



HAL
open science

Intégration des bactéries planctoniques dans le biofilm et étude fonctionnelle du gène plasmidique Bthur62720 chez *Bacillus thuringiensis*

Nay El Khoury

► **To cite this version:**

Nay El Khoury. Intégration des bactéries planctoniques dans le biofilm et étude fonctionnelle du gène plasmidique Bthur62720 chez *Bacillus thuringiensis*. Bactériologie. Université Paris-Saclay; Université Saint-Joseph (Beyrouth), 2021. Français. NNT : 2021UPASL014 . tel-03200788

HAL Id: tel-03200788

<https://theses.hal.science/tel-03200788>

Submitted on 16 Apr 2021

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.

Intégration des bactéries planctoniques dans le biofilm
et étude fonctionnelle du gène plasmidique *Bthur62720*
chez *Bacillus thuringiensis*

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n°577, Structure et Dynamique des Systèmes Vivants (SDSV)

Spécialité : Microbiologie

Unité de recherche : Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech,
Micalis Institute, 78350, Jouy-en-Josas, France.

Référent : Faculté des sciences d'Orsay

**Thèse présentée et soutenue à Paris-Saclay, le 10 Mars 2021, par
Nay EL KHOURY**

Composition du Jury

Richard MAROUN

Professeur, Université Saint-Joseph,
Liban

Président

Louis COROLLER

Professeur, Université de Brest, France

Rapporteur & Examineur

Jacques MAHILLON

Professeur, Université Catholique de
Louvain, Belgique

Rapporteur & Examineur

Michel GOHAR

Docteur, HDR, Université Paris-Saclay,
France

Directeur de thèse

Mireille KALASSY AWAD

Professeure, Université Saint-Joseph,
Liban

Co-directrice de thèse

Remerciements

Pour commencer, je tiens à exprimer toute ma gratitude à mes deux directeurs de thèse :

Michel Gohar, depuis que tu m'as encadré pendant mon stage M2, je voulais à tout prix faire une thèse sous ta direction et je ne regrette pas du tout ma décision. Tu m'as permis de m'épanouir scientifiquement et je t'en serai toujours reconnaissante. Merci pour ta gentillesse, tes conseils, tes blagues, ta patience (surtout quand je suis têtue) et of course tes biscuits et tes chocolats. Tu as toujours été bienveillant avec moi durant c'est 4 ans et je suis très chanceuse d'avoir été ton étudiante.

Mireille Kallassy Awad, c'est grâce à toi que j'ai commencé (il y'a 8 ans !) mon parcours. Merci pour la confiance et la chance que tu m'as accordée. Merci pour ta présence, ta gentillesse, ton écoute au niveau professionnel et personnel. Je n'oublie jamais le laboratoire de bactériologie et nos discussions dans ton bureau (surtout le thé et les pommes de Ghineh !!). Tu as toujours été là pour moi, durant les bons et surtout les mauvais moments, et ça je ne l'oublierais jamais.

Je tiens à remercier Didier Lereclus, pour sa bienveillance et ses encouragements tout au long de la thèse. Merci de m'avoir accordé l'opportunité de faire une thèse au sein de l'équipe GME et pour toutes les autres opportunités que tu m'as offertes.

Je remercie également de tout cœur M. Richard Maroun, pour m'avoir offert l'opportunité de faire une thèse à la Faculté des sciences.

Je tiens à remercier tous les membres de jury pour avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse. Je remercie M. Jacques Mahillon et M. Louis Coroller pour avoir accepté d'être rapporteurs, et M. Richard Maroun pour avoir accepté d'être examinateur.

Je remercie le conseil de la recherche de l'USJ et la Bourse Eiffel de Campus France pour m'avoir accordé un financement tout au long de mes études.

Leyla, je te remercie pour tes conseils et ton écoute tout au long de la thèse. You are a wonderful person. Merci à Stef, pour les conseils et les bons moments au labo et au bureau !! Nath, merci pour ta bienveillance et ta gentillesse depuis mon stage et jusqu'à aujourd'hui.

A tout les membres de l'équipe GME, je vous remercie d'avoir été tellement accueillant depuis mon arrivée en France. Votre présence et votre gentillesse m'ont permis de m'adapter rapidement à ma nouvelle vie et je peux dire aujourd'hui que j'ai une famille en France 😊

Je n'oublie pas mes profs à la FS, Laure El Chamy, Zeina Hobeika, Magda Bou Dagher Kharrat, Mme Abboud et Mr. Joseph et Mr Georges et Mme Nayla.

A Tony, Rassoul, Anna Maria, Rebecca, Rhéa, Zaynoun, Elie et M. Tony Najeim,
J'ai passé 10 ans inoubliables à la faculté des sciences grâce à vous tous !

Hadi, j'ai eu le plaisir de travailler avec toi au labo, avec speckle et les biofilms. Tu es plus qu'un camarade, tu es un vrai ami 😊

Ali, merci pour ta positivité et ton humour durant nos séjours à Paris 😊

Nancy, I will never forget all the really (really!!) long conversations about every little thing we had in mind. You are truly a good person and you will excel in everything you do, no doubts about it.

Racha, those few lines do not reflect how grateful I am to have you as a friend. We've been really close ever since I came to France and I couldn't thank you enough for all the times you were here for me.

Rima, you are my family in France. You've seen me at my best and at my worst. I will never forget your presence, your words, our adventures and all the crazy things we've been through in Paris/Angers. Thank you for everything.

Mimi, you are the nicest, most caring person I have ever met. Tu as toujours été là pour moi, même avant ma thèse. Thank you for your unconditional support and your positive vibes that helped a lot during difficult times.

Lea, my childhood friend, and my forever support system, you are one of the reasons why this whole complicated journey was easier to overcome. You are a true gem, always spreading positive vibes and helping me in every possible situation. You are my sister 😊

Karen, merci pour ton support toutes ces longues années. You are a true friend.

Rana, you quickly became a friend and a part of my support system here in France. You are the sweetest, purest person I know and that's why I consider you a valuable person in my life. Merci pour tout, tu es géniale.

Zeina, merci pour ta bonne humeur, ta positivité, ton humour et ta bienveillance qui m'ont beaucoup aidé tout au long de cette thèse. You are a true friend.

Nath, merci pour ton soutien inconditionnel durant, et même avant la thèse. Tu es une vraie amie.

Le plus important reste pour la fin : c'est à ma famille, mes parents Salem et Randa et mon frère Naim à qui je dois tout. Ma famille a toujours été là pour moi, avant, pendant et après la thèse. Même durant la crise que connaît mon pays en ce moment, ils m'ont toujours soutenue. Je peux toujours compter sur leur positivité et leurs paroles pour me remonter le moral, alors qu'eux-mêmes traversent une période plus difficile. Ma famille est très courageuse et je suis très chanceuse de les avoir. Je vous aime.

Publications

- ❖ **Article 1 - Massive integration of planktonic cells within a developing biofilm**

Nay El-Khoury, Imene Bennaceur, Emilie Verplaetse, Stéphane Aymerich, Didier Lereclus Mireille Kallassy and Michel Gohar

Accepté pour publication au journal : Microorganisms

- ❖ **Article 2 - Polar localization of lipid rafts is dependent on plasmidic genes in *Bacillus thuringiensis***

Congrès

- ❖ **Présentation Orale, Colloque Bactéries Sporulantes Pathogènes ou d'Intérêt Technologique «BISPIT» à Paris, Mars 2018:
Bip, a protein required for the integration of planktonic bacteria inside a biofilm**
- ❖ **Oral presentation, The Lebanese Association for the Advancement of Science « LAAS » au Liban, Avril 2018
Evolution spatio-temporelle de la sporulation dans le biofilm de *Bacillus thuringiensis***
- ❖ **Présentation Orale, Society for Invertebrate Pathology « SIP » à Valence, 28 Juillet 2019:
Bip, a protein required for the integration of planktonic bacteria inside a biofilm**

Liste des abréviations

Aer: Aerotaxis receptor

ARN: Acide ribonucléique

Bap : biofilm-associated protein

Bt: Bacillus thuringiensis

Cache: Ca²⁺ channels and chemotaxis receptors

CCW : counterclockwise

CDC: center for disease control

CW : clockwise

CytK: cytotoxine K

DBP: dipeptide-binding protein

EPS : exo polysaccharide

FAD: Flavine adenine dinucleotide

FMN: Flavine mononucleotide

Hbl : hemolytic toxin

HAMP: Histidine Kinases, Adenylyl cyclases, Methyl-accepting chemotaxis proteins, and Phosphatases

4-HCA: Acide 4-hydroxycinnamic

HemAT: heme-based aerotaxis transducer

LB: Luria Bertani

LBR: Ligand-Binding protein

MA: methyl-accepting

MCP : methyl-accepting chemotaxis protein

MMFs: microdomaines membranaires fonctionnels

NAO : N-nonyl acridine orange

NRPS : non-ribosomal peptide syntase

Nhe : non-hemolytic intro-toxin

PAS: Period circadian protein, Ah receptor nuclear translocator protein, Single-minded protein

PlcR: phospholypase c regulator

QS : Quorum sensing

SST3: système de sécrétion de type 3

TA : système toxine-antitoxine

TIAC : toxi-infection alimentaire collective

TApA : TasA anchoring-assembly protein

TarH: Taxis towards Aspartate and related amino acids and Homologs

Tap: Taxis Toward petptides

Vip : vegetative insecticidal proteins

Wt: wild-type

Liste des figures

| | |
|--|----|
| <u>Figure 1 Observation de spores et des cristaux de <i>B. thuringiensis</i> par microscopie électronique à balayage (Palma, Munoz et al. 2014).</u> | 23 |
| <u>Figure 2 Biofilm de <i>Bacillus thuringiensis</i> en surface air/liquide.</u> | 24 |
| <u>Figure 3 Schéma illustrant les étapes principales de formation d'un biofilm de <i>Bacillus subtilis</i> sur une surface abiotique (Vlamakis, Chai et al. 2013).</u> | 29 |
| <u>Figure 4 Représentation schématique de la coagrégation inter- et intra-espèces entre bactéries aquatiques.</u> | 34 |
| <u>Figure 5 Observation par microscopie électronique a balayage de la plaque dentaire sous-gingivale.</u> | 39 |
| <u>Figure 6 Coloration au crystal violet des biofilms formés dans des microplaques de 96 puits.</u> | 41 |
| <u>Figure 7 Image d'une cellule a circulation (flow-cell), un dispositif utilise pour former des biofilms.</u> | 42 |
| <u>Figure 8 observation par coloration négative par microscopie électronique des différentes dispositions des flagelles.</u> | 46 |
| <u>Figure 9 Schéma de l'appareil flagellaire des bactéries gram + (gauche) et gram - (droite).</u> | 49 |
| <u>Figure 10 Schéma représentatif des composants moléculaires impliqués dans la biosynthèse du flagelle de <i>Salmonella enterica</i> 18483484.</u> | 50 |
| <u>Figure 11 Schéma descriptif du mécanisme de la nage des bactéries péritriches.</u> | 53 |
| <u>Figure 12 Représentation schématique des structures des MCPs présentes chez les bactéries.</u> | 60 |
| <u>Figure 13 Représentation schématique du récepteur Tsr d' <i>E. coli</i> et de la voix de signalisation impliquée dans la transduction du signal chimiotactique.</u> | 64 |

