et al. 2011; de Francesco et al. 2012; Qiao et al. 2013).

En microscopie électronique à transmission (MET), les spores  $\Delta cotE$  apparaissent dépourvues de crust et de tunique externe, qui semblent s'accumuler à la surface de la spore. De plus, un espace apparaît entre la tunique interne et le cortex, peut être dû à une plus grande souplesse de la tunique interne (Zheng, Donovan et al. 1988; Henriques and Moran 2007) (Figure 24).

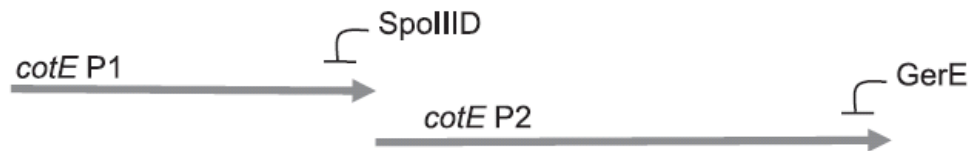


**Figure 24 : Observation des spores  $\Delta cotE$  de *B. subtilis***

Coupe de spore observée au microscopie électronique à transmission qui permet de visualiser les enveloppes de la spore affectées par la mutation de *cotE*. IC : tunique interne, CI : amas de tunique externe. D'après Zheng et al (1988)

Selon Aronson et Fitz-James, le mutant  $\Delta cotE$  ne possède pas « d'undercoat » qui assure l'accrolement du cortex et de la tunique interne, ce qui expliquerait l'espace visualisé (Driks 1999). Selon Giorno et al (2007), CotE confère une élasticité aux tuniques en forçant son contact avec le cortex (Giorno et al. 2007). En effet, l'absence de CotE, l'absence de tunique externe et/ou l'absence de protéines dont l'assemblage dépend de CotE pourraient expliquer que les spores  $\Delta cotE$  aient des tuniques d'un plus grand diamètre (Zheng et al. 1988; Driks 1999). Les spores  $\Delta cotE$  conservent leur thermorésistance mais l'absence de CotE entraîne un défaut de germination des spores, une diminution de la résistance au lysozyme, à l'acide nitreux, à l'hypochlorite de sodium, au peroxyde d'hydrogène, une plus grande résistance aux UV-C et une plus grande vulnérabilité à la prédation (Zheng et al. 1988; Driks 1999; Riesenman and Nicholson 2000; Setlow 2006; Setlow 2014).

Chez *B. subtilis*, l'expression du gène *cotE* a lieu en deux temps, avant et après la formation de l'endospore et sous le contrôle de deux types de promoteurs (Figure 25) (Costa et al. 2007). Le promoteur P1 est reconnu par le facteur  $\sigma^E$  et la transcription est initiée peu de temps après la division asymétrique puis stoppée par SpoIIID. Avant l'apparition des tuniques, la transcription a lieu par l'activation du promoteur P2 par  $\sigma^K$  et SpoIIID. La transcription est alors définitivement stoppée par GerE.



**Figure 25 : Contrôle de l'expression du gène *cotE* chez *B. subtilis***

L'expression du gène *cotE* est sous le contrôle du promoteur 1 dont l'activité est réprimé par SpolIID (*cotE* P1) puis du promoteur 2 réprimé par GerE (*cotE* P2). D'après Costa et al (2007)

Chez *B. anthracis*, les spores  $\Delta cotE$  présentent un exosporium partiellement ou entièrement détaché de la spore. Contrairement aux spores  $\Delta cotE$  de *B. subtilis*, les spores ne sont pas moins résistantes au lysozyme mais ont des capacités de germination affectées comme chez *B. subtilis*. (Giorno et al. 2007).

L'observation des spores en MET permet de visualiser des tuniques internes et externes qui semblent intègres bien que moins accolées au cortex et un exosporium fragmenté qui n'entoure pas la spore (Figure 26) (Giorno et al. 2007). Ces résultats suggèrent que chez *B. anthracis*, la protéine CotE joue un rôle majeur dans l'assemblage de l'exosporium, mais un rôle plus limité dans la formation des tuniques.



**Figure 26 : Observation de spores  $\Delta cotE$  de *B. anthracis***

Coupe de spore observée au microscope électronique à transmission qui permet de visualiser les enveloppes de la spore affectées par la mutation de *cotE*. ct : tuniques, cx : cortex, e : exosporium. D'après Giorno et al (2007)

L'absence de CotE chez *B. subtilis* entraîne la disparition de la moitié des protéines de tuniques (Zheng et al. 1988; Bauer et al. 1999; Little and Driks 2001). Chez *B. anthracis*, seulement une protéine BAS2377 (dont on ignore la localisation et la fonction), est absente dans les spores  $\Delta cotE$  (Giorno et al. 2007). Sur les 24 protéines dont l'assemblage est contrôlé par CotE chez *B. subtilis*, 16 sont retrouvées chez *B. anthracis* (Zheng, et al. 1988; Little and Driks 2001; Kim et al. 2006; Giorno et al. 2007). Une hypothèse suggère l'implication de CotE dans l'assemblage des protéines CotY et ExsY de l'exosporium de *B. cereus*, ces protéines étant des orthologues de la protéine de tunique CotZ de *B. subtilis* dont l'assemblage est contrôlé par CotE (Johnson et al. 2006).

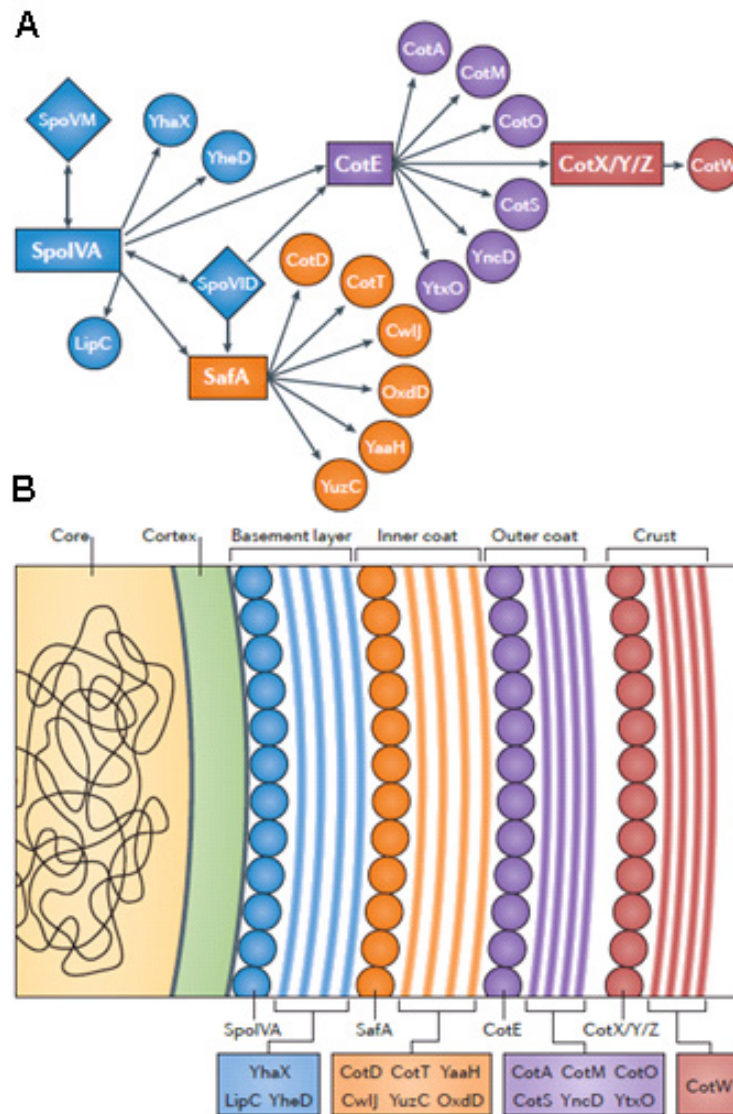
Bien qu'il semble que le rôle de la protéine CotE soit différent chez *B. subtilis* et *B. anthracis*, CotE semble être importante pour l'assemblage des protéines dans les enveloppes de la spore chez les deux espèces.

L'identification des protéines de l'exosporium de la souche *B. cereus* ATCC 10876, après migration sur gel SDS-PAGE et séquençage N-terminale, révèlent la présence dans l'exosporium d'une bande de 12 kDa correspondant à la N-terminale de la protéine CotE (Todd et al. 2003). Ce résultat suggère que CotE attache l'exosporium aux tuniques.

Bien qu'une protéine présentant une certaine homologie à la protéine CotE ait été identifiée dans les espèces du genre *Clostridium*, il semble peu probable que ce soit un homologue fonctionnel de CotE des *Bacilli* (Paredes-Sabja et al. 2014).

### **2.3.2. L'assemblage des tuniques**

L'assemblage des tuniques est un processus complexe qui repose sur réseau important d'interactions protéiques (Figure 27) (Takamatsu and Watabe 2002; Henriques and Moran 2007; McKenney, Driks et al. 2010; McKenney, Driks et al. 2013). Chez *B. subtilis*, des protéines produites dans la cellule mère se déposent progressivement autour de la préspore pour former les tuniques internes et externes : au cours des étapes précoces de la sporulation, la protéine morphogénétique SpoIVA, est produite dans la cellule mère sous le contrôle du facteur  $\sigma^E$ . Elle se positionne près de la membrane du septum par interaction avec la protéine SpoVM (Ramamurthi et al. 2006). Formant ensuite un anneau autour de la préspore, SpoIVA initie la formation de la « pré-tunique » en interagissant avec une autre protéine morphogénétique, SpoVID, qui assure elle-même l'assemblage de la protéine morphogénétique SafA. Ces protéines sont la base de l'assemblage d'autres protéines, dont CotE, dans cette « pré-tunique ». Divers études montrent que la protéine CotE forme un anneau autour de la préspore et donc à la surface de la « pré-tunique » (Driks et al. 1994; Webb et al. 1995; McKenney et al. 2010; de Francesco et al. 2012).



**Figure 27: Représentation schématique du réseau d'interactions des protéines de tuniques chez *B. subtilis*.**

(A) Représentation spatiale des interactions à l'origine des enveloppes de la spore : la « pré-tunique » (bleue), la tunique interne (orange), la tunique externe (violet) et le crust (rouge). Chacune de ces enveloppes possède respectivement une protéine morphogénétique : SpoIVA, SafA, CotE and CotX/CotY/CotZ. (B) l'assemblage de chaque enveloppe est contrôlée par les protéines morphogénétiques qui assurent la mise en place des protéines en couches successives. D'après McKenney et al (2013).

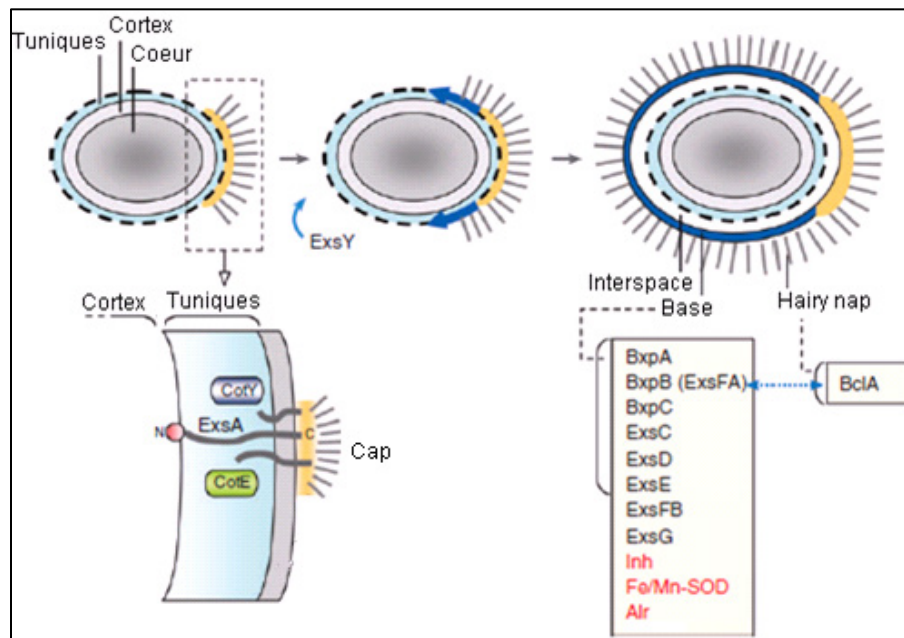
La formation de la tunique interne et de la tunique externe sont deux événements concomitants, sous le contrôle du facteur  $\sigma^K$ . Chez *B. subtilis*, l'espace de 75 nm formant la « pré-tunique » délimité par l'anneau de CotE est le site de formation de la tunique interne. L'anneau de CotE sert également de support à la formation de la tunique externe, CotE se trouvant alors à l'interface tunique interne et tunique externe. Elle contribue majoritairement à l'assemblage des protéines des tuniques interne et externe et du crust, bien que certaines protéines s'assemblent aussi indépendamment de CotE (Driks et al. 1994; Henriques and Moran 2007; McKenney et al. 2010; Leggett et al. 2012; McKenney et al. 2013).

Le détail de ce mécanisme d'assemblage est principalement décrit chez *B. subtilis*. On peut s'interroger sur l'existence d'une autre organisation chez les bactéries sporulantes possédant un exosporium.

### 2.3.3. L'assemblage de l'exosporium

Peu d'études décrivent à ce jour le mécanisme d'assemblage de l'exosporium chez les bactéries du groupe *B. cereus*, mais certaines ont suggéré des modèles hypothétiques, tels ceux décrits pour *B. anthracis* (Figure 28) (Henriques and Moran 2007).

La protéine ExsA de *B. cereus*, orthologue de SafA chez *B. subtilis*, est indispensable à l'attachement de l'exosporium aux tuniques (Bailey-Smith et al. 2005). La formation de l'exosporium débute en un point de la cellule appelé « cap » puis se prolongerait sur toute la surface de la préspore (Henriques and Moran 2007; Thompson and Stewart 2008; McKenney et al. 2013). Boydston et al (2005) ne retrouve pas de ce point initial de formation dans les spores  $\Delta cotE$  et suggère que cette protéine est nécessaire à l'attachement du « cap » à la surface des tuniques (Boydston et al. 2005).



**Figure 28 : Représentation schématique de l'assemblage de l'exosporium chez les *Bacilli***

Les principales étapes de l'assemblage des tuniques et de l'exosporium chez les *Bacilli* sont représentées, ainsi que le rôle de SpoIVA, ExsA et CotY dans les étapes initiales de l'assemblage de l'exosporium. Certaines de ces protéines sont retrouvées en association avec l'exosporium des spores matures. Les enzymes sont en rouges (Inh ; inosine nucleoside hydrolase ; SOD, superoxide dismutase ; Alr, alanine racemase). La double flèche entre BclA et la protéine de la base lamellaire de l'exosporium BxpB (ExsFA) représente leur dépendance respective pour leur assemblage dans l'exosporium. D'après Henriques et al (2007).

L'assemblage des tuniques semble avoir lieu au même moment et en un même point d'origine que celui de l'exosporium (Giorno et al. 2007; Henriques and Moran 2007). Les deux structures



connectées par des éléments de l'espace entourent progressivement la surface de la présore. A chaque étape, on observe l'assemblage de la base et de la bordure en brosse de l'exosporium (Henriques and Moran 2007). BxpB est la protéine nécessaire à l'assemblage des protéines de la base de l'exosporium. Ce complexe est indispensable au bon ancrage de BclA, la protéine majoritaire de la bordure en brosse (Steicheny et al. 2005).

Peu d'informations ont été réunies à ce jour sur la formation de l'exosporium chez *C. difficile*. Cependant, deux études récentes montrent qu'une protéine orthologue à BclA est présente dans l'exosporium et qu'une protéine unique à *C. difficile*, CdeC, joue un rôle essentiel dans l'assemblage de l'exosporium (Barra-Carrasco et al. 2013; Paredes-Sabja et al. 2014).

### **3. Impact des conditions de sporulation sur les propriétés et la structure des spores**

#### **3.1. Introduction**

La sporulation est un processus de différenciation qui peut avoir lieu dans des environnements changeants et variés (température, pH, milieu...). La structure unique des spores est à l'origine de leurs propriétés de résistance et leur persistance dans l'environnement. Des travaux ont précédemment montré l'influence de l'environnement sur le processus de sporulation, ainsi que les conséquences sur les propriétés et caractéristiques des spores bactériennes. Le paragraphe suivant présente une synthèse bibliographique que je souhaite soumettre pour publication dans la revue « Research in Microbiology ».

#### **3.2. Revue: *Environment of sporulation impacts structure and properties of Bacillus spores***

Manuscrit en préparation

**Christelle Bressuire-Isoard<sup>1,2</sup>, Véronique Broussolle<sup>1,2</sup>, Frédéric Carlin<sup>1,2</sup> #**

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

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

#: corresponding author: frederic.carlin @avignon.inra.fr

Keywords: spore resistance, germination, outgrowth, sporulation environment, spore structure

### 3.2.1. Abstract

Spore formation is a lifestyle used by some bacteria to survive in hard environments and to deal with lethal extreme conditions. Bacterial spore resistance results from protective multilayer structures and the unique spore core composition. The environmental conditions in which spores are formed strongly impacts their structure, composition and properties. In particular, the consequence of these modifications on spore resistance has been well studied in *Bacillus* species. The sporulation environment has also a strong influence on the spore life after dormancy ie germination and outgrowth.

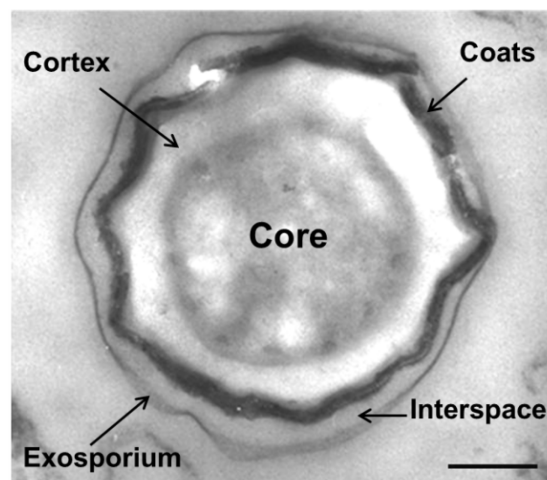
### 3.2.2. Introduction

Under stress conditions, bacteria from *Bacillaceae* sequester their genome in a resistant and dormant structure, the spore, which retains the capacity to sense changes in the environment and germinate if conditions become favorable to cell multiplication. Spore formation is one of the most sophisticated bacterial strategies to deal with a hostile environment. Spores known as the hardest form of life on Earth remain dormant and metabolically inert for a long period from thousands to millions of years (Gould 2006). Reports on spore longevity revealed the isolation of *Bacillus spp* spores from the gut of a fossilized 25 - 40 million years old bee and the recovery of *Bacillus* spores from a brine inclusion within a 250 million year old salt crystal from New Mexico (Cano and Borucki 1995; Vreeland et al. 2000).

Spores can be carried away by wind, water or living hosts to geographical locations far away from the sporulation site, and therefore in an environment not immediately suitable for growth. For example, the presence of thermophiles spores in cold environment is attributed to a dispersion from their initial habitat, such as geothermal aquifers and hydrothermal vents (de Rezende et al. 2013). If the environment becomes favorable, spores can rapidly break dormancy and re-initiate a life cycle by germination and outgrowth process. This life cycle represents a successful way for widespread dispersal of spore-forming bacteria on earth. Therefore, spores can be found in highly diverse environmental niches (soil, plant, animal, industry, hospital, human...). For example, in soil which represents the principal niche of spore-forming bacteria, cells are exposed to lethal extreme conditions with cycles of heat and cold, freezing and thawing, physical abrasion, desiccation or exposure to corrosive chemicals or solar radiation (Nicholson et al. 2000).

The sporulation process leads to spores which are structurally different from vegetative cells. Their extreme robustness results in part from the assembly of several protective structures (Figure 1).





**Figure 1: *Bacillus cereus* spore ultrastructure.**

Thin section of spores observed in transmission electron microscopy showing the spore core, the cortex, coat and exosporium layers. The exosporium is separated from the electron-dense coat by a region called the interspace. Bar scale: 200 nm. INRA (Avignon)

Some *Bacilli* species such as *B. cereus* or *B. anthracis*, form spores with an external “balloon-like” layer called the exosporium. The exosporium is the first point of spore contact with the environment and contributes to spore resistance and germination (Bailey-Smith et al. 2005; Johnson et al. 2006; Severson et al. 2009; Abel-Santos 2012). This structure is highly hydrophobic and contributes to adhesion of spores to cells and abiotic surfaces (Oliva et al. 2009; Lequette(b) et al. 2011; Xue et al. 2011). However, most of spore-forming bacteria do not have an exosporium. In *Bacillus subtilis*, an outermost structure has been recently identified and named the crust but no implication of this structure in spore resistance has been reported so far (Henriques and Moran 2007; McKenney et al. 2010; Imamura et al. 2011; Leggett et al. 2012; McKenney et al. 2013).

The spore coat is a complex structure which serves as an initial barrier to some chemicals or peptidoglycan-breaking enzymes (Nicholson et al. 2000; Young and Setlow 2003). Coat differentiated into an inner and outer layer is also essential for resistance to predation by protozoa, UV-light and mechanical disruption (Riesenman and Nicholson 2000; Gould 2006; Laaberki and Dworkin 2008; Setlow and Johnson 2013). The outer membrane lies to spore coats and may not have a significant role in spore resistance (Leggett et al. 2012; Sella et al. 2014; Setlow 2014).

The spore cortex peptidoglycan is a major factor in the protection of spore to heat by maintaining the dehydrated states of the core and plays a role also in dormancy (Driks 1999; Meador-Parton and Popham 2000; Sella et al. 2014). The inner membrane is characterized by a low permeability to small molecules and water, preventing most of chemicals to reach and damage the DNA (Paredes-Sabja and Sarker 2011). The core is necessary for spore resistance: it contains DNA

which is protected from radiations by small acid soluble proteins (SASP), high level of dipicolinic acid and minerals, and is characterized by a low water content (Sella et al. 2014; Setlow 2014).

All these structural factors are essential to assure the spore integrity regardless the type of environment and the dormancy duration. However, how the diverse environmental conditions in which spore are formed influence their properties? For instance, what is the difference between a spore formed in soil and a spore formed in the gut of animal or insect? This review will detail recent advances on the influence of sporulation conditions such as temperature, media composition and pH, oxygen availability and water activity on spore morphology, resistance, germination and outgrowth.

### **3.2.3. The environment determines the sporulation efficacy and spore characteristics**

Bacteria have to adapt to a variety of conditions in natural environment such as, fluctuating temperatures, pH, salt, oxygen or nutrient limitation. These environmental conditions have also a significant effect on the sporulation process and tremendous consequences on spore final morphology. Spores are routinely produced in laboratory at different temperatures and different oxygen supply, on solid or liquid media at various pH, either rich or limited in nutrients, which will determine the sporulation efficacy and the spore structure and composition.

#### *3.2.3.1. Sporulation efficacy*

Several studies described the yield and time to achieve sporulation, as a function of the media used for spore production (Table 1). It is assumed that sporulation of *Bacillus* species is a response to nutrient starvation (Driks 2002; Setlow et al. 2003; Piggot and Hilbert 2004). Appearance of spore is faster in nutrient deprivation conditions than with significant amounts of carbon and nitrogen in a medium (Atrih and Foster 2001; de Vries et al. 2005; Baweja et al. 2008). In poor nutrient media, the spores were mostly unstable and germinated after their release from the mother cell, unless harvested immediately (Atrih and Foster 2001). Addition of  $MnCl_2$  or other salts such as  $MgCl_2$ ,  $FeCl_3$ ,  $ZnCl_2$ ,  $CaCl_2$ , increased the sporulation efficacy of *Bacillus* species and improved the stability of spores which no longer underwent spontaneous germination (Atrih and Foster 2001).

The time required to obtain a complete sporulation process depends of the type of substrate present in the sporulation media: for *B. cereus* ATCC 14579, the higher the glutamate concentration, the longer the sporulation process was (de Vries et al. 2005). However, the temporal expression of key sigma factors involved in sporulation was similar for different glutamate concentrations (de Vries et al. 2005). Actually, glutamate did not delay the initiation of sporulation control by these

transcriptional factors but might rather impact the mother cells lysis or the spore maturation (de Vries et al. 2005). Sporulation time of *B. subtilis* was four times longer in absence than in presence of calcium (Minh et al. 2011). The calcium limitation might inhibit the formation of  $\text{Ca}^{2+}$ /DPA complex required for progression of sporulation process (Minh et al. 2011). A study reported that time for sporulation completion was similar for three strains of *B. cereus* cultivated on four different media in a continuous process where cell growth and sporulation occurred simultaneously (Mazas et al. 1995).

Other studies revealed the impact of the media on the final quantity of *B. cereus* and *B. subtilis* spore: removing calcium ions from the sporulation medium decreased the spore yield while no difference was observed when changing the type of carbon source or removing nutrient from the media (de Vries et al. 2005; Minh et al. 2011). Also, the combined effects of yeast extract, peptone and glucose contributed positively to the spore yield of *B. stearothermophilus* and *B. megaterium* (Penna et al. 2003; Verma et al. 2013). In the same way, the addition of glucose and ribose in the sporulating media increased the spore yield of *B. subtilis* (Warriner and Waites 1999; de Vries et al. 2005; Monteiro et al. 2005).

Other parameters such as water activity ( $a_w$ ) and pH influence the sporulation process. Decreasing the  $a_w$  of the sporulation medium leads to a decrease of the time of *B. subtilis* sporulation (Lee and Kim 1995; Minh et al. 2008). In contrast, the higher the  $a_w$  was, the higher the spore quantity obtained (Minh et al. 2008). The link between pH of the media and sporulation yield is species-dependent: *B. anthracis* was not able to sporulate at pH of 3 and 11, while *B. cereus* exhibited a low sporulation yield at pH lower or equal to 6.1 and higher and equal to 8.8 (Mazas et al. 1997; Baweja et al. 2008).

The sporulation also depends on temperature and oxygen availability. Some studies revealed that *Bacillus* sporulation is not possible at some temperatures. Indeed sporulation, efficacy decreased at temperatures lower or higher than the optimum growth temperature of the bacteria (González et al. 1999; Baweja et al. 2008; Garcia et al. 2010; Minh et al. 2011; Planchon et al. 2011). For instance, no spores of *B. anthracis*, whose optimum growth temperature is 37°C, were produced at temperatures lower than 25°C and higher than 45°C (Baweja et al. 2008). Sporulation of the psychrotrophic *B. weihenstephanensis* KBAB4 was possible even at low yield at 7°C, and the thermophilic *B. coagulans* ATCC 8038 strain produced more than 80 % of spores at 52°C (Garcia et al. 2010). The temperature affects both the length of the sporulation process and the quantity of spores obtained. Spore production of *Bacillus* species was higher and faster at temperatures close to the optimum growth of the studied strain (Nicholson et al. 2000). A shift of temperature during sporulation of *B. anthracis* significantly delayed the time to spore detection, which may be a consequence of the time required for

adaptation of bacteria to variation in temperature (Baweja et al. 2008). Although the yield of sporulation was the same, the time to obtain the spore was different from one temperature to another for *B. coagulans* and *B. cereus* strains (González et al. 1999; Planchon et al. 2011). For *B. subtilis* ATCC 31324, the highest quantity of spores was obtained in 4 days at 37°C and in 14 days and 10 days at 19°C and 45°C, respectively (Minh et al. 2011). Moreover, most scientific evidence strongly suggests that sporulation occurs within the growth temperature domain.

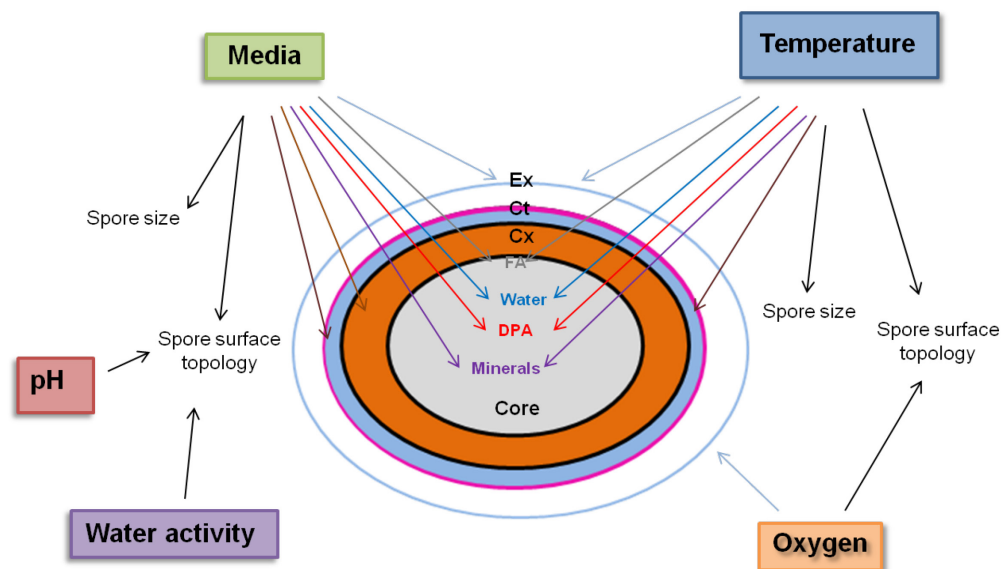
The yield of sporulation is also affected by oxygen availability: the quantity of spore produced was lower under oxygen limitation than in aerobiosis. Reciprocally, a high aeration level also resulted in higher spore counts for *B. thuringiensis* and *B. cereus* (Avignone-Rossa et al. 1992; Boniolo et al. 2012; Abbas et al. 2014). Under saturated conditions, the presence of non-sporulating cells increased so the sporulation yield never exceeded 50 % for *B. thuringiensis* H14 (Sarrafzadeh and Navarro 2006). Interestingly, once started, the sporulation of this strain was completed even if oxygen supply was interrupted (Sarrafzadeh and Navarro 2006).

Table 1: Impact of environmental conditions on sporulation efficacy

Environmental conditions of sporulation	Species	Consequences on sporulation	References
<b>Media composition</b>			
Salts	<i>B. subtilis</i> <i>B. megaterium</i> <i>B. cereus</i>	Addition of MnCl <sub>2</sub> , MgCl <sub>2</sub> , FeCl <sub>3</sub> , ZnCl <sub>2</sub> , CaCl <sub>2</sub> increased the spore concentration	(Atrih and Foster 2001)
	<i>B. subtilis</i>	Absence of Ca <sup>2+</sup> increased the time to achieve sporulation and decrease the sporulation yield	(Minh et al. 2011)
Carbon source	<i>B. subtilis</i> <i>B. anthracis</i> <i>B. cereus</i>	Absence of a carbon source decreased the time to achieve sporulation	(Atrih and Foster 2001) (Baweja et al. 2008) (de Vries et al. 2005)
	<i>B. steraothermophilus</i> <i>B. megaterium</i>	Combined effects of yeast extract, peptone and glucose increased the spore concentration	(Penna et al. 2003) (Verma et al. 2013)
	<i>B. subtilis</i>	Addition of glucose and ribose increased the spore concentration	(Warriner and Waites 1999) (Monteiro et al. 2005)
<b>Water activity <math>a_w</math></b>			
	<i>B. subtilis</i>	Decreasing the $a_w$ decreased the time to achieve sporulation and increasing the $a_w$ increased spore concentration	(Minh et al. 2008) (Lee and Kim 1995)
<b>pH</b>			
	<i>B. anthracis</i> <i>B. cereus</i> <i>B. licheniformis</i> <i>B. weihenstephanensis</i> <i>B. subtilis</i>	Impact on time to achieve the sporulation and the final spore concentration obtained. Existence of an optimum sporulation pH	(Baweja et al. 2008) (Mazas et al. 1997) (Baril et al. 2012) (Bari et al. 2012) (Minh et al. 2011)
<b>Temperature</b>			
	<i>B. weihenstephanensis</i>		(Garciat et al. 2010) (Planchon et al. 2011)
	<i>B. subtilis</i> <i>B. anthracis</i> <i>B. cereus</i>	Impact on time to achieve the sporulation and the final spore concentration obtained. Existence of an optimum sporulation pH	(Minh et al. 2011) (Baweja et al. 2008) (González et al. 1999)
<b>Oxygen</b>			
	<i>B. thuringiensis</i>	Impact on final spore concentration obtained	(Avignone-Rossa et al. 1992) (Boniolo et al. 2012) (Sarrafzadeh and Navarro 2006)
	<i>B. cereus</i>		(Abbas et al. 2014)

## 3.2.3.2. Variations in spore structures in response to environmental conditions

The sporulation environment strongly impacts the final spore structure (Figure 2).



**Figure 2: Impact of sporulation environment on *Bacilli* spore structure.**

Representation of spore structure: core, cortex (Cx), coats (Ct), exosporium (Ex) and fatty acids (FA). The core contains minerals, dipicolinic acid (DPA) and water. The five major environmental factors (medium, temperature, pH, water activity and oxygen) and their impact on the spore structure are represented.

A recent study showed that *B. cereus* spores produced on liquid medium were significantly smaller than those formed on agar plates (van der Voort and Abee 2013). The size of spores of eight *B. cereus* strains produced in air-liquid biofilms were shown to be larger than that of spores produced on liquid cultures or agar plates (van der Voort and Abee 2013). *B. thuringiensis* spores have been reported to swell and shrink in response to high and low relative humidity (Westphal et al. 2003; Sunde et al. 2009). However, the size of *B. anthracis* spore observed on atomic force microscopy was unaltered if the sporulation occurred in a poor nutrient medium or under acidic or alkaline conditions (Baweja et al. 2008). In the same way, no difference in the size of spores produced in anaerobic or aerobic conditions and observed by transmission electronic microscopy (Abbas et al. 2014).

Membrane fluidity is dependent on the fatty acid composition. It has been shown that the inner membrane of spores formed on plates had a higher ratio of anteiso- to iso-fatty acids than spores formed in liquid medium (Rose et al. 2007). Substantial modifications of the cortex peptidoglycan structure were observed for spores of various *Bacillus* species produced in a poor nutrient media, without carbon source, when compared to rich media (Atrih and Foster 2001). The authors hypothesized that a change in muropeptide ratio as a decrease in number of muropeptides containing  $\delta$ -lactam probably may reveal a functional defect of the cortex biosynthetic and/or maturation

machinery. Moreover, the addition of  $MnCl_2$  to the media affected the core dehydration but also the peptidoglycan composition, suggesting a role in the enzymatic activities involved in cortex biosynthesis (Atrih and Foster 2001). In a sporulation media without  $Ca^{2+}$ , *B. subtilis* spores were twice smaller than spores produced in a medium containing  $Ca^{2+}$  (Minh et al. 2011). Spores produced at low aeration or low water activity had a smooth surface spores whereas spores produced in a low calcium media and at modified pH or high temperature exhibited a rough-surface (Minh et al. 2008; Minh et al. 2011).

The temperature has a strong impact on spore morphology of different species. State of spore hydration is governed by the temperature during sporulation (Abel-Santos 2012). Since spore structures are sufficiently flexible to accommodate to volume changes during spore hydration, spore sizes can be governed by sporulation temperature (Baweja et al. 2008). This feature may explain also the impact of sporulation temperature on the spore surface. *B. subtilis* spores produced at high temperatures had a rougher structure (Minh et al. 2011). The prevalence of *B. cereus* spores with damage exosporium increased at high temperature (Faille et al. 2007; Abbas et al. 2014). As a function of temperature, significant variations were observed in the sizes of *B. anthracis* spores, with smaller spores at high temperatures for an unknown reason (Baweja et al. 2008). Some significant differences in fatty acid composition were observed between spores of *B. cereus* and *B. subtilis* produced at different sporulation temperatures: for *B. cereus*, the total amount of anteiso fatty acids increased in spore produced at low temperature and for *B. subtilis* the ratio anteiso/iso and amount of unsaturated fatty acids increased when the temperature decreased (Cortezzo and Setlow 2005; Planchon et al. 2011). The cortex peptidoglycan in spores prepared at different temperatures showed subtle changes in structure, with only a small increase in the percentage of muramic acid with a crosslink in spores prepared at high temperatures (Melly et al. 2002).

### 3.2.3.3. Variations in spore water, minerals and protein composition

Spores are able to accumulate a number of minerals with  $Ca^{2+}$  as the main component. The contents of individual minerals in spores of *B. megaterium* were flexible and dependent on the relative concentration of the particular mineral in the sporulation media (Abel-Santos 2012) (Figure 2). The addition of  $MnCl_2$  in a sporulation media increased the quantity of  $Mn^{2+}$  in spores of *B. subtilis* (Minh et al. 2011). Spores of different *Bacillus* strains prepared on nutrient agar with the mix of metals ions ( $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $K^+$  and  $Mn^{2+}$ ) appeared to have a lower water contents than those prepared on nutrient agar with only  $Mn^{2+}$  or in a media without the mix of metals ions (Cazemier et al. 2001; Minh et al. 2011). The type of sporulation media, liquid or solid did not seem to impact DPA and water spore content but the media composition did (Cazemier et al. 2001; Rose et al. 2007; Minh et al. 2011).

Spores of *B. cereus* produced on a sporulation medium with low concentration of glutamate had lower water content compared to those obtained with a higher glutamate quantity (de Vries et al. 2005).

Spores of *B. subtilis* strains that lack the ability to synthesize DPA and sporulate in a media without DPA had much more core water than the spores formed with DPA (Paidhungat et al. 2000). Presumably, DPA replaces the spore core water during the sporulation. The higher the DPA concentration is, the lower the water content is (Setlow 2006). Sporulation temperature had a strong impact on DPA and core water content. The amount of DPA in *B. cereus* and *B. anthracis* spores formed at a high temperature was higher than that of spores obtained at lower temperature (Baweja et al. 2008; Planchon et al. 2011). In contrast, *B. subtilis* spores prepared at different temperatures had the same amounts of DPA (Melly et al. 2002). The water content was lower in spores of *B. subtilis* HR and PS5832 strains prepared at high temperature than in spores formed at low temperature (Melly et al. 2002; Minh et al. 2011). However, other authors did not confirm the expected reduction of core water content with increasing sporulation temperature for *B. subtilis* PS533 (Kaieda et al. 2013). Higher sporulation temperature also correlated with higher levels of core spore mineralization (Palop et al. 1999; Igura et al. 2003).

It has been shown that the level of  $\alpha\beta$ -type SASP was the same for spores prepared at various temperatures, in liquid and solid media, but differences in spore coat protein composition was observed for *B. subtilis* spores (Melly et al. 2002; Setlow 2006). Among the notable differences, a reduction in intensity of several bands was observed in coat extracts of spores prepared at high sporulation temperature, corresponding to CotA, CotG, CotB and CotS proteins (Melly et al. 2002). Another study reported no major differences in relative levels of coat proteins extracted from spores produced on liquid or solid media (Rose et al. 2007). More proteins were readily extracted from spores prepared in liquid media, which suggested that these coat proteins were less cross-linked than in spores prepared on solid medium. However, the cross linking of GerQ, which was largely found in the insoluble fraction of the spore coat, was identical in spores from these two types of media (Ragkousi and Setlow 2004; Monroe and Setlow 2006; Rose et al. 2007). The spore pellet obtained from plates was darker than spores from liquid media. Even if this pigmentation is likely to be caused by CotA, due to its multicopper oxidase activity, no major differences in levels of CotA or any other coat protein were observed between these two kinds of media (Driks 1999; Rose et al. 2007).



### 3.2.4. Modulation of spore structure and composition: consequences on spore resistance

Interestingly, modifications of spore structures induced by different sporulation conditions might be related to changes in spore resistances.

#### 3.2.4.1. Spore heat resistance

##### 3.2.4.1.1. Factors of resistance

Resistance to extreme temperatures draws a major distinction between spores and vegetative cells of bacteria. Interestingly, heat shock proteins which play a major role in *Bacillus* heat stress response, do not have any significant role in spore heat resistance (Setlow 2000; Melly et al. 2002).

In general spores are more resistant to higher temperatures than growing cells, up to 40°C in moist-heat conditions and up to 30°C in dry-heat conditions (Setlow 2014; Checinska et al. 2015). The mechanisms of spore killing by wet and dry heat are different, corresponding respectively to protein damages and DNA damages. Resistance of *B. subtilis* to dry heat is related to the spore core where saturation of spore DNA with  $\alpha/\beta$ -type SASP and activation of DNA repair machinery implying RecA occurred during spore outgrowth (Table 2) (Nicholson et al. 2000; Setlow 2014).

**Table 2: Origin of spore physical and chemical resistances**

Type of treatment	Factors of resistance*
Dry heat	- Core: DNA SASP saturation and repair DNA system
Wet heat	- Core: DNA SASP saturation, high DPA Level, low water content and high minerals level - Cortex - Coats
UV radiation	- Core: DNA SASP saturation, DNA repair system and water content
Chemicals	- Core : DNA SASP saturation, repair DNA system, DPA level and water content - Inner membrane: low permeability - Cortex - Coat: detoxifying enzymes - Exosporium: detoxifying enzymes

\* Sources : (Driks 1999; Nicholson et al. 2000; Melly et al. 2002; Setlow 2006; Sella et al. 2014; Setlow 2014)

Resistance to wet heat involves numbers of factors present in the core, including minerals, DNA saturation with  $\alpha/\beta$ -type SASP, a low core water and a high DPA content (Setlow 2006; Setlow

2014). The increase of spore core water content decreases spore wet heat resistance. Interestingly, core water content does not decrease if DPA is not accumulated in the spore core (Magge, Granger et al. 2008). The low water content and reciprocally the high DPA content may results in reduced molecular mobility of core proteins. Thus the irreversible protein aggregation is preventing and proteins are protected against thermal denaturation (Sunde et al. 2009; Sella et al. 2014; Setlow 2014).

The spore cortex and coat of *B. subtilis* could play a role in spore heat resistance via their involvement in maintaining the dehydrated state of the spore core (Driks 1999). Coat and the level of peptidoglycan cross-linking in the cortex were described as important factors for the core water content preservation and protection of the spore interior (Atrih and Foster 1999).

#### 3.2.4.1.2. Impact of sporulation media

Several studies described the influence of sporulation conditions on spore heat resistance. *B. subtilis* spores produced on solid medium were more resistant to wet heat treatment than spores prepared in liquid medium (Table 3). Strangely, parameters known to affect spore wet heat resistance such as core water, DPA and  $\alpha/\beta$ -type SASP were identical in both types of spore (Rose et al. 2007). However, heat resistance depends on the specific characteristics of the solid sporulation media, such as the surface water and the viscosity of the agar plates: high viscosity resulted in more heat sensitive *B. cereus* spores than those produced at lower viscosity (Stecchini et al. 2009).

Sources of carbon or minerals have been reported to affect spore heat resistance. For example, *B. cereus* spores formed in a medium containing a high glutamate concentration had a higher heat resistance than those formed in presence of a lower glutamate concentration for a non-investigated reason (de Vries et al. 2005). The addition of phosphate in the sporulation media also increased heat resistance of *B. cereus* spores (Mazas et al. 2009). However, supplementation of a liquid medium with cysteine, cystine or thioproline did not lead to an increase of wet heat resistance of *B. subtilis* spores (Moeller et al. 2011). The presence of organic substances, such as proteins and carbohydrate, was shown to increase dry-heat resistance of *B. subtilis* spores whereas glucose reduced it (Molin and Östlund 1976).

The cationic environment of the sporulation media also affects the thermal spore resistance. The addition of  $Mn^{2+}$  to the sporulation medium promoted the increase of the wet heat resistance by affecting the peptidoglycan composition and core dehydration (Minh et al. 2011). In  $CaCl_2$  supplemented media, *B. megaterium* and *B. subtilis* spores had a higher heat resistance (Setlow

2006). *B. subtilis* spores exhibited a lower heat resistance if  $\text{Ca}^{2+}$  was substituted by  $\text{K}^+$  or  $\text{Na}^+$  in the sporulation medium (Kihm et al. 1990; Setlow 2006). *B. anthracis* spores, prepared on nutrient-deficient media with low mineral content, have been shown to be more sensitive to wet heat (Mazas et al. 1995; Baweja et al. 2008). Spores of *B. subtilis*, *B. licheniformis* and *B. coagulans* strains prepared on media with different mineral ions appeared to have a lower water content and be more heat resistant than spores with only one ion or completely demineralized (Cazemier et al. 2001; Igura et al. 2003). Indeed spore core mineralization and specific mineral ions increased spore dehydration and in consequence enhanced heat resistance but the underlying mechanism is not clear (Setlow 2006).

#### 3.2.4.1.3. Impact of sporulation temperature

Several studies have shown that spores of *Bacillus* species prepared at higher temperatures are generally more heat resistant than spores prepared at lower temperatures (Table 3) (Condon et al. 1992; Raso et al. 1995; González et al. 1999; Atrih and Foster 2001; Baweja et al. 2008; Garcia et al. 2010; Baril et al. 2011; Minh et al. 2011; Planchon et al. 2011; Bressuire-Isoard et al. 2015). Baril *et al* (2012) showed the existence of an optimum sporulation temperature for which the heat resistance was maximal (Baril et al. 2012). Indeed, spore core water content decreased as the sporulation temperature increased and, as previously mentioned, there was a reciprocal correlation between core dehydration and spore wet heat resistance (Atrih and Foster 2001; Melly et al. 2002). Moreover, higher sporulation temperature correlated with higher levels of spore mineralization which results as described below in higher heat resistance (Palop et al. 1999). In *B. anthracis*, high temperature result in higher DPA content and higher spore heat resistance but Melly et al (2002) were not able to found any difference in spore DPA content of *B. subtilis* spore prepared at different temperatures (Melly et al. 2002; Baweja et al. 2008). Sporulation temperature had subtle effect on cortex structure of *B. subtilis* spores which results in changes in core hydration (Melly et al. 2002). Nevertheless, the precise reason explaining why changes in water core content of spores formed at different temperatures was not linked to DPA content is still not known. Interestingly, spores of *Bacillus thermophiles* strains are more wet and dry heat resistant than spores of mesophilic strains likely because of their low core water content and the higher intrinsic thermostability of their proteins (Setlow 2006). Unlike wet heat, sporulation temperature had no effect on the dry heat resistance of *B. subtilis* spores (Melly et al. 2002).

Table 3: Impact of environmental conditions on spore heat resistance

Environmental conditions of sporulation	Species	Consequences on heat resistance	References
<b>Media</b>			
Viscosity and water surface	<i>B. cereus</i>	High viscosity of the media increased the resistance	(Stecchini et al. 2009)
	<i>B. cereus</i>	High glutamate concentration and addition of phosphate in the media increased the heat resistance	(de Vries et al. 2005) (Mazas et al. 2009)
Composition	<i>B. subtilis</i>	Addition of carbohydrates or proteins increased the dry heat resistance while addition of Mn <sup>2+</sup> and CaCl <sub>2</sub> increased the wet heat resistance	(Molin and Östlund 1976) (Minh et al. 2011) (Setlow 2006)
	<i>B. megaterium</i> <i>B. subtilis</i> <i>B. anthracis</i>	Low concentration of minerals in a media decreased the heat resistance. While a high concentration increase the resistance	(Setlow 2006) (Baweja et al. 2008)
<b>Temperature</b>			
	<i>Bacilli</i>	Increasing the sporulation temperature increases the heat resistance. A sporulation temperature for an optimum heat resistance can be defined for each strain	(Atrih and Foster 2001) (Baril et al. 2012) (Baweja et al. 2008) (Garciat et al. 2010) (González et al. 1999) (Minh et al. 2011) (Condon et al. 1992) (Planchon et al. 2011) (Raso et al. 1995) (Bressuire-Isoard, 2015)
<b>pH</b>			
	<i>B. anthracis</i> <i>B. cereus</i> <i>B. licheniformis</i> <i>B. weihenstephanensis</i> <i>G. stearothermophilus</i>	The impact of the pH on the heat resistance is strain-dependant and an optimum pH for heat resistance can be defined	(Bawejan et al. 2008) (Mazas et al. 1997) (Baril et al. 2012) (Guizelini et al. 2012)
<b>Water activity <math>a_w</math></b>			
	<i>B. subtilis</i>	Optimum $a_w$ for dry heat resistance	(Fine and Gervais 2005)
<b>Oxygen</b>			
	<i>B. subtilis</i>	Decreasing the aeration of a media increases the heat resistance	(Minh et al. 2008)
	<i>B. cereus</i>	Spores produced in anaerobiosis have a better heat resistance than spores produced in aerobiosis	(Abbas et al. 2014)

#### 3.2.4.1.4. Impact of sporulation pH, $a_w$ and oxygen

Fine and Gervais (2005) found the optimum  $a_w$  (0.30 - 0.50) for the highest dry heat resistance of *B. subtilis* spores and showed that thermal inactivation was less effective at lower or higher  $a_w$  than at this optimal  $a_w$  (Table 3) (Fine and Gervais 2005). Thi minh et al (2008) reported that *B. subtilis* spores produced at low  $a_w$  were less resistant to wet heat than those formed at high  $a_w$  (Minh et al. 2008). *B. anthracis* spores formed at acid pH were found to be more resistant to wet heat compared to spores formed at alkaline and neutral pH (Baweja et al. 2008). Heat resistance of *B. cereus* and *Geobacillus sterothermophilus* increased also with the sporulation pH (Mazas et al. 1997; Guizelini et al. 2012). The alkaline pH may increase mineralization of spores during sporulation further contributing to heat resistance. However, Baril *et al* (2012) showed the existence of an optimum pH for which the heat resistance of *B. weihenstephanensis* and *B. licheniformis* spores was maximal (Baril et al. 2012). Spores produced under low aeration condition (10 % of dissolved oxygen) have a higher resistant to heat than spores produced under standard oxygen condition (Minh et al. 2008). Spores of *B. cereus* produced under anaerobiosis are more resistant to wet heat resistance than spores produced in aerobiosis (Abbas et al. 2014).

#### 3.2.4.2. Spore resistance to physical and chemical injuries

Besides heat resistance, spores also exhibit resistance to a large number of factors, including desiccation, freezing and thawing, UV and  $\gamma$ -radiation, high pressures and a huge number of toxic chemicals with a variety of adverse effects including oxidizing agents, alkylating agents, aldehydes, halogens, acids and bases (Nicholson et al. 2000; Setlow 2014; Checinskai et al. 2015).

#### 3.2.4.2.5. Spore resistance factors

Resistance of spores to UV radiations is located on a scale from 10 to 50 times more compared to vegetative cells depending on the species (Nicholson et al. 2000). UV radiations lead to a novel photochemistry of DNA in spores with the production of photoproducts i) a thimidyl-thymidine adduct termed the spore photoproduct (SP) formed between adjacent thymidine residues on the same DNA strand ii) a cyclobutane dimer (CPDs) and a (6-4)-photoproduct (64PPs) formed between adjacent pyrimidine residues in the same DNA strand (Nicholson et al. 2000; Setlow 2006). Resistance to UV imply two major factors i) binding of  $\alpha/\beta$ -type SASPs to DNA molecules and ii) DNA repair during spore outgrowth (Table 2) (Setlow 2014). In addition to these major resistance factors, pigments present in outer layers, low water content and high level of DPA in the spore core also contribute to UV radiation resistance (Setlow 2014). *B. atropheus* spores were also resistant to  $\gamma$ -radiations which cause DNA, RNA and protein damages and imply factors of resistance, such as

components of the spore core, SASP, core hydration and DPA (Sella, Vandenberghe et al. 2014). As far as pulsed light radiation are concerned, the most efficient part of the spectrum is constituted by UV-C, the damages and the factor implied in the spore resistance might be the same as for UV-C treatments (Gomez-Lopez et al. 2007).

The mechanism of spore killing by chemical treatments, such as formaldehyde, nitrous acid, alkylating agents concerned DNA damages (Setlow 2014). Strong acid treatments, organic solvents at high temperatures and oxidizing agents such as hydrogen peroxide kill spores by damaging spore external layers (Cortezzo et al. 2004; Cortezzo and Setlow 2005). Those products affect mainly the inner membrane in which oxidation of unsaturated fatty acid results in membrane rupture and death. Alkali treatments mainly inactivated the outer layer lytic enzymes hydrolyzing the cortex during spore germination (Setlow 2014). The mechanism of spore killing for some other chemicals such as aldehydes remains unclear (Setlow 2006).

Resistance to chemicals imply a large number of factors as detoxifying enzymes of spore coat and/or exosporium, low permeability of the spore inner membrane, the DNA protection by  $\alpha/\beta$ -type SASPs and the DNA repair system (Setlow 2006; Sella et al. 2014; Setlow 2014). The spore coat is an initial barrier to large molecules which target the spore cortex. It plays a major role in spore protection against oxidizing agents as chlorine dioxide, hypochlorite, ozone and peroxyxynitrite but a minor role in resistance to hydrogen peroxide (Setlow 2000; Melly et al. 2002; Young and Setlow 2003). The DPA content of the spore core could be also involved in glutaraldehyde and  $H_2O_2$  resistances as *B. subtilis* DPA-less spores were more sensitive to that treatments than wild type spores (Paidhungat et al. 2000; Melly et al. 2002).

#### 3.2.4.2.6. Impact of sporulation media

As described for heat resistance, spore structural modifications induced by environmental conditions have an impact on resistance to physical and chemical treatments (Table 4). Spores of *B. subtilis* formed in liquid media were more sensitive to nitrous acid and super-oxidized water than spores formed on solid media. This could be due respectively to modifications of the inner membrane and of spore coat (Rose et al. 2007). Spores of *B. anthracis* formed in a poor nutrient medium were generally much more sensitive to hydrochloride, sodium hydroxide,  $H_2O_2$  and to UV radiation (Baweja et al. 2008). Baweja et al (2008) suggested that spores prepared in poor media were deprived of growth key elements such as carbon, nitrogen and divalent metal ions, all important for the mineral spore content, which is a major factor of spore resistance. However, no significant difference was observed in spore resistance to formaldehyde (Baweja et al. 2008). Supplementation of the

sporulation media with thioproline, cysteine or cystine resulted in significant increase in resistance of *B. subtilis* spores to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and solar UV radiations (290 - 400 nm) but not to 254 nm UV radiations (Moeller et al. 2011). This could be related to the formation of potential radioprotectants in the medium, which protect spore against specific reactive oxygen species ROS generated by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and solar UV radiations. Moreover, the increase in spore resistance was not observed after a decoating process, suggesting that uptake of these amino acids during sporulation increased the protecting role of the spore coat (Moeller et al. 2011).