Tables des matières

| | |
|---|----|
| <i>Avant-propos</i> | 11 |
| <i>Chapitre 1 : Revue bibliographique</i> | 14 |
| <i>Chapitre I : Le groupe <i>B. cereus sensu lato</i></i> | 15 |
| A. Caractéristiques du groupe <i>B. cereus sensu lato</i> | 15 |
| B. Phylogénie du groupe <i>B. cereus</i> | 16 |
| C. Pathogénicité de <i>B. cereus sensu stricto</i> | 17 |
| a) Intoxication de type émétique et facteur de virulence | 17 |
| b) Intoxication de type diarrhéique et facteurs de virulences | 18 |
| D. Pathogénicité de <i>B. thuringiensis</i> | 19 |
| E. Rôle des plasmides et des gènes qu'ils hébergent dans l'adaptation bactérienne | 21 |
| F. Le biofilm produit par <i>B. thuringiensis/cereus</i> | 23 |
| <i>Chapitre II : Les biofilms</i> | 25 |
| A. Définition et généralités | 25 |
| B. Formation du biofilm..... | 26 |
| a) L'adhésion des bactéries : l'étape initiatrice..... | 27 |
| b) Maturation du biofilm..... | 28 |
| c) L'essaimage : retour au mode planctonique..... | 29 |
| C. La pellicule : un biofilm sur une interface air/liquide | 30 |
| ▪ Migration des bactéries planctoniques à l'interface air/liquide | 31 |
| a) Recrutement des bactéries planctoniques dans un biofilm..... | 32 |
| b) La plaque dentaire : un modèle de biofilm multi-espèce. | 38 |
| c) Le biofilm mono-espèce..... | 39 |
| D. Étude des biofilms au laboratoire | 40 |
| <i>Chapitre III : La mobilité bactérienne</i> | 43 |
| A. La mobilité flagellaire..... | 43 |
| ▪ La nage bactérienne | 43 |
| ▪ L'essaimage | 44 |
| ▪ Disposition des flagelles..... | 44 |
| B. Biosynthèse et structure du flagelle..... | 46 |
| a) Le corps basal..... | 47 |
| b) Le crochet..... | 48 |
| c) Le filament | 48 |
| d) Expression des gènes flagellaires | 50 |
| e) La nage bactérienne | 52 |
| f) Le flagelle et la formation du biofilm | 53 |
| C. Le tactisme des bactéries..... | 54 |
| a) Détection des signaux extracellulaires par les MCPs | 55 |
| b) Organisation spatiale des MCPs..... | 60 |
| c) Transduction du signal chimiotactique | 62 |

| | |
|--|------------|
| D. Mobilité, tactisme et formation de la pellicule | 65 |
| Chapitre 2 - Résultats | 70 |
| Chapitre 2-1 | 71 |
| 1. Introduction | 75 |
| 2. Materials and Methods | 76 |
| 2.1. Strains and DNA manipulation | 76 |
| 2.2. Time-course of planktonic- and biofilm-populations growth..... | 76 |
| 2.3. Recruitment of gfp-tagged planktonic cells in a mCherry-tagged biofilm..... | 77 |
| 2.4. Time-course of the pellicle formation | 77 |
| 3. Results | 77 |
| 3.1. The planktonic population decreases when the biofilm grows..... | 77 |
| 3.2. The biofilm is the cause of the planktonic population decrease..... | 78 |
| 3.3. The planktonic population is recruited within the biofilm. | 79 |
| 3.4. Recruited bacteria are located in specific areas of the biofilm | 80 |
| 4. Discussion | 81 |
| 5. Conclusions | 82 |
| References | 83 |
| <i>Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.</i> | 84 |
| Chapitre 2-2 | 85 |
| Chapitre 3 - Discussion et perspectives | 103 |
| Références | 110 |

Avant-propos

Contexte de l'étude

Les microorganismes vivent sous forme de communautés bactériennes attachées à une surface et sont englobées par une matrice extracellulaire, dont les éléments sont sécrétés par les bactéries elles-mêmes. Ces communautés, nommées les biofilms, sont présentes dans tous types d'environnements, au niveau des surfaces industrielles ainsi que dans des milieux naturels comme l'organisme humain. Le CDC (Center for Disease Control) et l'Institut National de la Santé NIH (National Institutes of Health) estiment que 65 à 80 % des infections humaines difficiles à traiter sont causées par des bactéries produisant des biofilms, qui servent de barrière de protection pour les bactéries face à divers traitements ([Donlan, Costerton et al. 2002](#)). De plus, la composition microbienne des biofilms révèle la présence de différentes populations ([Gutiérrez, Delgado et al. 2012](#)). Lors de la formation d'un biofilm, on observe la coexistence d'une population planctonique (libre) et d'une population sessile (fixée). Ces deux populations peuvent échanger entre elles. On parle d'essaimage ou de dispersion quand la population sessile émigre vers la population planctonique, et d'immigration ou de recrutement quand la population planctonique intègre le biofilm. Le recrutement joue un rôle essentiel dans la constitution de biofilms multi-espèces. Il a été particulièrement bien décrit dans la formation de la plaque dentaire. Au cours de cette formation, une espèce pionnière, *Streptococcus gordonii*, adhère à l'émail des dents et forme un biofilm primaire dans lequel sera recruté des colonisateurs secondaires comme *Porphyromonas gingivalis*, puis des colonisateurs tertiaires ([Kolenbrander 2000](#)). Ces recrutements successifs font intervenir des interactions cellulaires de type ligand- récepteur, où les ligands et les récepteurs sont des sucres et des lectines localisées sur la paroi bactérienne des populations résidentes et immigrantes. En dehors de la plaque dentaire, un mécanisme similaire a été décrit pour la formation du biofilm mono-espèce chez *Vibrio cholerae* ([Smith, Maestre-Reyna et al. 2015](#)). La matrice du biofilm possède deux protéines très abondantes Bap1 et RbmA et le polysaccharide VPS. RbmA est sécrété dans la matrice du biofilm. La protéolyse de RbmA promeut le recrutement des cellules planctoniques alors que la forme non clivée de cette protéine consolide le biofilm en interagissant avec les cellules sessiles du biofilm qui présentent à leur surface le polysaccharide VPS

Les espèces du groupe *Bacillus cereus sensu lato* sont des bactéries ubiquitaires, présentes dans de très nombreux environnements, associées au sol ou à la plante, de telle sorte qu'on les retrouve au niveau des chaînes de production de différentes industries de production agroalimentaire. Leur présence au niveau des surfaces qui sont en contact avec les aliments facilite la mise en place d'un réservoir de contamination par les bactéries menaçant la qualité du produit fabriqué. Les souches de *Bacillus sp*, incluant le pathogène humain *B. cereus sensu stricto*, représentent 25% des souches isolées à partir de biofilms présents sur les surfaces dans les industries alimentaires ([Faille, Bnzzech et al. 2014](#)). La production de spores a longtemps été documentée dans les biofilms de *B. cereus* ([Majed, Faille et al. 2016](#)). En effet, les spores et les biofilms de cette espèce sont les causes majeures de contaminations persistantes, surtout au niveau des industries laitières et des pertes économiques importantes.

Concernant les biofilms produits par les espèces *B. cereus/thuringiensis*, des études préalables, menées dans notre laboratoire, ont montré que *Bacillus thuringiensis (Bt)* produit, en culture statique, un biofilm au niveau de l'interface air/liquide dans des tubes en verre, constitué d'un anneau et d'une pellicule. Cependant, l'aspect moléculaire et le rôle que peut jouer de la population planctonique dans la formation des biofilms produits par ces espèces ne sont pas étudié jusque-là. D'où les objectifs principaux de mon manuscrit de thèse :

En premier, le suivi de la cinétique d'évolution de la population planctonique lors de la formation d'un biofilm en interface air/liquide chez Bt. En second, la caractérisation moléculaire de nouveaux gènes impliqués dans ce recrutement. Ce manuscrit de thèse sera divisé en les parties suivantes :

- I. Chapitre 1 – Revue bibliographique et objectifs de l'étude.
- II. Chapitre 2 – Résultats.
 - Chapitre 2- Article 1
 - Chapitre 2- Article 2
- III. Chapitre 3 – Discussion et perspectives.

Chapitre 1 : Revue bibliographique

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

A. Caractéristiques du groupe *B. cereus sensu lato*

Les espèces du Genre *Bacillus* appartiennent au *phylum* des firmicutes et à la famille des *Bacillaceae*. Ce groupe comprend 8 espèces génétiquement très proches : *B. mycooides*, *B. pseudomycooides*, *B. weihenstephanensis*, *B. toyonensis*, *B. anthracis*, *B. thuringiensis*, *B. cereus sensu stricto* et *B. cytotoxicus* ([Guinebretière, Auger et al. 2013](#)) (Jimenez, 2013). Parmi ces espèces, quatre sont pathogènes : *B. anthracis*, *B. thuringiensis*, *B. cereus sensu stricto* et *B. cytotoxicus*. Ce sont des bactéries en forme de bacille, sporulantes, flagellées et aérobies facultatives. La taille des cellules végétatives varie de 0.5 x 1.2 µm à 2.5 x 10 µm de diamètre et leur température de croissance optimale varie de 25°C à 37°C, sachant que des membres psychrophiles ou thermophiles sont capables de croître à des températures de 4°C ou 53°C ([Drobniewski 1993](#)). La plupart des souches sont catalase positive et possèdent une flagellation péritriche.

La présence ubiquitaire de ces bactéries dans l'environnement se reflète par la variabilité des niches écologiques qu'elles occupent. En plus du sol, les souches sont isolées à partir des plantes, des invertébrés, des mammifères ainsi que les produits alimentaires. Cette diversité est illustrée aussi par l'existence, au sein du même groupe, de souches probiotiques et de souches pathogènes de l'homme ([Majed, Faille et al. 2016](#)) (Cutting 2011, Ehling-Schulz, Lereclus et al. 2019), ([Smith 1991](#)). Grâce à la formation d'endospores résistantes à plusieurs facteurs tels que la chaleur, les rayonnement UV, les pH acides et la dessiccation, ces espèces peuvent persister dans un état métaboliquement inactif, ce qui rend très difficile leur élimination. Lorsque les conditions du milieu sont à nouveau favorables à la croissance bactérienne, les spores germent et donnent naissance à des cellules végétatives métaboliquement actives. A partir du stock de spores présent dans l'environnement, les bactéries, notamment les espèces pathogènes, peuvent infecter l'homme par ingestion ou inhalation à travers des produits contaminés.

B. Phylogénie du groupe *B. cereus*

Les génomes du groupe *cereus* sont hautement conservés, avec une taille de 5.2- à 5.5-Mb et des séquences d'ARN 16S très similaires. La définition des espèces de ce groupe est, à l'origine, liée à des phénotypes macroscopiques et microscopiques, qui sont principalement associés à des plasmides spécifiques de chaque espèce ([Rasko, Altherr et al. 2005](#)) ([Ehling-Schulz, Lereclus et al. 2019](#)) L'espèce *anthracis*, agent causal de la maladie de l'anthrax, possède deux plasmides caractéristiques pX01 (182 kb) and pX02 (95 kb), qui portent respectivement des gènes codant pour des toxines et des gènes de biosynthèse de la capsule de la bactérie ([Okinaka, Cloud et al. 1999](#)). Les souches émétiques de *B. cereus sensu stricto* possèdent le plasmide pCER270 où sont localisés des gènes codant pour des enzymes impliquées dans la biosynthèse de la toxine céréulide ([Rasko, Rosovitz et al. 2007](#)) L'entomopathogène *B. thuringiensis* possède des mégaplasmides qui codent pour une variété de toxines, les protéines Cry et Cyt, qui cristallisent pendant la phase stationnaire sous forme de corps parasporal ([Berry, O'Neil et al. 2002](#))

Les 5 autres espèces peuvent être discriminées par des traits physiologiques ou morphologiques, par exemple *mycooides* et *pseudomycooides* forment des colonies rhizoïdes ([Di Franco, Beccari et al. 2002](#)) *weihenstephanensis* est une espèce psychrotrope, capable de croître à basse température jusqu'à 4 °C ([Lechner, Mayr et al. 1998](#)) D'autre part, *B. cytotoxicus* peut croître à de hautes températures, allant jusqu'à 50°C ([Guinebrière, Auger et al. 2013](#)) . L'espèce *B. toyonensis* est, quant à elle, connue pour ses propriétés probiotiques ([Jimenez, Urdiain et al. 2013](#)).

Cependant, la spéciation basée sur les traits phénotypiques et/ou le contenu plasmidique mène à des conclusions subjectives et n'est plus favorisée de nos jours. En effet, une analyse phylogénétique ([Liu, Lai et al. 2015](#)) a permis de regrouper 224 souches du groupe *cereus* en 5 clades différents, en classant des espèces phénotypiquement éloignées dans un même groupe. Cette étude démontre que l'existence de plasmides spécifiques de chaque espèce, comme les pXOs ou le pBtoxis par exemple, n'est pas un argument suffisant pour caractériser les espèces du groupe *cereus*. Des experts considèrent même le groupe *B. cereus* comme étant une espèce unique, composée de souches ayant une diversité très importante, due à la composition plasmidique, à l'expression de gènes de

régulation nécessaires à la survie, ou à la pathogénicité des bactéries ([Helgason, Okstad et al. 2000](#)) ([Rasko, Rosovitz et al. 2007](#)).

B. anthracis, *B. thuringiensis* et *B. cereus sensu stricto* sont les espèces du groupe les plus étudiées ; certaines souches de *B. cereus* peuvent être associées aux toxi-infections alimentaires chez l'homme, *B. anthracis* est un pathogène létal des mammifères et *B. thuringiensis*, un biopesticide utilisé mondialement en agriculture pour lutter contre les insectes ravageurs des cultures. *B. thuringiensis* constitue le modèle expérimental de notre étude. La pathogénicité de chaque espèce est détaillée ci-dessous.

C. Pathogénicité de *B. cereus sensu stricto*

Grâce à l'abondance et à la résistance de ses spores, *B. cereus* colonise la plupart des surfaces des industries alimentaires et contamine fréquemment ses productions ([Drobniewski 1993](#)), ([Granum, Brynestad et al. 1993](#)), ([Christiansson, Naidu et al. 1989](#)). L'existence également de souches psychotropes, capables de croître dans des produits conservés au frais, en plus de l'abondance des spores dans la nature et de leur résistance à la chaleur, font de *B. cereus* un pathogène difficilement contrôlable dans l'industrie agroalimentaire. Il est responsable de toxi-infections alimentaires collectives (TIAC) et provoque deux types d'intoxications : émétique et diarrhéique ([Meer, Baker et al. 1991](#)).

B. cereus est aussi associé, mais moins fréquemment, à des maladies opportunistes. Cette bactérie est capable de contaminer des plaies post-opératoires, et peut être responsable de bactériémies ou de septicémies, surtout chez les patients immunodéprimés ([Drobniewski 1993](#)) (Bottone, 2010).

a) Intoxication de type émétique et facteur de virulence

Ce syndrome se manifeste par de la nausée, des vomissements et des douleurs abdominales, généralement 1 h à 5 h après l'ingestion de la nourriture contaminée. La récupération a lieu 6h à 24h après l'intoxication et la mortalité est rare. L'apparition rapide des symptômes indique la préformation de toxines dans les aliments avant ingestion ([Turnbull 1981](#)). La toxine responsable de ce syndrome est le céréulide. C'est un

dodeca- depsipeptide cyclique ionophore constitué de 12 acides aminés liés par des liaisons non peptidiques, agissant comme transporteur de potassium. Il se caractérise par une forte hydrophobicité et une résistance à un pH allant de 2 à 11 et à l'action des enzymes protéolytiques. Il est thermostable et peut résister à 30 min d'exposition à 121°C ([Rajkovic, Uyttendaele et al. 2008](#)). Ces propriétés permettent à la toxine de résister à plusieurs traitements, comme la cuisson des aliments ou bien les réactions métaboliques de l'organisme. Par ailleurs, cette toxine est synthétisée par un complexe enzymatique non ribosomique (non ribosomal- peptide synthase, NRPSs). Les gènes codant pour les enzymes de ce complexe sont portés par un mégaplasmide (>200 kb), nommé pBCE ou pCER270, qui présente des similarités avec le plasmide pXO1 ([Ehling-Schulz, Guinebretiere et al. 2006](#)). Contrairement à d'autres toxines, la synthèse du céréulide se fait par le régulateur transcriptionnel AbrB ([Lucking, Dommel et al. 2009](#)). Cette toxine agit en perturbant le potentiel transmembranaire des cellules, entraînant des vomissements suite à la stimulation du nerf vague afférent ([Agata, Ohta et al. 1995](#)). A l'exception de deux souches de *B. weihenstephanensis*, la production de céréulide est restreinte à des souches de *B. cereus* phylogénétiquement très proches ([Ehling-Schulz, Svensson et al. 2005](#)), ([Thorsen, Hansen et al. 2006](#))

b) Intoxication de type diarrhéique et facteurs de virulences

Les intoxications diarrhéiques se manifestent par des douleurs abdominales, une diarrhée profuse et un ténésme rectal. Les symptômes apparaissent 8h à 12h après l'ingestion de spores ou de bactéries végétatives et peuvent durer jusqu'à 12h à 16h après ingestion. L'apparition tardive des symptômes peut être attribuée à la production d'entérotoxines lors de la multiplication de la bactérie dans l'organisme après la contamination ([Schoeni and Wong 2005](#)).

L'étude des toxines responsables de ce syndrome est très documentée, et révèle l'implication probable de trois entérotoxines thermosensibles produites par la bactérie : Hbl, Nhe et la Cytotoxine K. Elles agiraient en formant des pores dans la membrane des cellules cibles, provoquant ainsi une lyse osmotique et conduisant à la mort cellulaire. ([Granum and Nissen 1993](#)).

- L'entérotoxine HbL (Hemolytic toxin Bl) est une toxine tripartite, formée d'une sous-unité B impliquée dans la liaison toxine-cellule et de deux sous-unités lytiques L₁ et L₂. La formation d'un complexe (HbLB, HbL1 et/ou HbL2) est nécessaire pour l'activité biologique de la toxine. Celle-ci possède une activité hémolytique et dermonécrotique ([Beecher and Wong 2000](#)). Les protéines B, L1 and L2 sont codées par les gènes *hblA*, *hblD*, and *hblC*, respectivement. Ces gènes sont organisés en opéron au niveau du chromosome ([Beecher and Wong 2000](#)).
- L'entérotoxine Nhe (Non-Hemolytic Enterotoxin) a été décrite pour la première fois en 1996 ([Ehling-Schulz, Guinebretiere et al. 2006](#)). C'est une toxine à 3 composantes (NheA, NheB et NheC) qui induit un effet toxique sur les cellules épithéliales HeLa et CaCo2 en formant des pores transmembranaires. Les trois sous-unités Nhe sont codées par l'opéron *nhe*, localisé au niveau du chromosome et composé des gènes *nheA*, *nheB*, et *nheC*.
- La cytotoxine K (CytK), est une toxine de 34 kDa, possédant deux variantes (CytK1 et CytK2). CytK1 est fortement cytotoxique, nécrotique et hémolytique contre les érythrocytes de boeuf et de lapin. ([Ramarao and Sanchis 2013](#)) La toxine CytK1 a été identifiée à partir d'une souche identifiée à la base comme *B. cereus* ayant causée une intoxication alimentaire collective. A partir de cette souche a été décrite la nouvelle espèce *B. cytotoxicus* ([Guinebretière, Auger et al. 2013](#)). Les gènes *cytK1*, présents chez *B. cytotoxicus*, et *CytK2*, présents chez d'autres souches de *B. cereus*, sont chromosomiques.

La régulation des gènes codant pour ces entérotoxines est assurée par le régulateur transcriptionnel pléiotrope PlcR, qui avec son peptide associé PapR, forme un système de quorum sensing ([Slamti and Lereclus 2002](#)) Ce système régule l'expression de la plupart des facteurs de virulence chromosomiques chez *B. cereus*. Le régulon PlcR regroupe 45 gènes ([Gohar, Faegri et al. 2008](#)) dont les produits représentent environ 80 % du protéome extracellulaire de *B. cereus* ([Gohar, Faegri et al. 2008](#)) Ce régulateur joue un rôle important dans la pathogénicité de *B. cereus* ([Slamti and Lereclus 2005](#)).

D. Pathogénicité de *B. thuringiensis*

L'espèce *thuringiensis* est un entomopathogène et son activité insecticide est largement attribuée à des δ -endotoxines présentes sous forme de cristaux parasporaux produits en

phase stationnaire de la croissance bactérienne (Figure 1). De ce fait, *B. thuringiensis* est largement utilisé comme biopesticide dans la lutte contre une variété d'espèce d'invertébrés appartenant à différents ordres comme les lépidoptères, les diptères et les coléoptères. Des études récentes montrent également une activité contre les protozoaires, ou les nématodes ([Iatsenko, Nikolov et al. 2014](#)). Les δ -endotoxines incluent les protéines Cry et Cyt. Les toxines Cry sont subdivisées en plusieurs groupes en fonction de leur homologie et leur structure moléculaire. Les toxines Cyt constituent une catégorie moins variée de protéines cristallines à activité insecticide contre les diptères ([Palma, Munoz et al. 2014](#)). Lorsqu'une larve de lépidoptère ingère un mélange de spores et de cristaux, le pH basique de l'intestin moyen entraîne la solubilisation des cristaux pour libérer les pro-toxines qui sont ensuite activées par les protéases de l'hôte. La forme active des toxines Cry se fixe sur des récepteurs spécifiques des cellules épithéliales, s'oligomérisent et s'insèrent au niveau des rafts lipidiques membranaires pour former des pores et lyser les cellules. En revanche, les toxines Cyt, peuvent interagir directement avec les lipides membranaires pour former des pores ([Bravo, Gill et al. 2007](#), [Soberon, Fernandez et al. 2007](#)). La lyse des cellules épithéliales de l'intestin permet alors aux bactéries de traverser la paroi digestive et d'envahir l'hémolymphe pour provoquer une toxémie puis une septicémie conduisant à la mort de l'insecte ([Schnepf, Crickmore et al. 1998](#)).