Table 4: Impact of environment conditions on spore chemical and physical resistance

Environmental conditions of sporulation	Species	Consequences on spore resistance	References
<b>Media</b>			
Liquid/Solid	<i>B. subtilis</i>	Spore are more sensitive in liquid media to nitrous acid and super-oxidized water	(Rose et al. 2007)
	<i>B. anthracis</i>	Spore produced in a poor nutrient media are more sensitive to hydrochloride, UV and H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	(Baweja et al. 2008)
Composition	<i>B. subtilis</i>	Addition of thioproline, cysteine and cystine increased the resistance to UV (290 - 400 nm) and H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	(Moeller et al. 2011)
	<i>B. megaterium</i> <i>B. subtilis</i> <i>B. anthracis</i>	Low concentration of minerals in a media decreased the heat resistance. While a high concentration increase the resistance	(Setlow 2006) (Baweja et al. 2008)
<b>Temperature</b>			
	<i>B. cereus</i>	Decreased the temperature increase the resistance to high pressure and the sensitivity to sodium hydroxide pulsed light	(Planchon et al. 2011) (Young and Setlow 2003)
	<i>B. subtilis</i> <i>B. cereus</i>	Increasing the temperature increases the resistance to glutaraldehyde, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , and UV	(Atrih and Foster 2001) (Baril et al. 2012) (Mellyt et al. 2002) (Bressuire-Isoard et al. 2015)
	<i>B. subtilis</i>	Increased the temperature increase the resistance to super-oxidized water	(Melly et al. 2002)
	<i>B. anthracis</i>	Resistance to H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , Sodium hydroxide and hydrochloride is higher when the temperature increased	(Bawejan et al. 2008)
<b>pH</b>			
	<i>B. anthracis</i>	Acidic pH decreased the resistance to H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	(Baweja et al. 2008)
	<i>B. subtilis</i>	Alkali pH increased the resistance to high pressure	(Minh et al. 2011)
<b>Water activity <math>a_w</math></b>			
	<i>B. subtilis</i>	Decreased the $a_w$ decreased the resistance to high pressure	(Minht et al. 2008) (Minh et al. 2011)
<b>Oxygen</b>			
	<i>B. cereus</i>	Spores produced in anaerobiosis are more resistant to sodium hydroxide, nitrous acid and pulsed light	(Abbas et al. 2014)

#### 3.2.4.2.7. Impact of sporulation temperature

*B. cereus* spores produced at low temperature were more resistant to high pressure and more sensitive to pulsed light and sodium hydroxide while in contrast no difference was observed in formaldehyde, nitrous acid and calcium hypochlorite for *B. subtilis* spores (Table 4) (Melly et al. 2002; Young and Setlow 2003; Cortezzo et al. 2004; Rose et al. 2007; Planchon et al. 2011). *B. subtilis* and



*B. cereus* spores produced at high temperature were more resistant to glutaraldehyde and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and also to superoxidized water for *B. subtilis* (Melly et al. 2002; Young and Setlow 2003; Bressuire-Isoard et al. 2015). A possible explanation is that sporulation temperature influences protein composition of coat layers, cortex composition, membrane layers and DPA content (Melly et al. 2002; Setlow 2006; Planchon et al. 2011). Similarly, spores of *B. anthracis* formed at higher temperature were more resistant to hydrochloride, sodium hydroxide and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Baweja et al. 2008). Spores of *B. subtilis*, *B. anthracis* and *B. cereus* produced at low temperature were more sensitive to UV radiations (Melly et al. 2002; Baweja et al. 2008; Planchon et al. 2011). Other studies showed that high or low temperatures decreased the high pressure resistance of *B. subtilis* spores (Igura et al. 2003; Minh et al. 2008; Minh et al. 2011; Bate et al. 2014).

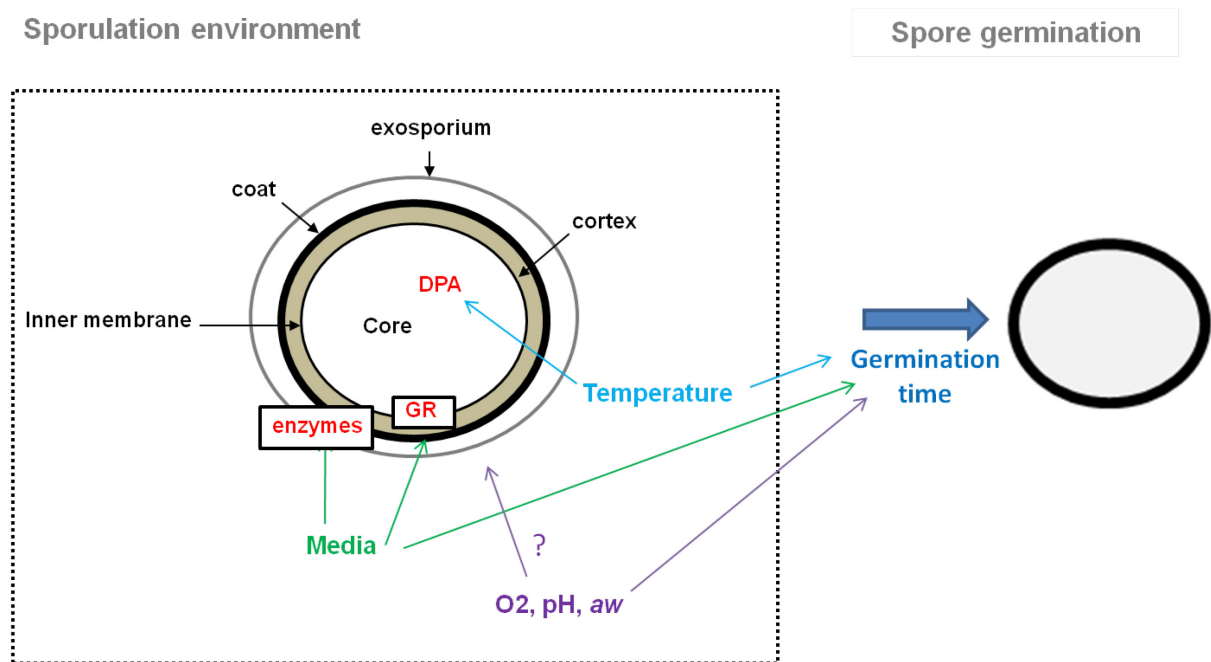
#### 3.2.4.2.8. Impact of sporulation pH, *a<sub>w</sub>* and oxygen

Spores of *B. subtilis* formed at alkali pH were more resistant to high pressure than spores formed at neutral pH (Table 4) (Minh et al. 2011). Although *B. anthracis* spores produced at alkali and acidic pH had the same sensitivity to hydrochloride, spores formed at acidic pH were more sensitive to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> compared to spores formed at alkali or neutral pH (Baweja et al. 2008). Moreover variations in the pH of the sporulation media caused a slight decrease in the UV radiation resistance of *B. anthracis* spores (Baweja et al. 2008). Thi minh et al (2008) reported that high pressure resistance of *B. subtilis* spores was not affected by changes in *a<sub>w</sub>* but was decreased by low aeration, high or low temperatures (Minh et al. 2008; Minh et al. 2011). It has been shown that *B. cereus* spores formed in anaerobiosis were more resistant to sodium hydroxide, nitrous acid and pulsed light radiations than spores formed in aerobiosis, while no difference was observed in UV-C radiation, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and formaldehyde resistance between the two sporulation conditions (Abbas et al. 2014).

### 3.2.5. Impact of sporulation environment on spore germination

Under favorable conditions, spores break dormancy and restart growth through spore germination and outgrowth process. Studies showed that sporulation history, including various environmental parameters (temperature, media, *a<sub>w</sub>*...), was in some ways stored by the spore and influenced subsequent germination and outgrowth, defined as the transition phase from the germinated spore to a new growing cell (Paidhungat et al. 2002; Segev et al. 2013; Setlow 2014). Spore germination is usually triggered by i) nutrients, including sugars, purine nucleosides and amino acids ii) non-nutrients agents such as surfactants and dodecylamine, iii) physical treatments such as hyperbaric treatment (Setlow 2014). Germination depends on DPA content, proteins located in spore membrane coat and cortex layers (Setlow 2014). (Paidhungat et al. 2002; Segev et al. 2013; Setlow 2014)

Spores of *B. subtilis* prepared in liquid medium germinated faster than spores prepared on plates in presence of dodecylamine and of L-alanine in a lesser extent (Figure 3) (Setlow et al. 2003; Rose et al. 2007). Germination is also dependent of the sporulation medium composition: *B. cereus* spores formed with a high glutamate concentration germinated faster in response to inosine, L-alanine and a combination of these two germinants than spores formed with low glutamate concentration (de Vries et al. 2005). These results could be due to the modulation of the quantity and/or activity of the alanine racemase and the nucleoside hydrolase, two germination-inhibiting enzymes, by glutamate (Todd et al. 2003; de Vries et al. 2005).



**Figure 3: Impact of sporulation environment on *Bacilli* spore germination.**

Representation of germinants receptors in the inner membrane, Ger protein of coat layers and the core containing dipicolinic acid (DPA). The five major environmental factors: media, temperature, pH, water activity and oxygen, and their impact on the spore structure are represented. Temperature has an impact on DPA concentration, which plays a role on germination efficiency; the media composition impacts the number of GRs (Ger proteins) which all together influence germination efficiency and the time of the process, water activity ( $a_w$ ), oxygen ( $O_2$ ) and pH also modify the time to achieve germination.

*Bacillus subtilis* spores formed in a rich nutrient sporulation medium germinated faster than spores formed in a poorer medium (Ramirez-Peralta et al. 2012). The levels of germinant receptors (GR) and the germination protein GerD, which is required for efficient germination with L-alanine of *B. subtilis*, were lower in the poor medium than in the rich one. Indeed, the composition of the sporulation media impacts the levels of the GRs that bind nutrient germinants to trigger germination and the levels of GerD protein (Mongkoltharuk et al. 2009; Ramirez-Peralta et al. 2012). Germination of *B. anthracis* spores formed in a poor-nutrient medium was lower than that of spores formed in a standard sporulation medium (Baweja et al. 2008). *B. cereus* spores produced in a rich media showed an enhanced germination response and the expression level of the seven *ger* operons per cell was higher

(Hornstra et al. 2005; Zhang et al. 2014). Changes in *ger* operons expression may cause variations in the number of receptors in the spore and over-expression of *gerA* operons in *B. subtilis* also lead to faster germination (Cabrera-Martinez et al. 2003). In consequence, the higher number of germination receptors in rich media may result in a higher germination rate (Hornstra et al. 2005).

A large number of studies showed that *Bacillus* spore produced at low temperature germinated more efficiently than spores produced at high temperature (Raso et al. 1998; Melly et al. 2002; Cortezzo and Setlow 2005; Black et al. 2007; Gounina-Allouane et al. 2008; Garcia, van der Voort et al. 2010; Planchon et al. 2011). Moreover, spores of psychrotolerant *B. cereus* had a greater germination than spores of a mesophilic strain (Anderson Borge et al. 2001; Gounina-Allouane et al. 2008) and those produced at low temperature contained less DPA than those produced at high temperature (Planchon et al. 2011). These results are in good agreement with previous studies in *B. subtilis* showing that DPA-less spores germinated rapidly (Magger et al. 2008). If the germination process was triggered by high pressure, the germination rate of *B. weihenstephanensis* KBAB4 is similar whatever the sporulation temperature confirming that germination mechanisms in response to pressure or to nutrient germinants are different (Garcia et al. 2010). Further growth from *B. weihenstephanensis* KBAB4 spores formed at a range of temperatures was unaffected by the temperature at which the spores were formed.

Sporulation at low  $a_w$ , low temperature or alkaline pH led to a germination of *B. subtilis* spores longer than in standard conditions (Minh et al. 2011). L-alanine triggered germination of *B. cereus* spores produced in anaerobiosis conditions was more efficient than that of spores produced in aerobiosis (Abbas et al. 2014).

### 3.2.6. Conclusions

In the environment, sporulation occurs in various conditions and morphology of the resulting spores differs significantly and leads to a number of changes in spore resistance and germination. Considering their ubiquity, the contamination of food and pharmaceutical industries by bacterial spores is unavoidable. Understanding the impact of sporulation occurring in diverse environments on spore properties is important to adjust methods of microbial decontamination or develop new strategies and formulations for spore killing. Although sporulation media have also a strong impact on spore properties, most of studies which fit to this objective demonstrated that sporulation temperature is considered to be one of the most important environmental factors that influences bacterial spores. However, we cannot affirm that the results of spore resistance studies in the laboratory conditions provide a suitable description of the conditions occurring in the environment. Moreover, the phenotypic

variation of bacteria should also be considered. Subpopulations of spores with different heat resistance produced heterogeneous responses to inactivation treatments (Stecchini et al. 2013; Setlow 2014). Attempts to overcome spore heterogeneity and distance between laboratory and environment conditions may add to the success of spore decontamination process. Further investigations may contribute to anticipate and identify the place where sporulation occurs.

### 3.2.7. References

**Abbas AA, Planchon S, Jobin M, Schmitt P.** 2014. Absence of oxygen affects the capacity to sporulate and the spore properties of *Bacillus cereus*. *Food Microbiology* **42**:122-131.

**Abel-Santos E.** 2012. *Bacterial Spores: Current Research and Applications*. Caister Academic Press.

**Anderson Borge GI, Skeie M, Sorhaug T, Langsrud T, Granum PE.** 2001. Growth and toxin profiles of *Bacillus cereus* isolated from different food sources. *International Journal of Food Microbiology* **69**:237-246.

**Atrih A, Foster SJ.** 1999. The role of peptidoglycan structure and structural dynamics during endospore dormancy and germination. *Antonie van Leeuwenhoek* **75**:299-307.

**Atrih A, Foster SJ.** 2001. Analysis of the role of bacterial endospore cortex structure in resistance properties and demonstration of its conservation amongst species. *Journal of Applied Microbiology* **91**:364-372.

**Avignone-Rossa C, Arcas J, Mignone C.** 1992. *Bacillus thuringiensis* growth, sporulation and  $\delta$ -endotoxin production in oxygen limited and non-limited cultures. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **8**:301-304.

**Bailey-Smith K, Todd SJ, Southworth TW, Proctor J, Moir A.** 2005. The ExsA protein of *Bacillus cereus* is required for assembly of coat and exosporium onto the spore surface. *Journal of Bacteriology* **187**:3800-3806.

**Baril E, Coroller L, Couvert O, Leguerinel I, Postollec F, Boulais C, Carlin F, Mafart P.** 2012. Modeling heat resistance of *Bacillus weihenstephanensis* and *Bacillus licheniformis* spores as function of sporulation temperature and pH. *Food Microbiology* **30**:29-36.

**Baril E, Coroller L, Postollec F, Leguerinel I, Boulais C, Carlin F, Mafart P.** 2011. The wet-heat resistance of *Bacillus weihenstephanensis* KBAB4 spores produced in a two-step sporulation process depends on sporulation temperature but not on previous cell history. *International Journal of Food Microbiology* **146**:57-62.

**Bate AR, Bonneau R, Eichenberger P.** 2014. *Bacillus subtilis* Systems Biology: Applications of -Omics Techniques to the Study of Endospore Formation. *Microbiology Spectrum* **2**.

**Baweja RB, Zaman MS, Mattoo AR, Sharma K, Tripathi V, Aggarwal A, Dubey GP, Kurupati RK, Ganguli M, Chaudhury NK, Sen S, Das TK, Gade WN, Singh Y.** 2008. Properties of *Bacillus anthracis* spores prepared under various environmental conditions. *Archives of Microbiology* **189**:71-79.

**Black EP, Wei J, Atluri S, Cortezzo DE, Koziol-Dube K, Hoover DG, Setlow P.** 2007. Analysis of factors influencing the rate of germination of spores of *Bacillus subtilis* by very high pressure. *Journal of Applied Microbiology* **102**:65-76.

**Boniolo FS, Rodrigues RC, Prata AMR, Lopez ML, Jacinto T, da Silveira MM, Berbert-Molina MA.** 2012. Oxygen supply in *Bacillus thuringiensis* fermentations: bringing new insights on their impact on sporulation and delta-endotoxin production. *Applied Microbiology and Biotechnology* **94**:625-636.

**Bressuire-Isoard C, Bornard I, Henriques AO, Carlin F, Broussolle V.** 2016. Sporulation temperature reveals a requirement for CotE in the assembly of both the coat and exosporium layers of *Bacillus cereus* spores. *Applied and Environmental Microbiology*.

**Cabrera-Martinez RM, Tovar-Rojo F, Vepachedu VR, Setlow P.** 2003. Effects of overexpression of nutrient receptors on germination of spores of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* **185**:2457-2464.

**Cano RJ, Borucki MK.** 1995. Revival and identification of bacterial spores in 25- to 40-million-year-old Dominican amber. *Science* **268**:1060-1064.

**Cazemier AE, Wagenaars SFM, terSteege PF.** 2001. Effect of sporulation and recovery medium on the heat resistance and amount of injury of spores from spoilage bacilli. *Journal of Applied Microbiology* **90**:761-770.

**Checinska A, Paszczynski A, Burbank M.** 2015. *Bacillus* and Other Spore-Forming Genera: Variations in Responses and Mechanisms for Survival. *Annual Review of Food Science and Technology*, Vol 6 **6**:351-369.

**Condon S, Bayarte M, Sala FJ.** 1992. Influence of the sporulation temperature upon the heat resistance of *Bacillus subtilis*. *Journal of Applied Bacteriology* **73**:252-256.

**Cortezzo DE, Koziol-Dube K, Setlow B, Setlow P.** 2004. Treatment with oxidizing agents damages the inner membrane of spores of *Bacillus subtilis* and sensitizes spores to subsequent stress. *Journal of Applied Microbiology* **97**:838-852.

**Cortezzo DE, Setlow P.** 2005. Analysis of factors that influence the sensitivity of spores of *Bacillus subtilis* to DNA damaging chemicals. *Journal of Applied Microbiology* **98**:606-617.

**de Rezende JR, Kjeldsen KU, Hubert CRJ, Finster K, Loy A, Jorgensen BB.** 2013. Dispersal of thermophilic *Desulfotomaculum* endospores into Baltic Sea sediments over thousands of years. *ISME J* **7**:72-84.

**de Vries YP, Atmadja RD, Hornstra LM, de Vos WM, Abee T.** 2005. Influence of glutamate on growth, sporulation, and spore properties of *Bacillus cereus* ATCC 14579 in defined medium. *Applied and Environmental Microbiology* **71**:3248-3254.

**Driks A.** 1999. *Bacillus subtilis* spore coat. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **63**:1-20.

**Driks A.** 2002. Overview: development in bacteria: spore formation in *Bacillus subtilis*. *Cellular and Molecular Life Sciences* **59**:389-391.

**Faille C, Tauveron G, Gentil-Lelievre CL, Slomianny C.** 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.

- Fine F, Gervais P.** 2005. Thermal destruction of dried vegetative yeast cells and dried bacterial spores in a convective hot air flow: strong influence of initial water activity. *Environmental Microbiology* **7**:40-46.
- Garcia D, van der Voort M, Abee T.** 2010. Comparative analysis of *Bacillus weihenstephanensis* KBAB4 spores obtained at different temperatures. *International Journal of Food Microbiology* **140**:146-153.
- Gomez-Lopez VM, Ragaert P, Debevere J, Devlieghere F.** 2007. Pulsed light for food decontamination: a review. *Trends in Food Science & Technology* **18**:464-473.
- González I, López M, Martínez S, Bernardo A, González J.** 1999. Thermal inactivation of *Bacillus cereus* spores formed at different temperatures. *International Journal of Food Microbiology* **51**:81-84.
- Gould GW.** 2006. History of science--spores. *J Appl Microbiol* **101**:507-513.
- Gounina-Allouane R, Broussolle V, Carlin F.** 2008. Influence of the sporulation temperature on the impact of the nutrients inosine and L-alanine on *Bacillus cereus* spore germination. *Food Microbiology* **25**:202-206.
- Guizelini BP, Vandenberghe LPS, Sella S, Socol CR.** 2012. Study of the influence of sporulation conditions on heat resistance of *Geobacillus stearothermophilus* used in the development of biological indicators for steam sterilization. *Archives of Microbiology* **194**:991-999.
- Henriques AO, Moran CP.** 2007. Structure, assembly, and function of the spore surface layers. *Annual Review of Microbiology* **61**:555-588.
- Hornstra LM, de Vries YP, de Vos WM, Abee T, Wells-Bennik MHJ.** 2005. gerR, a novel ger operon involved in L-alanine- and inosine-initiated germination of *Bacillus cereus* ATCC 14579. *Applied and Environmental Microbiology* **71**:774-781.
- Igura N, Kamimura Y, Islam MS, Shimoda M, Hayakawa I.** 2003. Effects of minerals on resistance of *Bacillus subtilis* spores to heat and hydrostatic pressure. *Applied and Environmental Microbiology* **69**:6307-6310.
- Imamura D, Kuwana R, Takamatsu H, Watabe K.** 2011. Proteins Involved in Formation of the Outermost Layer of *Bacillus subtilis* Spores. *Journal of Bacteriology* **193**:4075-4080.
- Johnson MJ, Todd SJ, Ball DA, Shepherd AM, Sylvestre P, Moir A.** 2006. ExsY and CotY are required for the correct assembly of the exosporium and spore coat of *Bacillus cereus*. *Journal of Bacteriology* **188**:7905-7913.
- Kaieda S, Setlow B, Setlow P, Halle B.** 2013. Mobility of core water in *Bacillus subtilis* spores by 2 H NMR. *Biophysical Journal* **105**:2016-2023.
- Kihm DJ, Hutton MT, Hanlin JH, Johnson EA.** 1990. Influence of transition metals added during sporulation on heat resistance of *Clostridium botulinum* 113B spores. *Applied and Environmental Microbiology* **56**:681-685.
- Laaberki M-H, Dworkin J.** 2008. Role of Spore Coat Proteins in the Resistance of *Bacillus subtilis* Spores to *Caenorhabditis elegans* Predation. *Journal of Bacteriology* **190**:6197-6203.
- Lee SB, Kim K-J.** 1995. Effect of water activity on enzyme hydration and enzyme reaction rate in organic solvents. *Journal of Fermentation and Bioengineering* **79**:473-478.

- Leggett MJ, McDonnell G, Denyer SP, Setlow P, Maillard JY.** 2012. Bacterial spore structures and their protective role in biocide resistance. *Journal of Applied Microbiology* **113**:485-498.
- Lequette Y, Garenaux E, Combrouse T, Dias Tdel L, Ronse A, Slomianny C, Trivelli X, Guerardel Y, Faille C.** 2011. Domains of BclA, the major surface glycoprotein of the *B. cereus* exosporium: glycosylation patterns and role in spore surface properties. *Biofouling* **27**:751-761.
- Magge A, Granger AC, Wahome PG, Setlow B, Vepachedu VR, Loshon CA, Peng LX, Chen D, Li YQ, Setlow P.** 2008. Role of dipicolinic acid in the germination, stability, and viability of spores of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* **190**:4798-4807.
- Mazas M, Fernandez A, Alvarez A, Lopez M, Bernardo A.** 2009. Effects of phosphate and sodium and potassium chlorides on sporulation and heat resistance of *Bacillus cereus*. *Journal of Food Safety* **29**:106-117.
- Mazas M, Gonzalez I, Lopez M, Gonzalez J, Martin Sarmiento R.** 1995. Effects of sporulation media and strain on thermal resistance of *Bacillus cereus* spores. *International Journal of Food Science and Technology* **30**:71-78.
- Mazas M, Lopez M, Gonzalez I, Bernardo A, Martin R.** 1997. Effects of sporulation pH on the heat resistance and the sporulation of *Bacillus cereus*. *Letters in Applied Microbiology* **25**:331-334.
- McKenney PT, Driks A, Eichenberger P.** 2013. The *Bacillus subtilis* endospore: assembly and functions of the multilayered coat. *Nat Rev Microbiol* **11**:33-44.
- McKenney PT, Driks A, Eskandarian HA, Grabowski P, Guberman J, Wang KH, Gitai Z, Eichenberger P.** 2010. A Distance-Weighted Interaction Map Reveals a Previously Uncharacterized Layer of the *Bacillus subtilis* Spore Coat. *Current Biology* **20**:934-938.
- Meador-Parton J, Popham DL.** 2000. Structural analysis of *Bacillus subtilis* spore peptidoglycan during sporulation. *Journal of Bacteriology* **178**:6451-6458.
- Melly E, Genest PC, Gilmore ME, Little S, Popham DL, Driks A, Setlow P.** 2002. Analysis of the properties of spores of *Bacillus subtilis* prepared at different temperatures. *Journal of Applied Microbiology* **92**:1105-1115.
- Minh HNT, Durand A, Loison P, Perrier-Cornet JM, Gervais P.** 2011. Effect of sporulation conditions on the resistance of *Bacillus subtilis* spores to heat and high pressure. *Applied Microbiology and Biotechnology* **90**:1409-1417.
- Minh HNT, Perrier-Cornet J-M, Gervais P.** 2008. Effect of the osmotic conditions during sporulation on the subsequent resistance of bacterial spores. *Applied Microbiology and Biotechnology* **80**:107-114.
- Moeller R, Wassmann M, Reitz G, Setlow P.** 2011. Effect of radioprotective agents in sporulation medium on *Bacillus subtilis* spore resistance to hydrogen peroxide, wet heat and germicidal and environmentally relevant UV radiation. *Journal of Applied Microbiology* **110**:1485-1494.
- Molin G, Östlund K.** 1976. Dry-heat inactivation of *Bacillus subtilis* var. niger spores with special reference to spore density. *Canadian Journal of Microbiology* **22**:359-363.
- Mongkolthanaruk W, Robinson C, Moir A.** 2009. Localization of the GerD spore germination protein in the *Bacillus subtilis* spore. *Microbiology* **155**:1146-1151.

- Monroe A, Setlow P.** 2006. Localization of the transglutaminase cross-linking sites in the *Bacillus subtilis* spore coat protein GerQ. *Journal of Bacteriology* **188**:7609-7616.
- Monteiro SM, Clemente JJ, Henriques AO, Gomes RJ, Carrondo MJ, Cunha AE.** 2005. A procedure for high-yield spore production by *Bacillus subtilis*. *Biotechnology Progress* **21**:1026-1031.
- Nicholson WL, Munakata N, Horneck G, Melosh HJ, Setlow P.** 2000. Resistance of *Bacillus* Endospores to Extreme Terrestrial and Extraterrestrial Environments. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **64**:548-572.
- Oliva C, Turnbough CL, Kearney JF.** 2009. CD14-Mac-1 interactions in *Bacillus anthracis* spore internalization by macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**:13957-13962.
- Paidhungat M, Setlow B, Daniels WB, Hoover D, Papafragkou E, Setlow P.** 2002. Mechanisms of induction of germination of *Bacillus subtilis* spores by high pressure. *Applied and Environmental Microbiology* **68**:3172-3175.
- Paidhungat M, Setlow B, Driks A, Setlow P.** 2000. Characterization of spores of *Bacillus subtilis* which lack dipicolinic acid. *Journal of Bacteriology* **182**:5505-5512.
- Palop A, Sala FJ, Condon S.** 1999. Heat resistance of native and demineralized spores of *Bacillus subtilis* sporulated at different temperatures. *Applied and Environmental Microbiology* **65**:1316-1319.
- Paredes-Sabja D, Sarker MR.** 2011. Germination response of spores of the pathogenic bacterium *Clostridium perfringens* and *Clostridium difficile* to cultured human epithelial cells. *Anaerobe* **17**:78-84.
- Penna TCV, Machoshvili IA, Ishii M.** 2003. Effect of media on spore yield and thermal resistance of *Bacillus stearothermophilus*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **105**:287-294.
- Piggot PJ, Hilbert DW.** 2004. Sporulation of *Bacillus subtilis*. *Current Opinion in Microbiology* **7**:579-586.
- Planchon S, Dargaignaratz C, Levy C, Ginies C, Broussolle V, Carlin F.** 2011. Spores of *Bacillus cereus* strain KBAB4 produced at 10 °C and 30 °C display variations in their properties. *Food Microbiology* **28**:291-297.
- Ragkousi K, Setlow P.** 2004. Transglutaminase-mediated cross-linking of GerQ in the coats of *Bacillus subtilis* spores. *Journal of Bacteriology* **186**:5567-5575.
- Ramirez-Peralta A, Zhang PF, Li YQ, Setlow P.** 2012. Effects of Sporulation Conditions on the Germination and Germination Protein Levels of *Bacillus subtilis* Spores. *Applied and Environmental Microbiology* **78**:2689-2697.
- Raso J, Gongora-Nieto MM, Barbosa Canovas GV, Swanson BG.** 1998. Influence of several environmental factors on the initiation of germination and inactivation of *Bacillus cereus* by high hydrostatic pressure. *International Journal of Food Microbiology* **44**:125-132.
- Raso J, Palop A, Bayarte M, Condón S, Sala F.** 1995. Influence of sporulation temperature on the heat resistance of a strain of *Bacillus licheniformis* (Spanish Type Culture Collection 4523). *Food Microbiology* **12**:357-361.



- Riesenman PJ, Nicholson WL.** 2000. Role of spore coat layers in *Bacillus subtilis* spore resistance to hydrogen peroxide, artificial UV-C, UV-B, and solar UV radiation. *Applied and Environmental Microbiology* **66**:620-626.
- Rose R, Setlow B, Monroe A, Mallozzi M, Driks A, Setlow P.** 2007. Comparison of the properties of *Bacillus subtilis* spores made in liquid or on agar plates. *Journal of Applied Microbiology* **103**:691-699.
- Sarrafzadeh MH, Navarro JM.** 2006. The effect of oxygen on the sporulation, delta-endotoxin synthesis and toxicity of *Bacillus thuringiensis* H14. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* **22**:305-310.
- Segev E, Rosenberg A, Mamou G, Sinai L, Ben-Yehuda S.** 2013. Molecular Kinetics of Reviving Bacterial Spores. *Journal of Bacteriology* **195**:1875-1882.
- Sella SRBR, Vandenberghe LPS, Socol CR.** 2014. Life cycle and spore resistance of spore-forming *Bacillus atrophaeus*. *Microbiological Research* **169**:931-939.
- Setlow B, Cowan AE, Setlow P.** 2003. Germination of spores of *Bacillus subtilis* with dodecylamine. *Journal of Applied Microbiology* **95**:637-648.
- Setlow P, Johnson EA.** 2013. Spores and their significance, p 45-80. *In* Doyle MP, Buchanan RL (ed), *Food Microbiology Fundamentals and Frontiers* 4th Edition. ASM Press, Washington DC.
- Setlow P.** 2000. Resistance of bacterial spores, p 217-230. *In* Storz G, HenggeAronis R (ed), *Bacterial Stress Responses*. Amer Soc Microbiology, 1325 Massachusetts Ave NW/Washington/DC 20005-4171/USA.
- Setlow P.** 2006. Spores of *Bacillus subtilis*: their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals. *Journal of Applied Microbiology* **101**:514-525.
- Setlow P.** 2014. Germination of Spores of *Bacillus* Species: What We Know and Do Not Know. *Journal of Bacteriology* **196**:1297-1305.
- Setlow P.** 2014. Spore Resistance Properties. *Microbiology Spectrum* **2**.
- Severson KM, Mallozzi M, Bozue J, Welkos SL, Cote CK, Knight KL, Driks A.** 2009. Roles of the *Bacillus anthracis* Spore Protein ExsK in Exosporium Maturation and Germination. *Journal of Bacteriology* **191**:7587-7596.
- Stecchini ML, Del Torre M, Polese P.** 2013. Survival strategies of *Bacillus* spores in food. *Indian Journal of Experimental Biology* **51**:905-909.
- Stecchini ML, Spaziani M, Del Torre M, Pacor S.** 2009. *Bacillus cereus* cell and spore properties as influenced by the micro-structure of the medium. *Journal of Applied Microbiology* **106**:1838-1848.
- Sunde EP, Setlow P, Hederstedt L, Halle B.** 2009. The physical state of water in bacterial spores. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**:19334-19339.
- Todd SJ, Moir AJG, Johnson MJ, Moir A.** 2003. Genes of *Bacillus cereus* and *Bacillus anthracis* encoding proteins of the exosporium. *Journal of Bacteriology* **185**:3373-3378.
- van der Voort M, Abee T.** 2013. Sporulation environment of emetic toxin-producing *Bacillus cereus* strains determines spore size, heat resistance and germination capacity. *J Appl Microbiol* **114**:1201-1210.

- Verma N, Singh NA, Kumar N, Raghu H.** 2013. Screening of different media for sporulation of *Bacillus megaterium*. *Int J Micro Res Rev* **1**:068-073.
- Vreeland RH, Rosenzweig WD, Powers DW.** 2000. Isolation of a 250 million-year-old halotolerant bacterium from a primary salt crystal. *Nature* **407**:897-900.
- Warriner K, Waites WM.** 1999. Enhanced sporulation in *Bacillus subtilis* grown on medium containing glucose : ribose. *Letters in Applied Microbiology* **29**:97-102.
- Westphal AJ, Price PB, Leighton TJ, Wheeler KE.** 2003. Kinetics of size changes of individual *Bacillus thuringiensis* spores in response to changes in relative humidity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100**:3461-3466.
- Xue QO, Gu CF, Rivera J, Hook M, Chen XW, Pozzi A, Xu Y.** 2011. Entry of *Bacillus anthracis* spores into epithelial cells is mediated by the spore surface protein BclA, integrin alpha 2 beta 1 and complement component C1q. *Cellular Microbiology* **13**:620-634.
- Young SB, Setlow P.** 2003. Mechanisms of killing of *Bacillus subtilis* spores by hypochlorite and chlorine dioxide. *Journal of Applied Microbiology* **95**:54-67.
- Zhang PF, Liang JT, Yi X, Setlow P, Li YQ.** 2014. Monitoring of Commitment, Blocking, and Continuation of Nutrient Germination of Individual *Bacillus subtilis* Spores. *Journal of Bacteriology* **196**:2443-2454.

## 4. Présentation du sujet de thèse

*B. cereus* est un agent de toxi-infection alimentaire représentant un danger pour la santé publique, la qualité et la salubrité de nombreux produits alimentaires traités thermiquement. Ces spores disséminées tout le long de la chaîne de transformation des aliments possèdent des propriétés de résistance et d'adhésion remarquables.

L'emploi de procédés de transformation d'intensité modérée qui n'éliminent pas efficacement les spores, voire les sélectionnent au détriment des formes végétatives, oblige les industriels à trouver les meilleurs compromis entre la préservation des qualités nutritionnelles et organoleptiques, et l'assurance de la sécurité sanitaire des aliments.

Dans un environnement naturel, les bactéries s'acclimatent à une variété de conditions défavorables, comme une fluctuation de la température, du pH et la disponibilité des nutriments. De nombreuses études montrent que la modulation de ces conditions de sporulation a un effet significatif sur les propriétés des spores. Prendre en compte la diversité des spores de *B. cereus* existant dans l'environnement permettra aux industries alimentaires d'adapter leurs traitements de désinfection.

La prévalence des spores de *Bacillus cereus* dans la nature et sa forte implication dans les toxi-infections alimentaires déclarées en France en fait un modèle pertinent pour l'étude de l'adaptation physiologique et moléculaire de la sporulation en fonction de l'environnement. La température est considérée comme l'un des facteurs environnementaux majeurs influençant la sporulation. La variabilité des propriétés des spores est directement liée à des modifications profondes dans la structure des spores.

La protéine CotE, est une protéine morphogénétique clé, jouant un rôle important dans la mise en place des structures de la spore. Chez *B. subtilis*, elle est indispensable à l'assemblage de la tunique externe et chez *B. anthracis* et *B. cereus* dans celui de l'exosporium. Au cœur d'un réseau d'interaction protéique complexe, cette protéine conservée au sein de nombreuses espèces, semble être indispensable au maintien de l'intégrité structurale des spores.

Bien que les conséquences de la température de sporulation sur la résistance des spores soient connues, de nombreuses interrogations persistent : comment la température de sporulation influence la structure et les propriétés des spores ? Quel est l'impact de la température sur la protéine CotE qui contrôle l'assemblage des structures de la spore ? Enfin, le mécanisme d'assemblage des enveloppes de spores impliquant CotE est-il le même en fonction de la température de sporulation ?

Ce travail de thèse a pour objectif de caractériser les mécanismes d'assemblages des enveloppes de la spore en fonction de la température de sporulation, à travers l'étude du rôle de la protéine morphogénétique CotE chez *B. cereus*. Le rôle de la protéine CotE en fonction de la température de sporulation chez *B. cereus* sera détaillé dans le chapitre 3. L'étude de sa localisation dans les spores et la description du mécanisme d'assemblage des enveloppes seront abordées dans le chapitre 4.



# **Chapitre 2**

## **Matériels et méthodes**

---



## Chapitre 2 : Matériels et méthodes

### 1. Milieux et conditions générales de croissance

La composition des milieux de culture utilisés dans cette étude est décrite dans le Tableau 4.

**Tableau 4 : Composition des milieux de culture**

Milieu	Composition <sup>a</sup>	Source
LB (Luria-Bertani)	- NaCl 10 g.L <sup>-1</sup> - Extrait de levure 5 g.L <sup>-1</sup> - Tryptone 10 g.L <sup>-1</sup>	(Bertani 1951)
mFNA (Fortified Nutrient Agar modifié)	- Tryptone 5 g.L <sup>-1</sup> - Extrait de viande 3 g.L <sup>-1</sup> - NaCl 3 g.L <sup>-1</sup> - Glucose 0,1 g.L <sup>-1</sup> - MnSO <sub>4</sub> , H <sub>2</sub> O 0,05 g.L <sup>-1</sup> - CaCl <sub>2</sub> , 6H <sub>2</sub> O 0,06 g.L <sup>-1</sup> - (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,08 g.L <sup>-1</sup> - MnCl <sub>2</sub> , 4H <sub>2</sub> O 0,008 g.L <sup>-1</sup> - CuSO <sub>4</sub> , 5H <sub>2</sub> O 0,005 g.L <sup>-1</sup> - ZnSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O 0,005 g.L <sup>-1</sup>	(Broussolle et al. 2008)
SMB (Sporulation Mineral Buffer)	- Tampon phosphate 39 mM pH 7,2 (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 3H <sub>2</sub> O: 4,5 g.L <sup>-1</sup> ; anhydre KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> : 1,8 g.L <sup>-1</sup> ) - CaCl <sub>2</sub> , 2H <sub>2</sub> O 8 mg.L <sup>-1</sup> - MnSO <sub>4</sub> , H <sub>2</sub> O 1,5 mg.L <sup>-1</sup>	(Baril et al. 2011)

<sup>a</sup> Pour les milieux solides, 15 g.L<sup>-1</sup> d'agar est ajouté à la composition de base

Les souches de *B. cereus* et d'*E. coli* sont mises en culture à 37°C en milieu LB solide ou liquide préchauffé sous agitation à 200 rpm. Si nécessaire, des antibiotiques sont ajoutés au milieu selon les concentrations suivantes : ampicilline 100 µg.mL<sup>-1</sup> (Amp 100) pour *E. coli*, spectinomycine 275 µg.mL<sup>-1</sup> (Spc 275) et érythromycine 5 µg.mL<sup>-1</sup> (Ery 5) pour *B. cereus*. Du substrat X-gal est ajouté au milieu solide LB à une concentration de 50 µg.L<sup>-1</sup> pour la sélection de clones.

## 2. Souches bactériennes

### 2.1. Souche d'étude *B. cereus* ATCC 14579

*Bacillus cereus sensu stricto* ATCC 14579 a été isolé à l'origine de l'atmosphère ambiante d'une étable au Royaume Uni au XIX<sup>ème</sup> siècle. Son génome a été séquencé et publié pour la



première fois en 2003 (Ivanova et al. 2003). Cette souche mésophile qui est la souche d'étude de ce travail de thèse appartient au groupe phylogénétique IV du groupe *Bacillus cereus sensu lato* (Guinebretiere et al. 2008). Cette souche ne possède plus le plasmide linéaire pBClin15. Conservée dans une solution de glycérol à 30 % à -80°C, la souche est mise en culture sur milieu solide Luria-Bertani (LB) et incubée à 37°C une première fois puis une seconde avant utilisation pour les travaux expérimentaux.

## 2.2. Souche $\Delta cotE$

Afin d'étudier le rôle de la protéine CotE dans les spores de *B. cereus*, un mutant de délétion a été construit à partir de la souche d'étude par une recombinaison homologue décrite dans la Figure 29.

### 2.2.1. Amplification de régions flanquant le gène *cotE*

Les fragments correspondant à la région de 578 pb située en amont du gène *cotE* (BC\_3770) et une région de 582 pb située en aval, sont amplifiés par PCR à partir d'ADN chromosomique extrait de la souche d'étude et des amorces suivantes : EavalFNcoI/EavalR pour la région aval et EamontF/EamontRBamHI pour la région amont (voir § 4, Tableaux 6 et 7). A partir d'une préparation du plasmide pDiA, la séquence du gène codant pour la spectinomycine de 1197 pb est amplifiée par PCR en utilisant les amorces SpcR3'/SpcR5' (Laouami et al. 2011). Par PCR chimérique en utilisant les amorces EavalF/EamontR, les trois fragments ont été fusionnés pour former un fragment chimère où le gène de résistance à la spectinomycine sépare les régions amont et aval du gène *cotE*.

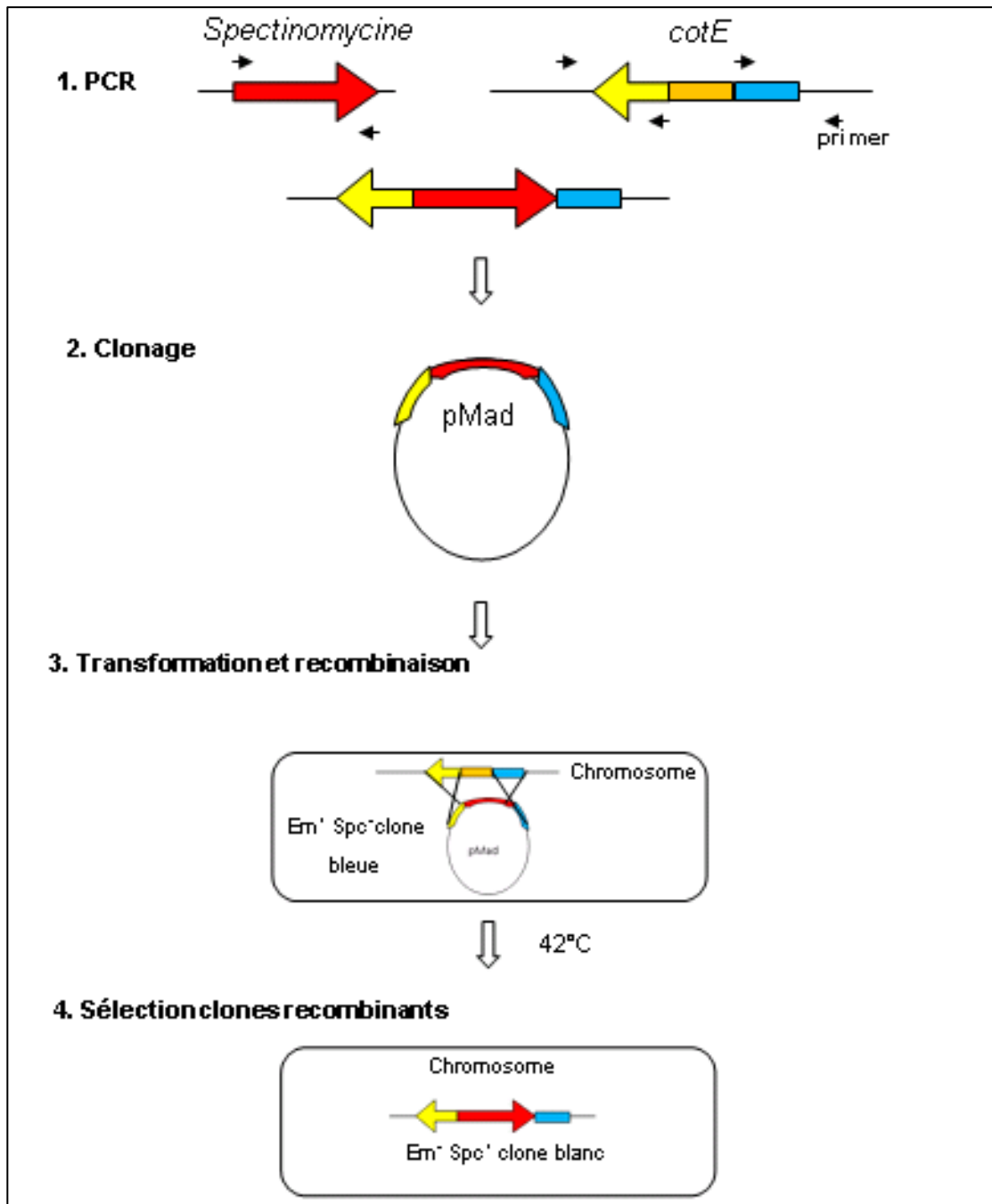


Figure 29 : Représentation schématique de la construction de la souche mutante  $\Delta cotE$  de *B. cereus* ATCC 14579

### 2.2.2. Clonage

Un sous clonage a ensuite été réalisé dans le plasmide pTOPO-XL donnant le vecteur pCotE introduit par choc thermique dans la souche d'*E. coli* TOP10. Les clones transformés ont été testés par PCR et leurs séquences vérifiées. Le fragment chimère a ensuite été collé aux sites de restriction *NotI* et *BamHI* du plasmide pMAD (Arnaud et al. 2004). Le plasmide pMAD $\Delta cotE$  a été introduit dans la souche d'*E. coli* DH5 $\alpha$  par choc thermique et les transformants ont été sélectionnés sur milieu solide

LB + ampicilline à 100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (Amp 100) avant incubation 16 h à 37°C. Les clones positifs ont été testés par PCR sur colonie avec les amorces pMad-ins-down/pMad-ins-up et contrôlés par séquençage.

### 2.2.3. Transformation et recombinaison

Le plasmide pMAD $\Delta$ *cotE* a été introduit dans la souche d'*E.coli* SCS110 (*dam*<sup>-</sup>/*dcm*<sup>-</sup>) avant transformation de la souche *B. cereus* ATCC 14579 par électroporation (voir § 3.6). (Arnaud et al. 2004). Les cellules transformées ont été mises en culture à 30°C sur milieu solide LB contenant de l'érythromycine à 5  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (Ery 5) pendant 48h. Six colonies obtenues ont été mises en culture à 30°C en milieu LB+Ery 5 permettant une répliation du plasmide recombinant. A  $DO_{600nm}=1$ , les cellules sont incubées à 42°C afin d'inactiver la répliation du plasmide, de favoriser à la fois sa perte et le phénomène de recombinaison homologue. Une succession de culture à 42°C est réalisée avant d'ensemencer des boîtes contenant de la spectinomycine à 275  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (Spc 275) et du X-Gal à 50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

### 2.2.4. Sélection des clones recombinants

Les colonies obtenues sont isolées sur Spc 275 X-gal et Ery 5 X-gal afin de sélectionner les colonies blanches Ery sensibles et Spc résistantes. La délétion du gène *cotE* est vérifiée par PCR sur colonie en utilisant les combinaisons d'amorces suivantes : ConfE1F/ConfE2R, pMad-ins-down/ConfE2R, ConfE1F/pMad-ins-up, ConfE1F/EamontR, EavalF/ConfE2R, pMad-ins-down/pMad-ins-up, pMad-in-down/EamontR, pMad-ins-up/EavalF et EamontR/EavalF, ConfE1FSall et ConfE2RSphI

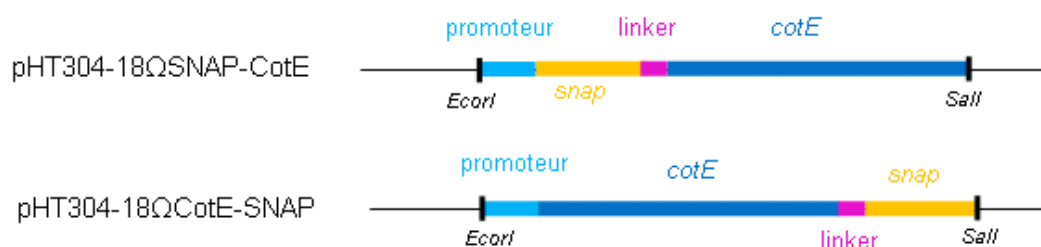
## 2.3. Construction de la souche $\Delta$ *cotE* $\Omega$ *cotE*

La complémentation de la souche  $\Delta$ *cotE* a été réalisée par l'apport en *trans* d'une construction plasmidique. Le gène *cotE* de 543 pb et la région de 180 pb située en amont de *cotE* ont été amplifiés par PCR avec les amorces CotEexF et CotEexR Le fragment généré a été clonés aux sites *Sall* et *SphI* du plasmide pHT304-18 (Sanchis et al. 1996) pour générer le plasmide pHT304-18 $\Omega$ *cotE* qui a ensuite été introduit dans la souche *B. cereus*  $\Delta$ *cotE*.

## 2.4. Construction des souches CotE-SNAP et SNAP-CotE

Dans le but de suivre la localisation de la protéine CotE par microscopie à fluorescence, deux fusions traductionnelles ont été réalisées : i) la construction SNAP-CotE où l'étiquette SNAP est placée en amont de la région N-terminale de la protéine CotE et ii) la construction CotE-SNAP où

l'étiquette SNAP est placée en aval de la région C-terminale de CotE. Deux fragments d'ADN ont été synthétisés par la société DNA 2.0 (Menlo Park, USA) puis insérés entre les sites *EcoRI* et *Sall* du plasmide pHT304-18 (Figure 30).



**Figure 30 : Représentation schématique des fusions CotE-SNAP et SNAP-CotE**  
Chaque séquence comprend le gène *cotE* (543 pb) et son promoteur (180 pb), le gène *snap* (553 pb) et un linker (27 pb)

Les plasmides ainsi synthétisés ont été introduits, comme décrit précédemment, dans les souches *B. cereus* ATCC 14579 et  $\Delta cotE$ .

## 2.5. Souches d'*E. coli*

Les souches d'*E. coli* utilisées au cours de cette thèse sont décrites dans le Tableau 5.

**Tableau 5 : Souches d'*E. coli* utilisées dans cette étude**

Souches	Génotype	Source
<i>E. coli</i> TOP10	<i>F</i> <sup>-</sup> <i>mcrA</i> $\Delta$ ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ) $\Phi$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ M15 $\Delta$ <i>lacX74</i> <i>recA1</i> <i>araD139</i> $\Delta$ ( <i>ara</i> <i>leu</i> ) 7697 <i>galU</i> <i>galK</i> <i>rpsL</i> ( <i>StrR</i> ) <i>endA1</i> <i>nupG</i>	Invitrogen
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	<i>fhuA2</i> <i>lac</i> ( <i>del</i> )U169 <i>phoA</i> <i>glnV44</i> $\Phi$ 80' <i>lacZ</i> ( <i>del</i> )M15 <i>gyrA96</i> <i>recA1</i> <i>relA1</i> <i>endA1</i> <i>thi-1</i> <i>hsdR17</i>	Collection du laboratoire
<i>E. coli</i> SCS110	<i>rpsL</i> <i>thr</i> <i>leu</i> <i>endA</i> <i>thi-1</i> <i>lacY</i> <i>galK</i> <i>galT</i> <i>ara</i> <i>tonA</i> <i>tsx</i> <i>dam</i> <i>dcm</i> <i>supE44</i> $\Delta$ ( <i>lac-proAB</i> )	Collection du laboratoire

## 3. Techniques de biologie moléculaire

### 3.1. Extraction et dosage ADN

L'extraction d'ADN plasmidique s'effectue selon les recommandations des kits commerciaux de Promega «Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification» et «PureYield™ Plasmid Maxiprep System». L'ADN génomique a été extrait à partir d'une culture de *B. cereus* ( $DO_{600nm}=2,0 - 3,0$ ).

Après centrifugation à 9500xg pendant 10 min, le culot est repris avec 400 µL de tampon TE à 10 mM (pH 8,0), 5 mg lysozyme et 5 µL de RNase (10 mg.mL<sup>-1</sup>) et incubé 1 h à 37°C. Par la suite sont ajoutés au mélange, 25 µL de sodium dodecyle sulfate (SDS) à 20 % (m/vol) et 100 µL de perchlorate de sodium (5 M). L'ADN est ensuite purifié par extraction phénol/chloroforme et précipité avec de l'éthanol absolu et rincé à l'éthanol 70 % froid et séché sous une hôte. Le culot est finalement repris avec 50 µL d'eau ultra pure. Le dosage de l'ADN est réalisé par mesure de l'absorbance DO<sub>260nm</sub>. L'ADN est considéré comme pur lorsque le rapport DO<sub>260nm</sub> / DO<sub>280nm</sub> est supérieur à 1,8. L'ADN plasmidique ou génomique est ensuite conservé à -20°C jusqu'à utilisation. Si nécessaire, les produits PCR ou les préparations plasmidiques sont envoyés pour contrôle au séquençage (GATC Biotech).

### 3.2. Amplification des acides nucléiques

Les réactions de PCR (Polymerase Chain Reaction) sont effectuées selon les recommandations du fournisseur à l'aide de la polymérase «Expand High Fidelity DNA polymerase» (Roche) pour les clonages ou «Go Taq DNA polymerase» (Promega) pour les PCR sur colonies. Les produits des réactions PCR sont purifiés à l'aide du kit de purification « High pure PCR product Purification System » (Roche). Pour les PCR sur colonie, une colonie est mise en suspension dans 30 µl d'eau stérile. Les cellules sont lysées par passage dans un micro-onde domestique pendant 3 min à puissance maximale, puis placées 20 min à -20°C. Le surnageant des échantillons est dilué au 1/30 dans de l'eau « DNase/RNase free » puis soumis à la réaction de PCR.

### 3.3. Electrophorèse d'ADN

L'électrophorèse de l'ADN s'effectue dans un gel d'agarose, suivant la résolution de séparation souhaitée et dans un tampon de migration TAE 0,5 X (Tris 40 mM, acide acétique 0,1 %, Ethylène diamine tétracétique 2 mM, pH 8,5). Après migration à 100 V, les gels sont colorés pendant 15 min dans un bain de TAE 0,5 X contenant du BET (0,5 µg/mL) puis les résultats sont révélés sous banc U.V.

### 3.4. Digestion enzymatique et ligature des fragments

L'ADN est digéré à 37°C pendant 4 h ou sur la nuit selon l'enzyme utilisée avec 1 unité d'enzyme par µg d'ADN et le tampon approprié. La ligature s'effectue dans 10 µL en présence d' 1U de ligase T4 DNA (Promega) sur la nuit à 16°C. La quantité d'insert et de vecteur est ajustée pour chaque réaction selon le calcul suivant :

$$\text{Quantité d'insert (en ng)} = \frac{\text{Taille plasmide (en pb)} \times \text{Quantité plasmide (en ng)}}{\text{Taille insert (en pb)}} \times 10$$

### 3.5. Transformation par choc thermique

Les souches d'*E. coli* sont transformées par choc thermique. Une quantité de 5 à 10 ng d'ADN est mélangée délicatement à 50 µL de cellules puis le tube contenant le mélange est immergé en glace pendant 30 min, avant choc thermique à 42°C pendant 45 s et incubation sur glace pendant 2 min. Les cellules transformées sont ensuite mises en culture liquide dans 2 mL de LB préchauffé pendant 1 h puis étalées sur milieu LB solide Amp 100 et incubées à 37°C sur la nuit.

### 3.6. Electroporation de *B. cereus*

Une préculture de *B. cereus* est utilisée pour ensemercer 100 mL de milieu LB. La croissance se poursuit jusqu'à  $DO_{600\text{ nm}} = 0,4$  puis les cellules sont centrifugées à 4°C pendant 10 min à 4000xg. Après 2 lavages successifs, le culot est repris dans 600 µL de polyéthylène glycol 6000 (PEG-6000 à 40 %) puis 400 µL de ce mélange est transféré dans une cuve d'électroporation de 0,4 cm auquel on ajoute entre 10 et 20 µg d'ADN. L'électroporation a lieu selon les paramètres suivants : 25 µF de capacité, 1000 Ω de résistance et voltage 2,5 kV. Les cellules rapidement reprises dans 2 mL de LB liquide préchauffé, sont incubées 2 h à 37°C sous agitation puis étalées sur gélose LB Ery 5 avant incubation sur la nuit à 37°C.

## 4. Amorces et plasmides

Les amorces utilisés dans cette étude sont répertoriés dans le Tableau 6.