Actuellement, plus de 380 toxines Cry sont classées en 42 familles en fonction du degré de divergence de leur séquence peptidique ([Crickmore, Zeigler et al. 1998](#)) et 33 gènes codant pour les protéines Cyt ont été séquencés. Une base de données, regroupant l'ensemble des toxines Cry et Cyt, est disponible et a été mise à jour en 2020 ([Crickmore, Berry et al. 2020](#)). Cette variété remarquable des toxines est due, en grande partie, à une importante plasticité génétique. En effet, la plupart des gènes codant pour les toxines Cry sont portés par des plasmides, certains conjugatifs ([Gonzalez, Brown et al. 1982](#)), ([Gonzalez, Dulmage et al. 1981](#)) et sont souvent flanqués par des éléments transposables. Ces propriétés facilitent le transfert des gènes entre les souches de *B. thuringiensis* et participent à la mobilité et la variété des gènes plasmidiques codants pour les toxines Cry ([Kronstad and Whiteley 1984](#)), ([Gonzalez, Dulmage et al. 1981](#)). Certaines souches de *B. thuringiensis* sécrètent également des protéines à activité insecticide comme les « Vegetative Insecticidal Proteins » (Vip) produites au cours de la phase exponentielle de croissance et qui causent des symptômes similaires à ceux produits par les protéines Cry ([Palma, Munoz et al. 2014](#)). Des protéases, des chitinases et d'autres

variétés d'enzymes qui peuvent participer au pouvoir pathogène de la bactérie sont aussi secrétées par la majorité des souches de *B. thuringiensis*.

E. Rôle des plasmides et des gènes qu'ils hébergent dans l'adaptation bactérienne

Les plasmides jouent un rôle important dans le dynamisme et l'évolution du génome bactérien suite à la perte ou au gain de gènes plasmidiques dit « accessoires » ou bien à la perte ou l'acquisition de nouveaux plasmides par la bactérie ([Ochman, Lawrence et al. 2000](#)). Les gènes portés par les plasmides, ne sont pas essentiels au fonctionnement cellulaire et à la viabilité de la bactérie. Cependant, ils constituent, avec les plasmides qui les portent, un outil d'adaptation de la bactérie à son environnement et par conséquent, une source potentielle de diversité phénotypique qu'on observe clairement au sein du groupe *cereus*. Ces gènes peuvent coder pour des protéines impliquées dans certaines fonctions cellulaires, comme la production d'enzymes de dégradation ([Gogarten, Doolittle et al. 2002](#)) ou dans le *Quorum Sensing* (QS) ([Kalamara, Spacapan et al. 2018](#)). D'où l'importance du transfert horizontal par les plasmides de gènes, conférant aux bactéries hôtes de nouvelles propriétés physiologiques leur permettant, par exemple, d'envahir une nouvelle niche écologique, ou de leur offrir un avantage adaptatif dans une niche nouvelle ([Cohan and Koeppl 2008](#)).

B. thuringiensis possède un contenu plasmidique très varié ([Lereclus, Lecadet et al. 1982](#)). En effet, le matériel génétique extra chromosomique de cette espèce représente une fraction importante du génome total (les plasmides par leurs tailles constituent 11,2% du génome total de *B. thuringiensis*), supérieure à celle des espèces *cereus* (4,2%) ou *anthracis* (4,75%) ([Fayad, Kallassy Awad et al. 2019](#)). L'étude menée par Gillis *et al.* ([Gillis, Fayad et al. 2018](#)) du contenu plasmidique de souches de *B. thuringiensis sv. israelensis* décrit la présence de plusieurs plasmides, de tailles différentes, dont des plasmides conjugatifs. La conservation de ce pool plasmidique, au sein des souches de *B. thuringiensis sv. israelensis*, est probablement due au développement et à l'adaptation de ces souches au cycle de vie de leurs hôtes, les diptères ([Patino-Navarrete and Sanchis 2017](#)). De plus, la souche *Bacillus thuringiensis* serovar *kurstaki HD73* possède un système de Quorum Sensing, nommé Rap-Phr, codé par des gènes, *rap8-phr8* et *rap63-phr63* présents, respectivement, sur les plasmides pHT 8-1 et pAW63 de cette bactérie et qui régulent son processus de la sporulation dans le cadavre des larves d'insectes ([Cardoso,](#)

[Fazion et al. 2020](#)). La délétion des deux gènes *phr63* et *phr8* diminue, d'une façon plus importante, le taux de sporulation de la bactérie, par comparaison à l'effet de la délétion de chacun des gènes *phr*. Malgré des similitudes au niveau des séquences de Phr63 et Phr8, il n'existe pas de cross-talk entre les deux systèmes. Ces derniers agissent probablement en synergie pour réguler le processus de sporulation de *B. thuringiensis* à la fin de son cycle infectieux dans les insectes. De plus, au niveau du groupe *cereus*, et principalement chez *B. thuringiensis*, 30% des gènes *rap-phr* identifiés sont portés par des plasmides. Malgré une grande variabilité de leurs séquences, il existe une association importante entre des souches apparentées et leur profil Rap-Phr. L'analyse de la conservation des résidus impliqués dans l'activité de la phosphatase RapH, prédit que 32% des protéines Rap régulent probablement la sporulation en inhibant la phosphorylation de Spo0F. Ces protéines Rap sont, de préférence, situées sur des plasmides. L'importante distribution et la diversité des systèmes Rap-Phr affirment qu'ils sont, en majorité, impliqués dans la régulation de la sporulation et met en évidence le rôle des plasmides dans l'adaptation des bactéries dans leur niche écologique. ([Cardoso, Perchat et al. 2019](#)).

Par ailleurs, deux gènes portés par le plasmide pGI1 de la souche *Bacillus thuringiensis* H1.1, codent potentiellement pour un système toxine-antitoxine. Le gène codant la toxine présente des homologies avec celui codant pour la toxine Doc (pour Death on curing) du système toxine-antitoxine *phd-doc* présent chez *E. coli*. Ce système de *B. thuringiensis* H1.1 est nommé *tasA-tasB* (pour *thuringiensis* addiction system) de par sa composition : une toxine TasB stable, cytotoxique pour la cellule et une antitoxine TasA qui interfère avec l'action létale de la toxine TasB. Lorsque le plasmide est présent dans la bactérie, la toxine et l'antitoxine sont produites de façon continue et l'antitoxine inhibe l'activité de la toxine. Lors de la division cellulaire, au moment de la ségrégation, la bactérie qui perd le plasmide ne produit plus les deux protéines, et l'antitoxine résiduelle dans la bactérie n'est plus renouvelée et sera alors dégradée par une protéase, ce qui a comme conséquence, l'induction de la mort cellulaire de la bactérie, par la toxine résiduelle qui est plus stable. Ainsi, la présence du plasmide et donc du système (TasAB), permet à celui-ci d'assurer son maintien au sein de la communauté bactérienne. L'expression des gènes des systèmes toxine-antitoxines TA sont activés en réponse à des conditions de choc thermique que subit la bactérie. Les systèmes TA sont donc des mécanismes potentiels de réponse au stress utilisés par de nombreuses espèces. Des études suggèrent qu'ils sont

particulièrement avantageux aux microorganismes exposés à de nombreuses variations environnementales ([Fico and Mahillon 2006](#)).

En plus des plasmides, des éléments génétiques mobiles, comme les transposons, sont décrits comme ayant un rôle important dans la plasticité génétique. Le transfert de gènes, par transposition, entre plasmides ou entre un plasmide et chromosome, en plus de la présence de plasmides mobilisables d'une souche –ou d'une espèce– à une autre, reflète le dynamisme du génome bactérien et son importance dans l'adaptation, l'évolution et la survie de la bactérie([Gillis, Fayad et al. 2018](#)).



FIGURE 1 Observation de spores et des cristaux de *B. thuringiensis* par microscopie électronique à balayage ([PALMA, MUNOZ ET AL. 2014](#)).

F. Le biofilm produit par *B. thuringiensis/cereus*

Les espèces du groupe *Bacillus cereus* sont capables de former des biofilms dans son milieu naturel et dans les industries agroalimentaires, au niveau des surfaces en contact avec les aliments. Le biofilm de ces espèces pourrait se développer sur les surfaces de plusieurs machines comme les pasteurisateurs, les outils de nettoyages et aussi dans les réservoirs de stockage. En fonction des espèces, des biofilms sont aussi détectés dans les salles climatisées, à basse température, pour la conservation des aliments ([Christison, Lindsay et al. 2007](#)). De plus, la sporulation dans un biofilm de *B. cereus sensu stricto* a été décrite et peut atteindre un taux très élevé en fonction des conditions. En effet, le pourcentage de spores peut atteindre 90% des cellules d'un biofilm de *B. cereus* ([Wijman,](#)

[De Leeuw et al. 2007](#)) ([Faille, Benezech et al. 2014](#)). Lorsque les conditions sont favorables, la spore, très résistante, peut germer à nouveau et participe à l'essaimage d'un biofilm mature et peut donc former un nouveau biofilm. Grâce à ces propriétés, *Bacillus cereus* peut persister durablement sur les surfaces des industries agroalimentaires. De plus, des biofilms multi-espèces sont détectés au niveau de ces surfaces. Le biofilm multi-espèce est un avantage pour les espèces (parfois des pathogènes humains) qui sont incapables de produire elles-mêmes des biofilms, puisqu'elles intègrent un biofilm préformé et persistent dans leur environnement.

Les souches de *B. cereus/thuringiensis* peuvent former des biofilms immergés mais également des biofilms au niveau d'une interface air/liquide, en condition statique dans des tubes en verre ([Wijman, De Leeuw et al. 2007](#)) (Figure 2). Ce biofilm est composé de deux structures : une pellicule flottante, qui couvre toute la surface du milieu à l'interface, et un anneau, très adhérent sur la paroi du tube ([Fagerlund, Dubois et al. 2014](#)). Nous avons récemment montré que la sporulation est précoce dans l'anneau par rapport à la pellicule. L'anneau, au niveau de la paroi du tube, est plus résistant aux procédures de nettoyage physique ou chimique. Il constitue alors la partie persistante du biofilm et représente une source de recontamination au niveau des surfaces industrielles ([El-Khoury, Majed et al. 2016](#)).



FIGURE 2 Biofilm de *Bacillus thuringiensis* en surface air/liquide.

(A) Vue latérale du biofilm en tube en verre.

(B) Vue de haut du biofilm en microplaque.

(C) Séparation de l'anneau et de la pellicule du biofilm en tube en verre.

Chapitre II : Les biofilms

A. Définition et généralités

Bien que la culture bactérienne en milieu liquide ait été essentielle pour l'étude et la découverte de plusieurs facettes de la physiologie bactérienne, la suspension cellulaire planctonique en culture pure est rarement l'état dans lequel les microorganismes existent dans la nature ([Davey and O'Toole 2000](#)). Les bactéries sont capables d'adhérer à une multitude de surfaces et forment des communautés caractérisées par une architecture complexe, que l'on désigne par biofilm ([Costerton, Lewandowski et al. 1995](#)). Ce mode de vie est observé, pour la première fois, par Van Leeuwenhoek (1632-1723), puis par ([Heukelekian and Heller 1940](#)) et par ([Zobell 1943](#)) qui observent un nombre de bactéries plus élevé au niveau des surfaces que dans le milieu de culture environnant. En 1981 apparaît le terme 'biofilm' dans son sens moderne, appliqué aux communautés microbiennes ([McCoy, Bryers et al. 1981](#)). Depuis, le nombre de publications relatives à ces communautés microbiennes augmente de façon exponentielle.