**Tableau 6 : Amorces utilisées dans cette étude**

Amorces	Séquence <sup>a</sup>
SpcR3'/SpcR5'	GTGGGTAAACCGTGAATATC / TTAATCTGTAGACAAATTGTGA
EavalFNcoI/EavalR	CGATGCATGCCATGGACTACTACCACCATCTCGGC/ TTGTCTACAGATTAAGCTCGTGTTATTCAGCCGCC
EamontF/EamontRBamHI	TCACGGTTTACCCACTGGTTAATTACCCAGCACCC/ GGCGATATCGGATCCAATGAAAATGTAAAGCGCGC
ConfE1F/ConfE2R	TTCGGATCTTCTACTTGCTC/ ATGACATTGTTGAACAAGCG
pMad-ins-down/pMad-ins-up	CATAATTATCCCCCTAGCTAATTTTCGT/AAGCGAGAAGAATCATAATGGGGAAGG
CotEexFSalI/CotEexRSphI	ATCCTCTAGAGTCGACAAAGGGTGAAACTGGCGC/ CCAGTGCCAAGCTTGCATGCCTTATCTCTATTTTCAGGAG

<sup>a</sup> Les sites de restriction sont soulignés

Les plasmides utilisés dans cette étude sont répertoriés dans le Tableau 7.

Tableau 7 : Plasmides utilisés dans cette étude

Plasmide	Génotype <sup>a</sup>	Source
p <i>diA</i>	Sp <sup>R</sup>	Collection du laboratoire
pMAD	Ap <sup>R</sup> et Em <sup>R</sup>	(Arnaud et al. 2004)
pMADΔ <i>cotE</i>	Plasmide recombinant portant le gène tronqué BC3770Δ128-313	(Bressuire-Isoard et al. 2015)
pHT304-18	Ap <sup>R</sup> et Em <sup>R</sup>	(Sanchis et al. 1996)
pHT304-18Ω <i>cotE</i>	BC3770 (543bp) et sa région promotrice (180 bp) clonés entre les sites <i>Sall</i> et <i>SphI</i> du pHT304-18	(Bressuire-Isoard et al. 2015)
pHT304-18ΩSNAP-CotE	Région promotrice du gène BC3770 (180 pb) suivie du gène <i>Snap-tag</i> sans son codon Stop (553 pb Biolabs) liés au gène BC3770 (543bp) sans son codon Start sont clonés entre les sites <i>EcoRI</i> et <i>Sall</i> du pHT304-18	DNA 2.0
pHT304-18ΩCotE-SNAP	Gène BC3770 (543 pb) sans son codon Stop et sa région promotrice (180pb) liés au gène <i>Snap-tag</i> sans son codon Start (553 pb Biolabs) et clonés entre les sites <i>EcoRI</i> et <i>Sall</i> du pHT304-18	DNA 2.0

<sup>a</sup> Sp, spectinomycine, Ap, ampicilline ; Em, Erythromycine

## 5. Production de spores

### 5.1.1. Sporulation en milieu mFNA

Un milieu solide mFNA (20 mL) estensemencé avec 0,2 mL d'une préculture sur la nuit puis incubé 7 jours à 37°C et 20 jours à 20°C. Lorsque plus de 95 % des cellules observées au microscope en contraste de phase (X1000, Olympus BX 50) correspondent à des spores, les cellules sont récoltées. Les boîtes sont inondées avec 4 mL d'eau stérile froide et la suspension de spores est lavée 4 fois selon une série de centrifugation à 4°C (15 min à 6800xg deux fois, 15 min à 3500xg et 15 min à 2200xg). Les spores sont finalement reprises dans 2 mL d'eau stérile froide puis pasteurisées (70 °C, 15 min) et dénombrées avant leur stockage à -20°C pour les spores produites à 20°C et à 4°C pour celles produites à 37°C. Si nécessaire une purification sur un gradient de densité (Gastrografin, Bayer) est réalisée. Pour cela, la suspension de spores récoltée sur boîtes mFNA est centrifugée (6800xg 10 min à 4°C) puis reprise avec 2 mL d'eau stérile froide. Les spores sont ensuite déposées sur 30 mL d'une solution de Gastrografine à 45 % puis centrifugées à 6800xg pendant 20 min à 4°C, lavées cinq fois avec de l'eau stérile froide (6800xg, 10 min à 4°C) et reprises avec 100 µL d'une solution PBS 0,1 % Triton X-100 (v/v).

### 5.1.2. Sporulation en milieu SMB

Les cellules sont mises en culture en milieu liquide LB à 37°C jusqu'à DO<sub>600nm</sub>=1,0 puis centrifugées (6000xg, 10 min à 12°C) et reprises avec le même volume de milieu SMB. L'absence de spores avant le transfert en milieu SMB est vérifié par dénombrement de cellules thermorésistantes

(70°C, 15 min). Lorsque plus de 95 % de spores réfringentes sont observées au microscope, celles-ci sont récoltées et pasteurisées et/ou purifiées comme décrit précédemment.

## 6. Résistance des spores

### 6.1. Résistance à la chaleur humide

La thermorésistance des spores est étudiée en réalisant une cinétique de destruction où des capillaires de verre contenant 100 µL d'une suspension de spores ( $10^7$  UFC.mL<sup>-1</sup>, activée au préalable à 70°C pendant 10 min) sont scellés et immergés dans un bain-marie à 90°C pendant 2, 5, 10, 20 et 30 min puis plongés dans la glace pour arrêter la destruction. Un dénombrement en milieu solide LB est ensuite réalisé pour déterminer le nombre de spores survivantes (N) ainsi que le nombre initial de spores (N<sub>0</sub>). La destruction de spores est exprimée sous forme de réduction logarithmique, selon la formule  $\log_{10}(N/N_0)=f(t)$ .

### 6.2. Résistance aux agents chimiques

#### 6.2.1. Peroxyde d'hydrogène

Un volume de 100 µL d'une suspension de spores ( $10^7$  UFC.mL<sup>-1</sup>, activée au préalable à 70°C pendant 10 minutes) est ajouté à 900 µL de PBS (*Phosphate Buffer Saline*). Un tube témoin ne subissant pas de traitement et un tube test traité à l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 5 % sont réalisés comme suit : pour le tube témoin 416,5 µL de spores et 83,5 µL d'eau, pour le tube test 416,5 µL de spores et 83,5 µL d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 30 %. L'incubation a été réalisée à température ambiante pendant 30 min. Pour stopper la réaction, 100 µL du tube test et témoin sont prélevés et mélangés à 900 µL d'une solution de catalase bovine (PBS, 100 µg.mL<sup>-1</sup>). La mortalité des spores est évaluée par dénombrement en milieu solide LB et le % de spores résistantes est exprimé par le rapport  $(N/N_0 \times 100)$  où N<sub>0</sub> est le nombre de spores non traitées (tube témoin) et N le nombre de spores après traitement (tube test).

#### 6.2.2. Lysozyme et mutanolysine

Une suspension de spores ( $10^7$  UFC.mL<sup>-1</sup>, activée au préalable à 70°C pendant 10 min) est mélangée à une solution d'eau distillée stérile contenant 7 U.mL<sup>-1</sup> de lysozyme (Promega) ou 250 µg.mL<sup>-1</sup> de mutanolysine (Promega) puis incubée à 37°C pendant 1 h. Un dénombrement en milieu solide LB est réalisé avant et après traitement.



Le % de spores résistantes est exprimé par le rapport  $(N/N_0 \times 100)$  où N et  $N_0$  représentant respectivement le nombre de spores présentes avant et après traitement.

### 6.3. Résistance aux UV-C et à la lumière pulsée

Une suspension de spores ( $10^7$  UFC.mL<sup>-1</sup>) est activée à 70°C pendant 10 min puis conservée en glace pour éviter toute germination avant traitement. Un volume de 100 µL de 6 à 7 dilutions décimales de cette suspension estensemencé sur milieu LB (diamètre de 9 cm) qui est ensuite traitée par les radiations. La résistance à la lumière pulsée est testée à l'aide d'un appareil spécifique de la société Claranor (Avignon) Cet appareil délivre des impulsions de lumière blanche de courte durée (250 µs), de large spectre (100 - 1100 nm) et riche en UV (200 - 400 nm) sous un voltage de 2500 V. La résistance aux UV-C est mesurée suite à l'exposition continue des spores aux UV-C monochromes, d'une longueur d'onde de 254 nm, délivrés par trois lampes à mercure à basse pression (Mazda). Immédiatement après étalement, chaque boîte de milieu a été exposée à la lumière pulsée ou aux UV-C à différentes fluences. La fluence correspond à l'énergie totale reçue par unité de surface et varie dans nos conditions pour la lumière pulsée de 0,389 à 2,59 J.cm<sup>-2</sup> et pour les UV-C de 26,1 à 250 mJ.cm<sup>-2</sup>. Le nombre de colonies obtenues après traitement correspond au nombre de spores N et celles obtenues sur les boîtes non traitées, au nombre initial de spores  $N_0$ . La destruction de spores est calculée selon la formule  $\log_{10} (N/N_0)=f(t)$ .

### 7. Germination des spores

La germination des spores a été observée par la perte de réfringence des spores au microscope à contraste de phase (X1000, Olympus BX 50). Les spores ont été activées à 70°C pendant 10 min puis refroidies 5 min dans la glace. Après ajout de l'inducteur de germination, milieu LB ou une solution d'inosine à 0,5 mM préparée dans un tampon composé de 10 mM Tris et 10 mM de NaCl, les spores sont incubées à 37°C pendant maximum 3 h sous agitation (200 rpm). Un dénombrement des spores non germées et germées qui apparaissent respectivement réfringentes et noires est alors réalisé pour établir un % de germination = (Nombre de spores germées/ Nombre de spores totales) x100.

### 8. Hydrophobicité des spores

Pour mesurer l'hydrophobicité des spores, un volume de 1,9 mL d'une suspension de spores à  $DO_{600nm}=0,4 - 0,5$  ( $DO_{600nm}$  initiale) est mélangé à 100 µL de *n*-hexadecane (Sigma Aldrich) dans un tube en verre. La suspension est vortexée pendant 1 min et incubée à température ambiante pendant

15 min. Après décantation, la  $DO_{600nm}$  est de nouveau mesurée ( $DO_{600nm}$  finale). Le % d'hydrophobicité est calculé selon la formule suivante % hydrophobicité =  $100 - [(DO_{600nm} \text{ initiale} / DO_{600nm} \text{ finale} \times 100)]$ .

## 9. Etude microscopique des spores

### 9.1. Microscopie électronique à transmission

Des spores fraîchement récoltées sont centrifugées à 3500xg pendant 5 min et fixées pendant 1,5 h à température ambiante avec 2,5 % de glutaraldehyde (v/v) dans un tampon de cacodylate de sodium (pH 7,2) contenant du rouge de ruthénium ( $1 \text{ mg.mL}^{-1}$ ). Les spores sont lavées trois fois avec du cacodylate de sodium (0,2 M), centrifugées pendant 5 min à 3500xg) et fixées 1 h à température ambiante avec 2 % de tetroxide d'osmium. Par la suite, les échantillons sont lavés avec de l'eau et mélangés avec de l'éthanol à 30 %. Après centrifugation, les culots sont fixés dans une solution d'agar à 3 % (m/vol) et soumis à des bains de déshydratation successifs avec des concentrations croissantes d'éthanol (50 %, 70 %, 90 % et 100 %).

L'éthanol est remplacé par de l'oxyde de propylène et échangé séquentiellement avec de la résine d'araldite. Les échantillons polymérisent pendant 72 h à 48°C, sont découpés en coupes minces (60 nm d'épaisseur) à l'aide d'un ultra microtome (Leica) et marqués avec 2 % d'acétate d'uranyle et de citrate de plomb. Les spores sont ensuite observées au microscope électronique à transmission (TE microscope Philips CM10-FEI).

### 9.2. Immunomicroscopie électronique

Les spores ont été fixées avec un mélange de 4 % de PFA et 2,5 % de glutaraldéhyde dans un tampon phosphate de 0,1 M (pH 7,2) pendant 1 h. Les cellules ont été traitées par ultracryomicrotomie. Les grilles obtenues sont lavées pendant 30 min à 37°C pour éliminer les restes de gélatine et de méthyle cellulose, puis trempées dans de la glycine à 50 mM (pH 7,2), lavées quatre fois 5 min avec du tampon phosphate et bloquées pendant 30 min avec un tampon contenant 1 % BSA et 0,1 % de BSA-CTM (BioValley). Les coupes sont immergées avec une solution d'anticorps d'anti-SNAP (Invitrogen) diluée au 1/200 pendant 2 h puis lavées trois fois avant d'être immergées pendant 1 h avec des anticorps secondaires de lapin IgG couplés à des particules d'or colloïdales de 10 nm et dilués au 1/50 (Colombie Biocell internationaux).

Les coupes sont de nouveau lavées puis marquées avec 2 % d'acétate d'uranyle pendant 10 min et fixées pendant 10 min sur la glace avec 2 % de méthyle cellulose contenant 5 % d'acétate d'uranyle.

Les coupes de spores ont ensuite été examinées au microscope électronique (Hitachi HT7700) de la plateforme MIMA2 UR1196, INRA-CRJ ([www6.jouy.inra.fr/mima2](http://www6.jouy.inra.fr/mima2)).

### 9.3. Microscopie à fluorescence

#### 9.3.1. Prélèvements et marquages des échantillons

Un volume de 5 mL de culture est centrifugé 10 min à 4 °C à 6000xg et les cellules (endospores ou spores) sont reprises dans 0,2 mL de PBS contenant 250 nM de substrats TMR-STAR ou 505-STAR (Biolabs). Les échantillons sont incubés 30 min à 37°C à l'abri de la lumière, lavés 3 fois avec 1 mL de PBS (centrifugation à 6000xg et à 4°C pendant 3 min) et finalement repris dans 15 µL de PBS avant observation. Si nécessaire, un marquage des membranes est également réalisé. Pour cela après les trois lavages au PBS, les cellules sont reprises avec 1 mL de PBS contenant 1µg.mL<sup>-1</sup> de Mitotracker Green (MTG, Invitrogen) puis incubées 1 min dans l'obscurité à température ambiante. Après deux lavages avec 1 mL de PBS (6000xg 3 min à 4°C), les cellules sont finalement reprises avec 15 µL de PBS.

#### 9.3.2. Observation microscopique et analyse d'image

Un volume de 3 µL de cellules (endospores ou spores) est déposé sur une lame en verre surmontée d'une fine couche d'agarose à 1,7 %. Les cellules sont ensuite observées au grossissement X1000 en contraste de phase et en fluorescence avec les filtres vert (L5, excitation (BP 480/40), émission (BP 527/30) et rouge (TX2, excitation (BP 560/40), émission (BP 645/75) du microscope optique Leica DM6000B. Les images sont acquises à l'aide de la caméra CCD Ixon (Andor technologies) puis sont analysées à l'aide du logiciel Metamorph version 5.8.

## 10. Techniques biochimiques

### 10.1.1. Fractionnement des spores

Les spores purifiées par Gastrografine sont lysées par deux passages successifs dans une presse de French à la pression de 18000 lb/in<sup>2</sup> (Thermo IEC, Mini Cell). Une centrifugation à 7500xg pendant 5 min permet de séparer les spores sans exosporium (culot) de leurs fragments d'exosporium (surnageant). Un contrôle au microscope optique est réalisé afin de vérifier l'absence de spores dans le surnageant contenant l'exosporium. Un dosage protéique selon la méthode de Bradford est réalisé

sur la fraction « exosporium ». Les deux échantillons, spores « sans exosporium » et « fragments d'exosporium », sont ensuite conservés à -20°C jusqu'à utilisation.

### 10.1.2. Extraction de protéines de spores et électrophorèse

Une suspension de spores diluée au 1/200, et de  $DO_{580nm} \geq 1$  purifiée par un gradient de Gastrografine est déposée sur gel SDS-PAGE. Le volume déposé est déterminé par la formule suivante : Volume déposé ( $\mu\text{L}$ ) =  $3600 / (DO_{580nm} \times 200)$ . On ajoute à ce volume de spores du tampon d'extraction 2X (4 % SDS, 0,125 M Tris-HCl, pH 6,8, 10 % 2  $\beta$ -mercaptoéthanol, 1 mM DTT, 10 % glycérol, 0,050 % bleue de bromophénol) et de l'eau pour atteindre un volume de 60  $\mu\text{L}$ . La suspension de spores est ensuite chauffée 8 min à 100°C avant dépôt sur gel SDS-PAGE à 15 % et migration 90 min à 120 V. Les gels SDS-PAGE peuvent être colorés au Bleue de Coomassie brillant R- 250, si nécessaire. Dans le cas d'une extraction de protéines de fusion SNAP, 50 mL de culture sont centrifugés à 6800xg pendant 10 min à 4°C puis repris avec 200  $\mu\text{L}$  de PBS. Après marquage fluorescent (réalisé comme décrit voir § 9.3.1), les cellules sont centrifugées (4000xg, 5 min à 4°C) puis reprises dans 1 mL de tampon « French Press Buffer » (10 mM Tris pH 8,0, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,5 mM EDTA, 0,2 mM NaCl, 10 % Glycérol, 1 mM PMSF) et traitées par la presse de French (18000 lb/in<sup>2</sup>). Les protéines totales sont dosées par la méthode de Bradford et 15  $\mu\text{g}$  de protéines sont mélangés au tampon d'extraction 2 X et à de l'eau distillée pour un volume finale de 30  $\mu\text{L}$ .

#### 10.1.1. Visualisation de la fluorescence des protéines

La fluorescence des protéines SNAP, séparées par électrophorèse sur gel SDS-PAGE est détectée avec un fluorimager (FUJI TLA-5100). Le fluorimager permet de visualiser les signaux fluorescents à partir de différents supports avec lecture de 3 fluorochromes (530 nm, 570 nm et 610 nm). Dans nos conditions, il est utilisé sous un voltage de 1000 V.

#### 10.1.2. Western Blot

Les protéines séparées sur gel SDS-PAGE sont transférées sur une membrane de nitrocellulose selon le protocole du système « iBlot » (ThermoFisher). La membrane est plongée dans une solution de PBST (PBS et Tween 20 à 0,5 %) à 10 % de Régilait en poudre pendant 30 min sous agitation légère. Après un lavage avec du PBST pendant 5 min, la membrane est plongée dans une solution de marquage contenant l'anticorps primaire de lapin (PBST 0,5 % lait) pendant une nuit sous agitation modérée. Après deux lavages au PBST pendant 10 min, la membrane est plongée dans une solution contenant les anticorps secondaires de lapin conjugués à la peroxydase de raifort (1/10000

dans du PBST 0,5 %) pendant 30 min puis lavées de nouveau deux fois avec PBST pendant 10 min. Une révélation selon le protocole du kit de détection chemiluminescent « ECL » (Amersham Pharmacia Biotech) est réalisée.

### 10.1.3. Dosage de protéine selon la méthode de Bradford

Vingt microlitres d'une solution de protéines sont mélangés de 980  $\mu$ L de réactif de Bradford (0,01 % de bleu de Coomassie, 4,7 % d'éthanol, 8,5 % d'acide phosphorique) dilué au 1/5. Après homogénéisation, une lecture d'absorbance à 595 nm est effectuée.

### 10.1.4. Analyse protéomique

Pour identifier la composition protéique de bandes cibles découpées sur gel SDS-PAGE, une analyse de chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS/MS) est entreprise. Les peptides issus de l'hydrolyse enzymatique des protéines sont séparés par chromatographie liquide en phase inverse suivant leur hydrophobicité. Les peptides arrivent séquentiellement dans la source du spectromètre de masse (nanospray) et sont ionisés. Puis, les peptides sont analysés dans le spectromètre de masse. L'identification des protéines est ensuite réalisée utilisant le logiciel Xtandem. Le protocole expérimental est entièrement décrit dans le « Supplemental material » de l'article présenté dans le Chapitre 3.

## 11. Analyse bioinformatique

Le génome de *B. cereus* ATCC 14579 et les séquences d'autres souches sont disponible sur le site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Les comparaisons de séquences nucléiques ou protéiques, ont été réalisées respectivement par les fonctions BLASTn et BLASTp de ce même site. Les alignements de séquence sont réalisés en utilisant le programme MultiAlin ( <http://multalin.toulouse.inra.fr>) et les cartes de restriction sont obtenues sur le site [tools.neb.com/NEBcutter2/](http://tools.neb.com/NEBcutter2/). La création des amorces a été assistée par le programme Primer 3 du site <http://frodo.wi.mit.edu/> et leurs hybridations spécifiques testées à l'aide du programme du site <http://www.ergo-light.com/>. Le désordre des régions protéiques a été prédit par le logiciel PONDR (<http://www.pondr.com>) et la présence de ponts disulfures sur le site DISULFIND (<http://omictools.com/disulfind-s5190.html>) .

## 12. Analyse statistique

L'intégralité des résultats de cette étude a été obtenue à partir d'échantillons de trois réplicats biologiques indépendants. Les résultats ont ensuite été soumis à une analyse de variance pour tester

les effets combinés des facteurs « souches » et « température de sporulation ». La signification statistique des différences entre moyennes au niveau  $p = 0,05$ ) est évaluée par un test de Tukey SPSS réalisé avec la version 9 du logiciel Systat (Systat Software, San José, USA) .



## **Chapitre 3**

# **Impact de la température de sporulation sur le rôle de la protéine CotE**

---





## Chapitre 3 : Impact de la température de sporulation sur le rôle de la protéine CotE dans l'assemblage des structures externes de la spore de *B. cereus*

### 1. Introduction à l'étude

Les spores bactériennes du genre *Bacillus* peuvent se former dans des environnements aux conditions physico-chimiques très diverses (milieu, pH, température,  $a_w$ ...), ce qui entraîne des modifications dans le processus de sporulation ainsi que dans les propriétés des spores ainsi formées (Nicholson et al. 2000; Sella et al. 2014). A titre d'exemple, la température de sporulation affecte l'efficacité de sporulation mais également les propriétés de germination et de résistance des spores à la chaleur humide, aux UV, aux fortes pressions et aux agents de conservation (Bressuire-Isoard et al. Under preparation).

*Bacillus cereus* est un pathogène alimentaire capable de sporuler dans des environnements variés, en particulier à des températures "non optimales" de croissance, et des travaux antérieurs réalisés au laboratoire ont montré que des spores de *B. cereus* psychrotrophes formées à basse température possèdent des propriétés différentes de celles produites à température optimale (Planchon et al. 2011).

La variation de propriétés de résistance ou de germination des spores en fonction de l'environnement peut avoir pour origine la modulation de facteurs impliqués dans l'assemblage des structures protectrices, cortex, tuniques et exosporium, au cours de la sporulation. Parmi ces facteurs, on peut citer les protéines morphogénétiques, comme SpoIVA, SafA et SpoVID qui ont pour fonction de guider l'assemblage d'autres protéines dans les enveloppes de la spore, formant ainsi un réseau complexe d'interactions protéiques (Takamatsu and Watabe 2002; Henriques and Moran 2007; McKenney, Driks et al. 2013).

Chez *Bacillus subtilis*, la protéine morphogénétique CotE est une protéine clé dans l'assemblage des tuniques externes de la spore (Zheng et al. 1988; Driks et al. 1994). Localisée à l'interface entre tunique interne et externe, elle permet principalement l'assemblage de certaines protéines de la tunique externe. Les spores du mutant  $\Delta cotE$  de *B. subtilis*, caractérisées par l'absence de tunique externe, sont plus résistantes au lysozyme et présentent un défaut de

germination (Zheng et al. 1988). Chez *Bacillus anthracis*, des travaux ont montré que la protéine CotE joue un rôle mineur dans la formation des tuniques de la spore mais un rôle majeur dans l'assemblage de l'exosporium (Giorno et al. 2007). Les spores du mutant  $\Delta cotE$  présentent un exosporium fragmenté et détaché de la surface de la spore et possèdent également un défaut de germination en réponse aux inducteurs de germination.

Chez *B. cereus*, le rôle exact de la protéine CotE dans l'assemblage des enveloppes externes de la spore n'est pas connu, ni l'impact éventuel de la température de sporulation sur le rôle de cette protéine.

Dans ce chapitre, nous avons tenté de répondre aux questions suivantes :

- Quel est le rôle de la protéine CotE dans la mise en place des structures externes des spores de *B. cereus*, et est-il modulé par la température de sporulation ?
- Quel est le rôle de la protéine CotE sur les propriétés de résistance et de germination des spores formées à différentes températures?

## 2. Stratégies envisagées

Afin de déterminer le rôle de la protéine CotE, une souche mutante délétée du gène *cotE* a été construite dans la souche ATCC 14579 de *Bacillus cereus*. Ainsi, 1/3 du gène BC\_3770 a été remplacé par une cassette de résistance à la spectinomycine comme précédemment décrit (Arnaud et al. 2004). La complémentation du mutant  $\Delta cotE$ , par apport en trans du gène *cotE* sous le contrôle de sa région promotrice native, a également été réalisée afin de valider l'implication directe du gène *cotE* dans les phénotypes des spores de la souche mutante. Les spores des souches WT,  $\Delta cotE$  et  $\Delta cotE\Omega cotE$  ont été produites à une température « suboptimale » de 20°C, et la température « optimale » de 37°C.

Nous avons observé en microscopie à transmission, les conséquences de l'absence de la protéine CotE sur l'ultrastructure des spores formées à 37°C et à 20°C, en comparant les spores des souches  $\Delta cotE$  et WT. Nous avons également déterminé si les changements structuraux observés aux deux températures pouvaient affecter la composition protéique des couches externes des spores. Les conséquences de telles modifications ont été étudiées par analyse des propriétés de résistance,

de germination et d'hydrophobicité des spores  $\Delta cotE$  et WT en fonction de la température de sporulation

### 3. Résultats et discussion

De façon intéressante, nous avons constaté, en Western-blot, une quantité plus importante de protéine CotE dans les extraits de spores formées à 20°C que dans les extraits de spores formées à 37°C. Ce résultat peut s'expliquer par : i) une expression plus importante du gène *cotE* à basse température, ii) un réseau d'interactions protéiques conduisant à une différence d'incorporation et donc d'extractabilité de CotE, plus facile à 20°C qu'à 37°C, iii) un état de cross-linking de protéines des tuniques différent entre les deux températures de sporulation et modifiant ainsi l'extractabilité de la protéine CotE.

Les observations des coupes en microscopie électronique à transmission, révèlent que les spores  $\Delta cotE$  formées à 20°C ont un exosporium et des tuniques fragmentés et détachés du reste de la structure. En revanche, pour les spores formées à 37°C seul l'exosporium est touché contrairement au mutant  $\Delta cotE$  de *B. anthracis* qui possède en plus à 37°C des tuniques qui ne sont pas complètement attachées au cortex (Giorno et al. 2007). Chez *B. cereus*, CotE est nécessaire à l'assemblage de l'exosporium et à son attachement aux structures plus internes, comme décrit chez *B. anthracis*.

Nous avons mis en évidence que les modifications structurales observées s'accompagnent de changements dans le contenu protéique des spores WT et  $\Delta cotE$ , aux deux températures de sporulation testées. Les analyses protéomiques réalisées indiquent que l'absence de la protéine CotE affecte également la présence et/ou l'extractabilité de plusieurs protéines des tuniques et de l'exosporium, de façon plus importante dans les spores produites à 20°C que dans celles produites à 37°C. En effet, certaines protéines sont absentes dans les spores  $\Delta cotE$ , parmi elles : superoxide dismutase (SOD) qui joue un rôle dans la résistance au stress oxydatif (Henriques and Moran 2000; Steichen et al. 2003; Cybulski et al. 2009) et un orthologue de la protéine YhcN qui joue un rôle dans la germination (Bagyan et al. 1998; Kuwana et al. 2002).

L'absence de la protéine CotE et/ou la température de sporulation affectent également certaines propriétés des spores : quelle que soit la température de sporulation, les spores de la souche  $\Delta cotE$  ont un défaut de germination en réponse à une induction par l'inosine et sont moins hydrophobes que les spores WT. Ces résultats concordent avec l'absence de protéines, de tuniques et d'exosporium, ayant un rôle respectif dans la germination et l'hydrophobicité des spores. De plus,

ces spores ont une plus grande sensibilité aux UV-C et au peroxyde d'hydrogène, mais une résistance à la chaleur plus élevée. Par ailleurs, les spores  $\Delta cotE$  formées à 20°C, sont sensibles à l'action du lysozyme et de la mutanolysine, sensibilité qui pourrait être dû aux défauts d'assemblage de l'exosporium et des tuniques observés, qui faciliterait l'accès des enzymes au cortex, sans exclure une possible modification du cortex lui-même qui n'a pas été analysé.

Nous avons montré dans cette étude que la protéine CotE joue un rôle important dans l'assemblage de l'exosporium des spores de *B. cereus* et que la température de sporulation impacte également la structure des spores. De plus, la formation de spores en condition suboptimale a permis de révéler que CotE a également un rôle dans l'assemblage des tuniques.

#### 4. Article: *Sporulation temperature reveals a requirement for CotE in the assembly of both the coat and exosporium layers of Bacillus cereus spores*

Manuscrit accepté pour publication dans « Applied and Environmental Microbiology »

**Christelle Bressuire-Isoard**<sup>1,2</sup>, Isabelle Bornard<sup>3</sup>, Adriano O. Henriques<sup>4</sup>, Frédéric Carlin<sup>1,2</sup>, Véronique Broussolle<sup>1,2#</sup>

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

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

<sup>3</sup>INRA, UR407 Pathologie Végétale, Montfavet, France

<sup>4</sup>Instituto de Tecnologia Química e Biológica, Universidade Nova de Lisboa, Avenida da República, Estação Agronómica Nacional, 2780-157 Oeiras, Portugal

#: corresponding author: [veronique.broussolle@avignon.inra.fr](mailto:veronique.broussolle@avignon.inra.fr)

Keywords: exosporium, coat proteins, resistance, spore germination, spore structure

#### 4.1. Abstract

The *Bacillus cereus* spore surface layers consist of a coat surrounded by an exosporium. We investigated the interplay between the sporulation temperature and the CotE morphogenetic protein in the assembly of the surface layers of *B. cereus* ATCC 14579 spores and on the resulting spore properties. The *cotE* deletion affects the coat and exosporium composition of the spores formed both at the suboptimal temperature of 20°C and at the optimal growth temperature of 37°C. Transmission

electron microscopy revealed that  $\Delta cotE$  spores had a fragmented and detached exosporium when formed at 37°C. However, when produced at 20°C,  $\Delta cotE$  spores showed defects in both coat and exosporium attachment and were susceptible to lysozyme and mutanolysin. Thus, CotE has a role in the assembly of both the coat and exosporium, which is more important during sporulation at 20°C. CotE was more represented in extracts from spores formed at 20°C than at 37°C, suggesting that increased synthesis of the protein is required to maintain proper assembly of spore surface layers at the former temperature.  $\Delta cotE$  spores formed at either sporulation temperature were impaired in inosine-triggered germination and resistance to UV-C and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and were less hydrophobic than wild-type (WT) spores but had a higher resistance to wet heat. While underscoring the role of CotE in the assembly of *B. cereus* spore surface layers, our study also suggests a contribution of the protein to functional properties of additional spore structures. Moreover, it also suggests a complex relationship between the function of a spore morphogenetic protein and environmental factors such as the temperature during spore formation.

## 4.2. Introduction

Bacterial endospores are formed in a wide range of ecological niches in soil, as well as in the gastrointestinal tract of invertebrate and vertebrate animals, and in both natural and anthropized environments (Nicholson et al. 2000). Physical and chemical conditions prevailing in such niches play a major role in triggering sporulation and in determining the final properties of the resulting spores (Carlin 2010). Laboratory experiments demonstrate the major influence of environment, in particular of temperature, on the efficiency and yield of sporulation, and in spore resistance to wet heat, UV, high hydrostatic pressure, and preservatives or spore response to germinants (Melly et al. 2002; reviewed in references Nicholson et al. 2000 and Setlow 2006).

Spore resistance and functional properties result from the assembly of several protective structures: cortex, coat, and exosporium. The spore peptidoglycan cortex, a structure common to all endospores, is a major factor in the resistance of spores to heat (Nicholson et al. 2000; Setlow 2006). The cortex is surrounded by a proteinaceous coat, and in organisms such as *Bacillus anthracis* or *Bacillus cereus* the coat is further enveloped by an exosporium, a “balloon-like” structure consisting of a paracrystalline basal layer and an external hair-like nap formed mainly by the collagen-like glycoprotein BclA ((Sylvestre et al. 2002; Daubenspeck et al. 2004; Boydston et al. 2005; Henriques and Moran 2007; Ball et al. 2008; Kailas et al. 2011; McKenney et al. 2013). While the coat contributes to protection against peptidoglycan-breaking enzymes, UV light, and oxidative agents, it is also central to the proper interaction of spores with compounds that trigger germination (McKenney et al. 2013). The exosporium also contributes to spore resistance and germination and is additionally a key

determinant in the adhesion of spores to cells and abiotic surfaces (Henriques and Moran 2007; Lequette(a) et al. 2011; Lequette(b) et al. 2011; Terry et al. 2011).

At the onset of sporulation, the cell divides asymmetrically to produce a larger mother cell and a smaller forespore, or future spore. Each of these cells receives a copy of the genome and deploys cell type-specific programs of gene expression. Assembly of the coat and exosporium takes place in the mother cell and involves the coordinated expression of a large number of mother cell-specific genes, under the governance of the early,  $\sigma^E$ , and late,  $\sigma^K$ , mother cell-specific RNA polymerase sigma factors (Henriques and Moran 2007; Higgins and Dworkin 2012; McKenney et al. 2013). Studies in the model organism *Bacillus subtilis* have evidenced the role of a group of so-called morphogenetic proteins in directing the assembly of the coat components (McKenney et al. 2013). In *B. subtilis*, the coat is differentiated into an inner layer, an outer layer, and a more external structure called the crust (Imamura et al. 2010; McKenney et al. 2010; Imamura et al. 2011).

Dedicated morphogenetic proteins govern the assembly of the various coat substructures. SafA is the main factor driving inner coat assembly, whereas CotE is the key determinant for the assembly of the spore outer coat and indirectly of the crust through recruitment of the morphogenetic protein CotZ (McKenney et al. 2013). Expression of both SafA and CotE begins early in the other cell line of gene expression, under the control of  $\sigma^E$  and both proteins localize early to the surface of the developing spore (Takamatsu et al. 1998; Ozin et al. 2000; Costa et al. 2007; McKenney et al. 2010). SafA is thought to localize close to the spore outer membrane, from where it recruits a group of inner coat proteins. CotE is thought to localize at a distance from the spore outer membrane, at the future inner coat/outer coat interface (McKenney et al. 2010) and, from this position, to recruit the proteins that form the outer coat substructure, as well as CotZ (Little and Driks 2001; Henriques and Moran 2007; McKenney et al. 2010). Accordingly, spores of a *cotE* mutant of *B. subtilis* lack the outer coat and the crust (Zheng et al. 1988). Spores of a *cotE* mutant are also impaired in germination, and susceptible to lysozyme treatment and to predation by protozoa (Zheng et al. 1988; Klobutcher et al. 2006; Carroll et al. 2008; Laaberki and Dworkin 2008).

In spores of *B. anthracis* and the closely related organism *B. cereus*, the coat is thinner and more compact than in *B. subtilis*, but an inner and an outer layer still seem to be present (Aronson and Fitzjames 1976). A *B. cereus* mutant unable to produce ExsA, a protein related to *B. subtilis* SafA, form spores with gross defects in the attachment of the coat and exosporium layers, and that are susceptible to lysozyme and impaired in germination (Bailey-Smith et al. 2005). Like SafA, ExsA is produced early in sporulation possibly under the control of  $\sigma^E$  (Bailey-Smith et al. 2005). In contrast, CotE, which is also produced early in sporulation, plays a minor role in formation of the spore coat in

*B. anthracis* but a major role in assembly of the exosporium (Todd et al. 2003; Giorno et al. 2007). Although spores of a *cotE* deletion mutant of *B. anthracis* show deficient attachment of the coat to the underlying spore cortex, their main phenotype is a fragmented or entirely missing exosporium (Giorno et al. 2007). Moreover, at least two proteins involved in exosporium assembly, CotY and ExsY (Redmond et al. 2004; Steichen et al. 2005; Boydston et al. 2006; Johnson et al. 2006) fail to be assembled in spores of the  $\Delta cotE$  mutant (Giorno et al. 2007). It is inferred that some as-yet-unidentified material fills the space between the coat and the exosporium, or interspace, connecting the two structures; CotE itself may localize at the edge of the coat, helping to connect this material, and hence the exosporium to the coat layers (Giorno et al. 2007). While fully heat resistant, spores of a *cotE* deletion mutant were also impaired in germination (Giorno et al. 2007). The  $\Delta cotE$  mutation had no impact on the virulence of *B. anthracis* (Giorno et al. 2007). However, the BclA protein plays a central role in *B. anthracis* pathogenesis, by promoting proper interaction of spores with the host phagocytic cell, which allows transport of the spores to sites of spore germination and bacterial growth (Oliva et al. 2008; Oliva et al. 2009). The role of CotE in the assembly of the spore surface layers in *B. cereus* has not been reported.

Strains of *B. cereus sensu lato* accomplish their life cycles in highly diverse ecological thermal niches, potentially generating spores with highly different properties (Jensen et al. 2003; Guinebretiere et al. 2008). *B. cereus* is also a major cause of foodborne poisoning, because of the resistance of its spores and its capacity to grow in different kinds of food products. A better understanding of the mechanisms affecting the resistance properties of *B. cereus* spores or their ability to germinate and grow is essential to the design of more-efficient control measures in the food chain.

In this study, we investigated how the sporulation temperature could affect the role of morphogenetic protein CotE in the assembly of the *B. cereus* ATCC 14579 spore surface layers. We constructed a  $\Delta cotE$  deletion mutant and we studied the consequences of the mutation on the ultrastructure and the protein composition of the spore surface layers and on the functional properties of spores produced at a suboptimal growth temperature (20°C), in comparison to an optimal growth temperature (37°C).

We show that deletion of *cotE* affects the composition of the spore surface layers at both 20°C and 37°C, causing the absence or reduced extractability of several proteins and increased representation or extractability of others. The changes in protein composition were greater in spores formed at 20°C. These spores had incomplete and loosely attached coats and exosporium and were susceptible to lysozyme and mutanolysin. Thus, our study unravels an important role of CotE in the assembly of both the coat and exosporium layers in spores of *B. cereus*. Moreover,  $\Delta cotE$  spores



show increased resistance to wet heat at 90°C, higher susceptibility to UV-C and to hydrogen peroxide, regardless of the sporulation temperature. Finally, we show that  $\Delta cotE$  spores formed at both temperatures were impaired in inosine-triggered germination and were less hydrophobic than wild-type (WT) spores.

While underscoring the importance of CotE in the assembly of the spore surface layers in the pathogen *B. cereus*, our study also documents the complex interplay between the function of a coat/exosporium morphogenetic protein and environmental factors such as temperature during spore formation.

### 4.3. Materials and Methods

#### 4.3.1. Strains and general methods

All bacterial strains and plasmids are listed in Table 1.

Tableau 1 : Strains and plasmids used in this study

Strains <sup>a</sup> or plasmids	Relevant genotype <sup>b</sup>	Source or reference
Strains		
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579 (Type strain) (WT)	pBclin15- cured	Laboratory collection
<i>B. cereus</i> $\Delta cotE$	ATCC 14579 BC3770 $\Delta$ 128-313	This work
<i>B. cereus</i> $\Delta cotE\Omega cotE$	ATCC 14579 BC3770 $\Delta$ 128-313+ pHT304-18 $\Omega cotE$	
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	<i>fhuA2 lac(del)U169 phoA glnV44 <math>\Phi</math>80' lacZ(del)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17</i>	Laboratory collection
<i>E. coli</i> SCS110	<i>rpsL thr leu endA thi-1 lacY galK galT ara tonA tsx dam dcm supE44 <math>\Delta</math>(lac-proAB)</i>	
<i>E. coli</i> TOP10	<i>F- mcrA <math>\Delta</math>(mrr-hsdRMS-mcrBC) <math>\Phi</math>80lacZ<math>\Delta</math>M15 <math>\Delta</math>lacX74 recA1 araD139 <math>\Delta</math>(ara leu) 7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG</i>	Invitrogen
Plasmids		
pdiA	Vector harboring a Sp <sup>R</sup> gene	Laboratory collection
pMAD	Ap <sup>R</sup> and Em <sup>R</sup> shuttle vector	(Arnaud et al. 2004)
pMAAD $\Delta cotE$	Recombinant pMAD harboring BC3770 $\Delta$ 128-313	This work
pHT304-18	Ap <sup>R</sup> and Em <sup>R</sup> cloning vector	(Sanchis et al. 1996)
pHT304-18 $\Omega cotE$	BC3770 (543 bp) and its upstream region (180 bp) cloned between the <i>Sall</i> and <i>SphI</i> sites of pHT304-18	This work

<sup>a</sup> ATCC American Type Culture Collection

<sup>b</sup> Sp, spectinomycin, Ap, ampicillin ; Em, Erythromycin

*Bacillus cereus* and *Escherichia coli* strains were grown routinely at 37°C in Luria-Bertani broth (LB) with stirring at 200 rpm. When necessary, antibiotics were added at the following concentrations:

ampicillin at 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  for *E. coli* cultures, spectinomycin at 275  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  and erythromycin at 5  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  for *B. cereus* cultures. X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside) was added to LB agar (LB broth + 15 g.Liter<sup>-1</sup> agar) at a final concentration of 50  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . *B. cereus* chromosomal DNA was extracted from cells harvested in mid-log phase of growth in LB (Guinebretiere et al. 2003). Transformation of *B. cereus* was performed by electroporation as previously described (Arnaud et al. 2004). Transformants were selected on LB plates containing erythromycin or spectinomycin. All constructions were confirmed by DNA sequencing (GATC, Constance, Germany).

#### 4.3.2. Mutant construction

A *cotE* insertional mutant was constructed by allele exchange as follows. Firstly, fragments corresponding to the regions upstream (578 bp) and downstream (582 bp) of the *cotE* coding region (BC\_3370) were PCR amplified from *B. cereus* chromosomal DNA using primer pairs EavalFNcoI/EavalR and EamontF/EamontRBamHI, respectively (the sequence of all primers is given in Table 2), and a 1,197-bp spectinomycin cassette was amplified from plasmid pDiA (Laouami et al. 2011), using primers SpcR3'/SpcR5'. The three PCR fragments were joined together using primers EavalF/EamontR and the resulting product was introduced into pTOPO-XL (Invitrogen, Saint Aubin, France) to produce pCotE. Next, the fragment was released from pCotE with NotI and BamHI and inserted between the same sites of pMAD (Arnaud et al. 2004). The resulting plasmid pMAD $\Delta$ *cotE* was introduced into *E. coli* SCS110 *dam dcm mutant* (a strain with a double deletion of genes *dam* and *dcm*) to obtain unmethylated DNA to be used for *B. cereus* transformation. pMAD $\Delta$ *cotE* was introduced into *B. cereus* by electroporation (above) and allelic exchange was selected for by successive cultures at 42°C essentially as described previously (Arnaud et al. 2004). White colonies of spectinomycin (Spc)-resistant and erythromycin (Em)-sensitive cells arising from a double crossing-over event were selected on spectinomycin-containing LB agar plates supplemented with X-gal (50  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). Deletion of *cotE* was verified by PCR using the following combinations of primers: ConfE1F/ConfE2R, pMad-ins-down/ConfE2R, ConfE1F/pMad-ins-up, ConfE1F/EamontR, EavalF/ConfE2R, pMad-ins-down/pMad-ins-up, pMad-in-down/EamontR, pMad-ins-up/EavalF and EamontR/EavalF. Deletion of *cotE* was further verified by DNA sequencing of PCR fragments generated with primers ConfE1FSall and ConfE2RSphI. For complementation tests, a DNA fragment encompassing the entire *cotE* gene (543 bp) and 180 bp of its upstream region was amplified by PCR with primers CotEexF and CotEexR, cleaved with Sall and SphI, and inserted between the same sites of pHT304-18 (Arantes and Lereclus 1991) to generate pHT304-18 $\Omega$ *cotE* (Table 1). pHT304-18 $\Omega$ *cotE* was introduced into the *B. cereus*  $\Delta$ *cotE* mutant by electroporation followed by selection of transformants on erythromycin-containing LB agar plates.

**Tableau 2 : Oligonucleotides used in this study**

Primers	Sequence <sup>a</sup>
SpcR3'/SpcR5'	GTGGGTAACCGTGAATATC/TTAATCTGTAGACAAATTGTGA
EavalFNcoI/EavalR	<u>CGATGCATGCCATGG</u> ACTACTACCACCATCTCGGC/ TTGTCTACAGATTAAGCTCGTGTATTTCAGCCGCC
EamontF/EamontRBamHI	TCACGGTTTACCCACTGGTTAATTACCCAGCACCC/ <u>GGCGATATCGGATCCA</u> ATGAAAATGTAAAGCGCGC
ConfE1F/ConfE2R	TTCGGATCTTCTACTTGCTC/ ATGACATTGTTGAACAAGCG
pMad-ins-down/pMad-ins-up	CATAATTATTCCCCCTAGCTAATTTTCGT/ AAGCGAGAAGAATCATAATGGGGAAGG
CotEexFSalI/CotEexRSphI	ATCCTCTAGAG <u>TCGACA</u> AAAGGGTGAAACTGGCGC/ CCAGTGCCAAGCTT <u>GCGATGC</u> CTTATCTCTCTATTTTCAGGAG

<sup>a</sup> Engineered restriction sites are underlined.

### 4.3.3. Spore production

*B. cereus* spores were produced on modified fortified nutrient agar (mFNA) (Broussolle et al. 2008). A 0.2-mL volume of an overnight culture in LB at 37°C was spread on mFNA plates and incubated for 7 days at 37°C or for 20 days at 20°C until > 95 % of cells observed under a phase-contrast microscope at a magnification of 1,000X (Olympus BX 50; Rungis, France) were free phase-bright spores. Plates were flooded with 4 mL of sterile cold demineralized water, and the spore suspensions were washed in sterile cold demineralized water by a series of four 15-min centrifugations at 4°C (twice at 6,800xg, then at 3,500xg and finally at 2,200xg). Spores were finally suspended in 2 ml of sterile cold demineralized water. The spore titer in these suspensions was used as an estimation of the sporulation yield on mFNA. For the extraction of spore proteins for mass spectrometry analysis (see below), highly purified spore suspensions were prepared by density gradient centrifugation through a solution of 45 % Gastrografin (Bayer, Newbury, United Kingdom). Following centrifugation at 6,800xg for 20 min at 4°C, the spore sediment was washed five times in sterile cold demineralized water (each wash was followed by centrifugation at 4°C, for 10 min at 6,800xg) and finally re-suspended in 100 µL of phosphate-buffered saline containing 0.1 % of Triton X-100 (vol/vol). The presence of 0.1 % Triton prevented spore clumping and facilitated the quantification of the suspension and the extraction of the coat proteins (see also below). After heat treatment at 70°C for 15 min, spore suspensions were stored at 4°C or -20°C and used within 1 month.

#### 4.3.4. Transmission electron microscopy (TEM)

Freshly prepared spores were centrifuged at 3,500xg during 5 min and fixed for 1.5 h at room temperature with 2.5 % glutaraldehyde (vol/vol) in a 0.1 M sodium cacodylate buffer (pH 7.2) containing 1 mg.mL<sup>-1</sup> ruthenium red. Spores were washed by three centrifugations (5 min at 3,500xg) in 0.2 M sodium cacodylate and fixed for 1 h at room temperature with 2 % osmium tetroxide. Next, the samples were washed with water and mixed with 30% ethanol. After centrifugation, pellets were embedded in 3 % (wt/vol) agar and submitted to successive agitated dehydration baths with increasing concentrations of ethanol (50 %, 70 %, 90 % and 100 %). Ethanol was replaced with propylene oxide and sequentially exchanged with araldite resin. Samples were polymerized for 72 h at 48°C. Thin sections (60 nm thick) were obtained with an ultramicrotome (Leica, France) and stained with 2 % uranyl acetate and lead citrate. At least 30 spores in each of two independent batches of spores formed at 37°C and 20°C were observed by Transmission electron microscopy (TEM; TE Microscope FEI-Philips CM10, Netherlands).

#### 4.3.5. Assessment of spore resistance to physical and chemical treatments

Wet heat resistance tests at 90°C were performed with 0.2 mL of a heat-activated (10 min at 70°C) spore suspension (10<sup>7</sup> CFU.mL<sup>-1</sup>) in sealed capillary tubes (Baril et al. 2011). Resistance to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was tested by incubating 1 mL of a heat-activated spore suspension (10<sup>7</sup> CFU.mL<sup>-1</sup>) for 30 min at room temperature in a 5 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solution, as previously described (Planchon et al. 2011). The sensitivity of spores to lytic enzymes was tested by following changes in CFU counts on LB agar plates of spores (10<sup>7</sup> CFU.mL<sup>-1</sup>) exposed for 1 h at 37°C to lysozyme at 7 U.mL<sup>-1</sup> or mutanolysin (both from Promega) at 250 µg.mL<sup>-1</sup> in water. Lysozyme hydrolyzes the β-1,4 glycosidic bonds between *N*-acetylmuramic acid (MurNAc) and *N*-acetylglucosamine (GlucNAc), while mutanolysin hydrolyzes *O*-acetylated peptidoglycans. Radiation resistance (Planchon et al. 2011) was assessed by using (i) a pulsed-light (PL) equipment (Claranor SA, Avignon, France) delivering 250-µs pulses of broad-spectrum white light (100 to 1,100 nm) under an input voltage of 2,500 V and at fluences ranging from 0.389 to 2.59 J.cm<sup>-2</sup>, and (ii) a device made of low-pressure mercury lamps (model TUV-T8, 15 W; Philips, Netherlands) emitting short-wave UV-C radiations with a peak at 253.7 nm and with an irradiation strength of 1.07 W.cm<sup>-2</sup>. Tests were performed as previously described (Planchon, Dargaignaratz et al. 2011). For each assay, the reduction in viable spore counts was determined and expressed as a percentage (N/N<sub>0</sub> x 100) or as a log<sub>10</sub> reduction log<sub>10</sub> (N/N<sub>0</sub>), where N<sub>0</sub> is the initial spore count and N is the count of surviving spores. Tests were performed with three independently prepared spore suspensions.

#### 4.3.6. Spore hydrophobicity

A 1.9-mL volume of a spore suspension in water, at an optical density at 600 nm ( $OD_{600}$ ) between 0.4 and 0.5, was mixed with 100  $\mu$ L of *n*-hexadecane (Sigma-Aldrich, Zwijndrecht, Netherlands), vortexed for 1 min, and incubated at room temperature for 15 min for separation into solvent and water phases. The percent of hydrophobicity was calculated using the following formula: % hydrophobicity =  $100 - [(OD_{600} \text{ of the spore suspension in water after phase separation} / OD_{600} \text{ of the spore suspension in water}) \times 100]$  (de Vries et al. 2004). Tests were performed with three independently prepared spore suspensions.

#### 4.3.7. Spore germination

Germination assays were performed by incubating heat-activated spores (70°C, 10 min) in a 0.5 mM inosine-10 mM Tris-10 mM NaCl buffer solution or in LB medium at 37°C for 3 h with agitation (200 rpm). Phase-bright (ungerminated) and phase-dark (germinated) spores were scored over time by phase-contrast microscopy. At least 100 spores were counted for each suspension and germination time. The percentage of germination is the number of germinated spores / (total number of spores x 100).

#### 4.3.8. Extraction and analysis of spore proteins

Proteins were extracted from a 200-fold dilution of spore suspensions at an initial  $OD_{595}$  of 1.0. Spore suspensions in a volume of 60  $\mu$ L were mixed with an equal volume of extraction buffer (4 % SDS, 0.125 M Tris-HCl [pH 6.8], 10 % 2-mercaptoethanol, 1mM dithiothreitol [DTT], 10 % glycerol, 0.050 % bromophenol blue) and heated at 100°C for 8 min. Proteins were electrophoretically resolved on 15 % SDS-PAGE gels and visualized by Coomassie brilliant blue R-250 staining. For Western blot analysis, a previously described anti-*B. anthracis* CotE polyclonal antibody was used at a dilution of 1:4,000 (Giorno et al 2007). A total of 19 bands showing different intensity between the extracts obtained from WT or  $\Delta cotE$  spores formed at 37°C or 20°C were isolated. For LC-MS/MS analysis, gel slices (2 mm by 1 mm) were cut and transferred into a 96-well polypropylene plate, which had been pierced by laser (FrameStar, 0750/Las; 4titude). Gel pieces were washed for 15 min with an acetonitrile 100 mM ammonium bicarbonate mixture (1:1). Digestion was performed at 37°C in 50 mM ammonium bicarbonate (pH 8.0), and the quantity of modified trypsin (sequencing grade; Promega) was 0.1  $\mu$ g per sample (40  $\mu$ l) (Gardan et al 2009). The supernatant was transferred by centrifugation in another 96-well plate without holes (FrameStar, 0960/C; 4titude). Peptides were extracted by 5 % (vol/vol) formic acid in water/acetonitrile. Tryptic peptides were dried and suspended again in 30  $\mu$ l of 0.1 %

(vol/vol) trifluoroacetic acid (TFA) and 2 % (vol/vol) acetonitrile. High-performance liquid chromatography (HPLC) was performed on a nanoRsLC system (Dionex, Germany). A 4  $\mu\text{l}$  sample was loaded at 20  $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$  on a precolumn cartridge (stationary phase, C18 PepMap 100, 5  $\mu\text{m}$ ; column, 300  $\mu\text{m}$  inner diameter [i.d.], 5 mm; Dionex). Separation was performed on a PepMap 100 C18 column (3  $\mu\text{m}$ ; column, 75- $\mu\text{m}$  i.d., 150 mm; Dionex). Buffers A and B were as follows: A, 0.1% HCOOH and 2 % ACN; B, 0.1 % HCOOH and 80 % ACN. The peptide separation was achieved with a linear gradient from 0 to 36 % buffer (B) for 42 min at 300  $\text{nl}\cdot\text{min}^{-1}$ , including the regeneration step at 100 % buffer (B) and the equilibration step at 100 % buffer (A). Eluted peptides were analyzed online with an LTQ-Orbitrap mass spectrometer (Thermo Electron, USA) using a nanoelectrospray interface. Peptide ions were analyzed using the Xcalibur 2.07 software with the following data-dependent acquisition steps: step 1, full MS scan in orbitrap mass-to-charge ratio ( $m/z$ ), 300 to 1,600, profile mode; step 2, MS/MS in linear trap ( $q_z = 0.25$ ; activation time, 30 ms; collision energy, 45 %; centroid mode). Step 2 was repeated for the four major ions detected in step 1. Dynamic exclusion time was set to 90 s. A database search was performed with the X!Tandem software (<http://www.thegpm.org/tandem/index.html>, version Sledge Hammer 2013.09.01) using X!TandemPipeline (version 3.3.3) developed by the PAPPSO platform (<http://pappso.inra.fr/index.php>). Enzymatic cleavage was declared as a trypsin digestion with one possible miscleavage. Cysteine carboxyamidomethylation and methionine oxidation were set to static and possible modifications, respectively. Precursor mass and fragment mass tolerance were 10 ppm and 0.5 Da, respectively. A refinement search was added with similar parameters except that semitryptic peptide and possible N-ter proteins acetylation were searched. The Uniprot database was used with *B. cereus* strain ATCC 14579 (5,363 entries, version 2015/02/19 from <http://www.uniprot.org/uniprot>). Only peptides with an E value lower than 0.1 were kept, and filters for X!Tandem pipeline were as follows: (i) a minimum of two different peptides was required with a E value smaller than 0.05 and (ii) a maximal protein log (E value) (calculated as the product of unique peptide E values) to conserve a protein  $\geq 2$ . To take redundancy into account, proteins with at least one peptide in common were grouped. This allowed to group proteins of similar function. Within each group, proteins with at least one specific peptide relatively to other members of the group were reported as sub-groups.

#### 4.3.9. Statistical analysis

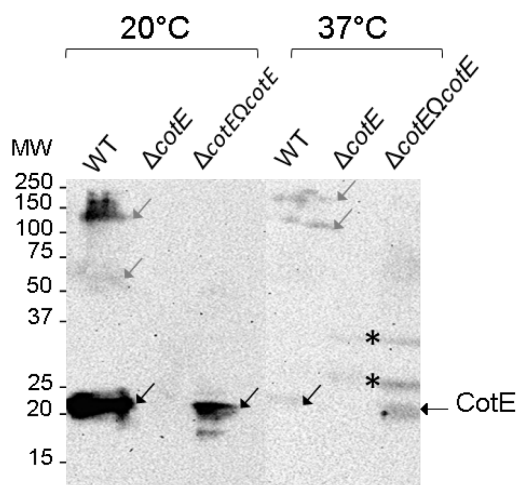
Results were subjected to a one-way variance analysis to test the effects of the strain-sporulation temperature combination. The significance at P values of  $< 0.05$  of the statistical differences of the means was tested with the Tukey's test (SPSS Systat version 9, Chicago, IL, USA).

## 4.4. Results

### 4.4.1. Deletion of *cotE* strongly impacts the structure of the outer layers and the protein composition of *B. cereus* spores formed at 20°C

The role of CotE protein in *B. cereus* spores and of its modulation by sporulation temperature was studied with a  $\Delta cotE$  mutant and a complemented strain (denoted  $\Delta cotE\Omega cotE$  strain) in the background of the ATCC 14579 type strain (WT). Both strains sporulate at both temperatures, with a lower titer, however, of  $\Delta cotE$  spores (see Table S1 in the supplemental material).

We started this investigation by examining whether the levels of CotE differed in spores of *B. cereus* ATCC 14579 formed at 20°C and at 37°C. Proteins were extracted from equal numbers of spores in highly purified spore suspensions, resolved by SDS-PAGE and subjected to immunoblotting with an anti-CotE polyclonal antibody (Giorno et al. 2007). CotE was detected with an apparent mass of 22 kDa, in agreement with the calculated mass of CotE (20.3 kDa) in extracts from WT spores produced at either 20°C or 37°C (Fig. 1). Additional bands around 60 kDa and just below the 150-kDa marker were also observed in the extracts from WT spores, at both temperatures (Fig. 1). Presumably, these species correspond to CotE multimers, as they are absent from extracts prepared from spores of the  $\Delta cotE$  mutant, formed at 20°C or 37°C (Fig.1). Surprisingly, the level of CotE, either the monomer or the presumed multimers, was 10 times higher in the extracts from spores formed at 20°C than in the extracts from spores formed at 37°C (Fig. 1). The level of CotE was lower in the complemented strain than in the WT at the same sporulation temperature; however as judged by protein levels, complementation seemed comparatively more efficient at 37°C (Fig. 1). These observations suggest that the sporulation temperature has an impact on the level of spore-associated CotE, or otherwise on its extractability

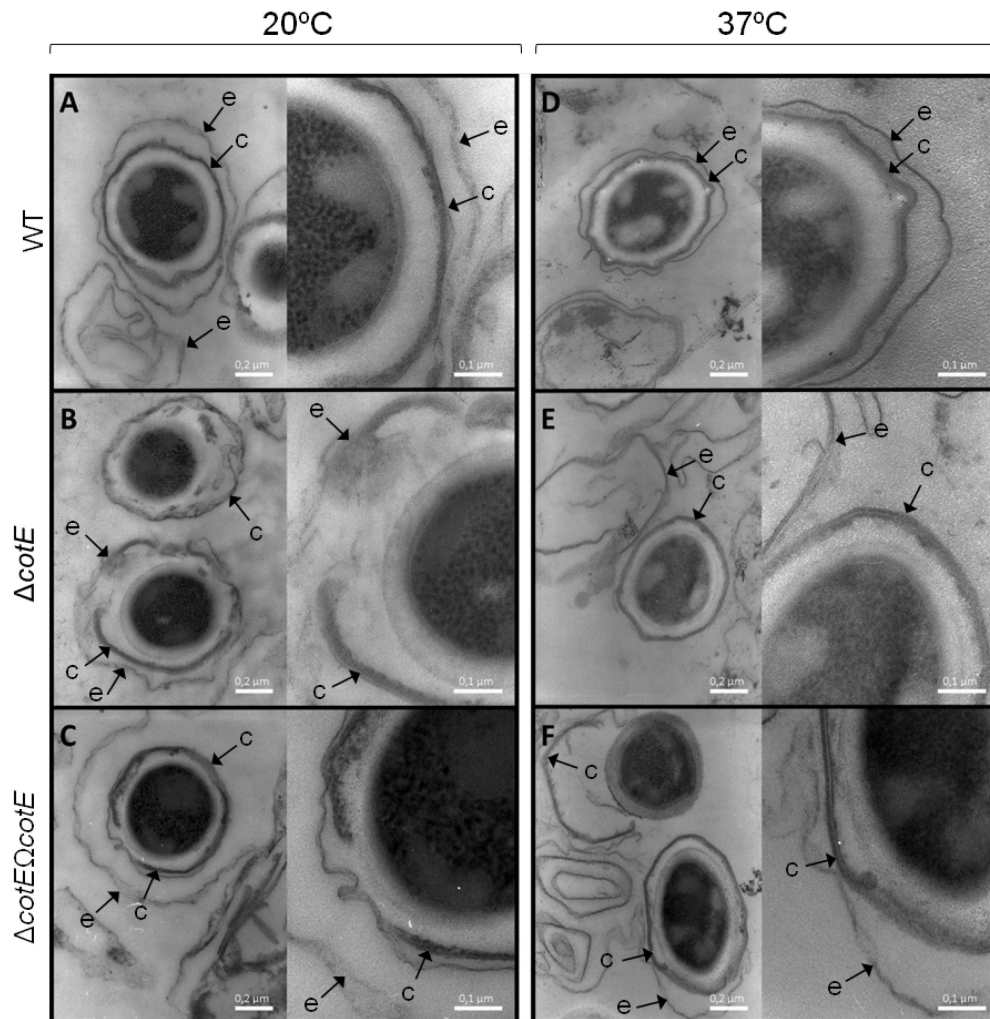


**Figure 1: Western blot analysis of protein extracts prepared from spores of *B. cereus* ATCC 14579 (WT) and congenic  $\Delta cotE$  and  $\Delta cotE\Omega cotE$  strains, formed at 20°C and 37°C.**

Total spore proteins were extracted from the same amount of spores, fractionated by SDS-PAGE and subjected to Western-blot analysis using an anti-CotE polyclonal antibody (30). Black arrows indicate CotE position and grey arrows indicate CotE multimers. The asterisks indicate non specific bands.

To investigate whether the morphology of spores was also affected by the sporulation temperature, purified spores formed at 20°C and 37°C were observed by thin-sectioning TEM. The results, shown in Fig. 2, revealed that the outer layers of WT spores were similar when spores were formed at 20°C (Fig. 2A) or at 37°C (Fig. 2D), with an exosporium forming a continuous structure around the entire spore and with a well-defined coat. In contrast, misassembled coats in addition to an incomplete and/or detached exosporium were observed in  $\Delta cotE$  spores formed at 20°C (Fig. 2B). Spores of the  $\Delta cotE$  mutant formed at 37°C showed an exosporium that either was not attached to the underlying coat or was interrupted at several locations (Fig. 2E). However, the thin coat apposed to the cortex is clearly visible in  $\Delta cotE$  spores formed at 37°C (Fig. 2E) and did not appear to differ from that of the WT (Fig. 2D). The complemented strain produced two kinds of spores at both sporulation temperatures (Fig. 2C and F): some showed a coat and exosporium similar to those of the WT, while other spores had an incomplete and detached exosporium similar to that of  $\Delta cotE$  spores formed at 37°C. More  $\Delta cotE\Omega cotE$  spores with exosporium and coat defaults were observed at 20°C (Fig. 2C) than at 37°C (Fig. 2F), suggesting that complementation was less efficient during sporulation at 20°C. Together, these results show that the function of CotE becomes more important when spores are formed at 20°C, conditions under which CotE has a role in formation of both the coat and exosporium structures. At 37°C, however, the main function of CotE is in the assembly of the exosporium. Possibly, the increased levels of CotE found in spores formed at 20°C relative to those formed at 37°C reflect the additional function of the protein in the assembly of the coat layers.

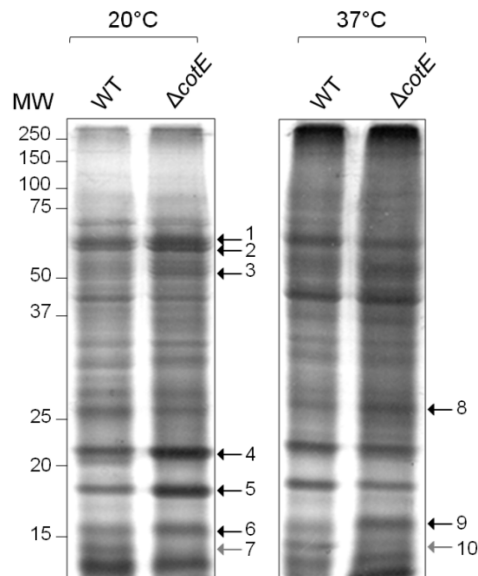




**Figure 2: Transmission electron microscopy of thin sections of spores of *B. cereus* ATCC 14579 WT (A and D),  $\Delta cotE$  (B and E) and  $\Delta cotE\Omega cotE$  (C and F), formed at 20°C (A, B and C) and 37°C (D, E and F). c, spore coats and e, exosporium. The concentric layers of WT spores are intact and surround spores at both sporulation temperatures (A and D).  $\Delta cotE$  spores formed at 20°C and 37°C exhibit a fragmented and detached exosporium (B and E) and the coat layers are locally interrupted (B). At both temperatures, some  $\Delta cotE\Omega cotE$  spores exhibit the same concentric arrangement of the spore layers as WT, but some lack an intact exosporium and surrounding coats (C and F).**

#### 4.4.2. Deletion of *cotE* alters the protein composition of *B. cereus* spores formed at 20°C and at 37°C

To determine whether these morphological alterations were accompanied by changes in the composition of the coat and exosporium layers, extraction of proteins from total purified spores was performed before electrophoretic resolution. Coomassie brilliant blue staining of the total spore protein extracts revealed that the intensity of 7 species in spores formed at 20°C and of 3 species in spores formed at 37°C varied between the extracts obtained from  $\Delta cotE$  or WT spores (Fig. 3, arrows).



**Figure 3: SDS-PAGE of the proteins extracted from the surface layers of *B. cereus* ATCC 14579 WT and  $\Delta cotE$  spores.**

Coat and exosporium proteins were extracted from spores formed at 20°C and 37°C, separated on a 15% polyacrylamide gel and stained with Coomassie brilliant blue. Arrows and numbers indicate bands in the protein extract of  $\Delta cotE$  spores with enhanced (black arrows) or lowered intensity (grey arrows) when compared to WT.

These intensity changes may result from altered levels and/or extractability of specific proteins. The proteins present in these bands were identified by liquid chromatography-tandem mass (LC-MS/MS) analysis (Table 3). Nineteen proteins were not detected in  $\Delta cotE$  versus WT spores formed at 20°C.

Among these proteins were CotJC, previously assigned to the coat and exosporium (Abhyankar et al. 2013) the exosporium protein CotB (Abhyankar et al. 2013), a superoxide dismutase (SOD) (BC\_1468), and BC\_4419, an orthologue of the *B. subtilis* YhcN spore protein (Bagyan et al. 1998). In addition, six proteins were detected only in  $\Delta cotE$  spores formed at 20°C, including another superoxide dismutase, BC\_5445 (Table 3). Thus, when spores are formed at 20°C, deletion of *cotE* affects the assembly and/or extractability of proteins thought to be present in both the coat and exosporium layers, consistent with the impaired formation of both the coat and exosporium layers as seen by TEM analysis.

TABLE 3 *B. cereus* ATCC 14579 proteins with differential detection in spores of the WT and  $\Delta$ cotE strains formed at 20°C and 37°C<sup>a</sup>

Protein identification <sup>b</sup> in spores formed at temp of:	Locus (gene name)	Protein accession no.	Mol mass (kDa)	Protein E value <sup>c</sup>	% of sequence covered	No. of spectra <sup>d</sup>	Detection in WT spores	Detection in $\Delta$ cotE spores	Putative location of protein in spore <sup>e</sup>
<b>20°C</b>									
CotJ/C protein	BC_0821	Q81H17	21.6	-63.25	38	24	+	-	Coats and exosporium
Spore coat protein B	BC_0390	Q81J16	16.7	-24.03	24	11	+	-	Coats and exosporium
Superoxide dismutase	BC_1468	Q81FV0	26.7	-28.04	23	10	+	-	Exosporium
Uncharacterized protein	BC_4419 ( <i>ykcW</i> )	Q817V9	24.4	-43.80	47	15	+	-	Coats
Nucleotide-binding protein	BC_1159	Q81GN2	18.3	-30.49	42	12	+	-	ND
Transcription elongation factor	BC_4374	Q817Z6	17.4	-39.00	56	11	+	-	ND
Peptidyl-prolyl <i>cis-trans</i> -isomerase	BC_4061	Q819C5	15.7	-21.45	43	10	+	-	ND
Uncharacterized protein	BC_4047 ( <i>cotG</i> )	Q819D8	14.0	-59.85	68	21	+	-	Coats and exosporium
Phosphoenolpyruvate	BC_4048	Q819D7	62.6	-82.05	30	25	+	-	Cytosolic fraction
DEAD box ATP-dependent RNA helicase CsbA	BC_0259	Q81I19	59.3	-45.90	24	17	+	-	ND
Pyruvate synthase alpha chain	BC_3774	Q81A21	64.3	-40.39	20	12	+	-	Cytosolic fraction
2,3-Bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase	BC_5136	Q815K7	56.2	-25.80	18	11	+	-	ND
Pyruvate oxidase	BC_2328	Q81DM9	61.8	-30.12	17	11	+	-	ND
Long-chain-fatty- $\alpha$ -d-coenzyme A ligase	BC_4526	Q817L4	55.2	-33.46	19	10	+	-	Cytosolic fraction
Adenylate kinase	BC_0152	Q81J22	23.7	-26.99	50	13	+	-	ND
Nitroreductase family protein	BC_3390	Q81B06	22.6	-48.24	46	26	+	-	Cytosolic fraction
Dipicolinate synthase subunit B	BC_3800	Q819Z6	21.6	-48.93	56	17	+	-	Cytosolic fraction
FMN-dependent NADH-azoreductase 1	BC_1835	Q81EX6	22.9	-27.02	36	12	+	-	ND
Hypoxanthin e-guanine phosphoribosyltransferase	BC_0071	Q81J83	20.2	-29.20	38	12	+	-	Cytosolic fraction
Superoxide dismutase Mn <sub>2</sub>	BC_5445	Q814I6	23.9	-75.05	56	13	-	+	ND
Chaperon protein DnaK	BC_4312	Q818E9	65.6	-14.58	42	26	-	+	ND
GroES co-chaperonin	BC_0294	Q814B1	10.0	-70.83	76	17	-	+	ND
Nucleoside diphosphate kinase	BC_1515	Q81FQ4	16.6	-44.62	50	12	-	+	ND
ABC transporter ATP-binding protein	BC_4221	Q818M8	33.1	-39.27	34	15	-	+	ND
<b>37°C</b>									
Uncharacterized protein	BC_5391 ( <i>gerQ</i> )	Q814N4	16	-38.90	30	15	+	-	Coats
Superoxide dismutase (Cu-Zn)	BC_4907	Q816F2	19	-34.89	47	11	+	-	ND
Uncharacterized protein	BC_0212 ( <i>yusW</i> )	Q81IY1	17.6	-51.73	44	13	+	-	Coats
Alkyl hydroperoxide reductase CZZ	BC_0377	Q81IK9	20.6	-45.22	68	16	-	+	ND

<sup>a</sup> +, presence of protein in analyzed and -, absence of proteins in analyzed bands

<sup>b</sup> Proteins were identified by LC-MS/MS analysis and names corresponds to annotation in the *B. cereus* ATCC 14579 genome

<sup>c</sup> Here protein E value is the product of its valid unique peptide E values and is different from the protein E values determined by XITandem. The values are expressed in log (E value)

<sup>d</sup> Number of spectra in LC MS/MS analysis

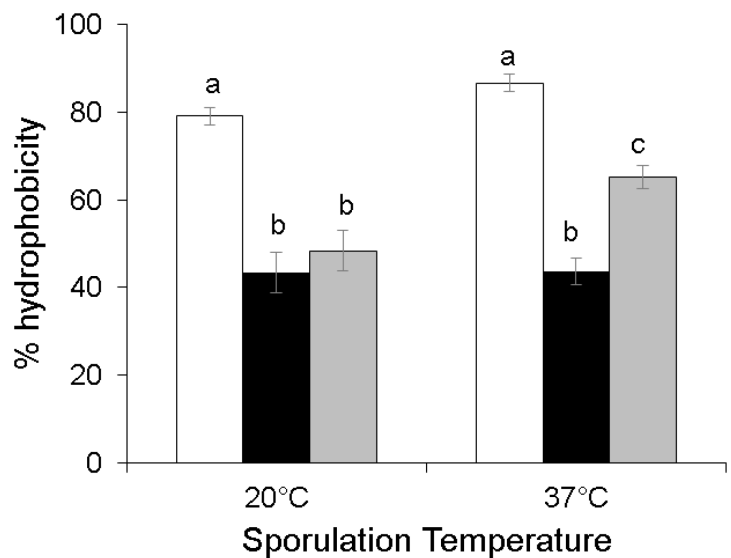
<sup>e</sup> Location of proteins according to Abhyankar et al (2013) ND, not determined

Three proteins were not detected in  $\Delta cotE$  spores formed at 37°C (Table 3), including an uncharacterized protein BC\_0212, homologue to *B. subtilis* YusW, BC\_5391, an orthologue of the spore coat protein GerQ/YwdL of *B. subtilis* (63 % sequence identity) previously shown to be required for proper assembly of the exosporium in *B. cereus* (Terry et al. 2011) and a [Cu-Zn] superoxide dismutase, homologue to the *B. anthracis* SodC (Cybulski et al. 2009). All three were detected in WT spores. Thus, when spores are formed at 37°C, deletion of *cotE* impairs the assembly of at least one protein required for exosporium assembly. This is consistent with the electron microscopy analysis (see above) and suggests that during sporulation at 37°C the main function of CotE is in proper assembly of the exosporium.

#### **4.4.3. Spore hydrophobicity and germination are affected by *cotE* deletion and not by sporulation temperature**

The results described above suggested that sporulation temperature and deletion of *cotE* affected the composition and structure of the spore surface layers. We therefore tested whether the sporulation temperature, the *cotE* deletion, and the combination of the two factors had also an impact on spore properties that rely on proper assembly of the surface layers. One of these properties is spore hydrophobicity. It is well established that impaired formation of the exosporium strongly reduced the hydrophobicity of spores (Bailey-Smith et al. 2005).

An assay based on the partitioning of spores purified through extensive water washing between aqueous and hexadecane phases was used to screen a library of transposon mutants for those forming spores with reduced hydrophobicity, leading to the identification of the *exsA* and *exsY* genes (28, 31). A similar assay was employed here. Spores produced by the  $\Delta cotE$  strain at 20°C were significantly ( $P < 0.05$ ) less hydrophobic than WT spores (43 % vs 79 % of spores partitioned into the solvent after phase separation) (Fig. 4).

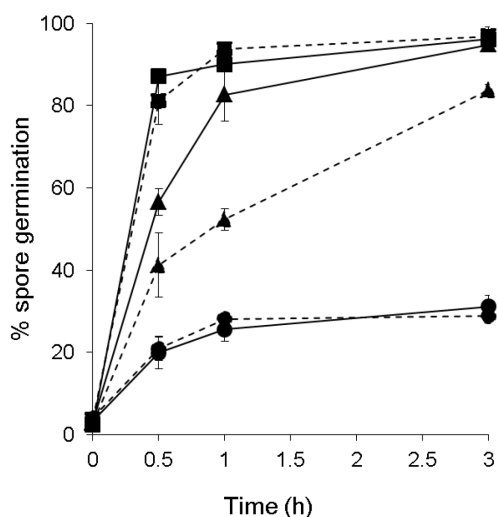


**Figure 4: Hydrophobicity of spores of *B. cereus* ATCC 14579 WT (white bars),  $\Delta cotE$  (black bars) and  $\Delta cotE \Omega cotE$  (grey bars) strains formed at 20°C and 37°C.**

The percentage of hydrophobicity represents the proportion (x100) of spores in *n*-hexadecane after a separation into solvent and water phases. Each hydrophobicity % is the mean of three replicate experiments, each performed with an independently prepared spore suspension. Bars represent standard deviation. Different letters show significant differences at  $P < 0.05$  (Tukey's test).

Moreover, an adhesion test showed that  $\Delta cotE$  spores were less adherent to polypropylene tubes than the WT spores, which is accordance with their lower hydrophobicity (see Fig. S1 in the supplemental material). The same difference in the hydrophobicity of the mutant and the WT was observed when spores were formed at 37°C (44 % for the WT versus 87 % for  $\Delta cotE$  spores). This suggests that the absence of CotE has a major effect on spore hydrophobicity, while the sporulation temperature does not. Complementation partially restored the WT phenotype, but only when  $\Delta cotE \Omega cotE$  spores were formed at 37°C.

The spore surface layers also influence the response of spores to germinants (Setlow 2014). *B. subtilis* mutants with strong defects in coat assembly are impaired in germination (Henriques and Moran 2007; Setlow 2013), and *B. anthracis* or *B. cereus* mutants with defects in exosporium assembly are also impaired in spore germination (Bailey-Smith et al. 2005; Giorno et al. 2007; Giorno et al. 2009; Terry et al. 2011). In particular, a *cotE* mutant of *B. anthracis* was shown to be impaired in germination (Giorno et al. 2007). After 1 h in the presence of inosine, 90 % of WT spores formed at 20°C had germinated as compared to only 26 % of  $\Delta cotE$  spores (Fig. 5).



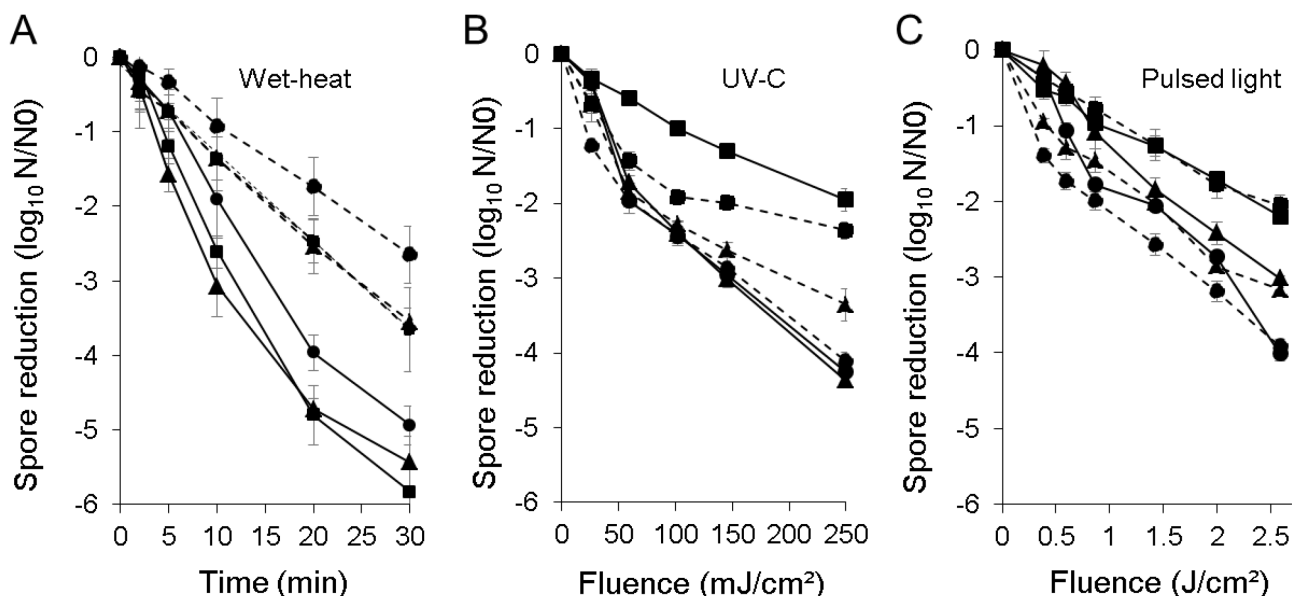
**Figure 5: Germination in response to 0.5 mM inosine of *B. cereus* ATCC 14579 (■)  $\Delta cotE$  (●) and  $\Delta cotE\Omega cotE$  (▲) spores formed at 20°C (solid line) and 37°C (dashed line).**

The percentage of germination was determined after counting of phase-bright (ungerminated) and phase-dark (germinated) spores with a phase-contrast microscope. The numbers represent the mean of three replicate experiments, each performed with an independently prepared spore suspension. Bars represent standard deviation.

The extent of spore germination rate did not increase further with time. Thus, under conditions where deletion of *cotE* impairs assembly of both the coat and exosporium, the mutation also strongly affects spore germination. However, the extent of inosine-triggered germination after 1 h for  $\Delta cotE$  and WT spores formed at 37°C was similar to that observed for spores produced at 20°C (28 % for the mutant and 94 % for the WT) (Fig. 5). This suggests that impaired germination may result from altered assembly of specific coat/exosporium components, rather than being caused by the morphological alterations detected by TEM, particularly at 20°C. Complementation partially restored the WT phenotype when spores were formed at 37°C (52 % germination for  $\Delta cotE\Omega cotE$  spores after 1 h and 84 % after 3 h at 37°C) (Fig. 5). Complementation was however more efficient for  $\Delta cotE\Omega cotE$  spores formed at 20°C; these spores germinated more rapidly than spores formed at 37°C (83 % germination for  $\Delta cotE\Omega cotE$  spores after 1 h and 95 % after 3 h) (Fig. 5). Thus, the germination defect of  $\Delta cotE$  spores was due mainly to deletion of *cotE*, which strongly impacted the germination capacity at the two sporulation temperatures. The percentage of inosine-triggered germination of  $\Delta cotE$  spores remained unchanged between 3 and 24 h after induction whatever the temperature (data not shown). Interestingly, the germination defect detected for  $\Delta cotE$  spores in inosine buffer was not observed when germination was induced in LB broth: more than 90 % spores germinated 1 h after induction and WT,  $\Delta cotE$  and  $\Delta cotE\Omega cotE$  spores behaved very similarly (data not shown). This is in line with the inference that the germination defect imposed by the mutation may be due to impaired assembly of coat/exosporium components required for proper germination under specific conditions.

#### 4.4.4. Sporulation temperature and deletion of *cotE* affect the resistance of spores to physical insults

Spores of the three strains formed at 20°C were less resistant to wet heat than spores formed at 37°C (Fig. 6A), confirming that sporulation temperature is an important factor influencing the wet heat resistance of *B. cereus* spores. Surprisingly, whatever the sporulation temperature,  $\Delta cotE$  spores tended to be more resistant to wet heat at 90°C than WT spores (Fig. 6A) and complementation restored the WT phenotype for both sporulation conditions.



**Figure 6: Sensitivity of *B. cereus* ATCC 14579 (■)  $\Delta cotE$  (●) and  $\Delta cotE\Omega cotE$  (▲) spores formed at 20°C (solid line) and 37°C (dashed line) to wet heat at 90°C (A), UV-C (B) and pulsed light (C).**

Each log<sub>10</sub> reduction is the mean of three replicate experiments, each performed with an independently prepared spore suspension. Bars represent standard deviation.

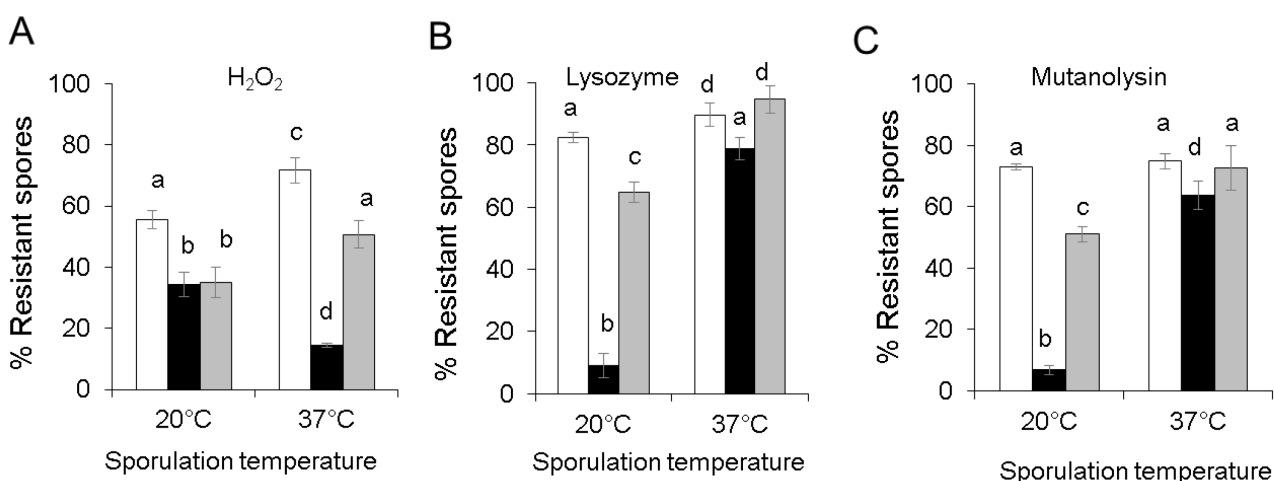
This result suggests that absence of CotE could directly or indirectly, affect one or several of the factors known to influence wet heat resistance, i.e. water, mineral ion, dipicolinic acid (DPA), cortex composition or small acid soluble protein (SASP) content of the spore core (Setlow 2006). One possibility is that CotE is required for the proper assembly of one or more components required for proper formation and/or modification of the spore cortex peptidoglycan.

Spores of the  $\Delta cotE$  strain formed at 20°C and 37°C had a significantly higher sensitivity to UV-C than spores of the WT (Fig. 6B). WT spores formed at 20°C were more resistant to UV-C than those formed at 37°C (Fig. 6B). Spores of the  $\Delta cotE\Omega cotE$  strain had the same sensitivity as  $\Delta cotE$  spores when formed at 20° but had an intermediate resistance to UV-C between the ones of WT and  $\Delta cotE$  spores when formed at 37°C (Fig. 6B).

When submitted to a pulsed-light (PL) treatment,  $\Delta cotE$  spores formed at 20°C and 37°C were more sensitive than WT spores (Fig. 6C). The  $\Delta cotE\Omega cotE$  spores (reduction of 3 log<sub>10</sub>) had an intermediate resistance to PL, higher than or similar to that of the  $\Delta cotE$  spores but lower than that of WT spores, suggesting that the higher PL sensitivity of  $\Delta cotE$  spores was due mainly to *cotE* deletion. In addition, spores formed at 20°C and 37°C behaved similarly when exposed to PL.

#### 4.4.5. Sporulation temperature and *cotE* deletion affect the chemical resistance of spores

Considering resistance to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,  $\Delta cotE$  spores formed at 20°C were significantly less resistant ( $P < 0.05$ ) (34 % spores surviving after 30 min exposure to 5 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) than WT spores (56 % surviving spores) and the same effect was observed with spores formed at 37°C (14 % versus 72 %, for  $\Delta cotE$  and WT spores respectively) (Fig. 7A).



**Figure 7: Resistance of *B. cereus* WT (white bars),  $\Delta cotE$  (black bars) and  $\Delta cotE\Omega cotE$  (grey bars) spores formed at 20°C and 37°C exposed for 30 min to 5 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (vol/vol) (A), for 1 h to 7 U.mL<sup>-1</sup> lysozyme (B) and to 250 µg.mL<sup>-1</sup> of mutanolysin (C).**

For each inactivation treatment, bars sharing the same letter were not significantly different ( $P < 0.05$ , Tukey's test). Bars represent standard deviation of three experiments, each performed with an independently prepared spore suspension.

Complementation partially restored the resistance of spores formed at 37°C (51 % surviving spores), but not that of spores formed at 20°C (35 % surviving spores), as no significant difference with  $\Delta cotE$  spores was observed. Additionally, WT and  $\Delta cotE\Omega cotE$  spores formed at 20°C were less resistant to 5 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> than those formed at 37°C, whereas  $\Delta cotE$  spores formed at the two sporulation temperatures were surprisingly more resistant (Fig. 7A).



Proper formation of the spore surface layers affords protection of the underlying spore cortex peptidoglycan against peptidoglycan-breaking enzymes (McKenney et al. 2013). When analyzing the resistance of spores to lysozyme and mutanolysin,  $\Delta cotE$  spores formed at 20°C were significantly more sensitive (9 % and 7 % surviving spores, respectively) than WT spores (82 % and 73 % surviving spores, respectively), after exposure to either enzyme for 60 min (Fig. 7B and C).  $\Delta cotE$  spores formed at 37°C were also significantly more sensitive ( $P < 0.05$ ) to both enzymes (79 % and 64 % respectively) than WT spores (90 and 75 % respectively). Complementation restored resistance to lysozyme and mutanolysin to WT levels, at both sporulation temperatures. The increased resistance of *cotE* spores to peptidoglycan-breaking enzymes is consistent with the TEM analysis, and suggests that both the assembly of the coat and the assembly of the exosporium contribute to cortex protection.

#### 4.5. Discussion

We have shown that the sporulation temperature and deletion of *cotE* have a strong impact on the morphology and properties of *B. cereus* ATCC 14579 spores. For spores of the *cotE* mutant formed during sporulation either at 20°C or 37°C, the exosporium, as seen by TEM, was present as fragments that failed to encase the spore, and were often detached. Thus, CotE is required for proper assembly of the exosporium and its attachment to the inner layer structures of *B. cereus* spores, consistent with previous work on the characterization of a *cotE* deletion mutant of the related organism *B. anthracis* (Giorno et al. 2007). At a sporulation temperature of 37°C, deletion of *cotE* had no detectable effect on the morphology of the *B. cereus* spore coat, while the coats of *B. anthracis* spores are not fully attached to the underlying cortex layer (Zheng et al. 1988; Giorno et al. 2007). However, when formed at 20°C, in addition to impaired assembly of the exosporium,  $\Delta cotE$  spores showed incomplete and often loosely attached coat layers. Thus, CotE plays an additional role in coat assembly at low sporulation temperature.

Consistent with the ultrastructural analysis, the representation of several proteins in extracts of coat and exosporium proteins differed between WT and  $\Delta cotE$  spores at the two sporulation temperatures tested. The alterations in the representation of these proteins are likely to contribute to the morphological changes observed. Importantly, deletion of *cotE* affects the presence or extractability of more proteins in spores formed at 20°C, than in those formed at 37°C. CotE itself is more represented in extracts from spores produced at 20°C than in those produced at 37°C (Fig. 1). More CotE could be produced and assembled at low temperature, and we note that expression of the *B. subtilis cotE* and *sigE* genes is also known to be induced during adaptation to low temperature (Budde et al. 2006). It is also possible that the increased representation of CotE in spores formed at

20°C results from increased extractability. In *B. subtilis* spores, a fraction of CotE is present as multimeric species, possibly covalently cross-linked (Little and Driks 2001; Kuwana et al. 2002; Lai et al. 2003; Costa et al. 2007). At least one multimeric form of CotE is extracted from *B. cereus* spores produced at either 20°C or 37°C (Fig. 1). However, this form is also more represented in the extracts from spores produced at 20°C. This suggests that the increased representation of CotE in the extracts from the spores formed at 20°C may result from increased synthesis of the protein. It was previously noted that lowering the sporulation temperature resulted in increased levels of the outer coat (CotE-dependent) CotA laccase in *B. subtilis* spores and it was suggested that this could be due to changes in the level or activity of CotE (Melly et al. 2002). It is tempting to suggest that increased assembly and/or activity of CotE may be required to maintain proper assembly and function of the coat/exosporium in *B. cereus* when sporulation takes place at 20°C.

The profile of extractable coat proteins for WT or  $\Delta cotE$  spores also suggests that the *cotE* deletion impacts the structure and composition of both the coat and the exosporium layers of the spore, with the effect on the coat more pronounced at 20°C. CotB, not detected in  $\Delta cotE$  spores formed at 20°C, is a well-characterized exosporium orthologue of the *B. subtilis* outer coat protein CotB (Redmond et al. 2004; Mallozzi et al. 2008; Isticato et al. 2010). Superoxide dismutase (SOD) proteins were also undetected in  $\Delta cotE$  spores regardless of the sporulation temperature. At least one SOD is associated with the spore coat in *B. subtilis* (Henriques et al. 1998). An iron/manganese SOD is also associated with the exosporium of *B. anthracis*, where it plays a role in oxidative stress resistance (Henriques and Moran 2000; Steichen et al. 2003; Cybulski et al. 2009). That these proteins are absent from  $\Delta cotE$  spores is consistent with the strong impact of the mutation in exosporium assembly and with previous work on the characterization of *B. anthracis*  $\Delta cotE$  spores (Giorno et al. 2007).  $\Delta cotE$  spores are susceptible to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and it seems possible that the impaired assembly of SOD (and possibly also of the manganese catalase CotJC; see below) con than those with intact coats, and the outer coat-associated CotA laccase was shown to have a role in protection against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Setlow 2006; Wiencek et al. 1990; Riesenman and Nicholson 2000).

Importantly, a group of proteins affected by deletion of *cotE* may be associated with the coat. For instance, the BC\_5391 protein, absent in  $\Delta cotE$  spores formed at 37°C, is an orthologue of the *B. subtilis* coat protein GerQ, which is most likely localized in the inner coat (Ragkousi and Setlow 2004; Imamura et al. 2010). Although deletion of *gerQ* (*ywdL*) in *B. cereus* leads to exosporium fragility, this effect could be due to an abnormal assembly of the underlying coat (Terry et al. 2011).

Also, undetected in *B. cereus*  $\Delta cotE$  spores formed at 20°C is CotJC previously detected in a proteomic analysis of *B. cereus* ATCC 14579 spores (Abhyankar et al. 2013) and whose *B. subtilis* orthologue is a component of the inner most coat layers (Seyler et al. 1997). Lastly, the BC\_4419

protein which is most likely an orthologue of the *B. subtilis* YhcN lipoprotein thought to be present in the spore inner membrane and to be important for spore germination (Bagyan et al. 1998; Kuwana et al. 2002) is also undetected in *B. cereus*  $\Delta cotE$  spores formed at 20°C.

We do not presently know whether the proteins whose assembly is impaired by the *cotE* mutation at 20°C are directly recruited by CotE to the developing spore, or whether CotE is required for their maintenance around the spore, as found for several *B. subtilis* coat proteins (Kim et al. 2006; McKenney et al. 2010). CotE may be localized at the edge of the coat from where it somehow promotes attachment of the exosporium. In its absence, while assembly of the exosporium is compromised, several coat proteins may fail to remain associated with the spore. If so, why more proteins are missing from  $\Delta cotE$  spores produced at 20°C is unclear. While it is possible that the missing proteins are directly recruited by CotE, it may also be that at 20°C the coat structure is not properly consolidated, for example through covalent protein cross-linking, and more proteins are lost from these spores over time.

Importantly, the alterations seen in the composition of the surface layers of the  $\Delta cotE$  spores may also explain, at least in part, additional properties of the mutant spores. Deletion of *gerQ* (*ywdL*) in *B. cereus* impairs germination in response to exogenous CaDPA and to inosine (Barlass et al. 2002; Terry, Shepherd et al. 2011). Deletion of *cotE* also impairs inosine-triggered spore germination in *B. anthracis* (Giorno, et al. 2007). Therefore, the *B. cereus* germination phenotype of the  $\Delta cotE$  spores could be due, at least in part, to the misassembly of the YhcN/YlaJ orthologue at 20°C and of GerQ/YwdL at 37°C. Additional coat proteins, such as CotO and CotH, which play a role in germination, possibly by affecting the interaction of germinants with spores (Henriques and Moran 2007), were undetected in  $\Delta cotE$  spores in our study. Moreover, the exosporium contains several enzymes, such as the alanine racemase Alr, shown to be involved in *B. anthracis* spore germination (Chesnokova et al. 2009) and which was also undetected in  $\Delta cotE$  spores in our study. Thus, the impaired interaction of germinants with spores and/or reduced accessibility to germinant receptors caused by the observed spore structural alterations, may explain the impaired germination observed for  $\Delta cotE$  spores formed at both 20°C and 37°C.

Also  $\Delta cotE$  spores showed lower hydrophobicity than WT spores. The exosporium is hydrophobic and plays a major role in spore adherence and pathogenicity of some species (Aronson 2012). Our results are also consistent with previous studies showing that *B. cereus*  $\Delta exsA$  spores lacking an exosporium are less hydrophobic than WT spores (Bailey-Smith et al. 2005). We did not observe any additional effect when lowering the sporulation temperature on the hydrophobicity of WT

or  $\Delta cotE$  spores of *B. cereus*, in line with previous results in other *B. cereus* strains and other *Bacillus* species (Wiencek et al. 1990).

When formed at 20°C,  $\Delta cotE$  spores were much more sensitive than the WT spores to lysozyme and mutanolysin activities. Possibly, the defect in coat and exosporium assembly observed for  $\Delta cotE$  spores formed at 20°C increases the accessibility of both lytic enzymes to the cortex. This is in line with the observation that *B. subtilis*  $\Delta cotE$  spores, which fail to assemble the outer coat layer, are sensitive to lysozyme (Zheng et al. 1988). However, we cannot exclude that *cotE* expression is required for the assembly of components involved in proper cortex formation and/or maturation, independently or in addition to a barrier function of the coats (Costa et al. 2007).

Interestingly,  $\Delta cotE$  spores were more resistant to wet heat treatment than WT spores at the two tested sporulation temperatures and even more when formed at higher temperature. In contrast, increased resistance to wet heat correlated with higher sporulation temperatures for *B. subtilis* spores (Melly et al. 2002). However, some environmental conditions such as anaerobiosis are known to lead to increased heat-resistance of *B. cereus* spores (Abbas et al. 2014). Heat resistance is multifactorial and a number of factors, such as a higher quantity of DPA, and/or lower spore water content, or the structure of the cortex, could explain the higher heat resistance of  $\Delta cotE$  than WT spores (Melly et al. 2002; Setlow 2006).

*B. cereus*  $\Delta cotE$  spores are less resistant to UV radiation (delivered by either UV-C or PL) treatment than WT spores. In contrast, spores of a *B. subtilis*  $\Delta cotE$  mutant were more resistant to UV-C treatment (Riesenman and Nicholson 2000). The forespore-specific  $\alpha/\beta$ -type SASP proteins are the major determinant for spore resistance to UV radiation in *B. subtilis* (Setlow 2014) and it is presently unknown whether CotE somehow influences their level (Riesenman and Nicholson 2000). Lowering the sporulation temperature did not impact the resistance to UV of WT and  $\Delta cotE$  spores in the *B. cereus* ATCC 14579 strain, in line with the observation that *B. subtilis* prepared at different temperatures had identical levels of  $\alpha/\beta$ -type SASP proteins and essentially identical resistance to UV radiation (Melly et al. 2002). However, lowering the sporulation temperature caused a reduction in the resistance of *B. weihenstephanensis* (belonging to the *B. cereus* group) KBAB4 spores to UV radiation (Planchon et al. 2011). The reason for these differences among strains is presently unclear. Possibly, as-yet-unknown factors contribute to spore resistance to UV radiation.

In conclusion, low sporulation temperature revealed a new major role for the CotE protein in spore morphogenesis of *B. cereus*. Understanding the spore assembly mechanisms under different environmental conditions may help to assess the structure and properties of spores existing in natural

environment and the development of optimized industrial treatments, particularly in the food chain, to limit survival and germination of contaminating spores.

#### 4.6. Acknowledgements

We thank Adam Driks for gift of anti-cotE antibodies, Arnaud Chastanet for insightful discussions, Céline Henry, from *Plateforme Analyse Protéomique de Paris Sud-Ouest* (PAPPSO), INRA Jouy-en-Josas (France) for help and support in the proteomic analysis, Stéphanie Chamot and Stéphanie Oriol-Gagnier for excellent technical assistance.

#### 4.7. Funding information

This work is a partial fulfillment of C.B PhD thesis under a *Contrat Doctoral* from *Université de Montpellier* (France) and was partly supported by *Programme Hubert Curien Pessoa* under contract 30919SJ.

#### 4.8. Supplemental Materials

##### 4.8.1. Table S1

**Table S1.** Sporulation yield and maximum specific growth rates ( $\mu_{max}$ ) of *B. cereus* ATCC 14579 WT,  $\Delta cotE$  and  $\Delta cotE\Omega cotE$  strains at 20° and 37°C

Characters	Strains and temperature					
	20°C			37°C		
	WT	$\Delta cotE$	$\Delta cotE\Omega cotE$	WT	$\Delta cotE$	$\Delta cotE\Omega cotE$
Final spore concentrations <sup>#</sup> (log <sub>10</sub> CFU.mL <sup>-1</sup> )	9.12±0.12 <sup>a</sup>	7.79±0.20 <sup>b</sup>	8.06±0.26 <sup>bc</sup>	9.33±0.57 <sup>a</sup>	8.84±0.52 <sup>ab</sup>	9.56±0.12 <sup>a</sup>
$\mu_{max}$ <sup>#</sup> (h <sup>-1</sup> )	0.56 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.50 ± 0.02 <sup>b</sup>	0.47 ± 0.03 <sup>c</sup>	2.59 ± 0.05 <sup>c</sup>	2.31 ± 0.05 <sup>d</sup>	2.31 ± 0.01 <sup>e</sup>

\* Concentrations of spore suspensions prepared on mFNA

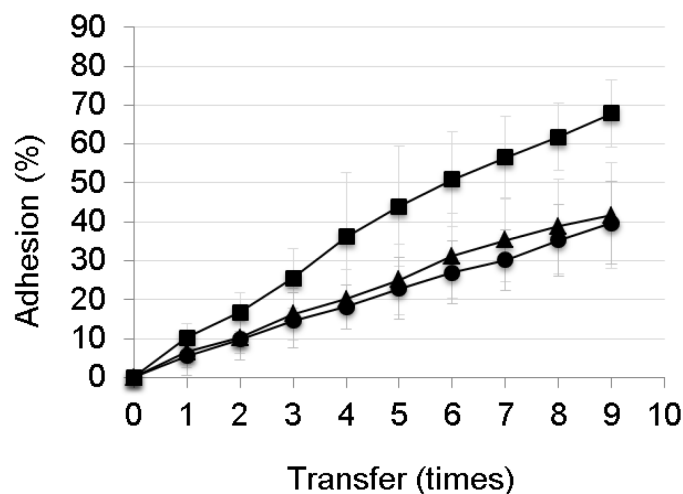
# Different superscript letters show significant differences ( $P < 0.05$ , Tukey's test,). Mean ± standard deviation, n = 3.

##### 4.8.2. Determination of growth rates at 20°C and 37°C of WT and mutant strains

The specific growth rate,  $\mu_{max}$ , was determined by calculating the inverse of the slope, when linear fitting was applied to detection time data (time to reach in LB an  $OD_{600}$  of the control non-

inoculated wells of + 0.05) against the natural logarithm of the respective inoculum levels in the wells of the Bioscreen C (Oy Growth Curves AB Ltd) at 20°C or of the Infinite M200 PRO (TECAN, Männedorf, Switzerland) at 37°C (Carlin and Nguyen The 2013).

#### 4.8.3. Figure S1



**Figure S1: Adhesion of *B. cereus* ATCC 14579 WT (■),  $\Delta cotE$  (●) and  $\Delta cotE\Omega cotE$  (▲) spores to polypropylene tubes.**

Adhesion (%) was determined by 10 successive binding reactions of the spores to the tubes, according to the protocol described by Abe et al (2014). Error bars indicate +/- standard deviations on three experiments performed with 3 independent suspensions of spores formed at 20°C

#### 4.9. References

**Abbas AA, Planchon S, Jobin M, Schmitt P.** 2014. Absence of oxygen affects the capacity to sporulate and the spore properties of *Bacillus cereus*. *Food Microbiol* **42**:122–131.

**Abe K, Kawano Y, Iwamoto K, Arai K, Maruyama Y, Eichenberger P, Sato T.** 2014. Developmentally-regulated excision of the SPb prophage reconstitutes a gene required for spore envelope maturation in *Bacillus subtilis*. *PLoS Genet* **10**:e1004636.

**Abhyankar W, Hossain AH, Djajasaputra A, Permpoonpattana P, Ter Beek A, Dekker HL, Cutting SM, Brul S, de Koning LJ, de Koster CG.** 2013. In pursuit of protein targets: proteomic characterization of bacterial spore outer layers. *J Proteome Res* **12**:4507–4521.

**Arantes O, Lereclus D.** 1991. Construction of cloning vectors for *Bacillus thuringiensis*. *Gene* **108**:115–119.

**Arnaud M, Chastanet A, Debarbouille M.** 2004. New vector for efficient allelic replacement in naturally nontransformable, low-GC-content, gram-positive bacteria. *Appl Environ Microbiol* **70**:6887–6891.

**Aronson AI, Fitzjames P.** 1976. Structure and morphogenesis of bacterial spore coat. *Bacteriol Rev* **40**:360–402.

**Aronson AI.** 2012. The structure and composition of the outlayers of the bacterial spore, p 57–71. In Abel-Santos E (ed), *Bacterial spores: current research and applications*. Caister Academic Press, Norfolk, United Kingdom.

**Bagyan I, Setlow B, Setlow P.** 1998. New small, acid-soluble proteins unique to spores of *Bacillus subtilis*: identification of the coding genes and regulation and function of two of these genes. *J Bacteriol* **180**:6704–6712.

**Bailey-Smith K, Todd SJ, Southworth TW, Proctor J, Moir A.** 2005. The ExsA protein of *Bacillus cereus* is required for assembly of coat and exosporium onto the spore surface. *J Bacteriol* **187**:3800–3806.

**Ball DA, Taylor R, Todd SJ, Redmond C, Couture-Tosi E, Sylvestre P, Moir A, Bullough PA.** 2008. Structure of the exosporium and sublayers of spores of the *Bacillus cereus* family revealed by electron crystallography. *Mol Microbiol* **68**:947–958.

**Baril E, Coroller L, Postollec F, Leguerinel I, Boulais C, Carlin F, Mafart P.** 2011. The wet-heat resistance of *Bacillus weihenstephanensis* KBAB4 spores produced in a two-step sporulation process depends on sporulation temperature but not on previous cell history. *Int J Food Microbiol* **146**:57–62.

**Barlass PJ, Houston CW, Clements MO, Moir A.** 2002. Germination of *Bacillus cereus* spores in response to L-alanine and to inosine: the roles of gerL and gerQ operons. *Microbiology* **148**:2089–2095.

**Boydston JA, Chen P, Steichen CT, Turnbough CL.** 2005. Orientation within the exosporium and structural stability of the collagen-like glycoprotein BclA of *Bacillus anthracis*. *J Bacteriol* **187**:5310–5317.

**Boydston JA, Yue L, Kearney JF, Turnbough CL, Jr.** 2006. The ExsY protein is required for complete formation of the exosporium of *Bacillus anthracis*. *J Bacteriol* **188**:7440–7448.

**Broussolle V, Gaillard F, Nguyen-The C, 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.

**Budde I, Steil L, Scharf C, Volker U, Bremer E.** 2006. Adaptation of *Bacillus subtilis* to growth at low temperature: a combined transcriptomic and proteomic appraisal. *Microbiology* **152**:831–853.

**Carlin F, Albagnac C, Rida A, Guinebretiere MH, Couvert O, Nguyen-The C.** 2013. Variation of cardinal growth parameters and growth limits according to phylogenetic affiliation in the *Bacillus cereus* group. Consequences for risk assessment. *Food Microbiol* **33**:69–76.

**Carlin F.** 2011. Origin of bacterial spores contaminating foods. *Food Microbiol* **28**:177–182.

**Carroll AM, Plomp M, Malkin AJ, Setlow P.** 2008. Protozoal digestion of coat-defective *Bacillus subtilis* spores produces “Rinds” composed of insoluble coat protein. *Appl Environ Microbiol* **74**:5875–5881.

**Chesnokova ON, McPherson SA, Steichen CT, Turnbough CL, Jr.** 2009. The spore-specific alanine racemase of *Bacillus anthracis* and its role in suppressing germination during spore development. *J Bacteriol* **191**:1303–1310.

- Costa T, Serrano M, Steil L, Volker U, Moran CP, Jr, Henriques AO.** 2007. The timing of cotE expression affects *Bacillus subtilis* spore coat morphology but not lysozyme resistance. *J Bacteriol* **189**:2401–2410.
- Cybulski RJ, Jr, Sanz P, Alem F, Stibitz S, Bull RL, O'Brien AD.** 2009. Four superoxide dismutases contribute to *Bacillus anthracis* virulence and provide spores with redundant protection from oxidative stress. *Infect Immun* **77**:274–285.
- Daubenspeck JM, Zeng HD, Chen P, Dong SL, Steichen CT, Krishna NR, Pritchard DG, Turnbough CL.** 2004. Novel oligosaccharide side chains of the collagen-like region of BclA, the major glycoprotein of the *Bacillus anthracis* exosporium. *J Biol Chem* **279**:30945–30953.
- de Vries YP, Hornstra LM, de Vos WM, Abee T.** 2004. Growth and sporulation of *Bacillus cereus* ATCC14579 under defined conditions: temporal expression of genes for key sigma factors. *Appl Environ Microbiol* **70**:2514–2519.
- Gardan R, Besset C, Guillot A, Gitton C, Monnet V.** 2009. The oligopeptide transport system is essential for the development of natural competence in *Streptococcus thermophilus* strain LMD-9. *J Bacteriol* **191**:4647–4655.
- Giorno R, Bozue J, Cote C, Wenzel T, Moody KS, Mallozzi M, Ryan M, Wang R, Zielke R, Maddock JR, Friedlander A, Welkos S, Driks A.** 2007. Morphogenesis of the *Bacillus anthracis* spore. *J Bacteriol* **189**:691–705.
- Giorno R, Mallozzi M, Bozue J, Moody K-S, Slack A, Qiu D, Wang R, Friedlander A, Welkos S, Driks A.** 2009. Localization and assembly of proteins comprising the outer structures of the *Bacillus anthracis* spore. *Microbiology* **155**:1133–1145.
- Guinebretiere MH, Nguyen-The C.** 2003. Sources of *Bacillus cereus* contamination in a pasteurized zucchini puree processing line, differentiated by two PCR-based methods. *FEMS Microbiol Ecol* **43**:207–215.
- Guinebretiere MH, Thompson FL, Sorokin A, Normand P, Dawyndt P, Ehling-Schulz M, Svensson B, Sanchis V, Nguyen-The C, Heyndrickx M, De Vos P.** 2008. Ecological diversification in the *Bacillus cereus* group. *Environ Microbiol* **10**:851–865.
- Henriques AO, Melsen LR, Moran CP, Jr.** 1998. Involvement of superoxide dismutase in spore coat assembly in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **180**:2285–2291.
- Henriques AO, Moran CP, Jr.** 2000. Structure and assembly of the bacterial endospore coat. *Methods* **20**:95–110.
- Henriques AO, Moran CP, Jr.** 2007. Structure, assembly, and function of the spore surface layers. *Annu Rev Microbiol* **61**:555–588.
- Higgins D, Dworkin J.** 2012. Recent progress in *Bacillus subtilis* sporulation. *FEMS Microbiol Rev* **36**:131–148.
- Hullo MF, Moszer I, Danchin A, Martin-Verstraete I.** 2001. CotA of *Bacillus subtilis* is a copper-dependent laccase. *J Bacteriol* **183**:5426–5430.
- Imamura D, Kuwana R, Takamatsu H, Watabe K.** 2010. Localization of proteins to different layers and regions of *Bacillus subtilis* spore coats. *J Bacteriol* **192**:518–524.