Par définition, un biofilm est un assemblage de microorganismes englobés dans une matrice constituée des substances polymériques extracellulaires « EPS » sécrétée par les cellules elles-mêmes. Les bactéries peuvent appartenir à la même espèce ou à des espèces différentes, donnant naissance à des biofilms mono- ou multi-espèces, ce dernier étant prédominant dans la nature. Le développement des techniques d'imagerie et de microscopie ont permis de visualiser une organisation complexe des bactéries dans un biofilm plutôt qu'un entassement aléatoire des cellules. Ainsi, et en fonction des conditions, les bactéries d'un biofilm vivent dans des microniches et profitent d'un milieu homéostatique, avec un accès important à l'oxygène et aux nutriments, favorisé par un système de circulation grâce à la présence de canaux élémentaires dans le biofilm ([Dunne 2002](#)). Ce mode de vie est donc une réponse adaptative des bactéries qui favorise leur persistance dans l'environnement. La présence d'une matrice protège les cellules sessiles des nombreux défis environnementaux tels que la dessiccation, les agents biocides ou les réponses immunitaires innées et acquises de l'hôte ou bien un appauvrissement en

nutriments([Rieu, Aoudia et al. 2014](#)). Par exemple, la matrice présente une capacité de sorption passive, qui influe les échanges de nutriments, de gaz et d'autres molécules entre le biofilm et le milieu extérieur([Billings, Birjiniuk et al. 2015](#)). De plus, en cas de lyse cellulaire, les débris cellulaires, retenus dans le biofilm, sont cannibalisés par les bactéries vivantes. Ceci est observé dans les biofilms de *B. subtilis*, où l'ADN du lysat cellulaire est utilisé comme source de phosphore, de carbone et d'énergie([Pinchuk, Ammons et al. 2008](#)). La matrice protège de la dessiccation grâce aux polymères extracellulaires hydratés de la matrice, qui agissent comme une éponge et piègent les molécules d'eau dans le biofilm. *B. subtilis* produit la protéine BlsA qui forme un film hydrophobe autour du biofilm et renforce sa capacité à supporter la dessiccation ([Flemming and Wingender 2010](#)).

Le biofilm est également le siège d'échanges de signaux cellulaires conduisant à l'émergence de caractères sociaux tels que la coordination et la coopération des cellules sessiles ([Boles and Horswill 2012](#)). La structure complexe du biofilm crée des communautés bactériennes ayant un profil d'expression génétique différent. La localisation des bactéries, au sein d'un même biofilm, dans des microenvironnements différents, affecte l'expression génétique des bactéries et donne naissance à l'hétérogénéité phénotypique observée dans un biofilm ([Vlamakis, Aguilar et al. 2008](#), [Verplaetse, Slamti et al. 2015](#)).

B. Formation du biofilm

Les travaux antérieurs réalisés sur les biofilms de *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens*, et *Pseudomonas aeruginosa* ont permis de définir un modèle général de la formation d'un biofilm (([O'Toole, Kaplan et al. 2000](#)) ([O'Toole and Kolter 1998](#)) ([Watnick and Kolter 1999](#)) ([Watnick, Lauriano et al. 2001](#)).

Le passage de la bactérie de l'état individuel à une communauté bactérienne structurée se fait par trois étapes essentielles : l'adhésion sur une surface naturelle ou synthétique, la maturation du biofilm et l'essaimage des bactéries sessiles pour coloniser d'autres surfaces (Figure 3).

a) L'adhésion des bactéries : l'étape initiatrice

Cette étape est essentielle pour initier la formation du biofilm. En effet, les premières bactéries, dites 'pionnières', qui adhèrent sur la surface, facilitent le recrutement des bactéries planctoniques lors du développement du biofilm. Elle est importante dans le cas des biofilms multi-espèces, sachant que certaines espèces sont incapables d'adhérer sur des surfaces et dépendent de l'adhésion initiale des bactéries pionnières ([Kolenbrander, Palmer et al. 2010](#)).

La surface peut être biotique (tissus animaux ou végétaux) ou abiotique (particules colloïdales du sol, sable et pierres dans les cours d'eau, équipements des industries agroalimentaires et pétrolières, pharmaceutiques, lentilles de contact, différents types d'implants médicaux et dispositifs transcutanés).

L'adhésion dépend, d'une part du conditionnement, de la charge, de l'hydrophobicité, de la rugosité, de la microtopographie de la surface, et d'autre part des propriétés de surface de la bactérie([Carpentier and Cerf 1993](#)). Elle se fait en deux étapes :

- **L'adhésion réversible ou l'amarrage** : Cette étape prend effet une fois que la bactérie a pu atteindre la surface, soit d'une façon aléatoire, par exemple grâce au mouvement brownien ou suite à la sédimentation, soit d'une façon orientée grâce à la mobilité des bactéries (flagelle) et au chimiotactisme. Elle est gouvernée par des variables physico-chimiques qui définissent l'interaction entre la bactérie et la surface d'intérêt. L'adhésion finale dépend de la somme nette des forces attractives ou répulsives générées entre les deux surfaces. Ces forces primaires incluent les interactions électrostatiques, les interactions de van der Waals, les interactions acide/ base de Lewis et les forces hydrodynamiques ([Carpentier and Cerf 1993](#)). Lors de cette étape, les bactéries peuvent être facilement enlevées par les forces de cisaillement générées par le fluide en mouvement, comme lors du rinçage.
- **L'adhésion irréversible ou la phase d'ancrage** : C'est la phase de consolidation de l'adhésion. Elle s'établit grâce à des éléments de surface de la bactérie (pilis, fimbriae, ...), ou grâce à un contact direct entre la paroi bactérienne et le substrat ou grâce à la sécrétion de molécules qui assurent le lien entre la paroi bactérienne

(où peuvent se trouver par exemple des adhésines) et le substrat. ([Carpentier and Cerf 1993](#)). Les bactéries produisent en plus des exopolymères qui les englobent et les fixent à la surface. À la fin de cette étape des forces physiques ou chimiques beaucoup plus fortes sont nécessaires pour éliminer les bactéries de la surface (raclage, nettoyants chimiques).

b) Maturation du biofilm

Durant cette étape, la monocouche de bactéries croît pour former des macro-colonies. Ce phénomène est initié par :

- Le recrutement des bactéries planctoniques dans le biofilm en cours de formation ([Tolker-Nielsen, Brinch et al. 2000](#))
- Les bactéries toujours mobiles situées au bord des micro-colonies qui vont participer à l'extension de ces micro-colonies sur la surface ([Houry, Briandet et al. 2010](#))
- Par la division cellulaire des bactéries adhérentes au support ([Heydorn, Nielsen et al. 2000](#))

La structure du biofilm est consolidée par la production de la matrice extracellulaire par les bactéries. Elle leur accorde ainsi une protection contre les conditions environnementales. La composition de la matrice extracellulaire diffère selon les espèces formatrices du biofilm, le taux de croissance bactérienne ainsi que le type de surface colonisée. La structure du biofilm semble être largement dépendante de la production des polymères de la matrice extracellulaire (EPS), celle-ci servant de soutien structurel pour le biofilm. Bien que cette structure soit clairement influencée par certains facteurs biologiques comme la mobilité bactérienne ou la signalisation cellulaire, d'autres facteurs comme l'environnement physique (par exemple les conditions hydrodynamiques) peuvent également jouer un rôle important dans la mise en place de la structure du biofilm. Lorsque le biofilm atteint une masse critique, un équilibre dynamique s'établit au cours duquel la couche la plus éloignée de la surface peut émigrer sous forme de bactéries planctoniques([Stoodley, Sauer et al. 2002](#)).

c) L'essaimage : retour au mode planctonique

C'est l'étape finale dans le cycle de vie du biofilm, les bactéries se détachent des macrocolonies. C'est un processus complexe qui peut impliquer divers signaux de dispersion. Cette étape peut-être :

- Passive : La dispersion est due à l'action de forces extérieures comme les forces hydrodynamiques, des perturbations de la concentration de nutriments, du niveau d'oxygène ou de température.
- Active : La dispersion est due à des facteurs propre au biofilm. Il peut s'agir de la production de molécules du *quorum sensing* et de surfactants extracellulaires tels que les rhamnolipides (qui diminuent l'adhésion cellule-cellule et cellule-matrice).

Il existe aussi des interactions entre espèces aboutissant à des compétitions ou à du parasitisme qui induisent le détachement, ou la mort , d'une espèce initialement présente dans le biofilm (([Houry, Gohar et al. 2012](#)), ([Boles and Horswill 2012](#)), ([McDougald, Rice et al. 2011](#)))

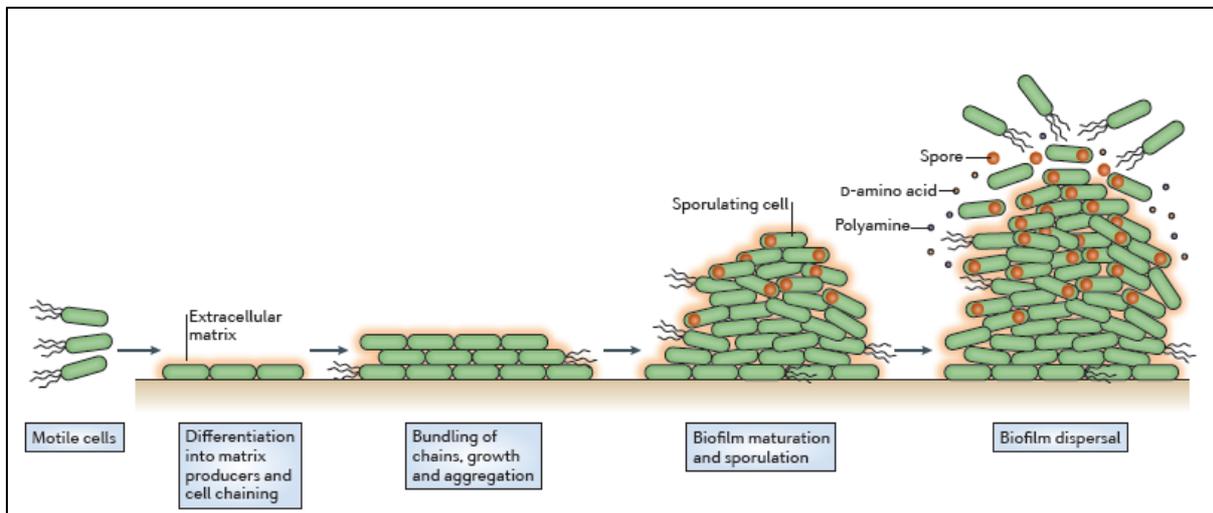


FIGURE 3 Schéma illustrant les étapes principales de formation d'un biofilm de *Bacillus subtilis* sur une surface abiotique ([VLAMAKIS, CHAI ET AL. 2013](#))

C. La pellicule : un biofilm sur une interface air/liquide

Dans la nature, les bactéries sont capables de former des biofilms sur plusieurs interfaces :

- Liquide –air ou solide-air-liquide, formant une pellicule.
- Solide-liquide, donnant naissance à des biofilms en immersion.