- Imamura D, Kuwana R, Takamatsu H, Watabe K.** 2011. Proteins involved in formation of the outermost layer of *Bacillus subtilis* spores. *J Bacteriol* **193**:4075–4080.
- Isticato R, Pelosi A, De Felice M, Ricca E.** 2010. CotE binds to CotC and CotU and mediates their interaction during spore coat formation in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **192**:949–954.
- Jensen GB, Hansen BM, Eilenberg J, Mahillon J.** 2003. The hidden lifestyles of *Bacillus cereus* and relatives. *Environ Microbiol* **5**:631–640.
- Johnson MJ, Todd SJ, Ball DA, Shepherd AM, Sylvestre P, Moir A.** 2006. ExsY and CotY are required for the correct assembly of the exosporium and spore coat of *Bacillus cereus*. *J Bacteriol* **188**:7905–7913.
- Kailas L, Terry C, Abbott N, Taylor R, Mullin N, Tzokov SB, Todd SJ, Wallace BA, Hobbs JK, Moir A, Bullough PA.** 2011. Surface architecture of endospores of the *Bacillus cereus/anthracis/thuringiensis* family at the subnanometer scale. *Proc Natl Acad Sci USA* **108**:16014–16019.
- Kim H, Hahn M, Grabowski P, McPherson DC, Otte MM, Wang R, Ferguson CC, Eichenberger P, Driks A.** 2006. The *Bacillus subtilis* spore coat protein interaction network. *Mol Microbiol* **59**:487–502.
- Klobutcher LA, Ragkousi K, Setlow P.** 2006. The *Bacillus subtilis* spore coat provides “eat resistance” during phagocytic predation by the protozoan *Tetrahymena thermophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:165–170.
- Kuwana R, Kasahara Y, Fujibayashi M, Takamatsu H, Ogasawara N, Watabe K.** 2002. Proteomics characterization of novel spore proteins of *Bacillus subtilis*. *Microbiology* **148**:3971–3982.
- Laaberki M-H, Dworkin J.** 2008. Role of spore coat proteins in the resistance of *Bacillus subtilis* spores to *Caenorhabditis elegans* predation. *J Bacteriol* **190**:6197–6203.
- Lai EM, Phadke ND, Kachman MT, Giorno R, Vazquez S, Vazquez JA, Maddock JR, Driks A.** 2003. Proteomic analysis of the spore coats of *Bacillus subtilis* and *Bacillus anthracis*. *J Bacteriol* **185**:1443–1454.
- Laouami S, Messaoudi K, Alberto F, Clavel T, Duport C.** 2011. Lactate dehydrogenase A promotes communication between carbohydrate catabolism and virulence in *Bacillus cereus*. *J Bacteriol* **193**:1757–1766.
- Lequette Y, Garenaux E, Combrouse T, Thays Del Lima D, Ronse A, Slomianny C, Trivelli X, Guerardel Y, Faille C (a).** 2011. Domains of BclA, the major surface glycoprotein of the *B. cereus* exosporium: glycosylation patterns and role in spore surface properties. *Biofouling* **27**:751–761.
- Lequette Y, Garenaux E, Tauveron G, Dumez S, Perchat S, Slomianny C, Lereclus D, Guerardel Y, Faille C (b).** 2011. Role played by exosporium glycoproteins in the surface properties of *Bacillus cereus* spores and in their adhesion to stainless steel. *Appl Environ Microbiol* **77**:4905–4911.
- Little S, Driks A.** 2001. Functional analysis of the *Bacillus subtilis* morphogenetic spore coat protein CotE. *Mol Microbiol* **42**:1107–1120.
- Mallozzi M, Bozue J, Giorno R, Moody K, Slack A, Cote C, Qiu D, Wang R, McKenney P, Lai E, Maddock J, Friedlander A, Welkos S, Eichenberger P, Driks A.** 2008. Characterization of a *Bacillus anthracis* spore coat-surface protein that influences coat-surface morphology. *FEMS Microbiol Lett* **289**:110–117.

- McKenney PT, Driks A, Eichenberger P.** 2013. The *Bacillus subtilis* endospore: assembly and functions of the multilayered coat. *Nat Rev Microbiol* **11**:33–44.
- McKenney PT, Driks A, Eskandarian HA, Grabowski P, Guberman J, Wang KH, Gitai Z, Eichenberger P.** 2010. A distance-weighted interaction map reveals a previously uncharacterized layer of the *Bacillus subtilis* spore coat. *Curr Biol* **20**:934–938.
- Melly E, Genest PC, Gilmore ME, Little S, Popham DL, Driks A, Setlow P.** 2002. Analysis of the properties of spores of *Bacillus subtilis* prepared at different temperatures. *J Appl Microbiol* **92**:1105–1115.
- Nicholson WL, Munakata N, Horneck G, Melosh HJ, Setlow P.** 2000. Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**:548–572.
- Oliva C, Turnbough CL, Jr, Kearney JF.** 2009. CD14-Mac-1 interactions in *Bacillus anthracis* spore internalization by macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**:13957–13962.
- Oliva CR, Swiecki MK, Griguer CE, Lisanby MW, Bullard DC, Turnbough CL, Jr, Kearney JF.** 2008. The integrin Mac-1 (CR3) mediates internalization and directs *Bacillus anthracis* spores into professional phagocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**:1261–1266.
- Ozin AJ, Henriques AO, Yi H, Moran CP.** 2000. Morphogenetic proteins SpoVID and SafA form a complex during assembly of the *Bacillus subtilis* spore coat. *J Bacteriol* **182**:1828–1833.
- Planchon S, Dargaingaratz C, Levy C, Ginies C, Broussolle V, 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.
- Ragkousi K, Setlow P.** 2004. Transglutaminase-mediated cross-linking of GerQ in the coats of *Bacillus subtilis* spores. *J Bacteriol* **186**:5567–5575.
- Redmond C, Baillie LWJ, Hibbs S, Moir AJG, Moir A.** 2004. Identification of proteins in the exosporium of *Bacillus anthracis*. *Microbiology* **150**:355–363.
- Riesenman PJ, Nicholson WL.** 2000. Role of the spore coat layers in *Bacillus subtilis* spore resistance to hydrogen peroxide, artificial UV-C, UV-B, and solarUVradiation. *Appl Environ Microbiol* **66**:620–626.
- Sanchis V, Agaisse H, Chaufaux J, Lereclus D.** 1996. Construction of new insecticidal *Bacillus thuringiensis* recombinant strains by using the sporulation non-dependent expression system of cryIIIA and a site specific recombination vector. *J Biotechnol* **48**:81–96.
- Setlow P.** 2006. Spores of *Bacillus subtilis*: their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals. *J Appl Microbiol* **101**:514–525.
- Setlow P.** 2013. Summer meeting 2013—when the sleepers wake: the germination of spores of *Bacillus* species. *J Appl Microbiol* **115**:1251–1268.
- Setlow P.** 2014. Germination of spores of *Bacillus* species: what we know and do not know. *J Bacteriol* **196**:1297–1305.
- Setlow P.** 2014. Spore resistance properties. *Microbiol Spectr* **2**(5)

**Seyler RW, Henriques AO, Ozin AJ, Moran CP.** 1997. Assembly and interactions of *cotJ*-encoded proteins, constituents of the inner layers of the *Bacillus subtilis* spore coat. *Mol Microbiol* **25**:955–966.

**Steichen C, Chen P, Kearney JF, Turnbough CL, Jr.** 2003. Identification of the immunodominant protein and other proteins of the *Bacillus anthracis* exosporium. *J Bacteriol* **185**:1903–1910.

**Steichen CT, Kearney JF, Turnbough CL.** 2005. Characterization of the exosporium basal layer protein BxpB of *Bacillus anthracis*. *J Bacteriol* **187**: 5868–5876.

**Sylvestre P, Couture-Tosi E, Mock M.** 2002. A collagen-like surface glycoprotein is a structural component of the *Bacillus anthracis* exosporium. *Mol Microbiol* **45**:169–178.

**Takamatsu H, Kodama T, Nakayama T, Watabe K.** 1999. Characterization of the *yrbA* gene of *Bacillus subtilis*, involved in resistance and germination of spores. *J Bacteriol* **181**:4986–4994.

**Terry C, Shepherd A, Radford DS, Moir A, Bullough PA.** 2011. YwdL in *Bacillus cereus*: its role in germination and exosporium structure. *PLoS One* **6**(8):e23801.

**Todd SJ, Moir AJ, Johnson MJ, Moir A.** 2003. Genes of *Bacillus cereus* and *Bacillus anthracis* encoding proteins of the exosporium. *J Bacteriol* **185**:3373–3378.

**Wienczek KM, Klapes NA, Foegeding PM.** 1990. Hydrophobicity of *Bacillus* and *Clostridium* spores. *Appl Environ Microbiol* **56**:2600–2605.

**Zheng LB, Donovan WP, Fitz-James PC, Losick R.** 1988. Gene encoding a morphogenic protein required in the assembly of the outer coat of the *Bacillus subtilis* endospore. *Genes Dev* **2**:1047–1054.

## 5. Données supplémentaires à l'article

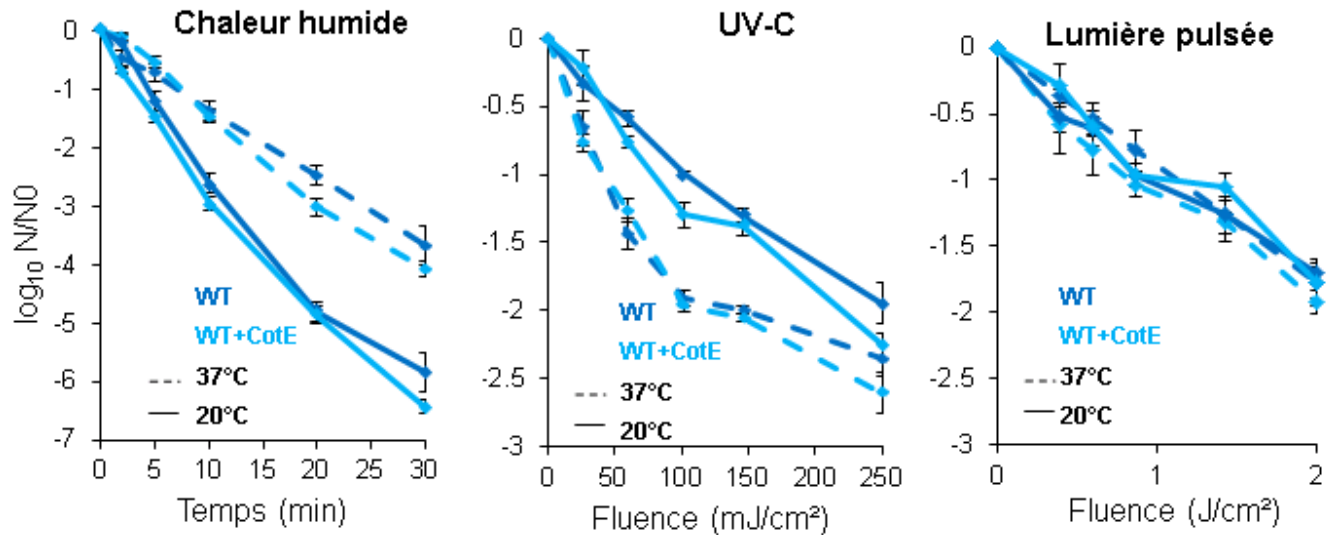
### 5.1. Impact de la surexpression du gène *cotE* dans les souches WT

Nous avons décrit précédemment l'effet de la délétion du gène *cotE* sur la sporulation et les propriétés des spores. Nos résultats révèlent une plus grande quantité de CotE dans les spores produites à 20°C. Cependant, une surproduction de CotE dans les spores produites à 37°C pourrait-elle conduire aux propriétés observées pour les spores produites à 20°C ? Pour répondre à cette question, nous avons introduit le plasmide utilisé pour la complémentation de la souche  $\Delta cotE$  dans la souche sauvage (WT) de *B. cereus* ATCC 14579.

En préambule à toute autre expérience, nous avons comparé la capacité de croissance de la souche sauvage WT complétementée (WT+CotE) avec celle de la souche WT. A 37°C les croissances des deux souches sont similaires, ( $\mu_{max} = 2,59 \pm 0,05 \text{ h}^{-1}$  et  $2,70 \pm 0,02 \text{ h}^{-1}$ , respectivement pour WT et WT+CotE). De la même façon, à 20°C, les croissances sont également similaires ( $\mu_{max} = 0,56 \pm 0,02 \text{ h}^{-1}$  et  $0,59 \pm 0,07 \text{ h}^{-1}$ , respectivement pour WT et WT+CotE). La sporulation des deux souches aux 2 températures en milieu mFNA est similaires : à 37°C pour la souche WT, [Spore]=  $9,33 \pm 0,57 \log_{10} \text{ UFC.mL}^{-1}$  et pour la souche WT+CotE [Spore]=  $9,68 \pm 0,17 \log_{10} \text{ UFC.mL}^{-1}$  et à 20°C pour la souche WT, [Spore]=  $9,12 \pm 0,12 \log_{10} \text{ UFC.mL}^{-1}$  et pour la souche WT+CotE, [Spore]  $9,29 \pm 0,12 \log_{10} \text{ UFC.mL}^{-1}$ . La surproduction de CotE dans la souche WT ne modifie donc pas la croissance et la sporulation.

#### 5.1.1. Résistances physiques, chimiques et hydrophobicité des spores

Aux deux températures de sporulation testées, la résistance des spores de WT+CotE à la chaleur humide, aux UV-C et à la lumière pulsée est similaire à celle des spores de la souche WT (Figure 31). Les spores de la souche WT+CotE à 37°C ont les mêmes propriétés de résistance que les spores WT produites à 20°C, pour lesquelles nous avons constaté précédemment une augmentation de la quantité de CotE. Le niveau de surproduction de la protéine CotE n'a pas occasionné de modifications mesurables du phénotype de la souche. Nous n'avons pas été en mesure d'évaluer la quantité de CotE produite et la comparer à celle présente dans les spores formées à 20°C, pour conclure quant à un rôle direct de CotE dû à la quantité produite ou à une interaction avec d'autres protéines également affectées à 20°C.

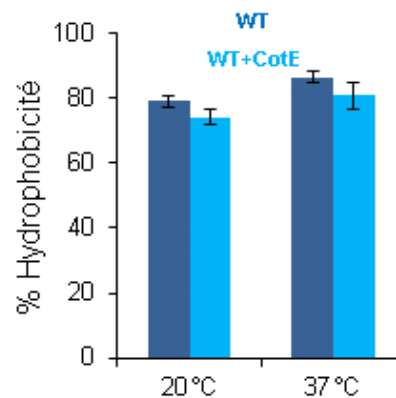


**Figure 31 : Résistance physiques des spores**

Les spores de *B. cereus* ATCC 14579 (bleue foncée) et WT+CotE (bleue claire) sont produites à 20°C (ligne droite) et 37°C (ligne pointillée) et leur résistance à la chaleur humide à 90°C, aux UV-C et à la lumière pulsée est testée. La diminution de la quantité de spores représentée par  $\log_{10} N/N_0$  est la moyenne de trois réplicats biologiques et les barres d'erreur représentent l'écart type.

### 5.1.2. Hydrophobicité

L'hydrophobicité des spores de la souche WT+CotE produites à 37°C et 20°C n'est pas significativement différente de celle de la souche WT (Figure 32).



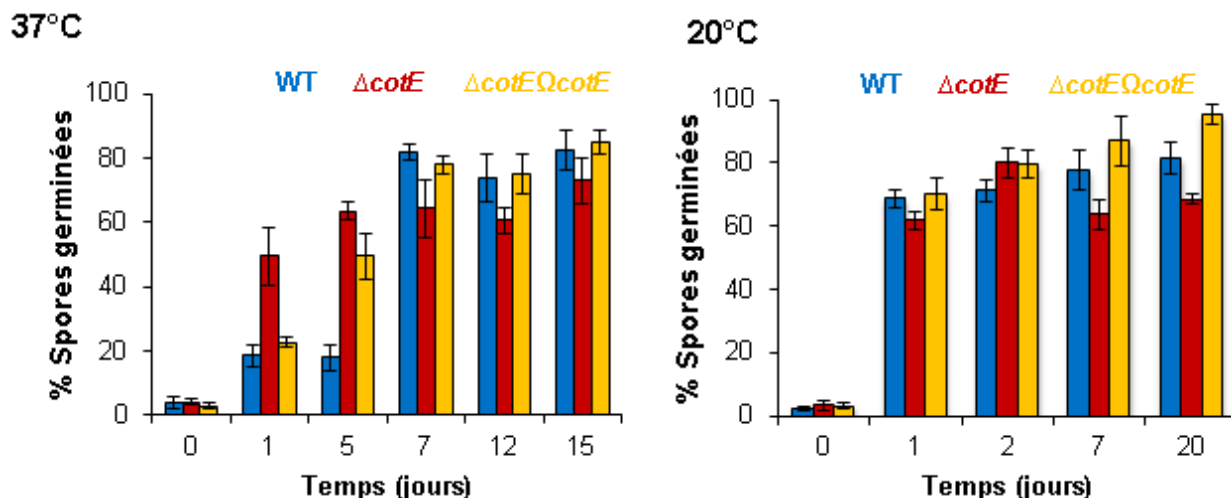
**Figure 32 : Hydrophobicité des spores**

L'hydrophobicité des spores de *B. cereus* ATCC 14579 (bleue foncée) et WT+CotE (bleue claire) produites à 20°C et 37°C est mesurée. Le % d'hydrophobicité représente la proportion de spores (x100) dans du *n*-hexadecane après séparation des phases du solvant et de l'eau. Chaque % est la moyenne de résultats obtenus pour trois réplicats biologiques et les barres d'erreur représentent l'écart type.

## 5.2. Germination spontanée des spores

Au cours de notre étude, nous avons constaté l'instabilité de nos lots de spores produites en mFNA et SMB à 37°C et 20°C et conservées à +4°C. Cette instabilité semble être plus élevée pour les spores produites en SMB que dans le milieu mFNA et à 20°C qu'à 37°C et ce quelle que soit la souche (WT, WT+CotE,  $\Delta cotE$  et  $\Delta cotE\Omega cotE$ ).

Pour étudier la germination spontanée, nous avons réalisé des observations au microscope optique au cours du temps et des comptages de spores germées dans des lots de spores produites en milieu mFNA à 37°C et 20°C et conservées à +4°C (Figure 33). Pour les trois souches étudiées, nous pouvons constater que le lot fraîchement récolté contient déjà quelques spores germées. La germination spontanée semble être plus rapide à 20°C qu'à 37°C, puisque dès 24 h, plus de 60 % des spores produites à 20°C ont germées contre en moyenne 40% pour les spores produites à 37°C. Les spores produites à basses températures contiennent en général moins d'acide dipicolinique (Anderson Borge et al. 2001; Melly et al. 2002; Planchon et al. 2011), ce qui peut être associé chez *B. subtilis* à une germination spontanée plus rapide (Setlow 2014).



**Figure 33 : Germination spontanée des spores de *B. cereus***

Les spores des souches de *B. cereus* ATCC 14579 (bleu),  $\Delta cotE$  (rouge) et  $\Delta cotE\Omega cotE$  (jaune) produites à 37°C et 20°C en milieu mFNA sont conservées à +4°C puis observées au microscope optique en contraste de phase. Le % de spores germées est évalué par comptage au microscope et l'écart type correspond à la variation entre trois réplicats biologiques.

Les spores  $\Delta cotE$  produites à 37°C germent de manière spontanée plus rapidement que celles de la souche sauvage, avant 7 j d'incubation. Après 24 h, la moitié des spores du mutant ont germé contre 20 % pour les souches sauvages et complémentées. Cependant, à 20°C toutes les spores germent en même temps, suggérant que la délétion de *cotE* pourrait avoir un léger impact sur la

germination spontanée mais uniquement pour des spores produites à 37°C. La délétion de *cotE* a un impact différent sur la composition protéique des spores produites à 37°C et 20°C (Bressuire-Isoard et al. 2015).

Nous avons vu précédemment que la souche  $\Delta cotE$  avait un défaut de germination avec l'inosine à 0,5 mM mais pas avec du milieu LB (Bressuire-Isoard et al. 2015). Ces résultats supplémentaires montrent que la souche  $\Delta cotE$  de *B. cereus* germe spontanément comme le mutant  $\Delta cotE$  de *B. subtilis* et que seule la voie de germination nécessitant les récepteurs à l'inosine est affectée par la mutation (Zheng et al. 1988).

Les propriétés de germination spontanée de nos souches nous ont amené à adapter notre méthode de travail : en effet toutes nos expériences ont nécessité l'utilisation de spores fraîchement récoltées et pasteurisées. Certains lots, dont celles produites à 20°C, ont été congelés pour certaines expérimentations.

**Chapitre 4**  
**Localisation de la protéine CotE**  
**et assemblage des structures de la spore**

---





## Chapitre 4 : Localisation de la protéine CotE et assemblage des structures de la spore

### 1. Introduction à l'étude

L'assemblage des tuniques et de l'exosporium repose sur un réseau complexe d'interactions protéiques à ce jour partiellement décrit chez *B. cereus*. La mise en place des protéines dans ces structures est un processus dynamique en totale coordination avec le développement des spores.

Les tuniques de *B. subtilis* sont formées d'un réseau de plus de 70 protéines (Henriques and Moran 2007; McKenney and Eichenberger 2012; Abhyankarn et al. 2013). Parmi ces protéines, on distingue le groupe des protéines morphogénétiques qui sont essentielles à la formation des enveloppes de la spore : SpoIVA, SpoVID, SafA et CotE. L'assemblage des tuniques correspond au dépôt ordonné et en vagues successives de protéines sur la surface de la membrane de la préspore (Kim et al. 2006; Henriques and Moran 2007; McKenney and Eichenberger 2012). Chez *B. subtilis*, SpoIVA et SpoVID appartiennent aux « protéines de classe I » dont l'assemblage a lieu parallèlement à l'invagination de l'endospore, tandis que CotE appartient aux protéines de classe II dont l'assemblage dépend des protéines de classe I (McKenney and Eichenberger 2012).

CotE forme un premier croissant appelé « cap » au pôle MCP (Mother Cell Proximal) de la préspore puis un second au pôle opposé MCD (Mother Cell Distal) avant de former un cercle complet autour de la préspore, entre la tunique interne et la tunique externe (McKenney and Eichenberger 2012). CotE est ainsi en interaction avec des protéines des deux tuniques, mais aussi avec elle-même. Les régions N-terminale et C-terminale de la protéine CotE jouent un rôle dans l'assemblage des protéines de tuniques et la région interne est importante pour sa localisation dans les structures externes de la spore (Little and Driks 2001; Wang et al. 2009).

La protéine CotE de *B. anthracis* joue un rôle important dans l'assemblage de l'exosporium et un rôle mineur dans l'assemblage des tuniques (Giorno et al. 2007). Chez *B. cereus*, CotE aurait un rôle important dans l'assemblage des deux structures (Todd et al. 2003), en particulier à basse température (Bressuire-Isoard, et al. 2015). Des travaux ont montré que l'assemblage de la protéine BclA de l'exosporium de *B. anthracis* débiterait parallèlement à celui des tuniques également par la formation d'un « cap » au pôle MCP, puis par la formation d'un cercle complet autour de la spore

(Thompson and Stewart 2008). Cependant, le détail du mécanisme d'assemblage d'une protéine morphogénétique de *B. cereus* n'a pas encore été décrit à ce jour.

L'environnement de sporulation a un impact fort sur la structure et les propriétés des spores (Sella et al. 2014; Bressuire-Isoard et al. Under preparation). Dans notre chapitre précédent, nous avons montré qu'il existe un lien entre la température de sporulation et la protéine morphogénétique CotE. A 20°C, la protéine CotE est produite en plus grande quantité qu'à 37°C et joue un rôle dans l'assemblage des tuniques et de l'exosporium, tandis qu'à 37°C, elle joue un rôle majeur dans l'assemblage de l'exosporium (Bressuire-Isoard et al. 2015). La protéine CotE en grande quantité est donc nécessaire pour maintenir les enveloppes de ces spores produites à 20°C, qui semblent plus fragiles face à certains traitements physiques ou chimiques.

La protéine CotE est indispensable à la mise en place de protéines dans les enveloppes de la spore et nos premiers résultats soulèvent plusieurs questions auxquelles nous avons tenté de répondre dans ce chapitre :

- Comment s'assemble la protéine CotE chez *B. cereus* ?
- Où est localisée la protéine CotE dans les spores matures de *B. cereus* ?

## 2. Stratégies envisagées

L'étude de l'assemblage et de la localisation de la protéine CotE chez *Bacillus cereus* ATCC 14579 a été réalisée par microscopie à fluorescence, et complétée par des expériences de biochimie et des observations en immunomicroscopie électronique. Pour cela, des fusions traductionnelles entre les régions N-terminale et C-terminale de CotE et une étiquette appelée SNAP ont été entreprises. L'étiquette SNAP est de petite taille (20 kDa) ce qui limite les risques de modifications de conformation de la structure native de CotE et offre des possibilités de marquages différentiels (par ajout de substrats produisant de la fluorescence de différentes couleurs) à différents stades du développement cellulaire. Une modification de la localisation de la protéine dûe au marquage, (interaction modifiée entre CotE et d'autres protéines, par exemple) semble être peu probable. En effet, d'autres études utilisant la microscopie à fluorescence ont montré que la localisation des protéines de tuniques ou d'exosporium concorde avec celle obtenue par immunomicroscopie électronique (Imamura et al. 2010).

Deux fusions traductionnelles ont été construites : la construction CotE-SNAP (où l'étiquette SNAP est fusionnée à la région C-terminale de la protéine CotE) et la construction SNAP-CotE (où l'étiquette SNAP est fusionnée à la région N-terminale de la protéine CotE). Une région de 9 bases appelée « linker » assure une flexibilité entre l'étiquette et la protéine d'intérêt afin de limiter les modifications de la structure protéique. Ces 2 constructions plasmidiques ont été introduites dans les souches sauvages (WT) et mutantes ( $\Delta cotE$ ) de *B. cereus* pour générer 4 souches : WT+CotE-SNAP, WT+SNAP-CotE,  $\Delta cotE$ +CotE-SNAP et  $\Delta cotE$ +SNAP-CotE.

Nous avons étudié la cinétique de production de la protéine CotE lors de l'assemblage des structures externes de la spore au cours de la sporulation. La sporulation a été synchronisée par transfert des souches étiquetées, cultivées en milieu LB à 37°C, dans le milieu de sporulation SMB incubé à 20°C ou à 37°C. La cinétique de CotE étiquetée a été suivie par microscopie de fluorescence et sa localisation dans la spore confirmée par immunomicroscopie électronique et western-blot sur des extraits de fractions de spores.

Les résultats obtenus pour la souche sauvage (WT) à 20°C sont présentés dans le manuscrit de la publication, les résultats des spores WT formées à 37°C, ainsi que ceux relatifs à la souche  $\Delta cotE$  aux deux températures de sporulation sont présentés dans un paragraphe de données supplémentaires (Voir § 5 de ce chapitre).

### 3. Résultats et discussion

Dans cette étude, nous avons mis en évidence une voie d'assemblage de la protéine morphogénétique CotE au cours de la sporulation de *B. cereus* ATCC 14579. La protéine CotE commence à s'assembler en un croissant de fluorescence au pôle MCP de la pré-spore puis un second croissant apparaît au pôle MCD et on observe finalement un anneau suggérant une disposition radiale de la protéine dans les enveloppes de la spore. Cette voie d'assemblage de la protéine CotE chez *B. cereus* est équivalente à celle décrite chez *B. subtilis* suggérant qu'elle fait également partie des protéines de classe II (Webb et al. 1995; McKenney and Eichenberger 2012).

CotE de *B. cereus* diffère de CotE de *B. subtilis*, en terme d'homologie de séquence et de prédiction de région ordonnée et de ponts disulfures. De plus, la structure des deux spores est différente, la première possède un exosporium et la seconde un crust. Nos résultats suggèrent que malgré une voie d'assemblage similaire, la protéine CotE de *B. cereus* pourrait être au cœur d'un réseau d'interactions différent de celui de *B. anthracis*.

L'anneau de fluorescence qui entoure la spore avec la fusion CotE-SNAP est moins large que celui observé avec la fusion SNAP-CotE. Imamura et al. rapporte que la mesure d'un diamètre de fluorescence est suffisante pour estimer la position d'une protéine dans les enveloppes de la spore (Imamura et al. 2010). Pour mieux visualiser cette différence, nous avons dans un premier temps placé les spores des deux fusions sur un même champ microscopique. Pour les distinguer, un marquage préalable avec deux fluorochromes de couleurs différentes a été réalisé puis les cellules mélangées. Nos résultats montrent clairement que la position de la fluorescence de la fusion N-terminale de CotE est plus externe que celle de la région C-terminale.

Pour confirmer nos observations, nous avons réalisé des mesures de longueur et largeur des cercles de fluorescence mais aussi des spores observées en contraste de phase. En effet, nous voulions vérifier que la différence de taille observée entre les deux types de fusion n'était pas due à une différence de taille de spores. Nos résultats montrent que quel que soit la fusion traductionnelle ou le fluorochrome testé, la taille des spores est inchangée, alors que la taille du cercle de fluorescence des cellules avec la fusion N-terminale est plus grande que celles avec la fusion C-terminale.

Nous avons suggéré que la protéine CotE pourrait être disposée de sorte que sa région N-terminale soit proche de l'exosporium et sa région C-terminale proche des tuniques et/ou du cortex. Une analyse par western blot, confirme cette hypothèse car CotE a été détectée dans les fragments d'exosporium et dans les spores sans exosporium mais possédant les tuniques et/ou le cortex. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus chez *B. cereus* ATCC 10876 (Todd et al. 2003) mais pas avec ceux obtenus chez *B. anthracis* où CotE n'est pas détecté dans l'exosporium (Giorno et al. 2007). Nos résultats en immunomicroscopie électronique montrent que la protéine CotE est bien présente dans l'exosporium, les tuniques et le cortex. Cependant, ces résultats sont montrés surtout avec la fusion CotE-SNAP suggérant que la localisation de la protéine rend moins accessible sa région N-terminale et/ou que les deux régions N et C-terminale de la protéine ne sont peut-être pas localisées strictement dans une enveloppe définie.

Nous avons proposé un modèle d'assemblage des tuniques et de l'exosporium de *B. cereus* orchestré par la protéine CotE. Après la mise en place d'une base appelée « scaffold » composée de protéines morphogénétiques, SpoIVA, SpoVID et SafA (ExsA), la protéine CotE commence à former un cap au pôle MCP de la spore avec sa région N-terminale orientée vers l'extérieur et sa région C-terminale vers l'intérieur. Ainsi, la formation de l'exosporium et des tuniques a lieu parallèlement et démarre également sous forme d'un second croissant au pôle MCD. Par des interactions entre protéine CotE, l'assemblage des deux structures progressent jusqu'à entourer complètement la spore. Au cours du processus, CotE aide à l'intégration des protéines de l'exosporium par sa région N-

terminale et celles des tuniques par sa région C-terminale. Les interactions entre protéines CotE sont organisées de sorte que les régions N-terminale et C-terminale peuvent être dans l'exosporium, dans l'espace entre exosporium et tuniques et dans les tuniques et cortex.

#### **4. Article: *Localization of CotE protein during the assembly of coat and exosporium layers in B. cereus spores***

Manuscrit en préparation

**Christelle Bressuire-Isoard**<sup>1,2</sup>, Monica Serrano<sup>3</sup>, Frédéric Carlin<sup>1,2</sup>, Adriano O. Henriques<sup>3</sup>, Véronique Broussolle<sup>1,2</sup>

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

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

<sup>3</sup> Instituto de Tecnologia Química e Biológica, Universidade Nova de Lisboa, Avenida da República, Estação Agronómica Nacional, 2780-157 Oeiras, Portugal

Keywords: Coat proteins, exosporium, spore structure, SNAP fusions, *B. cereus* ATCC 14579

#### **4.1. Abstract**

In *B. subtilis*, the CotE morphogenetic protein is thought to localize at the inner coat/outer coat interface, to direct the assembly of the outer coat. In *B. anthracis*, CotE has an important role in attachment of the exosporium, but a minor role in spore coat assembly. However, previous results suggests a more important role of CotE in assembly of both coat and exosporium in *B. cereus*, raising the possibility that CotE has a direct role in bridging the two structures together. We further analyzed by time-course fluorescence microscopy the localization of the CotE protein fused to a SNAP marker during *B. cereus* ATCC 14579 sporulation at 20°C. Observations of the kinetics of assembly suggested that CotE first assembled as a cap at the mother cell proximal pole of the forespore, then as a second cap at the mother cell distal pole, and finally as a ring-like structure around the mature spore. Moreover, the position of the fluorescence signals strongly suggested a radial disposition of CotE proteins in mature spores, with its C-terminus region located close to the coat and/or cortex and its N-terminus region located close to the exosporium.

## 4.2. Introduction

Bacterial spores are among the most accomplished forms of resistance in the living world allowing persistence of spore-forming micro-organisms in extreme environmental conditions and protection against physical and chemical aggressions, such as high temperatures, desiccation, UV radiations or oxidation by preservative agents (Nicholson et al. 2000; Setlow 2014; Checinska et al. 2015).

Several protective structures, cortex, coat and exosporium or crust, are essential in mechanisms of spore protection and contribute to dormancy and germination (Driks 1999; Henriques and Moran 2007; Sella et al. 2014). The spore cortex plays a major role in maintaining the dehydrated state of the spore core, essential for heat resistance and spore dormancy (Popham et al. 1999; Setlow 2006). The outermost layer of the spore, the exosporium, present in some *Bacilli* and *Clostridia* species, acts as a selective permeability barrier restricting access to other spore layers and plays a role in germination, pathogenicity and adhesion properties (Henriques and Moran 2007; Lequette(b) et al. 2011; Terry et al. 2011). The multilayered proteinaceous structure called the coat protects spores from diverse attacks as, oxidizing agents and participates also to germination since some coat proteins are cortex lytic enzymes activated during spore germination (Riesenman and Nicholson 2000; Ragkousi and Setlow 2004; Henriques and Moran 2007; Aronson et al. 2014). The assembly of both coat and exosporium layers are controlled by a complex network of interactions as yet not fully explained (Takamatsu and Watabe 2002; Henriques and Moran 2007; McKenney et al. 2010; Leggett et al. 2012; McKenney et al. 2013). However, coat and exosporium proteins assembly is clearly a dynamic process finely coordinated with spore development.

The coat structure involves the coordinated association of over 70 proteins in *B. subtilis* (Driks 1999; Kuwana et al. 2002; Lai et al. 2003; Henriques and Moran 2007; McKenney and Eichenberger 2012). A subset of proteins called morphogenetic proteins is involved in the correct assembly of the other coat proteins while not in their synthesis (Zheng et al. 1988; Roels et al. 1992; Driks 1999; Henriques and Moran 2007). The deletion of morphogenetic protein genes causes the spores to lack some of their major layers (Henriques and Moran 2007; McKenney et al. 2013). The most crucial morphogenetic protein SpoIVA attaches the coat to the forespore membrane and is important for cortex formation (Catalano et al. 2001; McKenney et al. 2013). SpoIVA forms a platform and recruits directly or indirectly other morphogenetic proteins, such as SpoVID, SafA and CotE (McKenney et al. 2013).

Indeed, these proteins and other coats proteins are produced in the mother cell and deposited in successive coordinated waves around the forespore surface, in an ordered fashion and according to a known transcriptional gene expression under the control of the mother cell  $\sigma^E$  and  $\sigma^K$  factors (Kim et al. 2006; Henriques and Moran 2007; McKenney and Eichenberger 2012). The sequence of these waves follows a kinetic with six classes of coat protein localization and gives the temporal dynamic of encasement by spore coat (McKenney and Eichenberger 2012). Encasement is driven by the establishment of a scaffold of class I coat proteins, including SpoIVA, SpoVM and SpoVID, at one pole of the forespore surface (McKenney et al. 2013). These proteins formed a cap at the mother cell proximal pole (MCP) of the forespore which evolves concomitantly to the engulfing of the forespore membrane and lead to a full spherical shell that encases the spore (Pogliano et al. 1995; Price and Losick 1999; McKenney et al. 2013). The basement shell is important for the initial targeting of every other coat proteins starting by the class II proteins, which includes CotE, CotO and CotM (McKenney and Eichenberger 2012). This explains the observed accumulation of CotE protein in the mother cell of  $\Delta spoIVA$  spores (Webb et al. 1995). The morphogenetic CotE protein appears to localize first as a point then a cap on the MCP pole, for later forming a second cap on the mother cell distal pole (MCD) and finally leading to a full shell around the spore (Webb et al. 1995; Ragkousi and Setlow 2004; Imamura et al. 2010; McKenney and Eichenberger 2012). This second shell of class II proteins has a larger diameter compared to the class I protein shell of located close to or on the surface of the outer membrane (Pogliano et al. 1995). The class II proteins interacting with class I proteins are in turn essential to the proper assembly of proteins belonging to class III, IV, V and VI (McKenney and Eichenberger 2012). For example CotE, which localized at the interface between inner and outer coat, appears to control the assembly of proteins mostly of the outer coat but also of the inner coat and crust (Zheng et al. 1988; Driks et al. 1994; Bauer et al. 1999; Little and Driks 2001; Imamura et al. 2011; McKenney, et al. 2013).

The CotE protein helps to the early recruitment of other class II proteins, such as CotO and later synthesized proteins, such as CotH which stabilizes the shell of CotE and CotG proteins (Kim et al. 2006; McKenney and Eichenberger 2012). Some studies showed that during this dynamic assembly, CotE interacts directly with SpoVID, CotC, CotT, CotU and also with itself (Chada et al. 2003; Krajcikova et al. 2009; Isticato et al. 2010; de Francesco et al. 2012; McKenney and Eichenberger 2012; Qiao et al. 2013). Self-association between CotE proteins may explain its ability to form a shell around the spore (Driks et al. 1994). The localization on either side of the CotE ring of both inner coat proteins, such as CotD, CotF and GerQ, and outer coat proteins, such as CotA, CotB and CotC, was observed using fluorescence microscopy (Imamura et al. 2010).



Mutagenesis studies indicated that CotE protein has a modular structure: i) its C-terminus and N-terminus regions each form domains which directs and are necessary to the assembly of proteins in the outer coat layer (Little and Driks 2001), ii) some residues of CotE N-terminus region are necessary for its oligomerization while not its localization, and ii) the internal part of CotE links it to the forespore membrane (Little and Driks 2001). In *B. anthracis* spores, CotE plays a major role in exosporium assembly (Giorno et al. 2007). Our recent work showed that low temperature sporulation revealed an additional role in coat assembly in *B. cereus* (Todd et al. 2003; Giorno et al. 2007; Bressuire-Isoard et al. 2015). While CotE protein controls assembly of half *B. subtilis* coat proteins, CotE-dependent coat proteins seem less important in *B. anthracis* and *B. cereus* spores with respectively one and ten proteins is absent in  $\Delta cotE$  spores (Giorno et al. 2007; Bressuire-Isoard et al. 2015).

Moreover, *B. cereus* CotE may be implied in the assembly of the CotY and ExsY exosporium proteins (Johnson et al. 2006). The ExsA protein, related to *B. subtilis* SafA, is essential for the attachment of the exosporium to coat and in the assembly of coat and exosporium proteins, such as CotE which could be present in the interspace between coat and exosporium (Bailey-Smith et al. 2005; Giorno et al. 2007; Henriques and Moran 2007). Study of the dynamic localization of exosporium proteins by microscopy revealed that exosporium assembles initially as a cap on the MCP pole and then form a full shell around the spore (Thompson and Stewart 2008; McKenney et al. 2013). The absence of ExsY protein causes an arrest in exosporium formation symbolized by the formation of only a cap-like fragment at the MCP. These results suggest that after the cap formation, a checkpoint is reached early before the progression of the rest of exosporium assembly (Boydston et al. 2006; Steichen et al. 2007).

In previous studies, we have shown that the morphogenetic protein CotE plays a role in both exosporium and coat assembly of *B. cereus* ATCC 14579 at 20°C, and that the absence of CotE strongly impacts some spore resistance properties (Bressuire-Isoard et al. 2015). Observations of the spore structures of *B. cereus*  $\Delta cotE$  spores suggest that CotE is required to maintain proper assembly of spore surface layers at low temperature (Bressuire-Isoard et al. 2015) and could have a role in bridging the two structures together. We investigated the role of CotE protein during the assembly of the different spore layers of *B. cereus* ATCC 14579. The localization of CotE was followed during the process of sporulation and in the mature spore, by fluorescence microscopy using translational fusions of N-terminus and C-terminus regions of the protein.

### 4.3. Materials and Methods

#### 4.3.1. Strains and general methods

All bacterial strains and plasmids are listed in Table 1.

**Table 1 : Strains and plasmids used in this study**

Strains <sup>a</sup> or plasmids	Relevant genotype <sup>b</sup>	Source or reference
Strains		
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579 (Type strain) (WT)	pBclin15- cured	Laboratory collection
<i>B. cereus</i> $\Delta cotE$	ATCC 14579 BC3770 $\Delta$ 128-31, Sp <sup>R</sup>	(Bressuire-Isoard et al. 2015)
<i>B. cereus</i> $\Delta cotEQcotE$	ATCC 14579 BC3770 $\Delta$ 128-31+pHT304-18 $\Omega cotE$ , Sp <sup>R</sup> and Em <sup>R</sup>	(Bressuire-Isoard et al. 2015)
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	<i>fhuA2 lac(del)U169 phoA glnV44 <math>\Phi</math>80' lacZ(del)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17</i>	Laboratory collection
<i>E. coli</i> SCS110	<i>rpsL thr leu endA thi-1 lacY galK galT ara tonA tsx dam dcm supE44 <math>\Delta</math>(lac-proAB)</i>	Invitrogen
Plasmids		
pHT304-18 pHT304-18 $\Omega$ SNAP-CotE	Ap <sup>R</sup> and Em <sup>R</sup> cloning vector Promoter region of BC3770 (180pb) followed by the <i>Snap-tag</i> without its stop codon (553 pb) linked to the BC3770 gene (543bp) without its start codon, and cloned between the <i>EcoRI</i> and <i>Sall</i> sites of pHT304-18 plasmid	(Sanchis et al. 1996) DNA 2.0 (Menlo Park CA)
pHT304-18 $\Omega$ CotE-SNAP	Promoter region of BC3770 (180pb) and BC3770 gene (543pb) without its stop codon linked to the <i>Snap-tag</i> without its start codon (553 pb Biolabs) and cloned between the <i>EcoRI</i> and <i>Sall</i> sites of pHT304-18 plasmid	DNA 2.0

<sup>a</sup> ATCC American Type Culture Collection

<sup>b</sup> Ap, ampicillin ; Em, Erythromycin; Sp, Spectinomycin

*Bacillus cereus* and *Escherichia coli* strains were grown routinely at 37°C or at 20°C in Luria-Bertani broth (LB) with stirring at 200 rpm. When necessary, antibiotics were added at the following concentrations: ampicillin at 100  $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$  for *E. coli* cultures, erythromycin at 5  $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$  and spectinomycin 275  $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$  for *B. cereus* cultures. Transformation of *B. cereus* was performed by electroporation as previously described (Arnaud et al. 2004).

### **4.3.2. Translational SNAP fusions**

Two fusions were constructed: one with the SNAP-tag placed at the N-terminus of CotE protein (SNAP-CotE) and a second one with the SNAP-tag placed at the C-terminus region of CotE protein (CotE-SNAP) (Pereira, Saujet et al. 2013). For both fusions, we first designed the sequence of the insert including (i) for the SNAP-CotE fusion, the upstream region of the *cotE* gene (180 bp, containing the promoter), followed by the SNAP-tag gene and a 27 bp sequence coding for a linker (553 bp in total, sequence available for download at [www.itqb.unl.pt/~aoh/SNAPCdDNAseq.docx](http://www.itqb.unl.pt/~aoh/SNAPCdDNAseq.docx)) and the *cotE* gene (543 bp, without its start codon) (ii) for the CotE-SNAP fusion, the *cotE* gene and its upstream region, the SNAP-tag gene and the linker. DNA fragments were synthesized and cloned between the *EcoRI* and *Sall* sites of the pHT304-18 plasmid (Sanchis, Agaisse et al. 1996) by DNA 2.0 (Menlo Park, CA, USA). Resulting plasmids pHT304-18ΩSNAP-CotE and pHT304-18ΩCotE-SNAP (Table 1) were introduced into *E. coli* DH5α (*recA*<sup>-</sup>) and *E. coli* SCS110 (*dam*<sup>-</sup>/*dcm*<sup>-</sup>) to obtain unmethylated DNA, used to transform the *B. cereus* ATCC 14579 strain.

### **4.3.3. Spore production.**

Spores were produced using a biphasic process used to synchronize the sporulation process (Baril, Coroller et al. 2011; Bressuire-Isoard, Bornard et al. Under revision). Cells grown in 500 mL LB at 37°C up to  $OD_{600}=1.0$  were centrifuged (6,000xg, 10 min at 12°C) and suspended again in 500 mL of a sporulation mineral buffer (SMB) (a 39.0 mM phosphate buffer at pH 7.2 supplemented with CaCl<sub>2</sub>, 2H<sub>2</sub>O, 8.0 mg.L<sup>-1</sup> and MnSO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O, 1.5 mg.L<sup>-1</sup>) and grown at 20°C with shaking at 200 rpm. Total cell and spore counts (surviving a heat-treatment 15 min at 70°C) were performed at different time intervals by spreading appropriate decimal dilutions in water and colony enumeration after 16 h at 37°C. In parallel, phase contrast observations were performed and when > 95 % of free phase bright spores were observed (ie 5 days at 20°C) under a phase-contrast microscope at a magnification of 1,000X (Olympus BX 50, Rungis, France), spore suspensions were then pelleted and washed with 500 mL of sterile demineralized cold water, centrifuged four times during 15 min at 4°C (6,800xg (x2), 3,500xg and 2,200xg) and finally suspended again in 2 mL of sterile cold demineralized water.

Spores were also occasionally produced on mFNA medium as followed: a 0.8 mL volume of an overnight *B. cereus* culture in LB at 37°C was spread onto mFNA plates (80 mL) (Broussolle et al. 2008) and incubated 13 days at 20°C until > 95 % of free phase-bright spores were observed as described above. Plates were then flooded with 10 mL of sterile cold demineralized water and the spore suspensions were washed in sterile cold demineralized water by a series of four 15 min centrifugations at 4°C (twice at 6,800xg, 3,500xg and 2,200xg). Spores were finally suspended in 2 ml

of sterile cold demineralized and purified using a 45% Gastrografin (Bayer, Newbury, UK) solution. Spores placed on the top of this solution were centrifuged at 6,800xg for 20 min at 4°C, washed by five centrifugations at 4°C in sterile cold demineralized water (6,800xg, 10 min) and re-suspended in 100 µL of phosphate-buffered saline with 0.1% of Triton X-100 (v/v). All spore suspensions received a final heat treatment 15 min at 70°C, aliquot fractions were stored at -20°C and used within one month.

#### **4.3.4. Assessment of spore resistance to lysozyme**

Sensitivity of spores to lysozyme (7 U.mL<sup>-1</sup> in water for 1 h at 37°C, Promega) was tested by following changes in CFU counts on LB agar plates after an overnight incubation at 37°C. The reduction in viable spore counts was determined and expressed as a percentage of resistant spores ( $N/N_0 \times 100$ ) where  $N_0$  is the initial spore count and  $N$  the count of surviving spores. Tests were performed with three independently prepared spore suspensions.

#### **4.3.5. Extraction and analysis of the spore protein fractions**

Cells were lysed using a French pressure cell press (18,000 lb/in<sup>2</sup>) and centrifuged 5 min at 6,800xg to separate spores devoid of exosporium in the pellet from the exosporium fragments released in the supernatant. All fractions were stored at -20°C until further analysis.

Proteins were extracted from a 200-fold dilution of spore suspensions at initial  $OD_{580} = 1.0$ . Spore suspensions and exosporium proteins (40 µg) in a volume of 60 µL were mixed with an equal volume of extraction buffer (4 % SDS, 0.125 M Tris-HCl, pH 6.8, 10 % 2-mercaptoethanol, 1 mM DTT, 10 % glycerol, 0.050 % bromophenol blue) and heated at 100°C for 8 min. Proteins were electrophoretically resolved on 15 % SDS-PAGE gels and visualized by Coomassie brilliant blue R-250 staining. For immunoblot analysis, *B. anthracis* anti-CotE, *B. cereus* anti- GerPC and anti-SNAP (New England Biolabs) polyclonal antibodies were used at a dilution of 1:4,000, 1:1,000 and 1:1,000 respectively (Johnson et al. 2006; Giorno et al. 2007). A rabbit secondary antibody conjugated to horseradish peroxidase (Sigma Aldrich, Zwijndrecht, the Netherlands) was used at dilution 1:10,000. The immunoblots were developed with enhanced chemiluminescence reagents (Amersham Pharmacia Biotech, Cardiff, United Kingdom).

#### **4.3.6. SNAP labeling and analysis**

Whole cell extracts were obtained by sampling, at selected times during the sporulation process, 50 ml samples of *B. cereus* SNAP-CotE and CotE-SNAP sporulating cells in SMB medium. Extracts were labeled with a final 250 nM TMR-Star substrate solution (New England Biolabs) for 30 min in the dark. The cells were then collected by centrifugation (4,000xg, for 5 min at 4°C), the pellet was washed with phosphate-buffered saline (PBS) and suspended again in 1 ml of French press buffer (10 mM Tris pH 8.0, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mM EDTA, 0.2 mM NaCl, 10 % glycerol, 1 mM PMSF). The cells were then lysed using a French pressure cell press (18,000 lb/in<sup>2</sup>). Proteins in the extracts (15 µg) were resolved on 15 % SDS-PAGE gels, which were first, scanned in a Fuji TLA-5100 fluorimager, and then subjected to immunoblot analysis, as described above.

#### **4.3.7. Microcopy and image analysis**

Volumes of 5 ml were sampled from SMB cultures at selected incubation times, and then centrifuged (6,000xg, 10 min at 4°C). Pelleted cells were resuspended in 0.2 ml PBS, and then labeled with a final 250 nM TMR-Star or 505-Star solutions (New England Biolabs) for 30 min at 37°C in the dark. Labeled cells were washed three times with 1 ml of PBS (6,000xg 3 min at 4°C), and finally suspended in 1 ml of PBS containing the membrane dye Mitotracker Green (MTG) at a final concentration of 1 µg.mL<sup>-1</sup> (Molecular Probes Invitrogen, Saint Aubin, France). Cells were washed twice in 1 mL of PBS (6,000xg 3 min at 4°C) and suspended in 15 µL of PBS.

For phase contrast and fluorescence microscopy, 3 µL of labeled-cells were deposited on 1.7% agarose coated glass slides and observed on a Leica DM6000B microscope equipped with a phase contrast Uplan F1 1006 objective and a CCD Ixon camera (Andor Technologies, Belfast, Northern Ireland). Images were acquired using the Metamorph software suite version 5.8 (Universal Imaging), and adjusted and cropped using ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). The number of cells in each class has been calculated by counting under microscope cells exhibiting a class “a” to “e” red fluorescent signal (TMR) relative to the total number of cells exhibited a red fluorescent signal: cells in each class (%) = [number of cells in a class x100] / number of total red cells. The spore length and width were obtained from the numeric images using the Metamorph software.

#### **4.3.8. Immunoelectron microscopy of spore cryosections**

Ultrathin cryosections of *B. cereus* spores were obtained with spores at concentration of 10<sup>9</sup> UFC.mL<sup>-1</sup> fixed 1 h with a solution of 4 % PFA and 2.5 % glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer at

pH = 7.2. Cells were processed for ultracryomicrotomy. Thin sections were then washed for 30 min at 37°C in a 2 % gelatine (wt/vol) solution in water to remove the embedding gelatin and remnants of the methyl cellulose. Cells were quenched four times 5 min with a 0.1 M of phosphate buffer at pH 7.2, supplemented with 50 mM glycine and blocked 30 min with a the same buffer containing 1 % BSA, 0.1 % BSA-cTM (BioValley, France). Thin sections were incubated 2 h with anti-SNAP antibody (produit commercial) at a 1/200 dilution rate and washed three times with the 0.1 M phosphate buffer at pH = 7.2. Then goat anti-rabbit IgG coupled to 10 nm colloidal gold particles (British Biocell International – TEBU, Cardiff, UK) at a 1/50 dilution rate were incubated for 1 h with the thin cryosections of the *B. cereus* spores. After a final wash, cryosections were stained for 10 min with 2 % uranyl acetate, and embedded for 10 min on ice with 2 % methylcellulose containing 5 % uranyl acetate. Cells were examined with a Hitachi HT7700 electron microscope operating at 80 kV (Elexience, France), and images were acquired with a charge-coupled device camera (AMT) at MIMA2 Platform of the laboratory UR1196, at INRA research center of Jouy-en-Josas ([www6.jouy.inra.fr/mima2](http://www6.jouy.inra.fr/mima2)).

#### **4.3.9. Bioinformatics analysis**

Amino acid sequence disorders were predicted by PONDR algorithm (<http://www.pondr.com>). Protein homology searches were carried out by performing BlastP analyses (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Multiple sequence alignments were performed using MultiAlin program (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>) and disulfide bonding prediction in protein sequence by DISULFIND (<http://disulfind.dsi.unifi.it/>).

### **4.4. Results**

#### **4.4.1. Dynamic and subcellular localization of CotE during *B. cereus* sporulation**

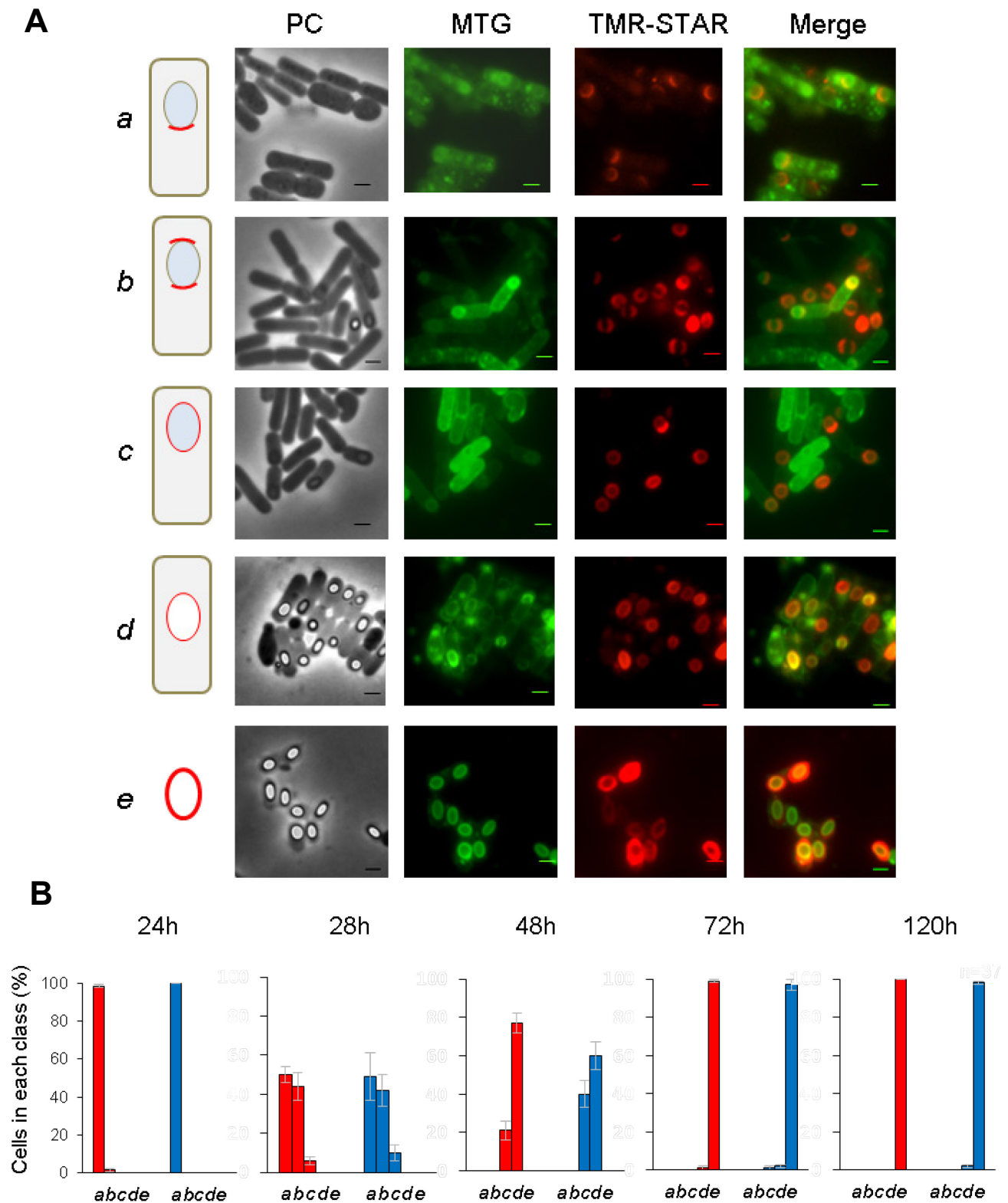
Translational fusions of the N-terminus and the C-terminus regions of *B. cereus* CotE protein with a SNAP-tag (respectively called SNAP-CotE and CotE-SNAP) were used to follow the subcellular localization of CotE during the sporulation process in *B. cereus* ATCC 14579 at 20°C. We first checked whether the introduction of the SNAP fusions could have an impact on the sporulation kinetics of the ATCC 14579 strain in SMB medium (Fig. S1). No major difference was observed between the sporulation of the SNAP strains when compared to the WT strain (Fig. S1). Cells and heat-resistant cells counts were approximately 7 log CFU.mL<sup>-1</sup> for the three strains, which indicates highly similar sporulation yield and similar time for completion of the WT and the SNAP strains

sporulation process. We also checked that the presence of the SNAP fusions does not have a major effect on spore resistance to lysozyme treatment (Bressuire-Isoard, Bornard et al. Under revision). The percentages of resistant spores to lysozyme which were 76.7 % for SNAP-CotE and 80 % for CotE-SNAP strains, were not significantly different from that of the WT (82 %) strain ( $p < 0.05$ ). Consequently, the SNAP fusions did not have any major influence on *B. cereus* spore development.

We followed the localization of CotE protein during *B. cereus* spore formation by observing SNAP-CotE and CotE-SNAP cells, in fluorescence microscopy, at different time points of the sporulation process (Fig. 1). Sporulation of SNAP-CotE and CotE-SNAP cells was synchronized by transfer from LB growth medium into the sporulation SMB medium. In the time course of sporulation, phase contrast microscopy observations, as well as the green fluorescent membrane staining by MTG, revealed the SNAP-CotE and CotE-SNAP cells that were sporulating (Fig. 1, panel A).

Staining of cell membranes with MTG delimited the entire contour of the vegetative cells and allowed to follow the engulfment and to visualize both the forespore and free spores. The red fluorescent signal, due to the SNAP-tag staining by the TMR substrate, revealed the presence of the CotE protein in the sporulating cells (Fig. 1, panel A). We then performed the assignment of all fluorescent cells to one of the five categories noted “a” to “e”, which correspond to five topologies of the red fluorescent signal, observed in either SNAP-CotE or CotE-SNAP (Fig. 1, panel A). CotE protein first assembled as a cap at the mother cell proximal (MCP) pole of the forespore (class “a”) (Fig. 1, panel A). The fluorescent signal was detected before the detection of the forespore by phase contrast microscopy. Class “b” cells exhibited a strong cap at the MCP and a lower cap signal at the mother cell distal (MCD) pole of the forespore. These two caps evolved to form a continuous ring which corresponded to the outline of the phase grey endospore (partially refractive) (class “c”). This uniformly fluorescent ring persisted as the forespore in formation turned phase bright (class “d”) and in free spores (class “e”) (Fig. 1, panel A).

We observed that red-fluorescent signal of CotE-SNAP and SNAP-CotE cells evolved from the “a” to “e” morphological classes (100% at time 24 h and 72 h respectively) during the sporulation process leading to mature spores (Fig. 1, panel B). The kinetics of CotE assembly were similar with the two translational fusions CotE-SNAP and SNAP-CotE, suggesting that the N-terminus and the C-terminus part of CotE assembled with the same kinetics (Fig 1, panel B).

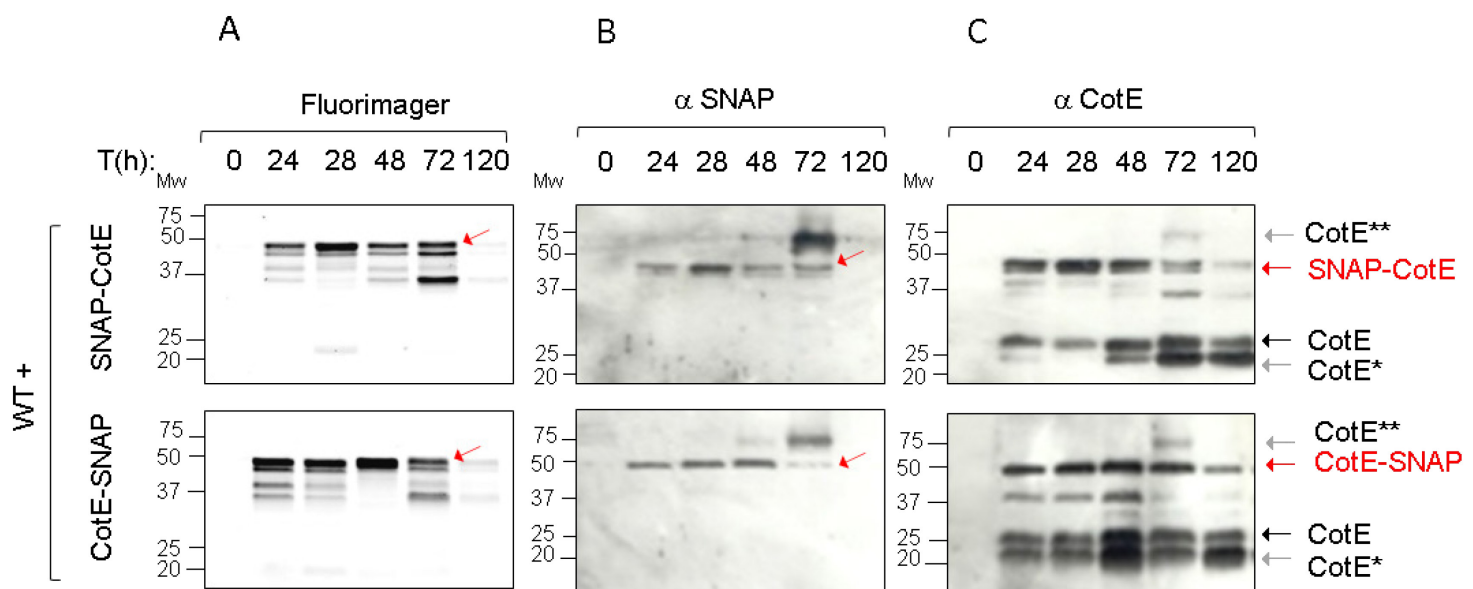


**Figure 1: Kinetics of CotE assembly in *Bacillus cereus* ATCC 14579 spores.**

(A) Samples were collected during sporulation in SMB medium at 20°C and stained with TMR-STAR substrate and MTG and examined by phase contrast (PC) and fluorescence microscopy under red and green channels. The merged images show the overlap between the TMR-STAR (red) and MTG (green). The (a) to (e) schematic diagrams of cells represent stages of CotE assembly during sporulation process. Scale bar, 1µm. (B) Quantification of the percentage of cells in the morphological classes for the WT+SNAP-CotE (red bars) and WT+CotE-SNAP (blue bars) strains, relative to the total cells number (n=750) exhibiting a fluorescence signal. The data represent the average of results obtained with three independent spore suspensions.



We checked that all the SNAP-CotE and CotE-SNAP proteins were labeled under our experimental conditions by analyzing the sporulating cells sampled during the assembly kinetics and stained with TMR-Star substrate before electrophoretic resolution (Fig. 2, panel A). A major fluorescent band at 40 kDa was observed corresponding to the size of SNAP-CotE and CotE-SNAP proteins, as well as other faint smaller bands corresponding to processing of the proteins and/or unmarked SNAP, as confirmed by immunoblotting with the anti-SNAP antibody (Fig. 2, panel B). Immunoblotting with anti-CotE antibodies evidenced SNAP-CotE and CotE-SNAP proteins, as well as a major band of approximately 20 kDa corresponding to the native form of the CotE protein also present in the two strains (Fig. 2, panel C). Multimers and processed forms of CotE and CotE-SNAP and SNAP-CotE proteins were also detected (Fig. 2, panel C).



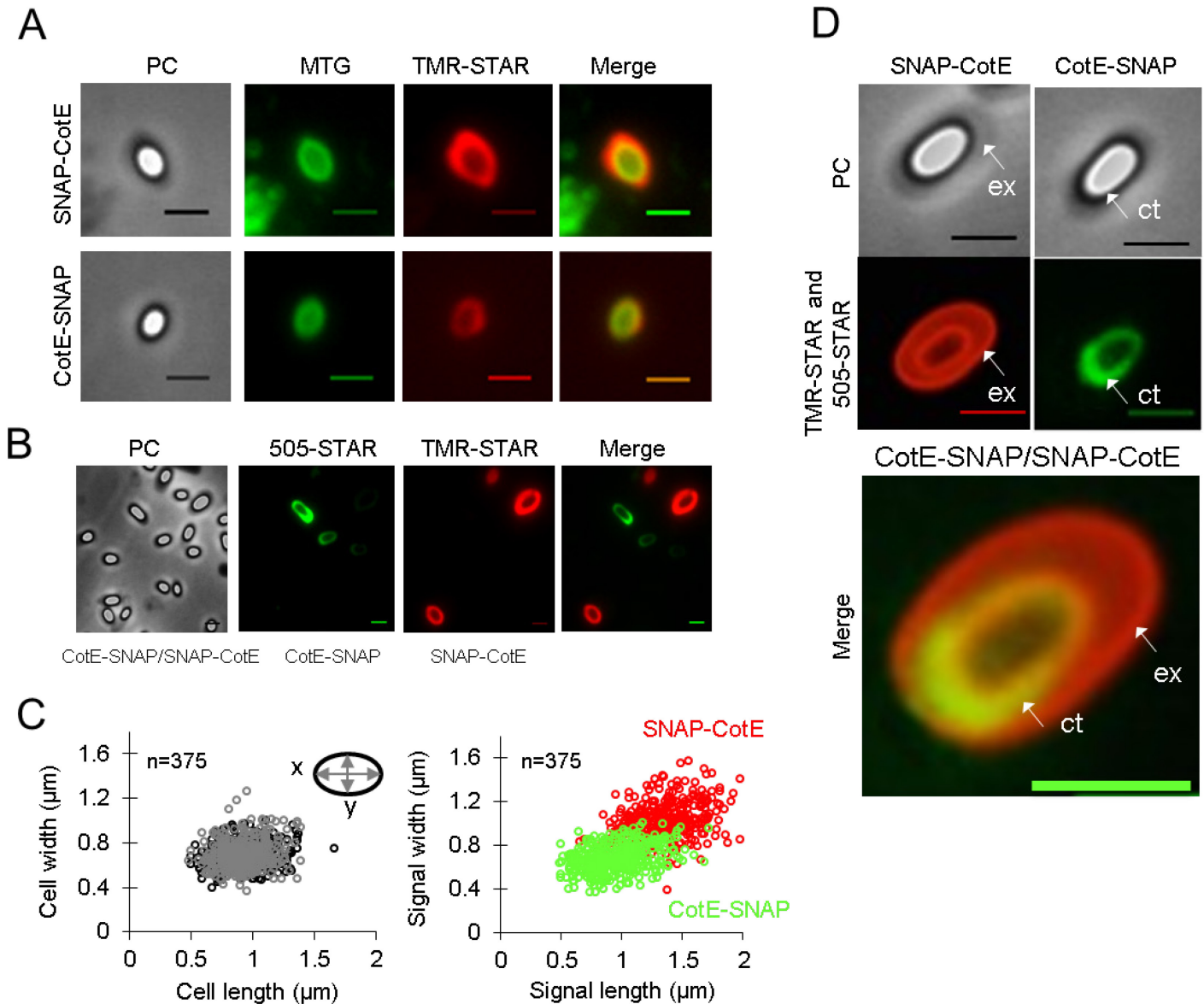
**Figure 2: SDS-PAGE and immunoblot analysis of extracts from *B. cereus* WT+SNAP-CotE and WT+CotE-SNAP sporulating cells and spores formed at 20°C in SMB medium.**

Samples were collected during sporulation on SMB medium at different time points, indicated for each lane and then labeled with TMR-STAR substrate. (A) TMR fluorescent signal from the SDS-PAGE gel obtained using a fluorimager. Red arrows point the position of the SNAP-CotE and CotE-SNAP proteins. (B) Samples blotted with anti-SNAP antibodies. Red arrows point the position of the SNAP-CotE and CotE-SNAP proteins. (C) Samples blotted with anti-CotE antibodies. Black arrows point the position of CotE protein, grey arrows point the position of processed CotE (\*) and CotE multimers (\*\*). Red arrows point the position of the SNAP-CotE and CotE-SNAP proteins. The position of molecular weight markers (Mw, in kDa) is shown on the left side of the panel.

#### 4.4.2. Localization of CotE in mature spores

The localization of the CotE protein in the mature spore was further investigated (Fig. 3). The red-fluorescent ring of the CotE-SNAP perfectly matched green-fluorescent MTG signal of the spore outline and, superimposed fluorescence microscopy images showed a yellow ring expressing the mix

between the red and the green fluorescence (Fig. 3, panel A). In contrast, the red-fluorescent ring of the SNAP-CotE exceeded the fluorescent-green ring labeling the spore membrane (Fig. 3, panel A). Each of the red (external) and green (internal) rings were clearly distinguishable on superimposed fluorescence microscopy images (Fig. 3, panel A).



**Figure 3: Localization of CotE protein in *B. cereus* spores.**

(A) WT+SNAP-CotE and WT+CotE-SNAP spores formed at 20°C in SMB medium, stained with TMR-STAR and MTG substrates and examined by phase contrast (PC) and fluorescence microscopy. The merged images show the overlap between the TMR-STAR (red), 505-STAR (green) and MTG (green) channels. Scale bar, 1µm. (B) Mix of spores of WT+SNAP-CotE stained with TMR-STAR and WT+CotE-SNAP (50%/50%) stained with 505-STAR, examined by phase contrast (PC) and fluorescence microscopy. Scale bar, 1µm. (C) Measure of spores and signal length and width observed on phase contrast for WT+SNAP-CotE stained with TMR-STAR (red dots) and WT+CotE-SNAP stained with 505-STAR (green dots). The total number of cells scored (n) is indicated. (D) Spores of WT+SNAP-CotE stained with TMR-STAR and WT+CotE-SNAP stained with 505-STAR with a similar shape for manual merge of pictures. Ex, exosporium; Ct, coat. Scale bar, 1µm.

To better appreciate the difference in the localization in the N- and C-terminus of the CotE protein in spores, we performed two labeling, a green one using the 505-STAR substrate for the CotE-SNAP spores and a red one using the TMR-STAR substrate for the SNAP-CotE spores (Fig. 3, panel B). Both strains with their respective substrates were mixed in equal proportions, observed with fluorescence microscopy, and images obtained with the red and green channels were merged. There was a pronounced difference in the signal positions, with the fluorescent areas of the SNAP-CotE markedly exceeding the ones of CotE-SNAP (Fig. 3, panel B). A possible bias due to the optical property of green versus red fluorescence was excluded as the inversion of substrates (i.e. fluorescent–red instead of green for CotE-SNAP and fluorescent-green instead of red for SNAP-CotE) led to same differences in the sizes of the fluorescence areas (data not shown).

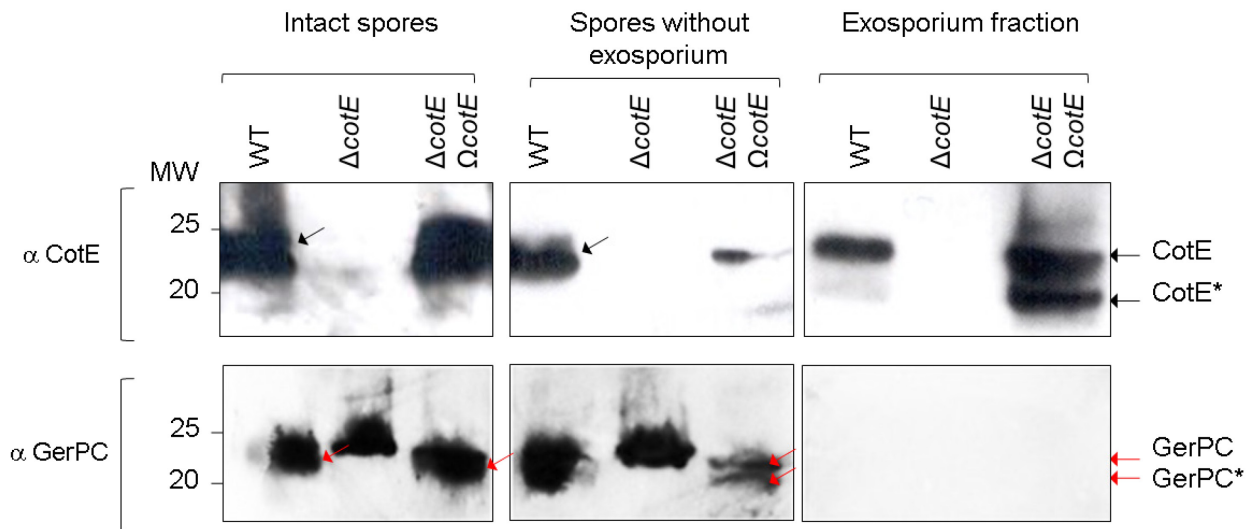
The dimensions (major and minor axis length) of the ellipse-shaped rings, green-fluorescent for CotE-SNAP, and of the red-fluorescent for SNAP-CotE, were measured on free spores (Fig. 3, panel C). We first wondered whether the difference in dimensions was due to difference in spore size. The sizes of CotE-SNAP and SNAP-CotE spores determined on phase contrast microscopy images were highly similar (Fig. 3, panel C). In contrast, the dimensions of the fluorescent ring of SNAP-CotE were larger than the ones of CotE-SNAP (Fig. 3, panel C).

Virtual superimposition of images of same-size spores of green-fluorescent CotE-SNAP and red-fluorescent SNAP-CotE confirmed a more external fluorescence labeling of SNAP-CotE than of CotE-SNAP (Fig. 3, panel D). Consequently, the N-terminus and C-terminus regions of the CotE protein could be in a radial disposition in different parts of the spore outer layers. The dark line surrounding spores seen in phase contrast microscopy has been previously interpreted as the spore coat linked to innermost layers (Wang et al. 2009; Imamura et al. 2010). In our experiment, the phospholipid membrane visualized by MTG labeling was close to the spore coat, suggesting that the C-terminus of CotE could be located close to the coat and/or cortex layer. In *B. anthracis*, the bright halo surrounding spores and seen in phase contrast microscopy was associated to the exosporium (Steichen et al. 2007). We can hypothesize that the N-terminus of the SNAP-CotE protein which showed fluorescence corresponding to this halo was located closely to the exosporium layer (Fig. 3, panel D).

#### **4.4.3. CotE is present in both coat and exosporium fractions**

The localization of CotE protein in *B. cereus* outer layers was checked by immunoblotting on spore fractions (Fig. 4). Intact spores, spores without exosporium and isolated fractions of exosporium proteins (ie after French press treatment) of WT,  $\Delta cotE$  and  $\Delta cotE\Omega cotE$  spores were analyzed. As

expected, the CotE protein was absent in  $\Delta cotE$  intact spores and the complementation restored CotE production (Fig. 4). The CotE protein monomers and multimers were detected in WT and  $\Delta cotE \Omega cotE$  intact spores, coat and exosporium fractions. The absence of the coat protein GerPC in the exosporium fraction showed that the spore fractioning process did not contaminate the exosporium fraction with coat proteins.

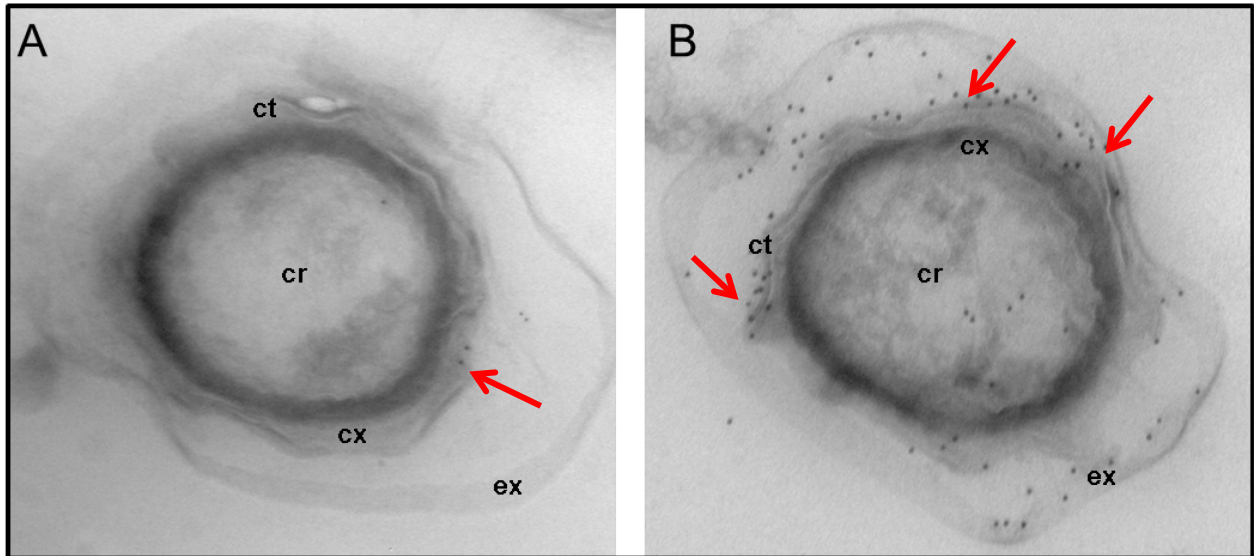


**Figure 4: Immunoblot analysis of protein extracts from spores of *B. cereus* WT and  $\Delta cotE$  and  $\Delta cotE \Omega cotE$  strains, all formed at 20°C in SMB medium.**

Total spore proteins were extracted from the same amounts of spores and an equal quantity of exosporium and spore without exosporium fractions (after French press treatment) for the three strains were analyzed. Proteins were fractioned by SDS-PAGE and subjected to immunoblot analysis using anti-CotE and anti-GerPC antibodies. Black arrows indicate CotE position and red arrows indicate GerPC position. The asterisks indicate processed forms of the corresponding protein. The position of molecular weight markers (Mw, in kDa) is shown on the left side of the panel.

We also analyzed the localization of CotE protein in SNAP-CotE and CotE-SNAP spores formed at 20°C, by immunoelectron microscopy after labeling with an anti-SNAP antibody (Fig. 5). Both the exosporium and coat layers of CotE-SNAP spores were highly labeled by the anti-SNAP antibody (Fig. 5, panel A), while the labeling was faint in both structures for SNAP-CotE spores (Fig. 5, panel B).

These images confirmed the localization of CotE in both exosporium and coat structures, with more gold-labeled CotE detected in or close to the coat of CotE-SNAP spores (Fig. 5, panel B), which is consistent with the predictive CotE orientation, observed by fluorescence microscopy (Fig. 3). These results also strongly suggested that the SNAP-tag was less accessible to the antibody in SNAP-CotE spores than in CotE-SNAP spores. All together, these observations confirmed that CotE is present in both coat and exosporium layers.



**Figure 5: Immunoelectron microscopy localization of SNAP-CotE (A) and CotE-SNAP proteins (B) in spores of *B. cereus* spores formed at 20°C on mFNA plates.**

Grains gold are visualized as black dots on thin sections of spores after labeling with an anti-SNAP antibody. Higher amount of gold grains was observed in coat and exosporium layers of CotE-SNAP spores than those of SNAP-CotE. Red arrows showed some grains gold. ct, spore coat; cx, cortex; cr, core; ex, exosporium.

#### 4.5. Discussion

In this study, we characterized the assembly pathway of the morphogenetic CotE protein during the sporulation of *B. cereus* ATCC 14579 and studied its localization in the mature spore to better understand its role in the assembly of the spore outer layers.

The assembly of CotE, observed by fluorescence microscopy with translational fusions of the N-terminus or C-terminus regions of the protein with a SNAP-tag, consisted in five different morphological classes: CotE started to assemble on one cap at the MCP spore pole then a second cap at the MCD spore pole and finally formed a shell around the forespore, the refractive endospore and the mature spore, suggesting a radial disposition of the protein (“a” to “d” classes). The kinetics of CotE assembly during *B. cereus* sporulation was similar to the CotE assembly described in *B. subtilis* since the same stages were observed (from one cap, two caps, and a ring formation) (Pogliano et al. 1995; Webb et al. 1995; McKenney and Eichenberger 2012). *B. subtilis* spores does not form an exosporium but a crust structure where CotE also makes interactions with CotX, CotY and CotZ proteins (Pogliano et al. 1995; Webb et al. 1995; McKenney and Eichenberger 2012; McKenney et al. 2013). Thus, *B. cereus* CotE belongs to the kinetic class II of coat proteins defined for CotE *B. subtilis* (Driks et al. 1994; Webb et al. 1995; McKenney and Eichenberger 2012). Their assembly depends

and happens after the establishing of a first weave of class I proteins on the forespore membrane, forming a scaffold such as SpoIVA, in *B. subtilis* and *B. anthracis* spores (Driks et al. 1994; Webb et al. 1995; Giorno et al. 2007; McKenney and Eichenberger 2012).

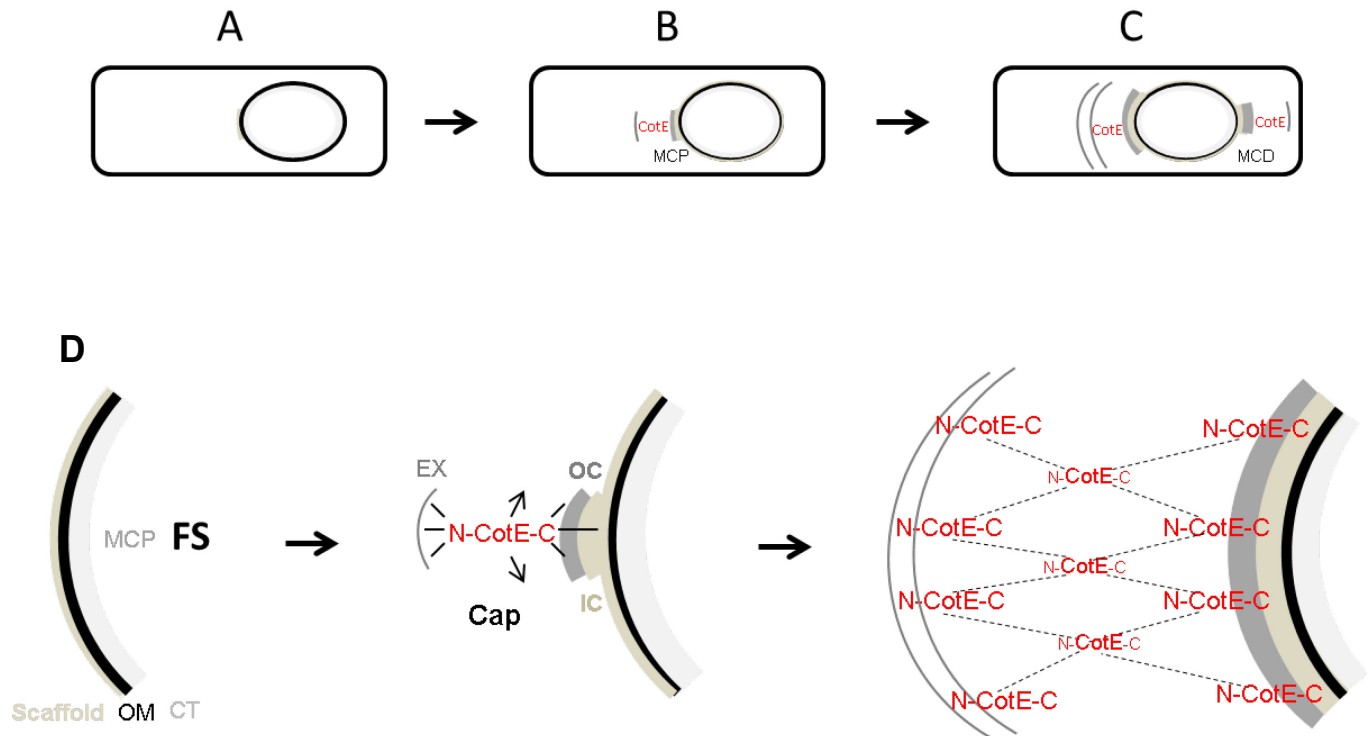
The SNAP-CotE and CotE-SNAP fusions were particularly useful to determine the position of CotE in the outer spore layers of mature spores. It appears in our study that the N-terminus of CotE was located at an external position, corresponding to the exosporium layer, and that the C-terminus region of CotE was more likely localized in the coat/cortex layers. These results are consistent with both our immunoblotting and immunoelectron microscopy experiments, which showed that CotE was present in the exosporium and in the coat/cortex of *B. cereus* ATCC 14579. A truncated form of CotE was previously also evidenced in the exosporium fraction of *B. cereus* ATCC 10876 spores (Todd et al. 2003). In contrast, CotE protein was not detected in exosporium fractions of *B. anthracis* where CotE seems to be located in coat and/or in the interspace region between coat and exosporium (Giorno et al. 2007). These differences between the two species could be due to a subtle change in spore layers assembly and a possible different involvement of CotE. Indeed, we previously showed that more spore proteins were affected by *cotE* deletion in *B. cereus* than in *B. anthracis* (Bressuire-Isoard et al. 2015). In *B. cereus*, evidence suggested a more important role of CotE in assembly of both the coat and the exosporium (Bressuire-Isoard et al. 2015). We can hypothesize that CotE occupies the space between the coat and the exosporium layers and has a direct role in bridging the two structures, maybe by self-interactions, compensating the small size of CotE (Fig. 8).

We noticed for instance the presence of multimeric forms of SNAP-CotE or CotE-SNAP and of non-tagged CotE (Fig. 2), in concordance with previous studies showing self-interactions between two internal regions of the CotE protein (Driks et al. 1994; Giorno et al. 2007; Krajcikova et al. 2009; Istatico et al. 2010). In the N-terminus domain of *B. subtilis*, CotE was shown to interact with some outer coat proteins, while its internal region is implicated in oligomerization and localization, and its C-terminus domain interacts with inner coat proteins (Price and Losick 1999; Little and Driks 2001). We can hypothesize that the N-terminus region of CotE in *B. cereus* spores, located close to the exosporium, directs assembly of exosporium proteins in *B. cereus*, its internal region favors CotE dimers and radial arrangement, while its C-terminus region closely located to the coat/cortex layers may play a role in the recruitment of coat proteins.

However, differences between both amino acid sequences and CotE folding capacity between *B. cereus*, *B. anthracis* and *B. subtilis* (Fig. 6) could also lead to different roles of these domains. Immunoelectron microscopy experiments showed that the N-terminus region of *B. cereus* CotE was poorly detected by the anti-SNAP antibody, maybe because of a low accessibility of the SNAP-tag due







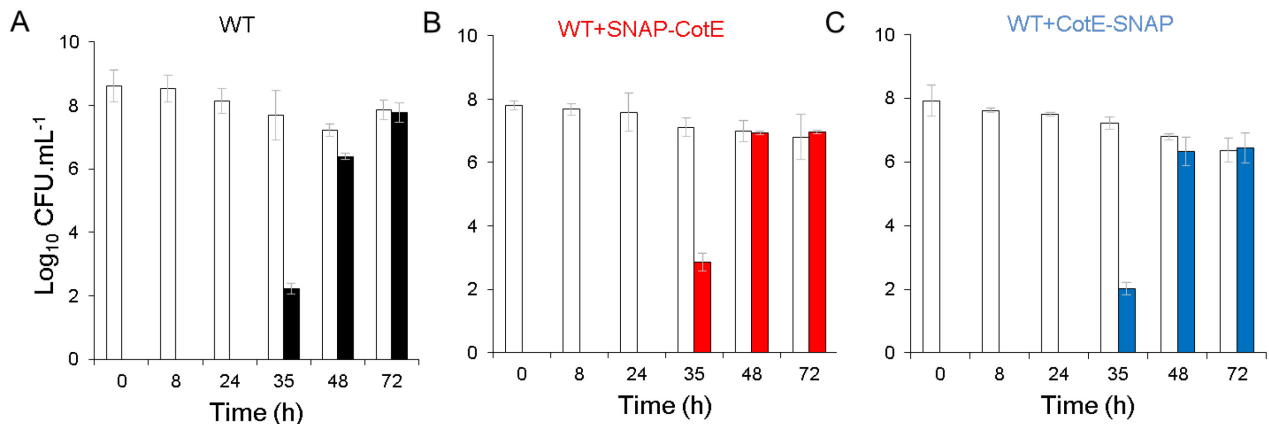
**Figure 7: Model for coat and exosporium assembly mediated by CotE protein in *B. cereus* spores.** Stages of outer layers assembly during sporulation of *B. cereus* (A to C) and localization of CotE during the process in *B. cereus* spore (D) are illustrated. In the first stage after the cortex formation (A), some proteins start to assemble to form a basement layer on the outer membrane (OM). Proteins of the scaffold layer help to the recruitment of the CotE protein with its N-terminus region oriented outward and its C-terminus region orientated inward (B). CotE controls simultaneously the deposition of coat and exosporium proteins on one point of the mother cell proximal (MCP) pole (B). (C) CotE interacts with itself and localize in coats (IC and OC), exosporium (EX) and the cortex (CT). A second cap of CotE protein appears at the mother cell distal (MCD) pole (C).

#### 4.6. Acknowledgements

This work is a partial fulfillment of C.B PhD thesis under a *Contrat Doctoral* from *Université de Montpellier* (France) and was partly supported by *Programme Hubert Curien Pessoa* under contract 30919SJ. Authors also thank Dr Adam Driks and Dr Anne Moir for gift of anti-cotE antibodies and anti-GerPC antibodies, Stephanie Chamot from UM408 SQPOV for her technical assistance and Christine Longin from UMR1313 Génétique Animale et Biologie Intégrative, Equipe Plateforme MIMA2 for help and support in the immunoelectron Microscopy analysis.



## 4.7. Supplemental Materials



**Figure S1: Sporulation kinetics at 20°C of *B. cereus* WT (A), WT+SNAP-CotE (B) and WT+CotE-SNAP (C) cells in SMB medium.**

White bars represent the total cells counts, black bars (in panel A), red bars (in panel B) and blue bars (in panel C) represent spores counts (mean  $\pm$  standard deviation). Error bars represent standard deviation of three experiments, each performed with an independently prepared spore suspension.

## 4.8. References

- Arnaud M, Chastanet A, Débarbouillé M.** 2004. New Vector for Efficient Allelic Replacement in Naturally Nontransformable, Low-GC-Content, Gram-Positive Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **70**:6887-6891.
- Aronson A, Goodman B, Smith Z.** 2014. The regulated synthesis of a *Bacillus anthracis* spore coat protein that affects spore surface properties. *Journal of Applied Microbiology* **116**:1241-1249.
- Bailey-Smith K, Todd SJ, Southworth TW, Proctor J, Moir A.** 2005. The ExsA protein of *Bacillus cereus* is required for assembly of coat and exosporium onto the spore surface. *Journal of Bacteriology* **187**:3800-3806.
- Bauer T, Little S, Stover AG, Driks A.** 1999. Functional regions of the *Bacillus subtilis* spore coat morphogenetic protein CotE. *Journal of Bacteriology* **181**:7043-7051.
- Boydston JA, Yue L, Kearney JF, Turnbough CL, Jr.** 2006. The ExsY protein is required for complete formation of the exosporium of *Bacillus anthracis*. *J Bacteriol* **188**:7440-7448.
- Bressuire-Isoard C, Bornard I, Henriques AO, Carlin F, Broussolle V.** 2016. Sporulation temperature reveals a requirement for CotE in the assembly of both the coat and exosporium layers of *Bacillus cereus* spores. *Applied and Environmental Microbiology*.
- Catalano FA, MeadorParton J, Popham DL, Driks A.** 2001. Amino acids in the *Bacillus subtilis* morphogenetic protein SpoIVA with roles in spore coat and cortex formation. *Journal of Bacteriology* **183**:1645-1654.

- Chada VGR, Sanstad EA, Wang R, Driks A.** 2003. Morphogenesis of *Bacillus* spore surfaces. *Journal of Bacteriology* **185**:6255-6261.
- Checinska A, Paszczynski A, Burbank M.** 2015. *Bacillus* and Other Spore-Forming Genera: Variations in Responses and Mechanisms for Survival. *Annual Review of Food Science and Technology*, Vol 6 **6**:351-369.
- de Francesco M, Jacobs JZ, Nunes F, Serrano M, McKenney PT, Chua M-H, Henriques AO, Eichenberger P.** 2012. Physical Interaction between Coat Morphogenetic Proteins SpoVID and CotE Is Necessary for Spore Encasement in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* **194**:4941-4950.
- Driks A, Roels S, Beall B, Moran CP, Jr., Losick R.** 1994. Subcellular localization of proteins involved in the assembly of the spore coat of *Bacillus subtilis*. *Genes Dev* **8**:234-244.
- Driks A.** 1999. *Bacillus subtilis* spore coat. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **63**:1-20.
- Giorno R, Bozue J, Cote C, Wenzel T, Moody KS, Mallozzi M, Ryan M, Wang R, Zielke R, Maddock JR, Friedlander A, Welkos S, Driks A.** 2007. Morphogenesis of the *Bacillus anthracis* spore. *Journal of Bacteriology* **189**:691-705.
- Henriques AO, Moran CP.** 2007. Structure, assembly, and function of the spore surface layers. *Annual Review of Microbiology* **61**:555-588.
- Imamura D, Kuwana R, Takamatsu H, Watabe K.** 2010. Localization of Proteins to Different Layers and Regions of *Bacillus subtilis* Spore Coats. *Journal of Bacteriology* **192**:518-524.
- Imamura D, Kuwana R, Takamatsu H, Watabe K.** 2011. Proteins Involved in Formation of the Outermost Layer of *Bacillus subtilis* Spores. *Journal of Bacteriology* **193**:4075-4080.
- Isticato R, Pelosi A, De Felice M, Ricca E.** 2010. CotE Binds to CotC and CotU and Mediates Their Interaction during Spore Coat Formation in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* **192**:949-954.
- Johnson MJ, Todd SJ, Ball DA, Shepherd AM, Sylvestre P, Moir A.** 2006. ExsY and CotY are required for the correct assembly of the exosporium and spore coat of *Bacillus cereus*. *Journal of Bacteriology* **188**:7905-7913.
- Kim H, Hahn M, Grabowski P, McPherson DC, Otte MM, Wang R, Ferguson CC, Eichenberger P, Driks A.** 2006. The *Bacillus subtilis* spore coat protein interaction network. *Molecular Microbiology* **59**:487-502.
- Krajcikova D, Lukacova M, Mullerova D, Cutting SM, Barak I.** 2009. Searching for Protein-Protein Interactions within the *Bacillus subtilis* Spore Coat. *Journal of Bacteriology* **191**:3212-3219.
- Kuwana R, Kasahara Y, Fujibayashi M, Takamatsu H, Ogasawara N, Watabe K.** 2002. Proteomics characterization of novel spore proteins of *Bacillus subtilis*. *Microbiology* **148**:3971-3982.
- Lai EM, Phadke ND, Kachman MT, Giorno R, Vazquez S, Vazquez JA, Maddock JR, Driks A.** 2003. Proteomic analysis of the spore coats of *Bacillus subtilis* and *Bacillus anthracis*. *Journal of Bacteriology* **185**:1443-1454.
- Leggett MJ, McDonnell G, Denyer SP, Setlow P, Maillard JY.** 2012. Bacterial spore structures and their protective role in biocide resistance. *Journal of Applied Microbiology* **113**:485-498.

- Lequette Y, Garenaux E, Combrouse T, Dias Tdel L, Ronse A, Slomianny C, Trivelli X, Guerardel Y, Faille C.** 2011. Domains of BclA, the major surface glycoprotein of the *B. cereus* exosporium: glycosylation patterns and role in spore surface properties. *Biofouling* **27**:751-761.
- Little S, Driks A.** 2001. Functional analysis of the morphogenetic spore coat *Bacillus subtilis* protein CotE. *Molecular Microbiology* **42**:1107-1120.
- McKenney PT, Driks A, Eichenberger P.** 2013. The *Bacillus subtilis* endospore: assembly and functions of the multilayered coat. *Nat Rev Microbiol* **11**:33-44.
- McKenney PT, Driks A, Eskandarian HA, Grabowski P, Guberman J, Wang KH, Gitai Z, Eichenberger P.** 2010. A Distance-Weighted Interaction Map Reveals a Previously Uncharacterized Layer of the *Bacillus subtilis* Spore Coat. *Current Biology* **20**:934-938.
- McKenney PT, Eichenberger P.** 2012. Dynamics of Spore Coat Morphogenesis in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology* **83**:245-260.
- Nicholson WL, Munakata N, Horneck G, Melosh HJ, Setlow P.** 2000. Resistance of *Bacillus* Endospores to Extreme Terrestrial and Extraterrestrial Environments. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **64**:548-572.
- Pogliano K, Harry E, Losick R.** 1995. Visualization of the Subcellular Location of Sporulation Proteins in *Bacillus-Subtilis* Using Immunofluorescence Microscopy. *Molecular Microbiology* **18**:459-470.
- Popham DL, Gilmore ME, Setlow P.** 1999. Roles of low-molecular-weight penicillin-binding proteins in *Bacillus subtilis* spore peptidoglycan synthesis and spore properties. *Journal of Bacteriology* **181**:126-132.
- Price KD, Losick R.** 1999. A four-dimensional view of assembly of a morphogenetic protein during sporulation in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* **181**:781-790.
- Qiao H, Krajcikova D, Xing C, Lu B, Hao J, Ke X, Wang H, Barak I, Tang J.** 2013. Study of the interactions between the key spore coat morphogenetic proteins CotE and SpoVID. *Journal of Structural Biology* **181**:128-135.
- Ragkousi K, Setlow P.** 2004. Transglutaminase-mediated cross-linking of GerQ in the coats of *Bacillus subtilis* spores. *Journal of Bacteriology* **186**:5567-5575.
- Riesenman PJ, Nicholson WL.** 2000. Role of spore coat layers in *Bacillus subtilis* spore resistance to hydrogen peroxide, artificial UV-C, UV-B, and solar UV radiation. *Applied and Environmental Microbiology* **66**:620-626.
- Roels S, Driks A, Losick R.** 1992. Characterization of Spoiva, a Sporulation Gene Involved in Coat Morphogenesis in *Bacillus-Subtilis*. *Journal of Bacteriology* **174**:575-585.
- Sanchis V, Agaisse H, Chaufaux J, Lereclus D.** 1996. Construction of new insecticidal *Bacillus thuringiensis* recombinant strains by using the sporulation non-dependent expression system of cryIIIA and a site specific recombination vector. *Journal of Biotechnology* **48**:81-96.
- Sella SRBR, Vandenberghe LPS, Soccol CR.** 2014. Life cycle and spore resistance of spore-forming *Bacillus atrophaeus*. *Microbiological Research* **169**:931-939.

**Setlow P.** 2006. Spores of *Bacillus subtilis*: their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals. *Journal of Applied Microbiology* **101**:514-525.

**Setlow P.** 2014. Spore Resistance Properties. *Microbiology Spectrum* **2**.

**Steichen CT, Kearney JF, Turnbough CL.** 2007. Non-uniform assembly of the *Bacillus anthracis* exosporium and a bottle cap model for spore germination and outgrowth. *Molecular Microbiology* **64**:359-367.

**Takamatsu H, Watabe K.** 2002. Assembly and genetics of spore protective structures. *Cellular and Molecular Life Sciences* **59**:434-444.

**Terry C, Shepherd A, Radford DS, Moir A, Bullough PA.** 2011. YwdL in *Bacillus cereus*: Its Role in Germination and Exosporium Structure. *Plos One* **6**.

**Thompson BM, Stewart GC.** 2008. Targeting of the BclA and BclB proteins to the *Bacillus anthracis* spore surface. *Molecular Microbiology* **70**:421-434.

**Todd SJ, Moir AJG, Johnson MJ, Moir A.** 2003. Genes of *Bacillus cereus* and *Bacillus anthracis* encoding proteins of the exosporium. *Journal of Bacteriology* **185**:3373-3378.

**Wang KH, Isidro AL, Domingues L, Eskandarian HA, McKenney PT, Drew K, Grabowski P, Chua MH, Barry SN, Guan M, Bonneau R, Henriques AO, Eichenberger P.** 2009. The coat morphogenetic protein SpoVID is necessary for spore encasement in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **74**:634-649.

**Webb CD, Decatur A, Teleman A, Losick R.** 1995. Use of Green Fluorescent Protein for Visualization of Cell-Specific Gene-Expression and Subcellular Protein Localization during Sporulation in *Bacillus-Subtilis*. *Journal of Bacteriology* **177**:5906-5911.

**Zheng LB, Donovan WP, Fitz-James PC, Losick R.** 1988. Gene encoding a morphogenic protein required in the assembly of the outer coat of the *Bacillus subtilis* endospore. *Genes & Development* **2**:1047-1054.

## 5. Données supplémentaires

### 5.1. Assemblage et localisation de CotE dans la souche WT à 37°C

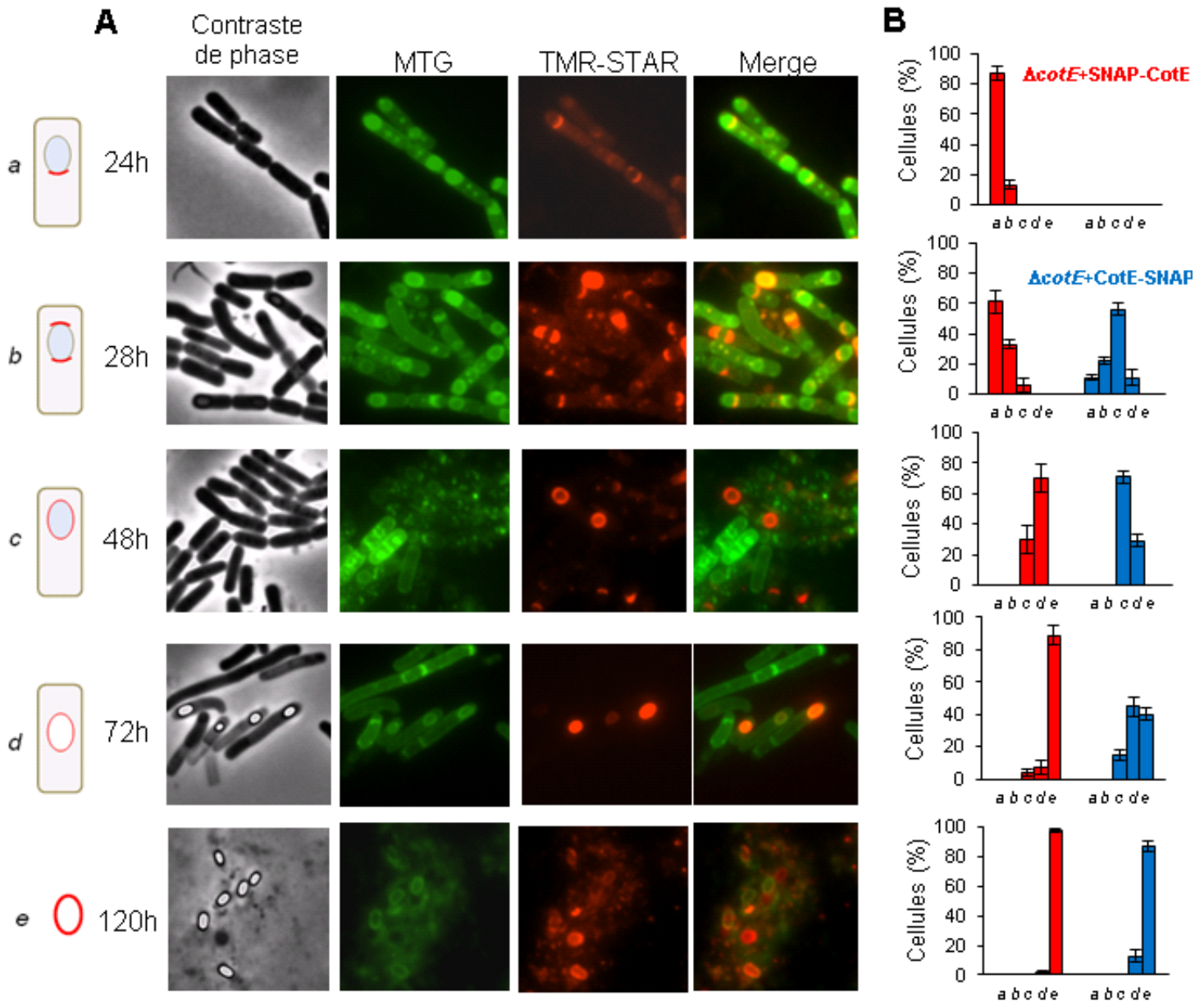
La cinétique d'assemblage et la localisation de la protéine CotE dans les spores de la souche WT de *B. cereus* (telles que présentées dans le manuscrit de la publication du chapitre 4) ont été également étudiées au cours de la sporulation à 37°C, afin de mettre en évidence un éventuel effet de la température de sporulation. Les résultats (que nous ne présentons pas ici) indiquent que le mécanisme d'assemblage de CotE dans les structures de la spore, ainsi que sa localisation finale, sont identiques aux deux températures de sporulation testées. Le marquage fluorescent observé dû à la protéine CotE est toutefois un peu plus faible dans les spores formées à 37°C que dans les spores formées à 20°C, peut-être en raison de la plus faible quantité de protéine CotE détectée à 37°C.

### 5.2. Assemblage et localisation de CotE dans la souche $\Delta cotE$

Le suivi de l'assemblage de CotE au cours de la sporulation a été réalisé dans cette étude par fusion traductionnelle de la protéine CotE avec une étiquette SNAP dans la souche sauvage de *B. cereus* ATCC 14579. Les souches WT+CotE-SNAP et WT+SNAP-CotE ainsi construites possèdent les copies de la protéine CotE de fusion et la copie native de la protéine CotE. Nous avons voulu vérifier cette surproduction ne modifie pas l'assemblage et la localisation de la protéine, en construisant les souches  $\Delta cotE$ +CotE-SNAP et  $\Delta cotE$ +SNAP-CotE afin de suivre uniquement l'assemblage des protéines CotE-SNAP et SNAP-CotE. Préalablement, nous avons vérifié que l'introduction du plasmide portant notre protéine de fusion ne modifie pas la sporulation et les propriétés des spores  $\Delta cotE$ +CotE-SNAP et  $\Delta cotE$ +SNAP-CotE, produites à 37°C et 20°C. L'assemblage de la protéine a ensuite été étudié au cours de la sporulation à 20°C (Figure 34) et 37°C par microscopie à fluorescence.

Les étapes d'assemblage de la protéine CotE chez les spores  $\Delta cotE$  +CotE-SNAP et  $\Delta cotE$  +SNAP-CotE (Figure 34, panel A) sont les mêmes que celles décrites pour les spores WT+CotE-SNAP et WT+SNAP-CotE à 20°C. Cependant, nous avons pu constater que le signal de fluorescence et le nombre de cellules marquées dans la souche  $\Delta cotE$  est plus faible que dans la souche WT. L'assemblage de la protéine de fusion dans la souche mutante semble donc être plus difficile. La présence de la protéine native dans la souche sauvage pourrait aider à l'assemblage de la protéine de fusion dans les structures de la spore. Nos résultats révèlent également un retard d'assemblage pour

la souche  $\Delta cotE+CotE-SNAP$  par rapport à la souche  $\Delta cotE+SNAP-CotE$  suggérant qu'en l'absence de la protéine native, l'assemblage de la protéine CotE-SNAP est plus difficile (Figure 34, panel B).



**Figure 34 : Cinétique d'assemblage de CotE dans les spores  $\Delta cotE$  de *B. cereus* ATCC 14579**

Les souches  $\Delta cotE+SNAP-CotE$  et  $\Delta cotE+CotE-SNAP$  sont cultivées en milieu SMB à 20°C. (A) Les échantillons collectés au cours de la sporulation sont marqués au MTG et au TMR-STAR puis observés par microscopie à fluorescence. La superposition des signaux MTG et TMR-STAR correspondent aux images « Merge ». Les illustrations de cellules (a-e) représentent les différentes étapes d'assemblage de CotE identifiées au cours de la sporulation. (B) La quantification de cellules appartenant à ces différentes classes est réalisée pour les souches  $\Delta cotE+SNAP-CotE$  (rouge) et  $\Delta cotE+CotE-SNAP$  (bleue). Les barres représentent l'écart type entre trois réplicats biologiques.

Des résultats identiques ont été obtenus pour la cinétique d'assemblage de CotE dans les spores  $\Delta cotE+CotE-SNAP$  et  $\Delta cotE+SNAP-CotE$  à 37°C (résultats non présentés ici), ce qui indique que la température de sporulation n'a pas d'impact sur les étapes d'assemblage de CotE dans la souche  $\Delta cotE$ . Les échantillons collectés au cours de la sporulation à 20°C sont marqués puis les protéines extraites sont déposées sur gel SDS-PAGE pour analyse de la fluorescence et détection des protéines CotE-SNAP, et SNAP-CotE et CotE par immunoblot (Figure 35). Pour la souche  $\Delta cotE+SNAP-CotE$ , le signal de fluorescence correspond à la protéine CotE-SNAP mise en évidence par les anticorps anti-SNAP et anti-CotE. Pour les prélèvements de 24 h après l'initiation de la sporulation, on ne détecte pas de fluorescence sur les gels, ni d'hybridation sur le western blot. Ces résultats sont concordants avec le faible signal observé en microscopie. Pour la souche  $\Delta cotE+CotE-SNAP$ , aucun signal de fluorescence n'est détecté sur gel ce qui suggère un signal de trop faible intensité pour être visualisé. De plus, nous pouvons constater qu'une bande à 20 kDa est détectée aussi bien avec les anticorps anti-SNAP que les anticorps anti-CotE. La taille de la protéine CotE (20,3 kDa) et de la protéine SNAP (20 kDa) suggèrent un possible clivage de la protéine de fusion. La région C-terminale de la protéine pourrait être nécessaire à la localisation de CotE dans la spore. Un clivage du SNAP placé en cette position est peut être indispensable à la cellule pour assurer le bon assemblage de la protéine.