La formation de la pellicule, en interface air/liquide, a été décrite chez plusieurs bactéries Gram positif/négatif. Elle s'établit en plusieurs étapes : à un temps précoce, une fine couche de cellules apparaît sur l'interface air/liquide, produite soit à partir des bactéries présentes sur la paroi du récipient, soit par la prolifération de groupes de cellules localisées à la surface, et qui s'étend sur la totalité de l'interface. Ensuite, on observe à l'œil nu une structure tridimensionnelle, due au développement et à l'épaississement du biofilm (([Lemon, Earl et al. 2008](#)) ([Branda, Gonzalez-Pastor et al. 2001](#)), ([Armitano, Mejean et al. 2014](#)), ([Armitano, Mejean et al. 2013](#))). L'essaimage de la pellicule a lieu lorsque les bactéries s'échappent du biofilm mature à cause du manque de nutriments ([Vlamakis, Chai et al. 2013](#)).

La formation de la pellicule dépend essentiellement de la production de la matrice extracellulaire ([Abee, Kovacs et al. 2011](#)). Cependant, d'autres éléments, comme la mobilité, la chimiotaxie et l'aérotaxie, sont aussi importants pour le déplacement et l'orientation des bactéries vers l'interface air-liquide pour former le biofilm ([Lemon, Higgins et al. 2007](#)) ([Armitano, Mejean et al. 2013](#)).

Les mécanismes moléculaires impliqués dans les étapes précoces de la formation de la pellicule, comme la migration et le maintien des bactéries planctoniques à la surface du milieu de culture, ou le recrutement de celles-ci dans le biofilm, sont assez peu caractérisés. Ces étapes seront détaillées dans les paragraphes ci-dessous.

- **Migration des bactéries planctoniques à l'interface air/liquide.**

Selon les espèces et les conditions de culture, plusieurs facteurs, comme la nage bactérienne, la chimiotaxie et l'aérotaxie affectent la formation de la pellicule. Cette partie sera reprise en détail dans le chapitre III.

La mobilité/nage bactérienne : La formation de biofilm et la mobilité sont considérés comme étant des éléments opposés, sachant que les cellules en mode biofilm sont immobiles. En effet, la transcription des gènes requis pour la formation du biofilm et ceux pour la mobilité sont inversement régulés lorsque la bactérie bascule de l'état planctonique à l'état biofilm ([Guttenplan, Blair et al. 2010](#)). Par exemple, lors des étapes précoces de formation d'une pellicule par *B. cereus* et *B. subtilis*, la nage est nécessaire pour permettre aux bactéries d'atteindre l'interface. En effet, un mutant *fla*, dépourvu de flagelles est incapable de migrer vers la surface pour former une pellicule ([Holscher, Bartels et al. 2015](#)) ([Houry, Briandet et al. 2010](#)). Les espèces *Listeria monocytogenes*, *Shewanella oneidensis* et *Pseudomonas aeruginosa*, montrent aussi un défaut, ou un retard, dans la formation de la pellicule lorsque des gènes impliqués dans la synthèse du flagelle sont inactivés ([Guttenplan, Blair et al. 2010](#)) ([Liang, Gao et al. 2010](#)). Cependant, le mouvement Brownien ou la flottabilité peuvent influencer la présence des bactéries à proximité de l'interface air/liquide lors de la phase d'initiation à la formation du biofilm. Par exemple, lorsque la densité bactérienne est assez élevée dans le milieu, les bactéries flottantes et se trouvant à proximité de l'interface peuvent initier la formation du biofilm, sans avoir besoin de nager vers la surface ([Holscher, Bartels et al. 2015](#)). Chez *B. subtilis*, la protéine 'clutch' EpsE, agit sur le rotor du flagelle pour inhiber la mobilité. EpsE est codé à partir du gène *epsE* de l'opéron *eps*, qui est impliqué dans la formation des exopolysaccharides (EPS) de la matrice du biofilm. Cette protéine possède des similitudes au niveau de sa séquence avec la famille des glycosyltransférases impliquées dans la biosynthèse des EPS. Elle possède donc un rôle bifonctionnel, agissant à la fois comme glycosyltransférase pour former les EPS et comme une protéine 'clutch', qui se lie à la protéine FliG au niveau du moteur du flagelle, pour inhiber la mobilité et pour stabiliser le biofilm. ([Guttenplan, Blair et al. 2010](#)).

La chimiotaxie bactérienne : Les bactéries peuvent aussi se diriger vers la surface d'une manière orientée. Il s'agit du chimiotactisme : des signaux extracellulaires sont perçus par des récepteurs membranaires en relation avec l'appareil flagellaire. ([Krell, Lacal et al. 2011](#)). Ces signaux peuvent être des nutriments ou des molécules produites par des cellules localisées à la surface.

L'aerotaxie : L'interface air-liquide est un environnement favorable pour les bactéries aérobies, puisque la concentration en oxygène y est plus élevée que dans zones plus profondes du milieu de culture. Pour l'espèce *Shewanella oneidensis*, la présence d'oxygène est vitale pour la formation de la pellicule. D'une façon similaire à la chimiotaxie, les bactéries orientent leur mouvement vers la surface grâce à la présence du gradient d'oxygène ([Armitano, Mejean et al. 2013](#))

a) Recrutement des bactéries planctoniques dans un biofilm

Le développement du biofilm résulte de la division des cellules engagées dans la formation de biofilm, et du recrutement des cellules planctoniques dans ce dernier. Lorsque les bactéries immigrantes parviennent au contact du biofilm, elles vont interagir, d'une façon transitoire ou durable, avec celui-ci.

Les bactéries planctoniques peuvent interagir soit avec les cellules du biofilm, soit avec les éléments de sa matrice extracellulaire ou bien répondre à l'environnement chimique du biofilm, par exemple des molécules du Quorum Sensing.

1. Les interaction cellules/cellules

Ces interactions conduisent à une liaison entre les cellules à travers des composants membranaires, par exemple des protéines, ou des protéines et des sucres.

- **Interaction protéine/protéine :**

La famille des protéines Bap (Biofilm associated protein) sont des protéines de surface et constituent un groupe de protéines partageant des caractéristiques structurales et fonctionnelles communes. Elles sont essentielles pour la formation du biofilm chez différentes espèces bactériennes à Gram-positives et à Gram-négatives, comme *Streptococcus parasanguinis* FW213 (BapA1) *Pseudomonas putida* (mus20), *Burkholderia cepacia* (Bap), et *Enterococcus faecalis* (Esp) ([Huber, Riedel et al. 2002](#))([Hinsa, Espinosa-Urgel et al. 2003](#)) ([Liang, Chen et al. 2011](#))

La première protéine de ce groupe (Bap) a été identifiée chez *S. aureus* et décrite comme étant responsable de l'adhésion intercellulaire. Cette adhésion requiert une interaction Bap-Bap. Pour certaines souches de *Staphylococcus aureus*, la présence de cette protéine est même suffisante pour former des biofilms en absence de production d'exopolysaccharides ([Cucarella, Tormo et al. 2004](#)). Chez *Salmonella enterica serovar enteritidis*, la présence de BapA à la surface des cellules est nécessaire pour le maintien des bactéries au sein de la pellicule du biofilm ([Latasa, Roux et al. 2005](#)) ([Latasa, Solano et al. 2006](#)). Les fimbriae (appendices protéiques extracellulaires) et plusieurs adhésines sont aussi impliqués dans les interactions cellule-cellule, notamment dans les biofilms multiespèces ([Kolenbrander, Palmer et al. 2010](#)).

- **Interaction protéine /sucre**

Ce sont des interactions entre une lectine (glycoprotéine) et un récepteur (sucre) présents à la surface de deux cellules bactériennes.

En milieu aquatique, il existe des interactions de type lectine-sucre permettant la coagrégation de bactéries aboutissant à la formation des biofilms. Cette coagrégation a lieu entre des bactéries d'une même espèce ou bien entre espèces différentes. Ces liaisons sont médiées par des interactions entre les protéines et les polysaccharides présents à la surface bactérienne. Certaines espèces sont même capables de se lier à plusieurs espèces différentes. Par exemple, l'espèce *Blastomonas natatorial 2.1* est capable d'agréger avec 18 autres espèces aquatiques. *B. natatorial 2.1* pourrait jouer le rôle de 'bridge organism' entre les colonisateurs primaires et secondaires lors du développement des biofilms

aquatiques, un rôle analogue à celui de *F. nucleatum* lors de la formation de la plaque dentaire, un autre exemple de biofilm multi-espèce. Au niveau moléculaire, la liaison entre *B. natatoria 2.1* et *Sphingomonas sp. 2.10* a lieu entre un récepteur polysaccharidique à la surface de *B. natatoria* et une adhésine à la surface de *Sphingomonas sp.* Ce même récepteur est capable de se lier à différentes adhésines à la surface d'autres bactéries comme *Methylobacterium sp. 2.9*. De plus, *B. natatoria 2.1* possède également des adhésines qui peuvent se lier à des récepteurs polysaccharidiques d'autres espèces aquatiques, lors de la formation d'un biofilm (Rickard, Gilbert et al. 2003) (Figure 4).

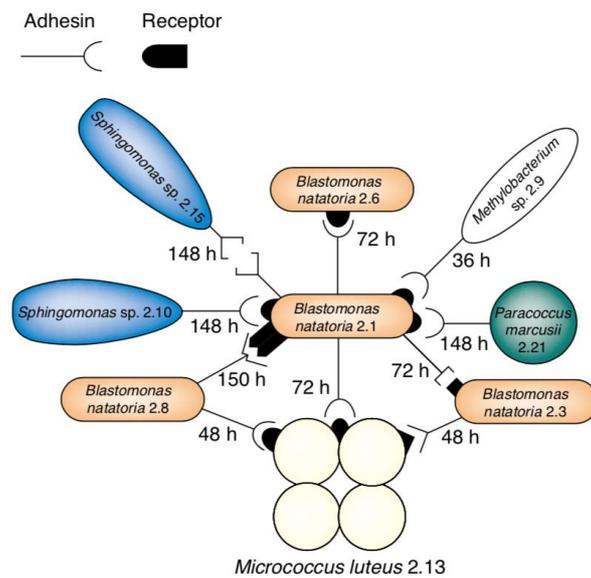


FIGURE 4 Représentation schématique de la coagrégation inter- et intra-espèces entre bactéries aquatiques. Les interactions sont représentées sous forme de tige pour les protéines adhésines et sous forme de bloc noir pour les récepteurs polysaccharidiques. La co-agrégation entre *Sphingomonas sp. 2.15* et *B. natatoria 2.1* est médiée par les deux adhésines de surface. *B. natatoria 2.1* est capable de se lier, par ses récepteurs polysaccharidiques ou bien ses adhésines de surface, à plusieurs autres microorganismes (Rickard, Gilbert et al. 2003).

2. Les interactions cellules/matrice

Les cellules planctoniques peuvent également interagir avec les composants de la matrice extracellulaire comme les protéines ou les exopolysaccharides.