Les mêmes résultats ont été obtenus pour les échantillons des spores  $\Delta cotE+CotE-SNAP$  et  $\Delta cotE+SNAP-CotE$  formées à 37°C (résultats non présentés ici).

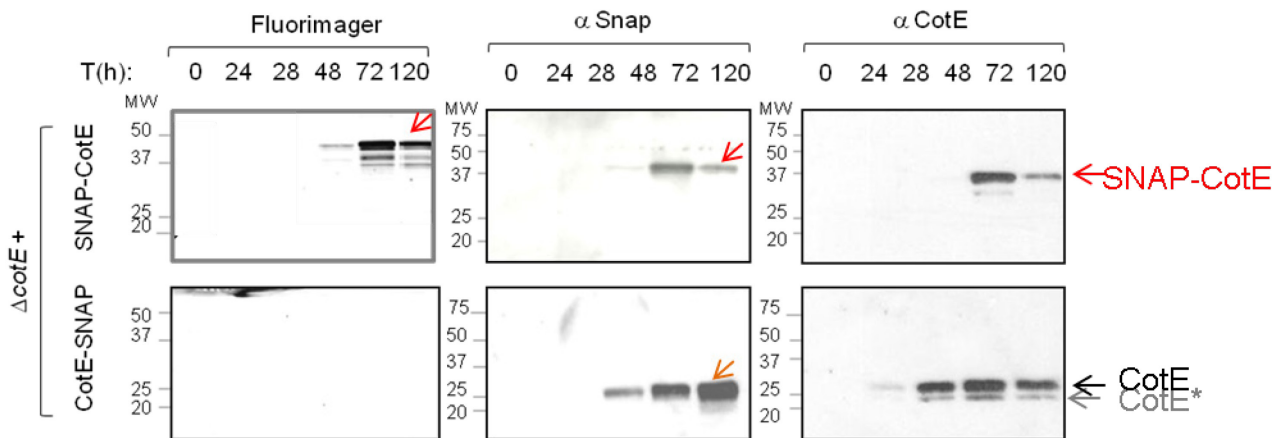


Figure 35 : Analyse des extraits protéiques des spores  $\Delta cotE$  de *B. cereus*

Des extraits protéiques des souches  $\Delta cotE+SNAP-CotE$  et  $\Delta cotE+CotE-SNAP$  collectés au cours de la sporulation en LB/SMB à 20°C sont déposés après marquage avec du TMR-STAR sur gel SDS-PAGE puis soumis à une analyse western blot avec les anticorps anti-CotE et anti-Snap. Le signal de fluorescence émis sur gel SDS-PAGE est visualisé. La flèche grise montre la localisation de la protéine de fusion et la rouge une bande non identifiée.

## **Conclusion et perspectives**

---





## Conclusion et perspectives

L'évolution biologique des espèces repose sur leur adaptation à un certain nombre de facteurs anatomiques, physiologiques ou biologiques. Chaque organisme s'adapte au mode de vie qu'il pratique et au milieu dans lequel il évolue, ce qui englobe également sa capacité à assurer sa survie et sa reproduction dans une gamme plus ou moins large de conditions. La variabilité des conditions environnementales auxquelles sont exposés les micro-organismes, entraînent des modifications physiologiques et métaboliques qui illustrent leur capacité d'adaptation. Cette capacité relève d'une véritable homéostasie, au sens d'une conservation de l'équilibre fonctionnel en dépit de contraintes extérieures.

Les bactéries sont considérées comme les premiers êtres vivants sur la Terre du fait de leurs extrêmes capacités d'adaptation et de survie aux conditions environnementales (Danchin 2015). Des chercheurs ont étudié l'adaptation de cellules de *B. subtilis* soumises à de nombreuses conditions pouvant être rencontrées dans leur habitat naturel : nutriments variés, croissance anaérobie ou aérobie, stress variés, etc... Ces études ont mis en évidence plus de 500 nouveaux gènes impliqués dans l'adaptation et ont décrit la plasticité de la transcription, qui vise à minimiser les dépenses énergétiques de la cellule (Buescher et al. 2012; Chalancon et al. 2012; Nicolas et al. 2012). Ces modifications transcriptionnelles permettent le développement de différentes stratégies de gestion de stress physico-chimiques rencontrés dans leur environnement. Une réponse adaptative des bactéries aboutit à un état de tolérance et par conséquent à une survie dans des conditions normalement létales. Chez les espèces bactériennes sporulées, une stratégie d'adaptation ultime aboutit au déclenchement d'un mécanisme complexe de différenciation cellulaire, la sporulation.

*Bacillus cereus* est une de ces bactéries pathogènes sporulantes, qui est relativement abondante dans la chaîne alimentaire. Il est avéré que l'environnement de sporulation a une influence déterminante sur les propriétés de résistance des spores bactériennes et sur leur capacité de germination. L'appréciation de leur survie et de leur croissance lors de la transformation et la conservation des produits est souvent basée sur des informations recueillies sur des spores produites en laboratoire. Bien que ces conditions ne représentent qu'imparfaitement la diversité des environnements naturels de sporulation, elles permettent cependant d'obtenir des éléments nouveaux sur la nature de l'impact de l'environnement sur les propriétés de spores.

Les travaux réalisés au cours de cette thèse ont porté sur l'exploitation de ce lien étroit entre environnement de sporulation, structure et propriétés des spores. Nous nous sommes intéressés plus précisément au mécanisme d'assemblage des enveloppes de spores de *B. cereus* ATCC 14579 en fonction de la température de sporulation. L'élucidation d'un tel processus s'inscrit dans la compréhension globale des mécanismes complexes développés par les organismes pour organiser un grand nombre de protéines en une structure fonctionnelle. L'assemblage des protéines de tuniques et de l'exosporium des spores de *B. cereus* est alors l'objet d'études fondamentales pour la biologie du développement, comme peuvent être la machine moléculaire de réplication de l'ADN, la mobilité cellulaire et d'autres mécanismes impliquant dans les bactéries des structures protéiques complexes. L'étude des structures externes de la spore soulève également un intérêt nouveau pour certain secteur industrielle. Wu et al (2015) ont reconstitué des tuniques de spores de *B. subtilis* à la surface d'une bille de silice pouvant être utilisé comme plateforme et transporteur de molécule d'intérêt pharmaceutique (médicaments, vaccins) ou écologique (enzymes de dépollution) (Wu et al. 2015).

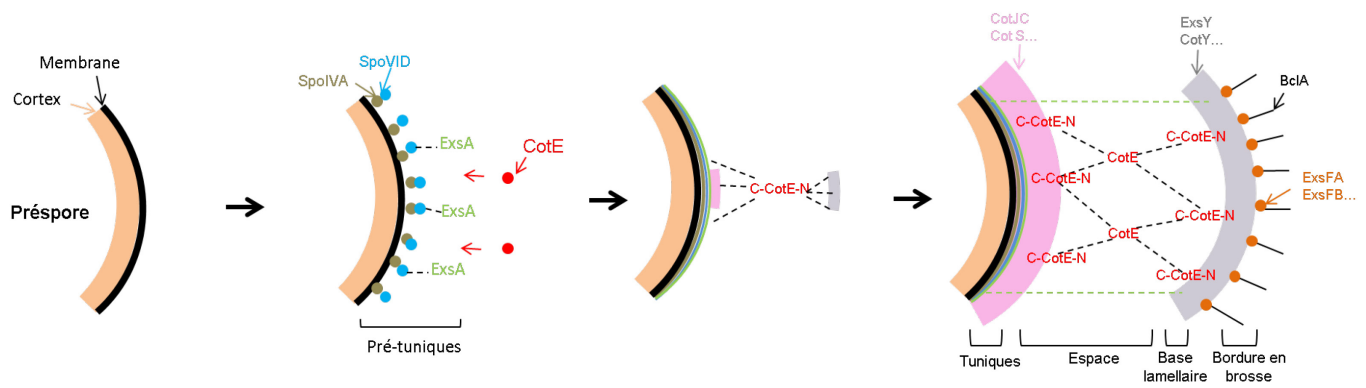
De nombreuses études ont montré les conséquences d'une variation de température sur la sporulation et les propriétés des spores (Baweja et al. 2008; Baril et al. 2011; Planchon et al. 2011; Setlow 2014). Cependant, peu d'études se sont intéressées à déterminer les mécanismes mis en jeu. Dans cette thèse, nous avons suggéré une modification du mécanisme d'assemblage des structures de la spore en fonction de la température. Pour cela, nous avons tout d'abord mis en évidence l'importance de la protéine morphogénétique CotE dans la formation des spores de *B. cereus* à basse température. La délétion du gène *cotE* affecte, la composition des tuniques et de l'exosporium chez les spores mutantes à une température suboptimale de 20°C et, uniquement celle de l'exosporium à la température optimale de 37°C. Les observations en microscope électronique à transmission révèlent que les spores  $\Delta cotE$  ont un exosporium fragmenté et détaché de la surface des spores quand elles sont formées à 37°C. Cependant, lorsque les spores  $\Delta cotE$  sont produites à 20°C, elles présentent un défaut d'assemblage de l'exosporium mais aussi des tuniques et deviennent plus sensibles aux enzymes lytiques, ce qui montre le rôle de la protéine CotE dans l'assemblage des deux enveloppes externe de la spore, modulé en fonction de la température de sporulation (Bressuire-Isoard et al. 2015).

La protéine CotE est détectée par Western blot dans l'exosporium et les tuniques et/ou le cortex des spores. Cette localisation dans les structures externes de la spore a été confirmée par des observations en microscopie électronique après immunomarquage. De plus, nous avons montré que la protéine CotE est détectée en plus grande quantité dans les spores formées à 20°C et l'augmentation de la synthèse de CotE pourrait être nécessaire au maintien de l'assemblage des enveloppes de la spore à cette température. Nos travaux suggèrent également la contribution directe

ou indirecte, mais majeure, de la protéine CotE dans les propriétés des spores comme, l'hydrophobicité et la résistance aux UV-C, à la chaleur humide et au peroxyde d'hydrogène ainsi que dans leur capacité à germer (Bressuire-Isoard et al. 2015).

Nous avons ensuite étudié la nature du lien entre la protéine CotE et la température de sporulation en analysant l'assemblage de la protéine au cours du processus de sporulation et à sa localisation dans la spore en fonction de la température de sporulation. Par microscopie à fluorescence, nous avons montré que la protéine CotE s'assemble en un point de la préspore, puis en un second point d'assemblage au pôle opposé de la préspore pour aboutir à la formation d'une couche uniforme autour de la spore. La température de sporulation ne semble pas avoir d'impact majeur sur la cinétique spatiale et temporelle d'assemblage de la protéine CotE. Dans les spores, la région N-terminale de la protéine CotE semble être orientée vers l'exosporium, tandis que sa région C-terminale semble orientée vers les tuniques et le cortex, ce qui est en accord avec sa localisation dans les deux structures. Ces expériences de microscopie à fluorescence pourraient être complétées par d'autres observations à l'aide d'un microscope à très haute résolution qui permettrait d'affiner encore la localisation des signaux fluorescents correspondant à la position de CotE. En théorie, la distance entre les cercles de fluorescence obtenus avec les deux fusions traductionnelles CotE-SNAP et SNAP-CotE devrait correspondre à la longueur de l'espace entre l'exosporium et les tuniques ou l'exosporium et le cortex, telle qu'observée sur les coupes de spores en microscopie électronique. Des mesures précises devraient nous permettre de le confirmer. La présence de la protéine CotE, peut-être présente en faible quantité dans l'espace qui sépare l'exosporium et les tuniques, reste également à démontrer. Il serait intéressant de déterminer la localisation de la protéine CotE dans un mutant dépourvu d'exosporium ou dans un mutant dépourvu de tuniques.

Les résultats recueillis au cours des travaux de cette thèse, nous permettent de proposer un modèle d'assemblage des tuniques et de l'exosporium des spores de *B. cereus* (Figure 36) (Henriques and Moran 2007; Kailas et al. 2011; Abhyankar et al. 2013). La mise en place de CotE débute après la formation d'une base composée des protéines morphogénétiques SpoIVA, SpoVID et ExsA. CotE se lierait par sa région N-terminale nécessaire à l'assemblage de l'exosporium en un point précis de la surface de l'endospore et par sa région C-terminale à celle des protéines de tuniques. La mise en place de l'exosporium et tuniques se produirait simultanément et parallèlement.



**Figure 36 : Modèle d'assemblage des tuniques et de l'exosporium de *B. cereus***

La première étape consiste en la mise en place d'une pré-tunique composée des protéines morphogénétiques SpoIVA, SpoVID et ExsA. CotE se met en place par l'intermédiaire de cette base puis commence à assembler les protéines des tuniques et de l'exosporium au pôle MCP de la préspore. La région N-terminale permettrait l'assemblage des protéines de l'exosporium comme ExsY et CotY, et la région C-terminale à celle des protéines de tuniques comme CotS et CotJ.

Ce modèle d'assemblage des structures pourrait être identique à 37°C et 20°C. Cependant, la plus grande quantité/accessibilité de CotE à basse température pourrait avoir un rôle sur la nature des interactions de CotE avec des protéines de tuniques et de l'exosporium. Selon notre modèle, la région C-terminale de CotE pourrait interagir préférentiellement avec des protéines de tuniques et la région N-terminale avec des protéines de l'exosporium. Des expériences de « pull down » pourraient permettre d'analyser la nature des interactions des domaines terminaux de CotE aux deux températures de sporulation. Il serait également intéressant de définir les protéines dont l'assemblage dépend directement ou indirectement de CotE. L'étude des protéomes des spores WT et  $\Delta cotE$  formées à 20° et 37°C, permettraient également de déterminer les protéines dépendant de CotE et/ou de la température de formation des spores.

Nos résultats montrent que la température de sporulation influe sur la quantité de la protéine CotE détectée au cours de la sporulation. Cette différence pourrait venir : i) d'une meilleure extractabilité à basse température, due à une différence dans la structure des spores ou des liaisons établies entre protéines ou « cross-linking » ou ii) d'une différence d'expression du gène *cotE*, à 20° ou 37°C. De la même façon, connaître la temporalité de l'expression des gènes des facteurs sigma pourrait nous renseigner sur la nature des régulateurs de la sporulation qui contrôlent potentiellement l'expression temporelle du gène *cotE*.

Le rôle de CotE dans le mécanisme d'assemblage des enveloppes de spores de *B. cereus* semble être différent de celui défini à ce jour chez *B. anthracis*, une autre espèce du groupe *B. cereus sensu lato*. Des différences peuvent donc exister entre deux espèces phylogénétiquement proches. Ce groupe comprend également un large nombre d'espèces psychrotrophes et thermophiles.

Ces espèces pourraient avoir une relation différente vis-à-vis de la température de sporulation de celle définie dans notre étude pour la souche mésophile *B. cereus* ATCC 14579. En plus d'une diversité de mécanismes intra-espèces, on peut se demander s'il n'existerait pas des différences à l'échelle d'une cellule isolée. La construction de mutant dans d'autres souches du groupe *B. cereus* et des expériences sur des cellules isolées peuvent être envisagées afin d'étudier la généricité du rôle de CotE chez *B. cereus* ainsi que la possible hétérogénéité de comportement au sein d'une population de spores.

Cette thèse a permis d'appréhender l'impact de la température de sporulation sur le mécanisme d'assemblage des spores. Cette étude montre alors que les conditions environnementales de sporulation déterminent bien plus que l'état physiologique des cellules. La température de sporulation modifie subtilement l'assemblage des protéines des enveloppes, ce qui a pour conséquence de modifier leurs propriétés de résistance et de germination. Nos travaux permettent de connaître et comprendre la variabilité de spores potentiellement présentes dans l'environnement et *a posteriori* dans les industries alimentaires. La problématique de cette diversité et en particulier sa gestion pour éradiquer les spores bactériennes, reste complexe dans la mesure où l'origine des spores et les conditions de leurs formations restent difficiles à estimer. On peut envisager la possibilité que la protéine CotE soit utilisée comme marqueur biologique. En effet, les spores de *B. cereus* formées à basses températures sont plus sensibles à divers traitements et présentent une plus grande quantité de CotE. Un dosage de la protéine révélerait la température de sporulation et les propriétés de ces spores. Cependant, un certain nombre de conditions doivent encore être envisagées pour considérer CotE comme un bon marqueur biologique, comme la simplicité d'un dosage, son faible coût et bien sur sa reproductibilité, si nos résultats sont transférables à d'autres modèles bactériens permettant son utilisation à grande échelle.

Depuis quelques années, on note l'émergence de voies prometteuses pour prendre en compte la variabilité microbienne d'origine physiologique. Dans le contexte de notre étude, il devient possible de prévoir, par des modèles mathématiques, l'impact de différents facteurs environnementaux sur le comportement d'une flore microbienne afin d'assurer la sécurité des aliments. Les modèles utilisés permettent, par exemple, de prévoir les délais de conservation d'un aliment, ou encore, les conséquences microbiologiques d'une modification de formulation d'un produit alimentaire ou d'un procédé de fabrication. Cependant la plupart des modèles surestiment le risque puisque ces systèmes simplifiés ne tiennent pas compte d'un certain nombre de paramètres. En effet, les limites d'une telle méthode reposent souvent sur la variabilité interespèce, le manque d'information sur l'histoire antérieure du microorganisme dont l'environnement de sporulation et l'impact de la flore de compétition. L'étude de l'impact de la température sur les spores est donc importante pour la définition

d'un modèle valable. L'approche expérimentale de notre étude s'inscrit donc dans cet objectif de compréhension fondamentale de la diversité microbienne.

Dans les années qui viennent, le croisement des données issues de la microbiologie prévisionnelle avec les connaissances des mécanismes moléculaires et physiologiques permettra une meilleure maîtrise du risque microbien en industries alimentaires.

## Références bibliographiques

---





---

## Références bibliographiques

- Abbas AA, Planchon S, Jobin M, Schmitt P.** 2014. Absence of oxygen affects the capacity to sporulate and the spore properties of *Bacillus cereus*. *Food Microbiology* **42**:122-131.
- Abe K, Kawano Y, Iwamoto K, Arai K, Maruyama Y, Eichenberger P, Sato T.** 2014. Developmentally-regulated excision of the SPb prophage reconstitutes a gene required for spore envelope maturation in *Bacillus subtilis*. *PLoS Genet* **10**:e1004636.
- Abee T, Groot MN, Tempelaars M, Zwietering M, Moezelaar R, Voort Mvd.** 2011. Germination and outgrowth of spores of *Bacillus cereus* group members: Diversity and role of germinant receptors. *Food Microbiology* **28**:199-208.
- Abel-Santos E.** 2012. *Bacterial Spores: Current Research and Applications*. Caister Academic Press.
- Abhyankar W, Hossain AH, Djajasaputra A, Permpoonpattana P, Ter Beek A, Dekker HL, Cutting SM, Brul S, de Koning LJ, de Koster CG.** 2013. In Pursuit of Protein Targets: Proteomic Characterization of Bacterial Spore Outer Layers. *Journal of Proteome Research* **12**:4507-4521.
- Abhyankar W, Ter Beek A, Dekker H, Kort R, Brul S, de Koster CG.** 2011. Gel-free proteomic identification of the *Bacillus subtilis* insoluble spore coat protein fraction. *Proteomics* **11**:4541-4550.
- Al-Hinai MA, Jones SW, Papoutsakis ET.** 2015. The *Clostridium* Sporulation Programs: Diversity and Preservation of Endospore Differentiation. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **79**:19-37.
- Amati G, Bisicchia P, Galizzi A.** 2004. DegU-P Represses Expression of the Motility fla-che Operon in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* **186**:6003-6014.
- Anderson Borge GI, Skeie M, Sorhaug T, Langsrud T, Granum PE.** 2001. Growth and toxin profiles of *Bacillus cereus* isolated from different food sources. *International Journal of Food Microbiology* **69**:237-246.
- Andersson A, Rönner U, Granum PE.** 1995. What problems does the food industry have with the spore-forming pathogens *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens*? *International Journal of Food Microbiology* **28**:145-155.
- Apetroaie-Constantin C, Shaheen R, Andrup L, Smidt L, Rita H, Sallinoja-Salonen M.** 2008. Environment driven cereulide production by emetic strains of *Bacillus cereus*. *International Journal of Food Microbiology* **127**:60-67.
- Arantes O, Lereclus D.** 1991. Construction of cloning vectors for *Bacillus thuringiensis*. *Gene* **108**:115-119.
- Argôlo-Filho R, Loguercio L.** 2013. *Bacillus thuringiensis* Is an Environmental Pathogen and Host-Specificity Has Developed as an Adaptation to Human-Generated Ecological Niches. *Insects* **5**:62.

- Arnaud M, Chastanet A, Débarbouillé M.** 2004. New Vector for Efficient Allelic Replacement in Naturally Nontransformable, Low-GC-Content, Gram-Positive Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **70**:6887-6891.
- Aronson A, Goodman B, Smith Z.** 2014. The regulated synthesis of a *Bacillus anthracis* spore coat protein that affects spore surface properties. *Journal of Applied Microbiology* **116**:1241-1249.
- Aronson AI, Fitzjames P.** 1976. Structure and morphogenesis of bacterial spore coat. *Bacteriological Reviews* **40**:360-402.
- Aronson AI, Shai Y.** 2001. Why *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins are so effective: unique features of their mode of action. *FEMS Microbiology Letters* **195**:1-8.
- Aronson AI.** 2012. The structure and composition of the outlayers of the bacterial spore, p 57-71. *In* Abel-Santos E (ed), *Bacterial Spores: Current Research and Applications*. Caister Academic Press, Las Vegas.
- Atrih A, Foster SJ.** 1999. The role of peptidoglycan structure and structural dynamics during endospore dormancy and germination. *Antonie van Leeuwenhoek* **75**:299-307.
- Atrih A, Foster SJ.** 2001. Analysis of the role of bacterial endospore cortex structure in resistance properties and demonstration of its conservation amongst species. *Journal of Applied Microbiology* **91**:364-372.
- Avignone-Rossa C, Arcas J, Mignone C.** 1992. *Bacillus thuringiensis* growth, sporulation and  $\delta$ -endotoxin production in oxygen limited and non-limited cultures. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **8**:301-304.
- Bagyan I, Setlow B, Setlow P.** 1998. New small, acid-soluble proteins unique to spores of *Bacillus subtilis*: identification of the coding genes and regulation and function of two of these genes. *Journal of Bacteriology* **180**:6704-6712.
- Bailey-Smith K, Todd SJ, Southworth TW, Proctor J, Moir A.** 2005. The ExsA protein of *Bacillus cereus* is required for assembly of coat and exosporium onto the spore surface. *Journal of Bacteriology* **187**:3800-3806.
- Ball DA, Taylor R, Todd SJ, Redmond C, Couture-Tosi E, Sylvestre P, Moir A, Bullough PA.** 2008. Structure of the exosporium and sublayers of spores of the *Bacillus cereus* family revealed by electron crystallography. *Molecular Microbiology* **68**:947-958.
- Baril E, Coroller L, Couvert O, Leguerinel I, Postollec F, Boulais C, Carlin F, Mafart P.** 2012. Modeling heat resistance of *Bacillus weihenstephanensis* and *Bacillus licheniformis* spores as function of sporulation temperature and pH. *Food Microbiology* **30**:29-36.
- Baril E, Coroller L, Postollec F, Leguerinel I, Boulais C, Carlin F, Mafart P.** 2011. The wet-heat resistance of *Bacillus weihenstephanensis* KBAB4 spores produced in a two-step sporulation process depends on sporulation temperature but not on previous cell history. *International Journal of Food Microbiology* **146**:57-62.
- Barlass PJ, Houston CW, Clements MO, Moir A.** 2002. Germination of *Bacillus cereus* spores in response to L-alanine and to inosine: the roles of gerL and gerQ operons. *Microbiology* **148**:2089-2095.

- Barra-Carrasco J, Olguin-Araneda V, Plaza-Garrido A, Miranda-Cardenas C, Cofre-Araneda G, Pizarro-Guajardo M, Sarker MR, Paredes-Sabja D.** 2013. The *Clostridium difficile* Exosporium Cysteine (CdeC)-Rich Protein Is Required for Exosporium Morphogenesis and Coat Assembly. *Journal of Bacteriology* **195**:3863-3875.
- Bate AR, Bonneau R, Eichenberger P.** 2014. *Bacillus subtilis* Systems Biology: Applications of -Omics Techniques to the Study of Endospore Formation. *Microbiology Spectrum* **2**.
- Bauer T, Little S, Stover AG, Driks A.** 1999. Functional regions of the *Bacillus subtilis* spore coat morphogenetic protein CotE. *Journal of Bacteriology* **181**:7043-7051.
- Baweja RB, Zaman MS, Mattoo AR, Sharma K, Tripathi V, Aggarwal A, Dubey GP, Kurupati RK, Ganguli M, Chaudhury NK, Sen S, Das TK, Gade WN, Singh Y.** 2008. Properties of *Bacillus anthracis* spores prepared under various environmental conditions. *Archives of Microbiology* **189**:71-79.
- Bertani G.** 1951. STUDIES ON LYSOGENESIS I.: The Mode of Phage Liberation by Lysogenic *Escherichia coli*1. *Journal of Bacteriology* **62**:293.
- Black EP, Wei J, Atluri S, Cortezzo DE, Koziol-Dube K, Hoover DG, Setlow P.** 2007. Analysis of factors influencing the rate of germination of spores of *Bacillus subtilis* by very high pressure. *Journal of Applied Microbiology* **102**:65-76.
- Boniolo FS, Rodrigues RC, Prata AMR, Lopez ML, Jacinto T, da Silveira MM, Berbert-Molina MA.** 2012. Oxygen supply in *Bacillus thuringiensis* fermentations: bringing new insights on their impact on sporulation and delta-endotoxin production. *Applied Microbiology and Biotechnology* **94**:625-636.
- Boydston JA, Chen P, Steichen CT, Turnbough CL.** 2005. Orientation within the exosporium and structural stability of the collagen-like glycoprotein BclA of *Bacillus anthracis*. *Journal of Bacteriology* **187**:5310-5317.
- Boydston JA, Yue L, Kearney JF, Turnbough CL, Jr.** 2006. The ExsY protein is required for complete formation of the exosporium of *Bacillus anthracis*. *J Bacteriol* **188**:7440-7448.
- Bressuire-Isoard C, Bornard I, Henriques AO, Carlin F, Broussolle V.** 2016. Sporulation temperature reveals a requirement for CotE in the assembly of both the coat and exosporium layers of *Bacillus cereus* spores. *Applied and Environmental Microbiology*.
- Bressuire-Isoard C, broussolle V, Carlin F.** Under preparation. Environment of sporulation influences *Bacillus* spore properties and morphology.
- Brillard J, Dupont CMS, Berge O, Dargaignaratz C, Oriol-Gagnier S, phanie, Doussan C, Broussolle V, ronique, Gillon M, Clavel T, rard A.** 2015. The Water Cycle, a Potential Source of the Bacterial Pathogen *Bacillus cereus*. *BioMed Research International* **2015**:15.
- Broussolle V, Gaillard F, Nguyen-The C, 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. *Journal of Applied Microbiology* **105**:1081-1090.
- Budde I, Steil L, Scharf C, Volker U, Bremer E.** 2006. Adaptation of *Bacillus subtilis* to growth at low temperature: a combined transcriptomic and proteomic appraisal. *Microbiology-Sgm* **152**:831-853.

Buescher JM, Liebermeister W, Jules M, Uhr M, Muntel J, Botella E, Hessling B, Kleijn RJ, Le Chat L, Lecointe F, Mader U, Nicolas P, Piersma S, Rugheimer F, Becher D, Bessieres P, Bidnenko E, Denham EL, Dervyn E, Devine KM, Doherty G, Drulhe S, Felicori L, Fogg MJ, Goelzer A, Hansen A, Harwood CR, Hecker M, Hubner S, Hultschig C, Jarmer H, Klipp E, Leduc A, Lewis P, Molina F, Noirot P, Peres S, Pigeonneau N, Pohl S, Rasmussen S, Rinn B, Schaffer M, Schnidder J, Schwikowski B, Van Diji JM, Veiga P, Walsh S, Wilkinson AJ, Stelling J, Aymerich S, et al. 2012. Global network reorganization during dynamic adaptations of *Bacillus subtilis* metabolism. *Science* **335**:1099-1103.

Cabrera-Martinez RM, Tovar-Rojo F, Vepachedu VR, Setlow P. 2003. Effects of overexpression of nutrient receptors on germination of spores of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* **185**:2457-2464.

Cano RJ, Borucki MK. 1995. Revival and identification of bacterial spores in 25- to 40-million-year-old Dominican amber. *Science* **268**:1060-1064.

Carlin F, Albagnac C, Rida A, Guinebretiere MH, Couvert O, Nguyen-The C. 2013. Variation of cardinal growth parameters and growth limits according to phylogenetic affiliation in the *Bacillus cereus* group. Consequences for risk assessment. *Food Microbiol* **33**:69-76.

Carlin F, Fricker M, Pielaat A, Heisterkamp S, Shaheen R, Salonen MS, Svensson B, Nguyen-The C, Ehling-Schulz M. 2006. Emetic toxin-producing strains of *Bacillus cereus* show distinct characteristics within the *Bacillus cereus* group. *International Journal of Food Microbiology* **109**:132-138.

Carlin F, Nguyen The C. 2013. Pathogen update: *Bacillus* species. In Sofos J (ed), *Advances in Microbial Food Safety* (Volume 1), vol 70-96. Woodhead Publishing Limited, Cambridge.

Carlin F. 2010. Origin of bacterial spores contaminating foods. *Food Microbiology* **28**:177-182.

Carlin F. 2011. Origin of bacterial spores contaminating foods. *Food Microbiology* **28**:177-182.

Carroll AM, Plomp M, Malkin AJ, Setlow P. 2008. Protozoal digestion of coat-defective *Bacillus subtilis* spores produces "Rinds" composed of insoluble coat protein. *Applied and Environmental Microbiology* **74**:5875-5881.

Catalano FA, MeadorParton J, Popham DL, Driks A. 2001. Amino acids in the *Bacillus subtilis* morphogenetic protein SpoIVA with roles in spore coat and cortex formation. *Journal of Bacteriology* **183**:1645-1654.

Cazemier AE, Wagenaars SFM, terSteege PF. 2001. Effect of sporulation and recovery medium on the heat resistance and amount of injury of spores from spoilage bacilli. *Journal of Applied Microbiology* **90**:761-770.

Chada VGR, Sanstad EA, Wang R, Driks A. 2003. Morphogenesis of *Bacillus* spore surfaces. *Journal of Bacteriology* **185**:6255-6261.

Chalancon G, Kruse K, Babu MM. 2012. Reconfiguring Regulation. *Science* **1219303**:335.

Checinska A, Paszczynski A, Burbank M. 2015. *Bacillus* and Other Spore-Forming Genera: Variations in Responses and Mechanisms for Survival. *Annual Review of Food Science and Technology*, Vol 6 **6**:351-369.

- Chesnokova ON, McPherson SA, Steichen CT, Turnbough CL, Jr.** 2009. The spore-specific alanine racemase of *Bacillus anthracis* and its role in suppressing germination during spore development. *Journal of Bacteriology* **191**:1303-1310.
- Clavel T, Carlin F, Lairon D, Nguyen-The C, Schmitt P.** 2004. Survival of *Bacillus cereus* spores and vegetative cells in acid media simulating human stomach. *Journal of Applied Microbiology* **97**:214-219.
- Cockell CS, Cousins C, Wilkinson PT, Olsson-Francis K, Rozitis B.** 2015. Are thermophilic microorganisms active in cold environments? *International Journal of Astrobiology* **14**:457-463.
- Condon S, Bayarte M, Sala FJ.** 1992. Influence of the sporulation temperature upon the heat resistance of *Bacillus subtilis*. *Journal of Applied Bacteriology* **73**:252-256.
- Cortezzo DE, Koziol-Dube K, Setlow B, Setlow P.** 2004. Treatment with oxidizing agents damages the inner membrane of spores of *Bacillus subtilis* and sensitizes spores to subsequent stress. *Journal of Applied Microbiology* **97**:838-852.
- Cortezzo DE, Setlow P.** 2005. Analysis of factors that influence the sensitivity of spores of *Bacillus subtilis* to DNA damaging chemicals. *Journal of Applied Microbiology* **98**:606-617.
- Costa T, Serrano M, Steil L, Volker U, Moran CP, Henriques AO.** 2007. The timing of cotE expression affects *Bacillus subtilis* spore coat morphology but not lysozyme resistance. *Journal of Bacteriology* **189**:2401-2410.
- Cowan AE, Olivastro EM, Koppel DE, Loshon CA, Setlow B, Setlow P.** 2004. Lipids in the inner membrane of dormant spores of *Bacillus* species are largely immobile. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**:7733-7738.
- Cybulski RJ, Jr., Sanz P, Alem F, Stibitz S, Bull RL, O'Brien AD.** 2009. Four superoxide dismutases contribute to *Bacillus anthracis* virulence and provide spores with redundant protection from oxidative stress. *Infection and Immunity* **77**:274-285.
- Danchin A.** 2015. The Emergence of the First Cells. *Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine*.
- Daubenspeck JM, Zeng HD, Chen P, Dong SL, Steichen CT, Krishna NR, Pritchard DG, Turnbough CL.** 2004. Novel oligosaccharide side chains of the collagen-like region of BclA, the major glycoprotein of the *Bacillus anthracis* exosporium. *Journal of Biological Chemistry* **279**:30945-30953.
- De Buyser ML, Dufour B, Maire M, Lafarge V.** 2001. Implication of milk and milk products in food-borne diseases in France and in different industrialised countries. *InterInternational Journal of Food Microbiology* **67**:1-17.
- de Francesco M, Jacobs JZ, Nunes F, Serrano M, McKenney PT, Chua M-H, Henriques AO, Eichenberger P.** 2012. Physical Interaction between Coat Morphogenetic Proteins SpoVID and CotE Is Necessary for Spore Encasement in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* **194**:4941-4950.
- de Hoon MJL, Eichenberger P, Vitkup D.** 2010. Hierarchical Evolution of the Bacterial Sporulation Network. *Current Biology* **20**:R735-R745.

- de Rezende JR, Kjeldsen KU, Hubert CRJ, Finster K, Loy A, Jorgensen BB.** 2013. Dispersal of thermophilic *Desulfotomaculum* endospores into Baltic Sea sediments over thousands of years. *ISME J* **7**:72-84.
- de Vries YP, Atmadja RD, Hornstra LM, de Vos WM, Abee T.** 2005. Influence of glutamate on growth, sporulation, and spore properties of *Bacillus cereus* ATCC 14579 in defined medium. *Applied and Environmental Microbiology* **71**:3248-3254.
- de Vries YP, Hornstra LM, de Vos WM, Abee T.** 2004. Growth and sporulation of *Bacillus cereus* ATCC 14579 under defined conditions: temporal expression of genes for key sigma factors. *Applied and Environmental Microbiology* **70**:2514-2519.
- Dedet JP.** 2007. La microbiologie, de ses origines aux maladies émergentes endnote. Dunod,
- Driks A, Roels S, Beall B, Moran CP, Jr., Losick R.** 1994. Subcellular localization of proteins involved in the assembly of the spore coat of *Bacillus subtilis*. *Genes Dev* **8**:234-244.
- Driks A.** 1999. *Bacillus subtilis* spore coat. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **63**:1-20.
- Driks A.** 2002. Overview: development in bacteria: spore formation in *Bacillus subtilis*. *Cellular and Molecular Life Sciences* **59**:389-391.
- Driks A.** 2003. The dynamic spore. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100**:3007-3009.
- Dromigny E.** 2008. Morphologie et structure cellulaire *Bacillus cereus*, p 43. In Lavoisier (ed), *Bacillus cereus*.
- Durre P.** 2011. Ancestral sporulation initiation. *Molecular Microbiology* **80**:584-587.
- Edwards AN, McBride SM.** 2014. Initiation of sporulation in *Clostridium difficile*: a twist on the classic model. *FEMS Microbiology Letters* **358**:110-118.
- EFSA.** 2013. Scientific Opinion on the risk posed by pathogens in food of non-animal origin. Part 1 (outbreak data analysis and risk ranking of food/pathogen combinations). *EFSA Journal* **11**:3025
- Ehling-Schulz M, Frenzel E, Gohar M.** 2015. Food-bacteria interplay: pathometabolism of emetic *Bacillus cereus*. *Frontiers in Microbiology* **6**.
- Ehling-Schulz M, Fricker M, Scherer S.** 2004. *Bacillus cereus*, the causative agent of an emetic type of food-borne illness. *Molecular Nutrition & Food Research* **48**:479-487.
- Errington E.** 1993. *Bacillus subtilis* sporulation: regulation of gene expression and control of morphogenesis. *Microbiological Reviews* **57**:1-33.
- Errington J.** 1996. Determination of cell fate in *Bacillus subtilis*. *Trends in Genetics* **12**:31-34.
- Faille C, Tauveron G, Gentil-Lelievre CL, Slomianny C.** 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.
- Fimlaid KA, Shen A.** 2015. Diverse mechanisms regulate sporulation sigma factor activity in the Firmicutes. *Current Opinion in Microbiology* **24**:88-95.

- Fine F, Gervais P.** 2005. Thermal destruction of dried vegetative yeast cells and dried bacterial spores in a convective hot air flow: strong influence of initial water activity. *Environmental Microbiology* **7**:40-46.
- Finlay WJJ, Logan NA, Sutherland AD.** 2000. *Bacillus cereus* produces most emetic toxin at lower temperatures. *Letters in Applied Microbiology* **31**:385-389.
- Galperin MY, Mekhedov SL, Puigbo P, Smirnov S, Wolf YI, Rigden DJ.** 2012. Genomic determinants of sporulation in Bacilli and Clostridia: towards the minimal set of sporulation-specific genes. *Environmental Microbiology* **14**:2870-2890.
- Garcia D, van der Voort M, Abee T.** 2010. Comparative analysis of *Bacillus weihenstephanensis* KBAB4 spores obtained at different temperatures. *International Journal of Food Microbiology* **140**:146-153.
- Gardan R, Besset C, Guillot A, Gitton C, Monnet V.** 2009. The Oligopeptide Transport System Is Essential for the Development of Natural Competence in *Streptococcus thermophilus* Strain LMD-9. *Journal of Bacteriology* **191**:4647-4655.
- Giorno R, Bozue J, Cote C, Wenzel T, Moody KS, Mallozzi M, Ryan M, Wang R, Zielke R, Maddock JR, Friedlander A, Welkos S, Driks A.** 2007. Morphogenesis of the *Bacillus anthracis* spore. *Journal of Bacteriology* **189**:691-705.
- Giorno R, Mallozzi M, Bozue J, Moody KS, Slack A, Qiu DL, Wang R, Friedlander A, Welkos S, Driks A.** 2009. Localization and assembly of proteins comprising the outer structures of the *Bacillus anthracis* spore. *Microbiology-Sgm* **155**:1133-1145.
- Gomez-Lopez VM, Ragaert P, Debevere J, Devlieghere F.** 2007. Pulsed light for food decontamination: a review. *Trends in Food Science & Technology* **18**:464-473.
- González I, López M, Martínez S, Bernardo A, González J.** 1999. Thermal inactivation of *Bacillus cereus* spores formed at different temperatures. *International Journal of Food Microbiology* **51**:81-84.
- Gonzalez-Pastor JE, Hobbs EC, Losick R.** 2003. Cannibalism by sporulating bacteria. *Science* **301**:510-513.
- Gould GW.** 2006. History of science--spores. *J Appl Microbiol* **101**:507-513.
- Gounina-Allouane R, Broussolle V, Carlin F.** 2008. Influence of the sporulation temperature on the impact of the nutrients inosine and l-alanine on *Bacillus cereus* spore germination. *Food Microbiology* **25**:202-206.
- Granum PE, Lund T.** 1997. *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiol Lett* **157**:223-228.
- Granum PE.** 1994. *Bacillus cereus* and its toxins. *Journal of Applied Bacteriology Symposium Supplement* **76**:61S-66S.
- Grossman AD, Losick R.** 1988. Extracellular Control of Spore Formation in *Bacillus-Subtilis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **85**:4369-4373.
- Guinebretiere MH, Auger S, Galleron N, Contzen M, De Sarrau B, De Buyser ML, Lamberet G, Fagerlund A, Granum PE, Lereclus D, De Vos P, Nguyen-The C, Sorokin A.** 2013. *Bacillus*



*cytotoxicus* sp nov is a novel thermotolerant species of the *Bacillus cereus* Group occasionally associated with food poisoning. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology **63**:31-40.

**Guinebretiere MH, Girardin H, Dargaignaratz C, Carlin F, Nguyen-The C.** 2003. Contamination flows of *Bacillus cereus* and spore-forming aerobic bacteria in a cooked, pasteurized and chilled zucchini puree processing line. International Journal of Food Microbiology **82**:223-232.

**Guinebretiere M-H, Nguyen-The C.** 2003. Sources of *Bacillus cereus* contamination in a pasteurized zucchini purée processing line, differentiated by two PCR-based methods. FEMS Microbiology Ecology **43**:207-215.

**Guinebretiere MH, Thompson FL, Sorokin A, Normand P, Dawyndt P, Ehling-Schulz M, Svensson B, Sanchis V, Nguyen-The C, Heyndrickx M, De Vos P.** 2008. Ecological diversification in the *Bacillus cereus* Group. Environmental Microbiology **10**:851-865.

**Guizelini BP, Vandenberghe LPS, Sella S, Socol CR.** 2012. Study of the influence of sporulation conditions on heat resistance of *Geobacillus stearothermophilus* used in the development of biological indicators for steam sterilization. Archives of Microbiology **194**:991-999.

**Hamoen LW, Venema G, Kuipers OP.** 2003. Controlling competence in *Bacillus subtilis*: shared use of regulators. Microbiology **149**:9-17.

**Harshey RM.** 2003. Bacterial motility on a surface: Many ways to a common goal. Annual Review of Microbiology **57**:249-273.

**Henriques AO, Melsen LR, Moran CP, Jr.** 1998. Involvement of superoxide dismutase in spore coat assembly in *Bacillus subtilis*. Journal of Bacteriology **180**:2285-2291.

**Henriques AO, Moran CP.** 2007. Structure, assembly, and function of the spore surface layers. Annual Review of Microbiology **61**:555-588.

**Henriques AO, Moran CPJ.** 2000. Structure and assembly of the bacterial endospore coat. Methods **20**:95-110.

**Higgins D, Dworkin J.** 2012. Recent progress in *Bacillus subtilis* sporulation. Fems Microbiology Reviews **36**:131-148.

**Hilbert DW, Piggot PJ.** 2004. Compartmentalization of gene expression during *Bacillus subtilis* spore formation. Microbiology and Molecular Biology Reviews **68**:234-+.

**Hong HA, Duc LH, Cutting SM.** 2005. The use of bacterial spore formers as probiotics. FEMS Microbiology Reviews **29**:813-835.

**Horneck G, Moeller R, Cadet J, Douki T, Mancinelli RL, Nicholson WL, Panitz C, Rabbow E, Rettberg P, Spry A, Stackebrandt E, Vaishampayan P, Venkateswaran KJ.** 2012. Resistance of Bacterial Endospores to Outer Space for Planetary Protection Purposes—Experiment PROTECT of the EXPOSE-E Mission. Astrobiology **12**:445-456.

**Hornstra LM, de Vries YP, de Vos WM, Abee T, Wells-Bennik MHJ.** 2005. gerR, a novel ger operon involved in L-alanine- and inosine-initiated germination of *Bacillus cereus* ATCC 14579. Applied and Environmental Microbiology **71**:774-781.

- Hoton FM, Andrup L, Swiecicka I, Mahillon J.** 2005. The cereulide genetic determinants of emetic *Bacillus cereus* are plasmid-borne. *Microbiology* **151**:2121-2124.
- Huang SS, Chen D, Li YQ.** 2007. Detection of *Bacillus thuringiensis* Spore Germination via CaDPA Biomarker Using Laser Tweezers Raman Spectroscopy. 2007 Conference on Lasers & Electro-Optics/Quantum Electronics and Laser Science Conference (Cleo/QELS 2007), Vols 1-5:1866-1867.
- Igura N, Kamimura Y, Islam MS, Shimoda M, Hayakawa I.** 2003. Effects of minerals on resistance of *Bacillus subtilis* spores to heat and hydrostatic pressure. *Applied and Environmental Microbiology* **69**:6307-6310.
- Imamura D, Kuwana R, Takamatsu H, Watabe K.** 2010. Localization of Proteins to Different Layers and Regions of *Bacillus subtilis* Spore Coats. *Journal of Bacteriology* **192**:518-524.
- Imamura D, Kuwana R, Takamatsu H, Watabe K.** 2011. Proteins Involved in Formation of the Outermost Layer of *Bacillus subtilis* Spores. *Journal of Bacteriology* **193**:4075-4080.
- INVS.** 2011. Bilan de l'épidémie d'infections à *Escherichia coli* O104:H4.
- INVS.** 2012. Rapport annuel 2012. INVS.
- Ireland JAW, Hanna PC.** 2002. Amino acid- and purine ribonucleoside-induced germination of *Bacillus anthracis* Delta Sterne endospores: gerS mediates responses to aromatic ring structures. *Journal of Bacteriology* **184**:1296-1303.
- Ireton K, Grossman AD.** 1994. A developmental checkpoint couples the initiation of sporulation to DNA replication in *Bacillus subtilis*. *Embo J* **13**:1566-1573.
- Isticato R, Cangiano G, Tran HT, Ciabattini A, Medaglini D, Oggioni MR, DeFelice M, Pozzi G, Ricca E.** 2001. Surface display of recombinant proteins on *Bacillus subtilis* spores. *Journal of Bacteriology* **183**:6294-6301.
- Isticato R, Pelosi A, De Felice M, Ricca E.** 2010. CotE Binds to CotC and CotU and Mediates Their Interaction during Spore Coat Formation in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* **192**:949-954.
- Iurlina MO, Saiz AI, Fuselli SR, Fritz R.** 2006. Prevalence of *Bacillus* spp. in different food products collected in Argentina. *LWT - Food Science and Technology* **39**:105-110.
- Ivanova N, Sorokin A, Anderson I, Galleron N, Candelon B, Kapatral V, Bhattacharyya A, Reznik G, Mikhailova N, Lapidus A, Chu L, Mazur M, Goltsman E, Larsen N, D'Souza M, Walunas T, Grechkin Y, Pusch G, Haselkorn R, Fonstein M, Ehrlich SD, Overbeek R, Kyrpides N.** 2003. Genome sequence of *Bacillus cereus* and comparative analysis with *Bacillus anthracis*. *Nature* **423**:87-91.
- Jääskeläinen EL, Häggblom MM, Andersson MA, Salkinoja-Salonen MS.** 2004. Atmospheric oxygen and other conditions affecting the production of cereulide by *Bacillus cereus* in food. *International Journal of Food Microbiology* **96**:75-83.
- Jensen GB, Hansen BM, Eilenberg J, Mahillon J.** 2003. The hidden lifestyles of *Bacillus cereus* and relatives. *Environmental Microbiology* **5**:631-640.
- Jiang M, Shao W, Perego M, Hoch JA.** 2000. Multiple histidine kinases regulate entry into stationary phase and sporulation in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology* **38**:535-542.

- Jiang S, Wan Q, Krajcikova D, Tang JL, Tzokov SB, Barak I, Bullough PA.** 2015. Diverse supramolecular structures formed by self-assembling proteins of the *Bacillus subtilis* spore coat. *Molecular Microbiology* **97**:347-359.
- Johnson MJ, Todd SJ, Ball DA, Shepherd AM, Sylvestre P, Moir A.** 2006. ExsY and CotY are required for the correct assembly of the exosporium and spore coat of *Bacillus cereus*. *Journal of Bacteriology* **188**:7905-7913.
- Kaieda S, Setlow B, Setlow P, Halle B.** 2013. Mobility of core water in *Bacillus subtilis* spores by 2 H NMR. *Biophysical Journal* **105**:2016-2023.
- Kailas L, Terry C, Abbott N, Taylor R, Mullin N, Tzokov SB, Todd SJ, Wallace BA, Hobbs JK, Moir A, Bullough PA.** 2011. Surface architecture of endospores of the *Bacillus cereus/anthracis/thuringiensis* family at the subnanometer scale. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**:16014-16019.
- Kihm DJ, Hutton MT, Hanlin JH, Johnson EA.** 1990. Influence of transition metals added during sporulation on heat resistance of *Clostridium botulinum* 113B spores. *Applied and Environmental Microbiology* **56**:681-685.
- Kim H, Hahn M, Grabowski P, McPherson DC, Otte MM, Wang R, Ferguson CC, Eichenberger P, Driks A.** 2006. The *Bacillus subtilis* spore coat protein interaction network. *Molecular Microbiology* **59**:487-502.
- Klobutcher LA, Ragkousi K, Setlow P.** 2006. The *Bacillus subtilis* spore coat provides "eat resistance" during phagocytic predation by the protozoan *Tetrahymena thermophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**:165-170.
- Krajcikova D, Lukacova M, Mullerova D, Cutting SM, Barak I.** 2009. Searching for Protein-Protein Interactions within the *Bacillus subtilis* Spore Coat. *Journal of Bacteriology* **191**:3212-3219.
- Kunst F, Ogasawara N, Moszer I, Albertini AM, Alloni G, Azevedo V, Bertero MG, Bessieres P, Bolotin A, Borchert S, Borriss R, Boursier L, Brans A, Braun M, Brignell SC, Bron S, Brouillet S, Bruschi CV, Caldwell B, Capuano V, Carter NM, Choi SK, Codani JJ, Connerton IF, Cummings NJ, Daniel RA, Denizot F, Devine KM, Dusterhoft A, Ehrlich SD, Emmerson PT, Entian KD, Errington J, Fabret C, Ferrari E, Foulger D, Fritz C, Fujita M, Fujita Y, Fuma S, Galizzi A, Galleron N, Ghim SY, Glaser P, Goffeau A, Golightly EJ, Grandi G, Guiseppi G, Guy BJ, Haga K, et al.** 1997. The complete genome sequence of the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature* **390**:249-256.
- Kuwana R, Kasahara Y, Fujibayashi M, Takamatsu H, Ogasawara N, Watabe K.** 2002. Proteomics characterization of novel spore proteins of *Bacillus subtilis*. *Microbiology* **148**:3971-3982.
- Laaberki M-H, Chalfie M, Dworkin J.** 2008. Cover of *Journal of Bacteriology* *Journal of Bacteriology* **190**:1.
- Laaberki M-H, Dworkin J.** 2008. Role of Spore Coat Proteins in the Resistance of *Bacillus subtilis* Spores to *Caenorhabditis elegans* Predation. *Journal of Bacteriology* **190**:6197-6203.
- Lai EM, Phadke ND, Kachman MT, Giorno R, Vazquez S, Vazquez JA, Maddock JR, Driks A.** 2003. Proteomic analysis of the spore coats of *Bacillus subtilis* and *Bacillus anthracis*. *Journal of Bacteriology* **185**:1443-1454.

- Laouami S, Messaoudi K, Alberto F, Clavel T, Duport C.** 2011. Lactate Dehydrogenase A Promotes Communication between Carbohydrate Catabolism and Virulence in *Bacillus cereus*. *Journal of Bacteriology* **193**:1757-1766.
- Lapidus A, Goltsman E, Auger S, Galleron N, Segurens B, Dossat C, Land ML, Broussolle V, Brillard J, Guinebretiere MH, Sanchis V, Nguen-the C, Lereclus D, Richardson P, Wincker P, Weissenbach J, Ehrlich SD, Sorokin A.** 2008. Extending the *Bacillus cereus* group genomics to putative food-borne pathogens of different toxicity. *Chemico-Biological Interactions* **171**:236-249.
- Lechner S, Mayr R, Francis KP, Prüss B, Kaplan T, Wiessner-Gunkel E, Stewart GSAB, Scherer S.** 1998. *Bacillus weihenstephanensis* sp. nov. is a new psychrotolerant species of the *Bacillus cereus* group. *International Journal of Systematic Bacteriology* **48**:1373-1382.
- Lee SB, Kim K-J.** 1995. Effect of water activity on enzyme hydration and enzyme reaction rate in organic solvents. *Journal of Fermentation and Bioengineering* **79**:473-478.
- Leggett MJ, McDonnell G, Denyer SP, Setlow P, Maillard JY.** 2012. Bacterial spore structures and their protective role in biocide resistance. *Journal of Applied Microbiology* **113**:485-498.
- Lequette Y, Garenaux E, Combrouse T, Dias Tdel L, Ronse A, Slomianny C, Trivelli X, Guerardel Y, Faille C.** 2011. Domains of BclA, the major surface glycoprotein of the *B. cereus* exosporium: glycosylation patterns and role in spore surface properties. *Biofouling* **27**:751-761.
- Lequette Y, Garenaux E, Tauveron G, Dumez S, Perchat S, Slomianny C, Lereclus D, Guerardel Y, Faille C.** 2011. Role Played by Exosporium Glycoproteins in the Surface Properties of *Bacillus cereus* Spores and in Their Adhesion to Stainless Steel. *Applied and Environmental Microbiology* **77**:4905-4911.
- Little S, Driks A.** 2001. Functional analysis of the morphogenetic spore coat *Bacillus subtilis* protein CotE. *Molecular Microbiology* **42**:1107-1120.
- Liu HB, Bergman NH, Thomason B, Shallom S, Hazen A, Crossno J, Rasko DA, Ravel J, Read TD, Peterson SN, Yates J, Hanna PC.** 2004. Formation and composition of the *Bacillus anthracis* endospore. *Journal of Bacteriology* **186**:164-178.
- Logan NA.** 2012. *Bacillus* and relatives in foodborne illness. *J Appl Microbiol* **112**:417-429.
- Lund T, Granum PE.** 1997. Comparison of biological effect of the two different enterotoxin complexes isolated from three different strains of *Bacillus cereus*. *Microbiology-Uk* **143**:3329-3336.
- Magge A, Granger AC, Wahome PG, Setlow B, Vepachedu VR, Loshon CA, Peng LX, Chen D, Li YQ, Setlow P.** 2008. Role of dipicolinic acid in the germination, stability, and viability of spores of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* **190**:4798-4807.
- Magnusson M, Christiansson A, Svensson B.** 2007. *Bacillus cereus* spores during housing of dairy cows: factors affecting contamination of raw milk. *Journal of Dairy Science* **90**:2745-2754.
- Mahillon J, Léonard C, Chandler M.** 1999. IS elements as constituents of bacterial genomes. *Research in Microbiology* **150**:675-687.
- Mallozzi M, Bozue J, Giorno R, Moody K, Slack A, Cote C, Qiu D, Wang R, McKenney P, Lai E, Maddock J, Friedlander A, Welkos S, Eichenberger P, Driks A.** 2008. Characterization of a

- Bacillus anthracis* spore coat-surface protein that influences coat-surface morphology. FEMS Microbiology Letters **289**:110-117.
- Margulis L, Jorgensen JZ, Dolan S, Kolchinsky R, Rainey FA, Lo SC.** 1998. The Arthromitus stage of *Bacillus cereus*: intestinal symbionts of animals. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **95**:1236-1241.
- Mazas M, Fernandez A, Alvarez A, Lopez M, Bernardo A.** 2009. Effects of phosphate and sodium and potassium chlorides on sporulation and heat resistance of *Bacillus cereus*. Journal of Food Safety **29**:106-117.
- Mazas M, Gonzalez I, Lopez M, Gonzalez J, Martin Sarmiento R.** 1995. Effects of sporulation media and strain on thermal resistance of *Bacillus cereus* spores. International Journal of Food Science and Technology **30**:71-78.
- Mazas M, Lopez M, Gonzalez I, Bernardo A, Martin R.** 1997. Effects of sporulation pH on the heat resistance and the sporulation of *Bacillus cereus*. Letters in Applied Microbiology **25**:331-334.
- McKenney PT, Driks A, Eichenberger P.** 2013. The *Bacillus subtilis* endospore: assembly and functions of the multilayered coat. Nat Rev Microbiol **11**:33-44.
- McKenney PT, Driks A, Eskandarian HA, Grabowski P, Guberman J, Wang KH, Gitai Z, Eichenberger P.** 2010. A Distance-Weighted Interaction Map Reveals a Previously Uncharacterized Layer of the *Bacillus subtilis* Spore Coat. Current Biology **20**:934-938.
- McKenney PT, Eichenberger P.** 2012. Dynamics of Spore Coat Morphogenesis in *Bacillus subtilis*. Molecular Microbiology **83**:245-260.
- Meador-Parton J, Popham DL.** 2000. Structural analysis of *Bacillus subtilis* spore peptidoglycan during sporulation. Journal of Bacteriology **178**:6451-6458.
- Melly E, Genest PC, Gilmore ME, Little S, Popham DL, Driks A, Setlow P.** 2002. Analysis of the properties of spores of *Bacillus subtilis* prepared at different temperatures. Journal of Applied Microbiology **92**:1105-1115.
- Minh HNT, Durand A, Loison P, Perrier-Cornet JM, Gervais P.** 2011. Effect of sporulation conditions on the resistance of *Bacillus subtilis* spores to heat and high pressure. Applied Microbiology and Biotechnology **90**:1409-1417.
- Minh HNT, Perrier-Cornet J-M, Gervais P.** 2008. Effect of the osmotic conditions during sporulation on the subsequent resistance of bacterial spores. Applied Microbiology and Biotechnology **80**:107-114.
- Mirouze N, Dubnau D.** 2013. Chance and Necessity in *Bacillus subtilis* Development. Microbiology Spectrum **1**.
- Mock M, Fouet A.** 2001. Anthrax. Annu Rev Microbiol **55**:647-671.
- Moeller R, Wassmann M, Reitz G, Setlow P.** 2011. Effect of radioprotective agents in sporulation medium on *Bacillus subtilis* spore resistance to hydrogen peroxide, wet heat and germicidal and environmentally relevant UV radiation. Journal of Applied Microbiology **110**:1485-1494.