- **Les protéines amyloïdes**

Les fibres amyloïdes sont présentes chez les espèces bactériennes à Gram négative ou à Gram positives, elles représentent le composant protéique majoritaire de la matrice du biofilm. Chez *E. coli* ou *Salmonella*, elles forment les curli qui interagissent avec les exopolysaccharides de la matrice du biofilm ([Chapman, Robinson et al. 2002](#)). Les curli sont un assemblage de fibres amyloïdes, attachées à la surface bactérienne. A travers leur interaction avec les exopolysaccharides de la matrice, elles assurent l'intégrité et la forte cohésion du biofilm. La protéine TasA de *Bacillus subtilis* produit des fibres amyloïdes au niveau de la matrice du biofilm et contribue à son intégrité et à sa robustesse. La polymérisation de monomères de protéines amyloïdes en complexes de fibre amyloïdes insolubles nécessite, dans certains cas, l'activité de protéines accessoires. Chez *B. subtilis*, TasA est ancrée au peptidoglycane puis polymérisée grâce à la protéine accessoire TapA (pour TasA anchoring/assembly protein) ([Romero, Aguilar et al. 2010](#)).

Les espèces *B. cereus*, *B. thuringiensis* et *B. anthracis* produisent CalY, une protéine bifonctionnelle : En phase stationnaire tardive, cette protéine est sécrétée, c'est la protéine qui ensuite polymérise et forme le constituant protéique de la matrice participe au maintien de la matrice du biofilm. A un temps plus précoce de la phase stationnaire, CalY est localisée à la surface de la bactérie, fonctionne comme une adhésine pour les hémocytes de l'insecte *Galleria mellonella*, et joue un rôle dans la virulence contre les larves de cet insecte ([Candela, Fagerlund et al. 2019](#)).

- **Les polysaccharides**

Les exopolysaccharides sont les constituants majeurs de la matrice, ils assurent la stabilité mécanique du biofilm. Chez *S. aureus* et *S. epidermidis*, l'agrégation et l'adhésion cellulaire sont facilitées par la présence d'exopolysaccharides ([Gotz 2002](#)) ([Vanningelgem, Zamfir et al. 2004](#)). Chez *B. subtilis*, la délétion du locus *eps* responsable de la production des exopolysaccharides de la matrice du biofilm induit une perte de l'architecture de la pellicule formée à l'interface air-liquide ([Branda, Chu et al. 2006](#)). En effet, lors de la formation d'une pellicule chez *B. subtilis*, la délétion du gène *epsH*, codant pour une enzyme de la biosynthèse des exopolysaccharides (EPS), inhibe la formation d'un

regroupement ou d'un 'cluster' des chainettes cellulaires à la surface du milieu ([Branda, Gonzalez-Pastor et al. 2004](#)). D'autre part, la délétion de *SigX*, un régulateur impliqué dans la modification de l'enveloppe bactérienne, inhibe également la formation de la pellicule. Ces résultats indiquent que des éléments présents au niveau de l'enveloppe cellulaire sont essentiels pour fixer la matrice extracellulaire autour de la bactérie lors du développement du biofilm ([Kobayashi 2007](#)). Les lectines, sécrétées dans le milieu ou bien associées à la surface bactérienne, interagissent avec les polysaccharides de la matrice de *Pseudomonas aeruginosa*. Lors de la formation de biofilm par cette bactérie, les lectines peuvent agir sur la réticulation des brins polysaccharidique pour assurer la cohésion de la matrice. Celles qui sont présentes au niveau de la surface des bactéries planctoniques permettent leur ancrage aux polysaccharides de la matrice, et donc leur intégration dans le biofilm ([Borlee, Goldman et al. 2010](#)), ([Kirkeby, Hansen et al. 2006](#)), ([Azakami, Nakashima et al. 2006](#)) ([Tielker, Hacker et al. 2005](#)).

- **L'ADN extracellulaire (ADNe)**

L'ADNe est présent dans la matrice du biofilm d'espèces comme *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus intermedius*, *Streptococcus mutans*, *Enterococcus faecalis*, *staphylococci* et *Bacillus cereus*. Chez *P. aeruginosa*, il a été démontré que l'ADNe était nécessaire pour la mise en place d'un biofilm structuré et pourrait donc jouer un rôle dans les interactions cellule-cellule du biofilm ([Whitchurch, Tolker-Nielsen et al. 2002](#)). Dans le biofilm de *B. cereus*, l'ADNe est présent dans la matrice extracellulaire, et formerait ainsi un film conditionnant qui jouerait le rôle d'adhésines et procurerait une certaine protection contre l'effet des antibiotiques comme par exemple l'actinomycine D. Ce dernier est un antibiotique qui inhibe la transcription en se liant à l'ADN cellulaire ([Vilain, Pretorius et al. 2009](#)).

3. Le quorum sensing

Le *quorum sensing* (QS) est un processus dépendant de la densité cellulaire, qui module la régulation génétique des bactéries, par le biais de la sécrétion de molécules de

signalisation appelées autoinducteurs ([Waters and Bassler 2005](#)). Les bactéries sont capables de détecter une concentration seuil minimale d'autoinducteur ([Davies, Parsek et al. 1998](#)) et en général, ces molécules se lient à des régulateurs transcriptionnels. En réponse, la population bactérienne régule de façon coordonnée l'expression de gènes impliqués dans l'adaptation aux conditions environnementales. Parmi les fonctions dépendantes de ces gènes figurent la sporulation ([Cardoso, Perchat et al. 2019](#)), la compétence ([Okada, Sato et al. 2005](#)), la virulence ([Rutherford and Bassler 2012](#)). Chez *B. cereus/thuringiensis*, deux systèmes de QS affectent le développement des biofilms : le régulateur transcriptionnel PlcR et son peptide signal PapR, et le système LuxS/AI-2 ([Slamti and Lereclus 2002](#), [Slamti and Lereclus 2005](#)); ([Auger, Krin et al. 2006](#)). Le régulateur transcriptionnel pléiotropique PlcR (Phospholipase C Regulator) et le peptide de signalisation PapR régulent l'expression des gènes codant, en majorité, pour des facteurs de virulence ([Rocha-Estrada, Aceves-Diez et al. 2010](#)). Le régulon PlcR comprend plus de 50 gènes codant pour des protéines extracellulaires qui sont impliquées dans la virulence (toxines, la production de nutriments (phospholipases, protéases), ou la survie (bactériocines, transporteurs, consolidation de la paroi cellulaire) ([Gohar, Faegri et al. 2008](#)). L'activation de PlcR dépend de PapR. Le gène codant pour ce peptide est situé en aval du gène *plcR*. L'interaction de PapR avec PlcR permet la fixation de PlcR à la séquence d'ADN cible (la PlcR box) qui elle-même active la transcription des gènes contrôlés par ce régulateur ([Agaisse, Gominet et al. 1999](#)). L'étude phénotypique et l'analyse structurale du complexe PlcR-PapR ont montré que PlcR appartient à la famille des RNPP (Rap/NprR/PlcR/PrgX) ([Declerck, Bouillaut et al. 2007](#)), des régulateurs dépendants du QS chez les bactéries Gram-positives. NprR, est un régulateur transcriptionnel de début de phase stationnaire, activé par le peptide de signalisation NprX. La transcription de NprR est positivement régulée par PlcR, et NprR active la production de kurstakine, un lipopeptide qui favorise la formation des biofilms ([Dubois, Perchat et al. 2013](#)) ([Gelis-Jeanvoine, Canette et al. 2017](#)). PlcR devrait donc, en principe, activer la formation des biofilms. Cependant, l'étude menée par ([Hsueh, Somers et al. 2006](#)), montre que la délétion de PlcR augmente d'un facteur de quatre la quantité de biofilm obtenue en microplaques en polystyrène chez *B. cereus ATCC14579*. Le résultat observé pour cette souche pourrait être due à l'interruption de NprR par un transposon. D'un autre côté, l'autoinducteur AI-2, sécrété par le système, LuxS/AI-2, inhibe la formation des biofilms chez *B. cereus* en favorisant l'essaimage des bactéries présentes dans le biofilm ([Auger, Krin et al. 2006](#)).

b) La plaque dentaire : un modèle de biofilm multi-espèce.

La plaque dentaire est un modèle de biofilm multi-espèce, largement étudié, et qui met en évidence le rôle indispensable du recrutement des bactéries planctoniques dans le développement de certains biofilms (Figure 5). En effet, la constitution de la plaque dentaire est conditionnée, en premier lieu, par l'adhésion de bactéries pionnières, capables d'adhérer au niveau de l'email dentaire conditionné par des sucres (*streptococci* et *actinomyces*), puis du recrutement séquentiel d'espèces colonisatrices secondaires puis tardives. L'ordre de cette succession est rendu possible grâce à des interactions cellule-cellule spécifiques qui induisent la coaggrégation intra-, inter- ou multi-espèce ([Periasamy, Chalmers et al. 2009](#)), ([Hughes, Kolenbrander et al. 1988](#)); ([Kolenbrander 2000](#)).([Kolenbrander, Palmer et al. 2010](#)).

La formation de biofilm multi-espèces est très avantageuse, surtout pour les espèces incapables d'adhérer pour former un biofilm. En effet, elles ont besoin d'interagir avec les espèces pionnières afin de persister sous forme de biofilm ([Klayman, Volden et al. 2009](#)). D'un autre côté, les espèces allogènes recrutées peuvent même envahir un biofilm résident, jusqu'à supplanter les espèces autochtones. Par exemple, il a été démontré que certaines bactéries immigrantes produisent des substances antibactériennes auxquelles la souche du biofilm résident est sensible ([Al-Bakri, Gilbert et al. 2004](#)) ([Houry, Gohar et al. 2012](#)).

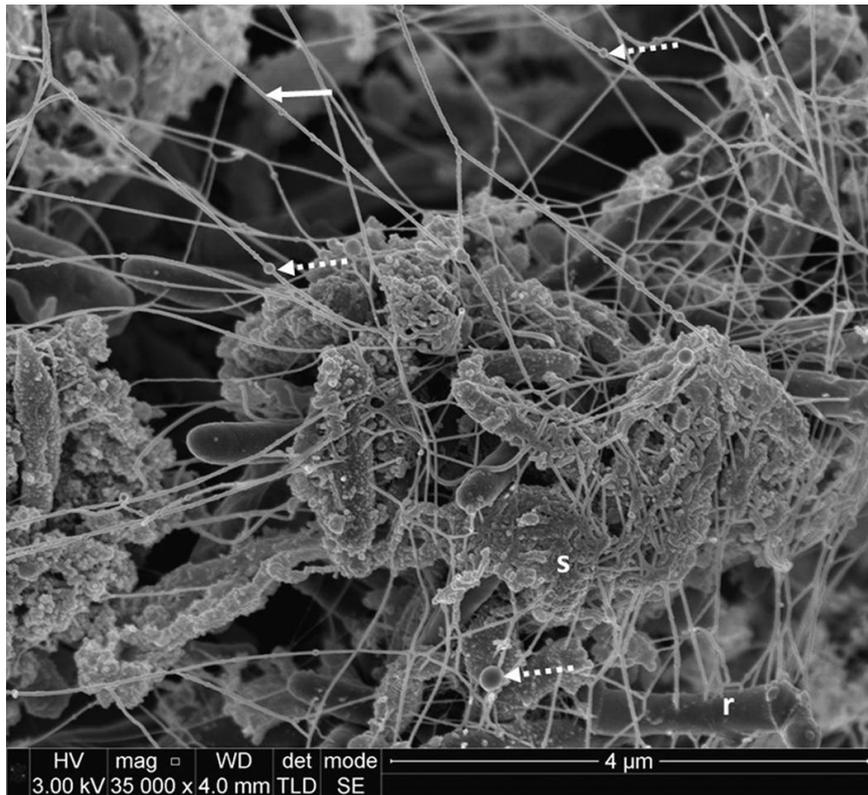


FIGURE 5 Observation par microscopie électronique a balayage de la plaque dentaire sous-gingivale.