- Moir A, Corfe BM, Behravan J.** 2002. Spore germination. *Cellular and Molecular Life Sciences* **59**:403-409.
- Moir A.** 2006. How do spores germinate? *Journal of Applied Microbiology* **101**:526-530.
- Molin G, Östlund K.** 1976. Dry-heat inactivation of *Bacillus subtilis* var. niger spores with special reference to spore density. *Canadian Journal of Microbiology* **22**:359-363.
- Molle V, Fujita M, Jensen ST, Eichenberger P, Gonzalez-Pastor JE, Liu JS, Losick R.** 2003. The Spo0A regulon of *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology* **50**:1683-1701.
- Mongkolthananaruk W, Robinson C, Moir A.** 2009. Localization of the GerD spore germination protein in the *Bacillus subtilis* spore. *Microbiology* **155**:1146-1151.
- Monroe A, Setlow P.** 2006. Localization of the transglutaminase cross-linking sites in the *Bacillus subtilis* spore coat protein GerQ. *Journal of Bacteriology* **188**:7609-7616.
- Monteiro SM, Clemente JJ, Henriques AO, Gomes RJ, Carrondo MJ, Cunha AE.** 2005. A procedure for high-yield spore production by *Bacillus subtilis*. *Biotechnology Progress* **21**:1026-1031.
- Nakamura LK.** 1998. *Bacillus pseudomycooides* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* **48**:1031-1035.
- Naranjo M, Denayer S, Botteldoorn N, Delbrassinne L, Veys J, Waegenaere J, Sirtaine N, Driesen RB, Sipido KR, Mahillon J, Dierick K.** 2011. Sudden Death of a Young Adult Associated with *Bacillus cereus* Food Poisoning. *Journal of Clinical Microbiology* **49**:4379-4381.
- Narula J, Kuchina A, Lee D-yD, Fujita M, Süel Gürol M, Igoshin Oleg A.** 2015. Chromosomal Arrangement of Phosphorelay Genes Couples Sporulation and DNA Replication. *Cell* **162**:328-337.
- Nicholson WL, Munakata N, Horneck G, Melosh HJ, Setlow P.** 2000. Resistance of *Bacillus* Endospores to Extreme Terrestrial and Extraterrestrial Environments. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **64**:548-572.
- Nicolas P, Mäder U, Dervyn E, Rochat T, Leduc A, Pigeonneau N, Bidnenko E, Marchadier E, Hoebeke M, Aymerich S, Becher D, Bisicchia P, Botella E, Delumeau O, Doherty G, Denham EL, Fogg MJ, Fromion V, Goelzer A, Hansen A, Härtig E, Harwood CR, Homuth G, Jarmer H, Jules M, Klipp E, Le Chat L, Lecointe F, Lewis P, Liebermeister W, March A, Mars RAT, Nannapaneni P, Noone D, Pohl S, Rinn B, Rügheimer F, Sappa PK, Samson F, Schaffer M, Schwikowski B, Steil L, Stülke J, Wiegert T, Devine KM, Wilkinson AJ, Maarten van Dijn J, Hecker M, Völker U, Bessières P, et al.** 2012. Condition-Dependent Transcriptome Reveals High-Level Regulatory Architecture in *Bacillus subtilis*. *Science* **335**:1103-1106.
- Oliva C, Turnbough CL, Kearney JF.** 2009. CD14-Mac-1 interactions in *Bacillus anthracis* spore internalization by macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**:13957-13962.
- Oliva CR, Swiecki MK, Griguer CE, Lisanby MW, Bullard DC, Turnbough CL, Jr., Kearney JF.** 2008. The integrin Mac-1 (CR3) mediates internalization and directs *Bacillus anthracis* spores into professional phagocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**:1261-1266.

- Onyenwoke RU, Brill JA, Farahi K, Wiegel J.** 2004. Sporulation genes in members of the low G+C Gram-type-positive phylogenetic branch (Firmicutes). *Archives of Microbiology* **182**:182-192.
- Oomes S, van Zuijlen ACM, Hehenkamp JO, Witsenboer H, van der Vossen J, Brul S.** 2007. The characterisation of *Bacillus* spores occurring in the manufacturing of (low acid) canned products. *International Journal of Food Microbiology* **120**:85-94.
- Ozin AJ, Henriques AO, Yi H, Moran CP.** 2000. Morphogenetic proteins SpoVID and SafA form a complex during assembly of the *Bacillus subtilis* spore coat. *Journal of Bacteriology* **182**:1828-1833.
- Paidhungat M, Setlow B, Daniels WB, Hoover D, Papafragkou E, Setlow P.** 2002. Mechanisms of induction of germination of *Bacillus subtilis* spores by high pressure. *Applied and Environmental Microbiology* **68**:3172-3175.
- Paidhungat M, Setlow B, Driks A, Setlow P.** 2000. Characterization of spores of *Bacillus subtilis* which lack dipicolinic acid. *Journal of Bacteriology* **182**:5505-5512.
- Palop A, Sala FJ, Condon S.** 1999. Heat resistance of native and demineralized spores of *Bacillus subtilis* sporulated at different temperatures. *Applied and Environmental Microbiology* **65**:1316-1319.
- Papazisi L, Rasko DA, Ratnayake S, Bock GR, Remortel BG, Appalla L, Liu J, Dracheva T, Braisted JC, Shallom S, Jarrahi B, Snesrud E, Ahn S, Sun Q, Rilstone J, Økstad OA, Kolstø A-B, Fleischmann RD, Peterson SN.** 2011. Investigating the genome diversity of *B. cereus* and evolutionary aspects of *B. anthracis* emergence. *Genomics* **98**:26-39.
- Paredes-Sabja D, Sarker MR.** 2011. Germination response of spores of the pathogenic bacterium *Clostridium perfringens* and *Clostridium difficile* to cultured human epithelial cells. *Anaerobe* **17**:78-84.
- Paredes-Sabja D, Shen A, Sorg JA.** 2014. *Clostridium difficile* spore biology: sporulation, germination, and spore structural proteins. *Trends in Microbiology* **22**:406-416.
- Penna TCV, Machoshvili IA, Ishii M.** 2003. Effect of media on spore yield and thermal resistance of *Bacillus stearothermophilus*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **105**:287-294.
- Pereira FC, Saujet L, Tome AR, Serrano M, Monot M, Couture-Tosi E, Martin-Verstraete I, Dupuy B, Henriques AO.** 2013. The spore differentiation pathway in the enteric pathogen *Clostridium difficile*. *PLoS Genet* **9**:e1003782.
- Piggot PJ, Hilbert DW.** 2004. Sporulation of *Bacillus subtilis*. *Current Opinion in Microbiology* **7**:579-586.
- Pirttijarvi TSM, Andersson MA, SalkinojaSalonen MS.** 2000. Properties of *Bacillus cereus* and other bacilli contaminating biomaterial-based industrial processes. *International Journal of Food Microbiology* **60**:231-239.
- Planchon S, Dargaignaratz C, Levy C, Ginies C, Broussolle V, Carlin F.** 2011. Spores of *Bacillus cereus* strain KBAB4 produced at 10 °C and 30 °C display variations in their properties. *Food Microbiology* **28**:291-297.
- Plomp M, Carroll AM, Setlow P, Malkin AJ.** 2014. Architecture and Assembly of the *Bacillus subtilis* Spore Coat. *Plos One* **9**.

- Plomp M, Leighton TJ, Wheeler KE, Malkin AJ.** 2005. Architecture and high-resolution structure of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus* spore coat surfaces. *Langmuir* **21**:7892-7898.
- Pogliano K, Harry E, Losick R.** 1995. Visualization of the Subcellular Location of Sporulation Proteins in *Bacillus-Subtilis* Using Immunofluorescence Microscopy. *Molecular Microbiology* **18**:459-470.
- Popham DL, Gilmore ME, Setlow P.** 1999. Roles of low-molecular-weight penicillin-binding proteins in *Bacillus subtilis* spore peptidoglycan synthesis and spore properties. *Journal of Bacteriology* **181**:126-132.
- Popham DL.** 2002. Specialized peptidoglycan of the bacterial endospore : the inner wall of the lockbox. *Cellular and Molecular Life Sciences* **59**:426-433.
- Price KD, Losick R.** 1999. A four-dimensional view of assembly of a morphogenetic protein during sporulation in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* **181**:781-790.
- Qiao H, Krajcikova D, Xing C, Lu B, Hao J, Ke X, Wang H, Barak I, Tang J.** 2013. Study of the interactions between the key spore coat morphogenetic proteins CotE and SpoVID. *Journal of Structural Biology* **181**:128-135.
- Ragkousi K, Setlow P.** 2004. Transglutaminase-mediated cross-linking of GerQ in the coats of *Bacillus subtilis* spores. *Journal of Bacteriology* **186**:5567-5575.
- Rai N, Rai R, Venkatesh KV.** 2015. Quorum Sensing in Competence and Sporulation, p 61-64. *In* Kalia VC (ed), *Quorum Sensing vs Quorum Quenching: A Battle with No End in Sight*. Springer India.
- Rajkovic A, Uyttendaele M, Vermeulen A, Andjelkovic M, Fitz-James I, in't Veld P, Denon Q, Verhe R, Debevere J.** 2008. Heat resistance of *Bacillus cereus* emetic toxin, cereulide. *Letters in Applied Microbiology* **46**:536-541.
- Ramamurthi KS, Clapham KR, Losick R.** 2006. Peptide anchoring spore coat assembly to the outer forespore membrane in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology* **62**:1547-1557.
- Ramirez-Peralta A, Zhang PF, Li YQ, Setlow P.** 2012. Effects of Sporulation Conditions on the Germination and Germination Protein Levels of *Bacillus subtilis* Spores. *Applied and Environmental Microbiology* **78**:2689-2697.
- Rasko DA, Altherr MR, Han CS, Ravel J.** 2005. Genomics of the *Bacillus cereus* group of organisms. *FEMS Microbiology Reviews* **29**:303-329.
- Raso J, Gongora-Nieto MM, Barbosa Canovas GV, Swanson BG.** 1998. Influence of several environmental factors on the initiation of germination and inactivation of *Bacillus cereus* by high hydrostatic pressure. *International Journal of Food Microbiology* **44**:125-132.
- Raso J, Palop A, Bayarte M, Condón S, Sala F.** 1995. Influence of sporulation temperature on the heat resistance of a strain of *Bacillus licheniformis* (Spanish Type Culture Collection 4523). *Food Microbiology* **12**:357-361.
- Redmond C, Baillie LWJ, Hibbs S, Moir AJG, Moir A.** 2004. Identification of proteins in the exosporium of *Bacillus anthracis*. *Microbiology-Sgm* **150**:355-363.



- Reineke K, Schlumbach K, Baier D, Mathys A, Knorr D.** 2013. The release of dipicolinic acid — The rate-limiting step of *Bacillus* endospore inactivation during the high pressure thermal sterilization process. *International Journal of Food Microbiology* **162**:55-63.
- Riesenman PJ, Nicholson WL.** 2000. Role of spore coat layers in *Bacillus subtilis* spore resistance to hydrogen peroxide, artificial UV-C, UV-B, and solar UV radiation. *Applied and Environmental Microbiology* **66**:620-626.
- Roels S, Driks A, Losick R.** 1992. Characterization of Spoiva, a Sporulation Gene Involved in Coat Morphogenesis in *Bacillus-Subtilis*. *Journal of Bacteriology* **174**:575-585.
- Rose R, Setlow B, Monroe A, Mallozzi M, Driks A, Setlow P.** 2007. Comparison of the properties of *Bacillus subtilis* spores made in liquid or on agar plates. *Journal of Applied Microbiology* **103**:691-699.
- Ross C, Abel-Santos E.** 2010. The Ger Receptor Family from Sporulating Bacteria. *Current Issues in Molecular Biology* **12**:147-157.
- Sahin O, Yong EH, Driks A, Mahadevan L.** 2012. Physical basis for the adaptive flexibility of *Bacillus* spore coats. *Journal of the Royal Society Interface* **9**:3156-3160.
- Sanchis V, Agaisse H, Chaufaux J, Lereclus D.** 1996. Construction of new insecticidal *Bacillus thuringiensis* recombinant strains by using the sporulation non-dependent expression system of cryIIIA and a site specific recombination vector. *Journal of Biotechnology* **48**:81-96.
- Sarrafzadeh MH, Navarro JM.** 2006. The effect of oxygen on the sporulation, delta-endotoxin synthesis and toxicity of *Bacillus thuringiensis* H14. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* **22**:305-310.
- Scheldeman P, Pil A, Herman L, De Vos P, Heyndrickx M.** 2005. Incidence and diversity of potentially highly heat-resistant spores isolated at dairy farms. *Applied and Environmental Microbiology* **71**:1480-1494.
- Schoeni JL, Wong ACL.** 2005. *Bacillus cereus* food poisoning and its toxins. *Journal of Food Protection* **68**:636-648.
- Scott SA, Brooks JD, Rakonjac J, Walker KMR, Flint SH.** 2007. The formation of thermophilic spores during the manufacture of whole milk powder. *International Journal of Dairy Technology* **60**:109-117.
- Segev E, Rosenberg A, Mamou G, Sinai L, Ben-Yehuda S.** 2013. Molecular Kinetics of Reviving Bacterial Spores. *Journal of Bacteriology* **195**:1875-1882.
- Segev E, Smith Y, Ben-Yehuda S.** 2012. RNA Dynamics in Aging Bacterial Spores. *Cell* **148**:139-149.
- Sella SRBR, Vandenberghe LPS, Soccol CR.** 2014. Life cycle and spore resistance of spore-forming *Bacillus atrophaeus*. *Microbiological Research* **169**:931-939.
- Setlow B, Cowan AE, Setlow P.** 2003. Germination of spores of *Bacillus subtilis* with dodecylamine. *Journal of Applied Microbiology* **95**:637-648.
- Setlow P, Johnson EA.** 2013. Spores and their significance, p 45-80. *In* Doyle MP, Buchanan RL (ed), *Food Microbiology Fundamentals and Frontiers* 4th Edition. ASM Press, Washington DC.

- Setlow P.** 2000. Resistance of bacterial spores, p 217-230. *In* Storz G, HenggeAronis R (ed), *Bacterial Stress Responses*. Amer Soc Microbiology, 1325 Massachusetts Ave NW/Washington/DC 20005-4171/USA.
- Setlow P.** 2006. Spores of *Bacillus subtilis*: their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals. *Journal of Applied Microbiology* **101**:514-525.
- Setlow P.** 2013. Summer meeting 2013 – when the sleepers wake: the germination of spores of *Bacillus* species. *Journal of Applied Microbiology* **115**:1251-1268.
- Setlow P.** 2014. Germination of Spores of *Bacillus* Species: What We Know and Do Not Know. *Journal of Bacteriology* **196**:1297-1305.
- Setlow P.** 2014. Spore Resistance Properties. *Microbiology Spectrum* **2**.
- Severson KM, Mallozzi M, Bozue J, Welkos SL, Cote CK, Knight KL, Driks A.** 2009. Roles of the *Bacillus anthracis* Spore Protein ExsK in Exosporium Maturation and Germination. *Journal of Bacteriology* **191**:7587-7596.
- Seyler RW, Henriques AO, Ozin AJ, Moran CP.** 1997. Assembly and interactions of *cotJ*-encoded proteins, constituents of the inner layers of the *Bacillus subtilis* spore coat. *Molecular Microbiology* **25**:955-966.
- Slaghuis BA, Te Giffel MC, Beumer RR, André G.** 1997. Effect of pasturing on the incidence of *Bacillus cereus* in raw milk. *International Dairy Journal* **7**:201-205.
- Sonenshein AL.** 2000. Control of sporulation initiation in *Bacillus subtilis*. *Current Opinion in Microbiology* **3**:561-566.
- Sorg JA, Sonenshein AL.** 2008. Bile salts and glycine as cogermnants for *Clostridium difficile* spores. *Journal of Bacteriology* **190**:2505-2512.
- Stecchini ML, Del Torre M, Polese P.** 2013. Survival strategies of *Bacillus* spores in food. *Indian Journal of Experimental Biology* **51**:905-909.
- Stecchini ML, Spaziani M, Del Torre M, Pacor S.** 2009. *Bacillus cereus* cell and spore properties as influenced by the micro-structure of the medium. *Journal of Applied Microbiology* **106**:1838-1848.
- Steichen C, Chen P, Kearney JF, Turnbough CL.** 2003. Identification of the immunodominant protein and other proteins of the *Bacillus anthracis* exosporium. *Journal of Bacteriology* **185**:1903-1910.
- Steichen CT, Kearney JF, Turnbough CL.** 2005. Characterization of the exosporium basal layer protein BxpB of *Bacillus anthracis*. *Journal of Bacteriology* **187**:5868-5876.
- Steichen CT, Kearney JF, Turnbough CL.** 2007. Non-uniform assembly of the *Bacillus anthracis* exosporium and a bottle cap model for spore germination and outgrowth. *Molecular Microbiology* **64**:359-367.
- Steiner E, Scott J, Minton NP, Winzer K.** 2012. An agr Quorum Sensing System That Regulates Granulose Formation and Sporulation in *Clostridium acetobutylicum*. *Applied and Environmental Microbiology* **78**:1113-1122.

- Stenfors Arnesen LP, Fagerlund A, Granum PE.** 2008. From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiology Reviews* **32**:579-606.
- Stragier P.** 2002. A Gene Odyssey : Exploring the Genomes of Endospore-Forming Bacteria., p 519-525. In Sonenshein AL, Hoch JA, Losick R (ed), *Bacillus subtilis* and Its Closest Relatives : from Genes to Cells. ASM Press, Washington, D.C.
- Stragier P.** 2006. To kill but not be killed: A delicate balance. *Cell* **124**:461-463.
- Sunde EP, Setlow P, Hederstedt L, Halle B.** 2009. The physical state of water in bacterial spores. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**:19334-19339.
- Sylvestre P, Couture-Tosi E, Mock M.** 2002. A collagen-like surface glycoprotein is a structural component of the *Bacillus anthracis* exosporium. *Mol Microbiol* **45**:169-178.
- Sylvestre P, Couture-Tosi E, Mock M.** 2003. Polymorphism in the collagen-like region of the *Bacillus anthracis* BclA protein leads to variation in exosporium filament length. *Journal of Bacteriology* **185**:1555-1563.
- Sylvestre P, Couture-Tosi E, Mock M.** 2005. Contribution of ExsFA and ExsFB proteins to the localization of BclA on the spore surface and to the stability of the *Bacillus anthracis* exosporium. *Journal of Bacteriology* **187**:5122-5128.
- Takamatsu H, Chikahiro Y, Kodama T, Koide H, Kozuka S, Tochikubo K, Watabe K.** 1998. A spore coat protein, CotS, of *Bacillus subtilis* is synthesized under the regulation of sigma(K) and GerE during development and is located in the inner coat layer of spores. *Journal of Bacteriology* **180**:2968-2974.
- Takamatsu H, Watabe K.** 2002. Assembly and genetics of spore protective structures. *Cellular and Molecular Life Sciences* **59**:434-444.
- Talukdar PK, Olguin-Araneda V, Alnoman M, Paredes-Sabja D, Sarker MR.** 2015. Updates on the sporulation process in *Clostridium* species. *Research in Microbiology* **166**:225-235.
- Tan IS, Ramamurthi KS.** 2014. Spore formation in *Bacillus subtilis*. *Environmental Microbiology Reports* **6**:212-225.
- Tauveron G, Slomianny C, Henry C, Faille C.** 2006. Variability among *Bacillus cereus* strains in spore surface properties and influence on their ability to contaminate food surface equipment. *International Journal of Food Microbiology* **110**:254-262.
- Terry C, Shepherd A, Radford DS, Moir A, Bullough PA.** 2011. YwdL in *Bacillus cereus*: Its Role in Germination and Exosporium Structure. *Plos One* **6**.
- Thompson BM, Stewart GC.** 2008. Targeting of the BclA and BclB proteins to the *Bacillus anthracis* spore surface. *Molecular Microbiology* **70**:421-434.
- Todd SJ, Moir AJG, Johnson MJ, Moir A.** 2003. Genes of *Bacillus cereus* and *Bacillus anthracis* encoding proteins of the exosporium. *Journal of Bacteriology* **185**:3373-3378.
- Toh M, Moffitt MC, Henrichsen L, Raftery M, Barrow K, Cox JM, Marquis CP, Neilan BA.** 2004. Cereulide, the emetic toxin of *Bacillus cereus*, is putatively a product of nonribosomal peptide synthesis. *J Appl Microbiol* **97**:992-1000.

- Valero M, Hernández-Herrero LA, Fernández PS, Salmerón MC.** 2002. Characterization of *Bacillus cereus* isolates from fresh vegetables and refrigerated minimally processed foods by biochemical and physiological tests. *Food Microbiology* **19**:491-499.
- van der Voort M, Abee T.** 2013. Sporulation environment of emetic toxin-producing *Bacillus cereus* strains determines spore size, heat resistance and germination capacity. *J Appl Microbiol* **114**:1201-1210.
- Verma N, Singh NA, Kumar N, Raghu H.** 2013. Screening of different media for sporulation of *Bacillus megaterium*. *Int J Micro Res Rev* **1**:068-073.
- Vilain S, Luo Y, Hildreth MB, Brozel VS.** 2006. Analysis of the life cycle of the soil saprophyte *Bacillus cereus* in liquid soil extract and in soil. *Applied and Environmental Microbiology* **72**:4970-4977.
- Vreeland RH, Rosenzweig WD, Powers DW.** 2000. Isolation of a 250 million-year-old halotolerant bacterium from a primary salt crystal. *Nature* **407**:897-900.
- Wang KH, Isidro AL, Domingues L, Eskandarian HA, McKenney PT, Drew K, Grabowski P, Chua MH, Barry SN, Guan M, Bonneau R, Henriques AO, Eichenberger P.** 2009. The coat morphogenetic protein SpoVID is necessary for spore encasement in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **74**:634-649.
- Warriner K, Waites WM.** 1999. Enhanced sporulation in *Bacillus subtilis* grown on medium containing glucose : ribose. *Letters in Applied Microbiology* **29**:97-102.
- Webb CD, Decatur A, Teleanu A, Losick R.** 1995. Use of Green Fluorescent Protein for Visualization of Cell-Specific Gene-Expression and Subcellular Protein Localization during Sporulation in *Bacillus-Subtilis*. *Journal of Bacteriology* **177**:5906-5911.
- Wenbo Z, Agnese S, Melanie S, Michael PB, David AW, Thomas EA.** 2014. Nutrient depletion in *Bacillus subtilis* biofilms triggers matrix production. *New Journal of Physics* **16**:015028.
- Westphal AJ, Price PB, Leighton TJ, Wheeler KE.** 2003. Kinetics of size changes of individual *Bacillus thuringiensis* spores in response to changes in relative humidity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**:3461-3466.
- Westphal AJ, Price PB, Leighton TJ, Wheeler KE.** 2003. Kinetics of size changes of individual *Bacillus thuringiensis* spores in response to changes in relative humidity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100**:3461-3466.
- Wiencek KM, Klapes NA, Foegeding PM.** 1990. Hydrophobicity of *Bacillus* and *Clostridium* spores. *Applied and Environmental Microbiology* **56**:2600-2605.
- Wijman JGE, de Leeuw PPLA, Moezelaar R, Zwietering MH, Abee T.** 2007. Air-Liquid Interface Biofilms of *Bacillus cereus*: Formation, Sporulation, and Dispersion. *Applied and Environmental Microbiology* **73**:1481-1488.
- Witkowska AM, Hickey DK, Alonso-Gomez M, Wilkinson MG.** 2011. The microbiological quality of commercial herb and spice preparations used in the formulation of a chicken supreme ready meal and microbial survival following a simulated industrial heating process. *Food Control* **22**:616-625.

**Wu IL, Narayan K, Castaing JP, Tian F, Subramaniam S, Ramamurthi KS.** 2015. A versatile nano display platform from bacterial spore coat proteins. *Nature Communications* **6**.

**Xue QO, Gu CF, Rivera J, Hook M, Chen XW, Pozzi A, Xu Y.** 2011. Entry of *Bacillus anthracis* spores into epithelial cells is mediated by the spore surface protein BclA, integrin alpha 2 beta 1 and complement component C1q. *Cellular Microbiology* **13**:620-634.

**Young SB, Setlow P.** 2003. Mechanisms of killing of *Bacillus subtilis* spores by hypochlorite and chlorine dioxide. *Journal of Applied Microbiology* **95**:54-67.

**Zeigler DR.** 2014. The *Geobacillus* paradox: why is a thermophilic bacterial genus so prevalent on a mesophilic planet? *Microbiology* **160**:1-11.

**Zhang PF, Liang JT, Yi X, Setlow P, Li YQ.** 2014. Monitoring of Commitment, Blocking, and Continuation of Nutrient Germination of Individual *Bacillus subtilis* Spores. *Journal of Bacteriology* **196**:2443-2454.

**Zheng LB, Donovan WP, Fitz-James PC, Losick R.** 1988. Gene encoding a morphogenic protein required in the assembly of the outer coat of the *Bacillus subtilis* endospore. *Genes & Development* **2**:1047-1054.

## **Valorisation des travaux de thèse**

---



## Valorisation des travaux de thèse

### Publication scientifique

- **C. Bressuire-Isoard**, I. Bornard, A. O. Henriques, F. Carlin and V. Broussolle. 2015. Sporulation temperature reveals a requirement for CotE in the assembly of both the coat and exosporium layers of *Bacillus cereus* spores. *Applied and Environmental Microbiology*.

### Communications orales

- **C. Bressuire-Isoard**. Mechanisms of spore layers assembly as a function of the sporulation temperature: Role of the CotE protein in *Bacillus cereus*. [Séminaire ITQB, Oeiras, Portugal, Octobre 2014](#).

- **C. Bressuire-Isoard**. Localization of CotE protein in spores of *Bacillus cereus* as a function of sporulation temperature. [Séminaire ITQB, Oeiras, Portugal, Mai 2015](#).

- **C. Bressuire-Isoard**. Environnement de sporulation et propriétés des spores bactériennes de *B. cereus*. [Journée des doctorants de l'INRA, Avignon, France, 2012 \(communication orale\)](#).

- **C. Bressuire-Isoard**, Mécanismes d'assemblage des enveloppes de spores en fonction de la température de sporulation: Rôle de la protéine CotE chez *Bacillus cereus*. [Journée des doctorants de l'INRA, Avignon, France, 2013. Communication orale](#)

- **C. Bressuire-Isoard**, Mécanismes d'assemblage des enveloppes de spores en fonction de la température de sporulation: Rôle de la protéine CotE chez *Bacillus cereus*. [Conseil scientifique INRA, Avignon, France, 2014. Communication orale](#)

- **C. Bressuire-Isoard**,. Assemblage des enveloppes de spores de *Bacillus cereus* : CotE, une protéine-clé. [Journée de l'école doctorale SPSA, Université Montpellier II, Montpellier, France, Juin 2015. Second prix meilleure conférence orale](#).

- **C. Bressuire-Isoard**, M. Serrano, A. O. Henriques, F. Carlin and V. Broussolle. Rôle et localisation de la protéine morphogénétique CotE dans les spores de *Bacillus cereus*. [Colloque « Bactéries sporulantes pathogènes ou d'intérêt technologique » Paris, France, Juillet 2015. \(Résumé + Communication orale\)](#)

### Communications affichées

- **C. Bressuire-Isoard**, I. Bornard, F. Carlin and V. Broussolle. Role of the CotE protein in *Bacillus cereus* spore structure and properties. [6<sup>th</sup> European Spore Conference, Londres, Royaume-Uni, Avril 2014 \(Résumé\)](#)

- **C. Bressuire-Isoard**, I. Bornard, F. Carlin and V. Broussolle. Role of the CotE protein in *Bacillus cereus* spore structure and properties. [Journée de l'école doctorale SPSA, Université Montpellier II, Montpellier, France, Juin 2014](#).

- **C. Bressuire-Isoard**, I. Bornard, A. O. Henriques, F. Carlin and **V. Broussolle**. Temperature-dependent role of CotE in the assembly of *Bacillus cereus* spore outer layers. [8th International Conference on Gram-Positive Microorganisms, Montecatini Terme, Italie, 2015. \(Résumé\)](#)



**Journée de l'école doctorale SPSA 2015 - Résumé.**  
**(Second Prix meilleure communication orale)**

**Assemblage des enveloppes de spores de *Bacillus cereus* : CotE, une protéine-clé**  
**C. Bressuire-Isoard<sup>1</sup>, M. Serrano<sup>2</sup>, A. O. Henriques<sup>2</sup>, F. Carlin<sup>1</sup> et V. Broussolle<sup>1</sup>**

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

<sup>2</sup>Instituto de Tecnologia Quimica e Biologica, Universidade Nova de Lisboa, 2781-901 Oeiras Codex, Portugal

*Bacillus cereus* est une bactérie présente dans les sols sous forme de spores. Contaminants de la chaîne alimentaire, ces spores responsables d'intoxication alimentaire représentent un danger pour la santé publique et un problème pour la salubrité de produits alimentaire traités thermiquement. En effet la structure et la composition chimique très particulière des spores sont à l'origine de leurs propriétés de résistances aux traitements anti-microbiens de l'industrie alimentaire. Les spores de *Bacillus cereus* possèdent des tuniques protégées par une couche plus externe, l'exosporium. L'assemblage des tuniques et de l'exosporium repose sur un réseau d'interaction protéique complexe impliquant plusieurs protéines morphogénétiques dont CotE.

Nous avons étudié le rôle de la protéine CotE dans les spores de *B. cereus* ATCC 14579. Les propriétés des spores de la souche mutante ( $\Delta cotE$ ) sont la plupart affectées par rapport à celles de la souche sauvage (WT). Elles ont un défaut de germination, une plus faible hydrophobicité et une plus grande sensibilité aux UV-C, peroxyde d'hydrogène et enzymes lytiques. L'observation en microscopie électronique à transmission des spores  $\Delta cotE$  révèle un problème d'assemblage de l'exosporium lorsque les spores sont produites à 37°C et 20°C, mais également un défaut d'assemblage des tuniques pour celles produites à 20°C. De plus une analyse protéomique indique que ces modifications structurales s'accompagnent d'une modification de la composition protéique des spores. Nos résultats suggèrent que la protéine morphogénétique CotE joue un rôle majeur dans l'attachement de l'exosporium aux tuniques dans les spores de *B. cereus*. Un lien affecté lorsqu'on diminue la température de sporulation et à l'origine des modifications de propriétés des spores.

Dans un second temps l'assemblage de la protéine CotE au cours de la sporulation et sa localisation finale dans les spores de *B. cereus* ATCC 14579 ont été étudiés. Une protéine de fusion de la protéine CotE avec une protéine fluorescente, SNAP-tag, a été synthétisée afin de suivre la protéine dans les cellules par microscopie à fluorescence. Une identification des différents états d'assemblage de la protéine au cours du processus de sporulation a été réalisée et un modèle suggérant le positionnement de la protéine dans la spore proposé.

**Colloque « Bactéries sporulantes pathogènes ou d'intérêt technologique - Résumé**  
**(Communication orale)**

**Rôle et localisation de la protéine morphogénétique CotE  
dans les spores de *Bacillus cereus***

C. Bressuire-Isoard<sup>1</sup>, M. Serrano<sup>2</sup>, A. O. Henriques<sup>2</sup>, F. Carlin<sup>1</sup> et V. Broussolle<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup>Instituto de Tecnologia Quimica e Biologica, Universidade Nova de Lisboa, 2781-901 Oeiras Codex, Portugal

La structure et la composition chimique très particulière des spores bactériennes sont à l'origine de leurs propriétés de résistances. Les spores de *Bacillus cereus* possèdent des tuniques protégées par une couche plus externe, l'exosporium. L'assemblage des tuniques et de l'exosporium repose sur un réseau d'interaction protéique complexe impliquant plusieurs protéines morphogénétiques dont CotE.

Nous avons étudié le rôle de la protéine CotE en fonction de la température de sporulation dans les spores de *B. cereus* ATCC 14579. Les spores  $\Delta cotE$ , quel que soit la température de sporulation, 37°C et 20°C, ont un défaut de germination à l'inosine, une plus faible hydrophobicité, une meilleure résistance à la chaleur humide à 90°C et une plus grande sensibilité aux UV-C, peroxyde d'hydrogène, lysozyme et mutanolysine. L'observation en microscopie électronique à transmission des spores  $\Delta cotE$  révèle un problème d'assemblage de l'exosporium à 37°C et 20°C, mais également un défaut d'assemblage des tuniques pour celles produites à 20°C. Une analyse protéomique indique que ces modifications structurales, due à la délétion de *cotE* et la température de sporulation, s'accompagnent d'une modification de la composition protéique des spores. Nos résultats suggèrent que la protéine morphogénétique CotE joue un rôle majeur dans l'attachement de l'exosporium aux tuniques dans les spores de *B. cereus*. Un lien affecté lorsqu'on diminue la température de sporulation et à l'origine des modifications de propriétés des spores.

L'assemblage de la protéine CotE au cours de la sporulation et sa localisation finale dans les spores de *B. cereus* ATCC 14579 ont également été étudiés. Des fusions traductionnelles de la protéine CotE avec une protéine fluorescente, SNAP-tag, ont été réalisées afin de suivre la protéine par microscopie à fluorescence dans une souche sauvage. Une identification des différents états d'assemblage de la protéine au cours du processus de sporulation a été réalisée et un modèle suggérant le positionnement de la protéine dans la spore proposé.

**6th European Spore Conference - Résumé**  
**(Communication affichée)**

**Role of CotE protein in structure and properties of *Bacillus cereus* spores**

C. Bressuire<sup>1,2</sup>, I. Bornard<sup>3</sup>, F. Carlin<sup>1,2</sup> and V. Broussolle<sup>1,2</sup>

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

<sup>3</sup> INRA, UR407 Pathologie Végétale, F- 84140 Montfavet, France

The chemical composition and structure of bacterial spores are essential in determining their properties. Spores of the foodborne pathogen *Bacillus cereus* exhibit inner and outer coats surrounded by a structure called an exosporium. Coats are composed of about 50 proteins which are organized in an interaction network, responsible with other elements, of the unique spore resistance. In *Bacillus subtilis*, the absence of the morphogenetic protein CotE leads to a default of coat protein deposition in inner and outer coat layers. In contrast, CotE has a more limited role in coat formation of *Bacillus anthracis* spores but a major one in the exosporium assembly. Whether its function is conserved in *B. cereus sensu lato* species is not known so far. The aim of this study is to determine the role of CotE protein in spores of the *B. cereus* strain ATCC 14579. A  $\Delta cotE$  mutant strain has been constructed by allelic exchange: growth rate of  $\Delta cotE$  cells at 37°C is slightly lower compared to that of the wild-type cells. However, time to sporulation and yield of sporulation in Fortified Nutrient Agar of  $\Delta cotE$  mutant cells are similar to that of wild-type cells at 37°C. The impact of the absence of CotE on spore resistance properties to UV, lysozyme, moist-heat and peroxide and on spore germination triggered by L-alanine and inosine has been studied. Analysis of the morphology and ultrastructure of wild-type and mutant spores will also be presented.

Poster 6th European Spore Conference et journée de l'école doctorale SPSA 2014



# Role of the CotE protein in *Bacillus cereus* spore structure and properties

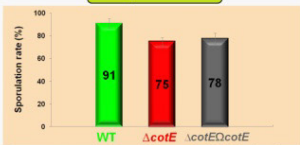
Christelle Bressuire<sup>1,2</sup>, Isabelle Bornard<sup>3</sup>, Frédéric Carlin<sup>1</sup>, Véronique Brousolle<sup>1</sup>

## INTRODUCTION

Bacterial spores are protected from the environment by several shells including the proteinaceous coat layers and the exosporium for some species. In *B. subtilis* the morphogenetic protein CotE is involved in the deposition of the outer coat proteins and seems to play a major role in the assembly of *B. anthracis* exosporium. Our aim was to study the role of this protein in *Bacillus cereus*, responsible of foodborne poisoning. A  $\Delta cotE$  mutant was constructed in the *B. cereus* ATCC14579 strain (WT) by allelic exchange and complemented with an *in trans* plasmidic copy. The properties and the structure of the  $\Delta cotE$  and  $\Delta cotE\Omega cotE$  spores were analyzed and compared to those of the WT spores.

## RESULTS

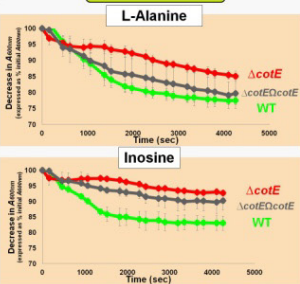
### 1. Sporulation



Spores were produced at 37°C on Fortified Nutrient Agar. Sporulation rate was determined by total cell count before and after heat treatment 15min at 70°C. Bars represent Standard Error.

➤ The sporulation rates (as well as the growth rate) of the  $\Delta cotE$  and  $\Delta cotE\Omega cotE$  strains are not significantly different from that of the WT strain.

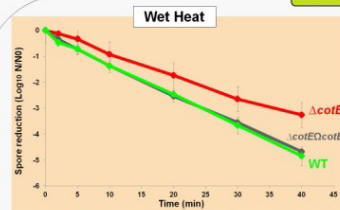
### 2. Germination



After a heat activation (70°C, 10min), germination of spores in presence of 100mM L-alanine (+D-cycloserine) or 0.5mM Inosine was followed by monitoring the decrease in  $A_{600nm}$ . Bars represent Standard Error.

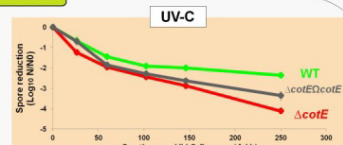
➤ The  $\Delta cotE$  spores germinated less efficiently than the WT with Inosine or L-Alanine.  
 ➤ Spore germination is partially restored in the complemented  $\Delta cotE\Omega cotE$  strain.  
 ➤ The deletion may have an impact on the accessibility of the germinants to their receptors.

### 3. Resistance



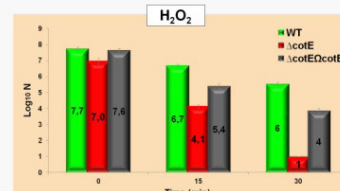
Wet-heat resistance at 90°C was performed on a spore suspensions in capillary tubes heated at 90°C different times and counting resistant spores leading to CFU after an overnight incubation at 30°C. Bars represent Standard Error.

➤ Unexpectedly the  $\Delta cotE$  strain is more resistant than the WT and the complemented strain.



Spores spread on LB agar plates were exposed to UV-C fluences delivered by Pulsed light and continuous UV-C sources. Pulsed light (PL) consists in short intense light flashes in the wavelengths 200 nm to 1100 nm generated by xenon lamps. CFU were determined after an overnight incubation at 30°C. Bars represent Standard Error.

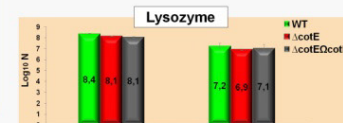
➤  $\Delta cotE$  spores are more sensitive to UV-C and PL than WT and  $\Delta cotE\Omega cotE$  spores



Resistance was tested by incubating spore suspensions 15 or 30 min with 5% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at room temperature. Bars represent Standard Error.

➤ The  $\Delta cotE$  spores are more sensitive to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment compared to WT and  $\Delta cotE\Omega cotE$  spores.  
 ➤ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> may have easier accessibility to the core of mutant spore.

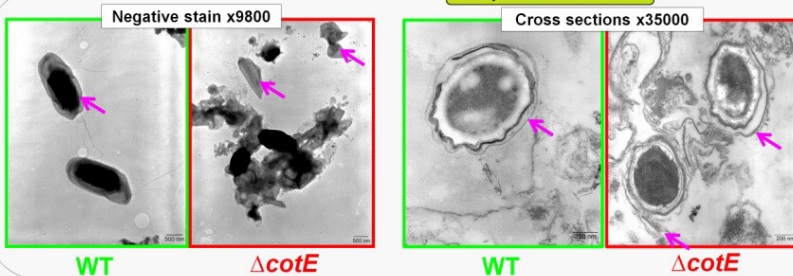
➤ The DNA lesions likely induced by UV-C, both continuous and PL are not efficiently repaired in  $\Delta cotE$  spores.



Resistance was tested by mixing spore suspensions to lysozyme (5mg/ml) and incubation at 37°C for 60 min and counting resistant spores leading to CFU after an overnight incubation at 30°C. Bars represent Standard Error.

➤ There was a slight decrease in the numbers of spores, without significant differences between the tested strain  
 ➤  $\Delta cotE$  spores seems to have intact coats protecting their cortex from lysozyme hydrolysis

### 4. Spore ultrastructure



#### Observations by transmission electronic microscopy

Spore produced in FNA medium at 37°C were stained negatively or by ruthenium red for thin sections. Arrows show exosporium.

➤ Exosporium of  $\Delta cotE$  spores seems to be detached from the spore surface however coat structures do not seem to be affected.

## CONCLUSIONS

- Mutation of the *cotE* gene affects the spore germination process triggered by L-alanine and inosine.
- $\Delta cotE$  spores are more resistant to wet-heat than the WT spores whereas *B. subtilis* and *B. anthracis*  $\Delta cotE$  spores are not.
- CotE could also be involved in *B. cereus* spore resistance to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and UV-C treatments.
- The CotE protein seems to play a role in the assembly of *B. cereus* exosporium, as described for *B. anthracis*. Proteomic analysis is underway in order to determine the role of CotE in deposition of exosporium and/or coats protein.

**8th International Conference on Gram-Positive Microorganisms - Résumé****(Communication affichée)****Temperature-dependent role of CotE in the assembly of *B. cereus* spore outer layers**C.Bressuire-Isoard<sup>1</sup>, I. Bornard<sup>2</sup>, A. O. Henriques<sup>3</sup>, F. Carlin<sup>1</sup>, V. Broussolle<sup>1</sup><sup>1</sup>INRA, Université d'Avignon, UMR408 Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale, F-84000 Avignon, France<sup>2</sup>INRA, UR407 Pathologie Végétale, F-84000 Montfavet, France<sup>3</sup>Instituto de Tecnologia Quimica e Biologica, Universidade Nova de Lisboa, 2781-901 Oeiras Codex, Portugal


The environmental conditions during sporulation can have a strong impact on the structure, composition, resistance and other functional properties of bacterial spores. In particular, the sporulation temperature is known to affect the spore resistance to heat, the composition of the spore surface layers, and their germination response. The surface layers of *Bacillus cereus* spores are formed by a proteinaceous coat in turn surrounded by a “balloon-like” structure called the exosporium. Assembly of the coat and exosporium rests on a complex protein interaction network that operates in the mother cell during sporulation and involves several morphogenetic proteins, among which CotE.

We have studied the role of the CotE protein in the assembly of the surface layers of *B. cereus* ATCC 14579 spores and how it could be affected by the sporulation temperature. We have compared the morphology and functional properties of wild type (WT) and  $\Delta cotE$  spores formed at 37°C or 20°C. Deletion of the *cotE* gene had a limited impact on sporulation efficiency, which was nevertheless lower at 20°C than at 37°C. However,  $\Delta cotE$  spores were more resistant to moist-heat at 90°C than WT spores, regardless of the sporulation temperature.  $\Delta cotE$  spores also showed higher susceptibility to UV-C, to hydrogen peroxide, and to the peptidoglycan-breaking enzymes lysozyme and mutanolysin. Both  $\Delta cotE$  and WT spores produced at 20°C were more sensitive to those treatments than spores produced at 37°C. Moreover,  $\Delta cotE$  spores were impaired in inosine-triggered germination and were less hydrophobic than WT spores, regardless of the sporulation temperature. The differences in the resistance and functional properties of the spores were paralleled by extensive modifications in spore morphology as revealed by transmission electron microscopy.  $\Delta cotE$  spores produced at 37°C exhibited a fragmented and detached exosporium and in addition, when produced at 20°C, a misassembled coat. A proteomic analysis also showed some modifications in the spore protein content caused by *cotE* deletion and by sporulation temperature.

Our results strongly suggest that CotE plays a major role in attachment of the exosporium to the spore coat in *B. cereus* spores and that formation of the spore surface layers is strongly impaired by the absence of CotE, an effect that is exacerbated when decreasing the sporulation temperature.



Poster 8th International Conference on Gram-Positive Microorganisms



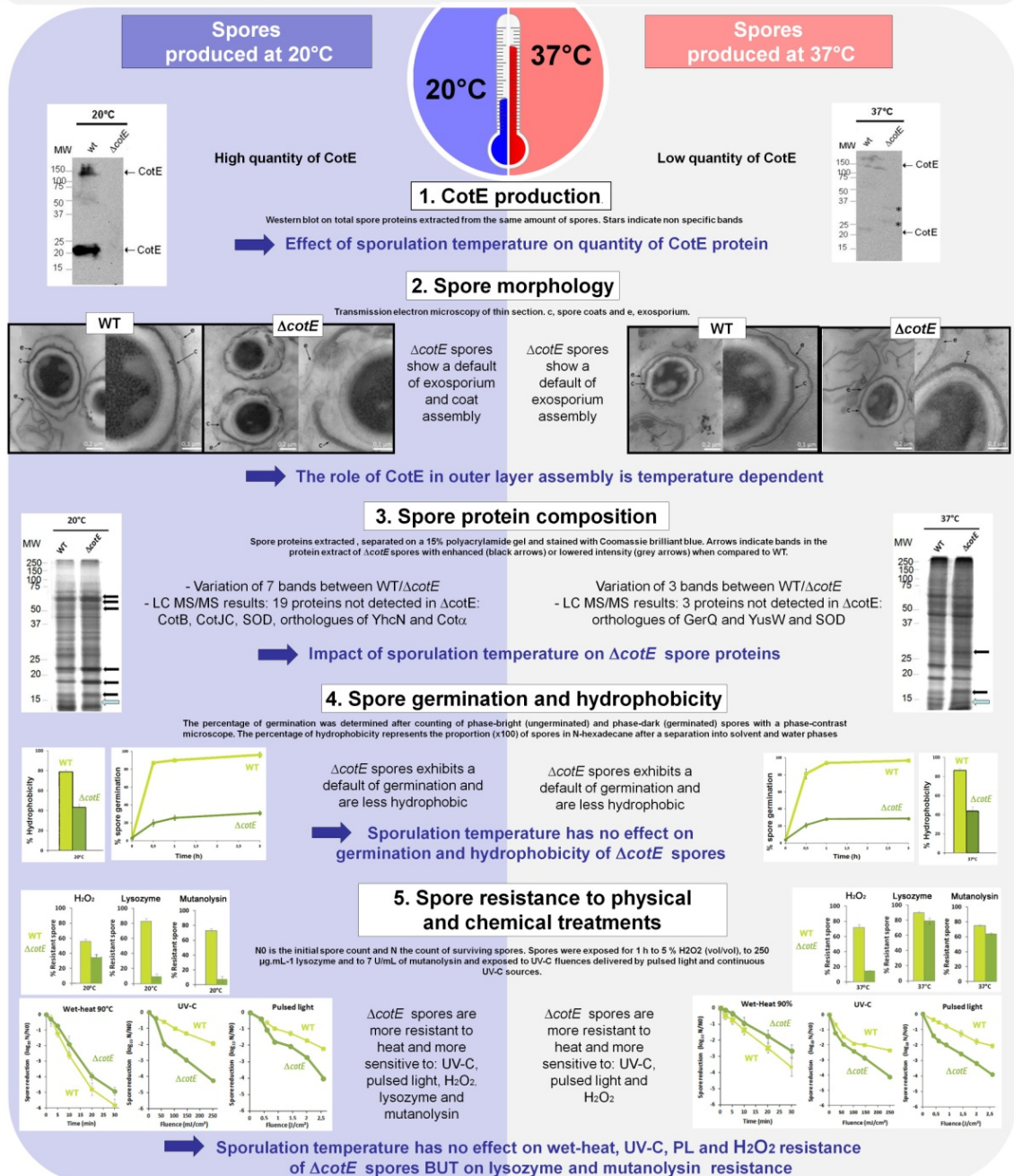
UNIVERSITÉ D'AVIGNON  
UMR408

## Temperature-dependent role of CotE in the assembly of *Bacillus cereus* spore outer layers

Christelle Bressuire-Isoard<sup>1</sup>, Isabelle Bornard<sup>2</sup>, Adriano O. Henriques<sup>3</sup>, Frédéric Carlin<sup>1</sup>, Véronique Broussolle<sup>1</sup>

1. INRA, Avignon Université, UMR408 Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale, F-84000 Avignon France  
2. INRA, UR407 Pathologie Végétale, Laboratoire de microscopie, F-84143 Montfavet France  
3. Instituto de Tecnologia Química e Biológica, Universidade de Nova de Lisboa, Apartado 2781-901 Oeiras Codex, Portugal

In *Bacillus cereus* spores, the inner and the outer coats are surrounded with an external shell called exosporium. Assembly of coat and exosporium layers rests on a complex protein interaction network that involves several morphogenetic proteins, among which CotE. In *B. subtilis*, CotE is involved in coat assembly and in exosporium assembly in *B. anthracis*. Sporulation temperature affects spore resistance, germination response and composition of spore surface layers. Our aim was to study how sporulation temperature modifies the spore outer layer assembly and how CotE is implicated, in *Bacillus cereus* ATCC14579



- The *B. cereus* Cot E amount is higher in spores formed at low than at optimal sporulation temperature
- Lowering the sporulation temperature exacerbated the effect of *cotE* deletion on coat and exosporium assembly, spore protein content, resistance to lysozyme and mutanolysin
- The mechanisms of spore layers assembly may be different in function of the sporulation temperature



## **Résumé**

*Bacillus cereus* est une bactérie sporulante pathogène largement disséminée dans la nature. Les propriétés de résistance de ses spores aux traitements appliqués dans la chaîne de transformation des aliments font de *B. cereus* un contaminant à l'origine de toxi-infections alimentaires. La température est considérée comme l'un des facteurs environnementaux majeurs influençant la résistance de la spore. La variabilité des propriétés des spores liée à des modifications profondes dans leur structure contribue à une incertitude sur l'efficacité des processus de décontamination. Ce travail de thèse avait pour objectif de caractériser le mécanisme d'assemblage des enveloppes de la spore en fonction de la température de sporulation, et en particulier le rôle de la protéine morphogénétique CotE chez *B. cereus*. La protéine CotE est retrouvée en plus grande abondance dans les spores produites à 20°C, que dans celles produites à 37°C, température optimale de croissance de la souche ATCC 14579. La protéine CotE est détectée dans les tuniques et l'exosporium, structures protectrices de la spore. L'observation de spores d'un mutant  $\Delta cotE$  en microscopie électronique à transmission révèle un défaut d'assemblage de l'exosporium à 37°C et à 20°C, mais également un défaut d'assemblage des tuniques à 20°C, ce qui suggère un rôle fondamental de CotE dans la mise en place de ces deux enveloppes. Ce mécanisme d'assemblage dépendrait de la température de sporulation. Par microscopie à fluorescence, nous avons étudié la cinétique de production de la protéine CotE au cours de la sporulation, ainsi que sa localisation finale dans la spore mature. Nos résultats suggèrent également que la protéine CotE assurerait la cohésion entre l'exosporium et les tuniques/cortex. Enfin, nous avons montré que la protéine CotE est impliquée dans la germination mais également dans la résistance à la fois physique et chimique des spores.

**Mots clés:** structure, tuniques, exosporium, résistance, germination

## **Abstract**

Spores of the pathogenic bacterium *Bacillus cereus* are widespread in the environment and responsible of foodborne poisonings. Spores are a major concern to public health because of high resistance to treatments applied in food processing operations. Sporulation temperature is a main environmental factor that influences spore resistance properties. The variability of the conditions in which spores are formed during the sporulation process deeply modifies their structure and consequently the efficiency of decontamination treatments. The aim of this work was to study the mechanism of spore layers assembly as a function of the sporulation temperature, and more precisely the role of the CotE protein in *B. cereus* strain ATCC 14579. This morphogenetic protein is more detected in spores formed at 20°C, a sub-optimal growth temperature, than at 37°C, the optimal growth temperature. Observations in transmission electronic microscopy of  $\Delta cotE$  spores revealed an assembly default of the spore exosporium at 37°C and 20°C, but also of the spore coat at 20°C. CotE has therefore a role in the assembly of both layers and this role depends on the sporulation temperature. By fluorescence microscopy, we studied the kinetics of CotE production during sporulation and CotE final localization in mature spores. Our results suggest that CotE links the exosporium to the coat and cortex structures. Finally, we showed that CotE also plays a role in germination and resistance properties of *B. cereus* spores to physical and chemical treatments.

**Keywords:** spore structure, coats, exosporium, resistance, germination