Un réseau de matrice extracellulaire est observé dans le milieu (**Flèche pleine**). Des structures arrondies sont visibles sur les composant extracellulaires en forme de brins (**Flèche pointillée**). La matrice est observable sous forme de couche extrapolymerique qui recouvre les bactéries (**s**). Des cellules en forme de bâtonnets (**r**) sont présentes avec des extensions extracellulaires provenant de la surface des bactéries (grossissement $\times 35000$) ([Holliday, Preshaw et al. 2015](#)).

c) Le biofilm mono-espèce.

Contrairement aux biofilms multi-espèces, les mécanismes moléculaires impliqués dans le recrutement des cellules planctoniques dans un biofilm mono-espèce sont moins connus. Les études menées par ([Houry, Briandet et al. 2010](#), [Houry, Gohar et al. 2012](#)) sur la formation du biofilm en flow-cell par *Bacillus cereus*, ont montré que la mobilité est indispensable pour que les bactéries planctoniques puissent pénétrer dans un biofilm. L'intégration dans le biofilm dépend de l'âge du biofilm. Un biofilm âgé de 24 h est capable de recevoir huit fois plus de bactéries planctoniques par rapport à un biofilm de 72 h. L'accroissement de la densité des exopolysaccharides et donc de la viscosité de la matrice, entre 24 h et 72 h, peut expliquer ce résultat ([Houry, Gohar et al. 2012](#)). D'un autre côté, chez *Vibrio cholerae*, la matrice du biofilm possède deux protéines très abondantes Bap1 et RbmA et le polysaccharide VPS. RbmA est sécrété dans la matrice du biofilm. La protéolyse de RbmA promeut le recrutement des cellules planctoniques alors que la

forme non clivée de cette protéine consolide le biofilm par interaction avec les cellules sessiles du biofilm qui présentent à leur surface le polysaccharide VPS ([Smith, Maestre-Reyna et al. 2015](#)).

D. Étude des biofilms au laboratoire

La détection des mécanismes moléculaires impliqués dans la formation de biofilm est possible grâce à de nombreux systèmes expérimentaux développés par les microbiologistes. Le choix du dispositif à utiliser dépend du type de biofilm étudié et des données à analyser ([Azeredo, Azevedo et al. 2017](#)). L'utilisation des microplaques en polystyrène pour former des biofilms est une méthode couramment utilisée (Figure 6). Ce système a été développé pour étudier les mécanismes d'adhésion et par la suite adapté pour étudier la formation des biofilms ([O'Toole and Kolter 1998](#)). Les bactéries sont cultivées dans les puits des microplaques et, à différents temps, ces puits sont lavés pour éliminer les cellules planctoniques, et la biomasse du biofilm, attachée à la paroi des puits, est révélée en utilisant des colorants spécifiques, comme le Crystal Violet ([Djordjevic, Wiedmann et al. 2002](#)). Cependant, la biomasse observée peut être due, en partie, à la sédimentation des bactéries au fond du puit, avant la formation d'un biofilm, qui est ensuite 'recouverte' par la matrice du biofilm immergé formé ultérieurement. Le système Calgary ([Ceri, Olson et al. 1999](#)), permet de remédier à cet artefact. Dans ce cas, la formation du biofilm se fait sur le couvercle, composé de picots, d'une microplaque. Les picots sont insérés dans les puits de cette plaque, qui eux contiennent la suspension bactérienne qui va former le biofilm. Grâce à ces conditions, la sédimentation bactérienne n'est pas prise en compte lors de la formation du biofilm sur les picots. Afin de quantifier la biomasse du biofilm, une sonication est nécessaire pour récupérer les bactéries sessiles des picots. Ceci peut être un facteur limitant, si uniquement une fraction de la population est récupérée ([Edmonds, Collett et al. 2009](#)). Les flow-cells (cellules à circulation) sont des chambres avec un système de circulation et des surfaces transparentes, où des biofilms immergés peuvent se former et être continuellement alimentés en éléments nutritifs et les déchets métaboliques produits peuvent être éliminés (Figure 7). Les biofilms submergés qui se forment sur la lamelle de verre du flow-cell sont observables par microscopie confocale à balayage laser. Ces conditions permettent le suivi, *in situ*, de la structure tridimensionnelle du

biofilm en temps réel, formé par bactéries fluorescentes. Toutefois, ce système de flow-cells peut être lourd et n'est pas facilement adapté pour le criblage d'un grand nombre de mutants, à l'inverse du système Calgary ([Christensen, Sternberg et al. 1999](#)). Malgré l'importante variété de ces outils, les mutants qui présentent un défaut de formation de biofilm dans un dispositif, peuvent avoir une différence indétectable ou ne pas avoir de différence avec la souche sauvage dans un autre dispositif. Toutefois, certains mutants présentent un phénotype reproductible dans tous les systèmes, ce sont principalement les mutants défectueux pour la production de la matrice extracellulaire.

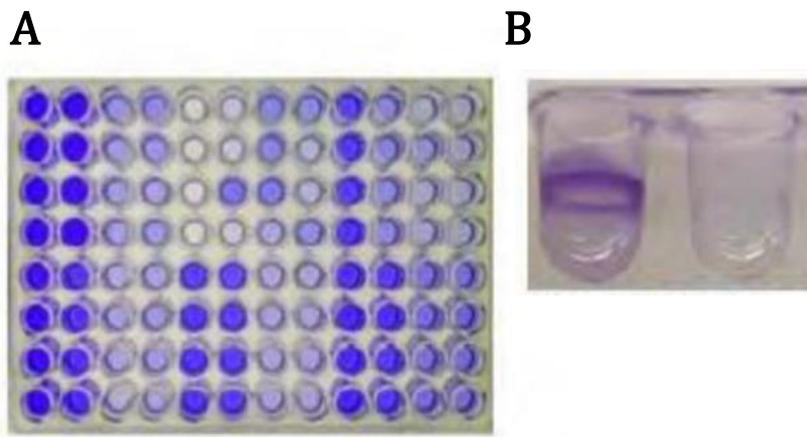


FIGURE 6 Coloration au crystal violet des biofilms formés dans des microplaques de 96 puits.
A- Vue du haut après formation et coloration des biofilms au crystal violet dans des microplaques de 96 puits.
B- Vue latérale du biofilm adhérant sur la paroi des puits (de la thèse BELLIFA Samia, 2014).

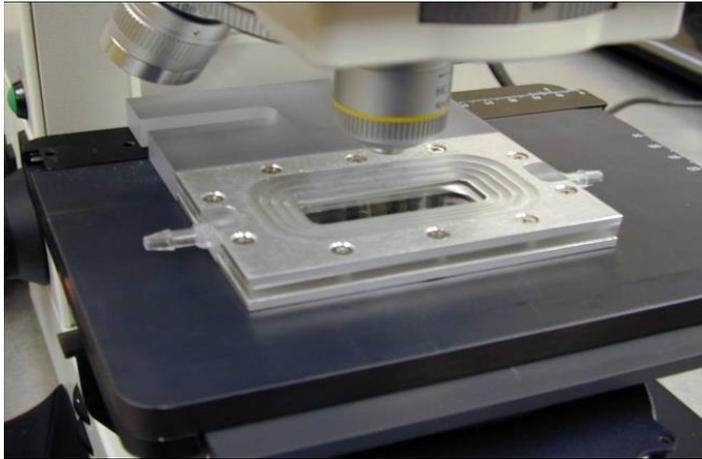


FIGURE 7 Image d'une cellule a circulation (flow-cell), un dispositif utilise pour former des biofilms.

Une cellule à circulation est composée de deux plaques en verre faiblement espacées.

Le milieu de culture et la suspension bactérienne peuvent circuler et être inoculés, à travers des tuyaux, entre les deux plaques.

Le biofilm se forme sur la surface en verre et est observable directement par microscopie.

(de Staff, Center for Biofilm Engineering, Montana State University, Bozeman)

Chapitre III : La mobilité bactérienne.

Dans un environnement défavorable, les bactéries doivent s'adapter rapidement pour assurer leur survie. Une des stratégies adoptées par ces bactéries est 'la migration' vers un milieu plus favorable à leur croissance. Ce phénomène implique des récepteurs sensoriels, des transducteurs de signal et des moteurs moléculaires générant le mouvement des cellules ([Manson 1992](#)). Cette mobilité bactérienne est l'un des phénomènes les plus étudiés en microbiologie.

A la suite des travaux entrepris par J. Henrichsen ([Henrichsen 1972](#)), sur 18 genres bactériens différents, six catégories de mobilité bactérienne ont été définies : le swimming (la nage), le swarming (l'essaimage), le «gliding», le « twitching », le « sliding » et le « darting ».

Une large variété de structures cellulaires sont utilisées par les bactéries pour faciliter ces types de mobilité. Par exemple, le flagelle est impliqué dans les mobilités de type 'swimming' et 'swarming', alors que 'le twitching' exige la présence de pili de type IV ([Mattick 2002](#)). Le sliding / spreading (propagation), à l'inverse des types précédents, est une forme passive de translocation ([Martinez, Torello et al. 1999](#)). Parmi les structures impliquées dans la mobilité, le flagelle est sans doute le plus répandu et le mieux étudié ([Bardy, Ng et al. 2003](#)).

A. La mobilité flagellaire

▪ La nage bactérienne

La nage, en anglais « swimming motility » est un type de mobilité flagellaire des bactéries, qui a lieu dans un milieu liquide ou semi-liquide (maximum 0,3 % d'agar). La bactérie est capable de nager à une vitesse moyenne entre 15 et 100 $\mu\text{m/s}$ ([Bai, Minamino et al. 2012](#)). Cette vitesse dépend des espèces : Chez *E. coli*, la vitesse moyenne de nage en milieu aqueux est de 25 $\mu\text{m/s}$. Chez *Rhodobacter sphaeroides*, elle est de l'ordre de 35 $\mu\text{m/s}$ ([Ping 2012](#)). Des bactéries marines peuvent aller jusqu'à 300 $\mu\text{m/s}$ voire 400 $\mu\text{m/s}$ ([Mitchell, Pearson et al. 1995](#)) ([Locsei and Pedley 2009](#)). Pour le moment, le record de

vitesse est attribué à *Thiovulum majus*, qui mesure entre 5 et 25 µm de diamètre et qui peut aller à une vitesse supérieure à 600 µm/s ([Zhang, Santini et al. 2012](#))

- **L'essaimage**

L'essaimage ou le « swarming motility » est définie comme une mobilité flagellaire en milieu visqueux (maximum 0,7 % d'agar). C'est un processus coordonné d'un groupe de bactéries, d'où l'appellation mobilité en essaim. Lors de l'essaimage, les bactéries subissent une transformation morphologique : en milieu liquide, les cellules sont courtes et présentent quelques flagelles, mais s'allongent et présentent une hyper flagellation en milieu visqueux. La plupart des bactéries utilisent le(s) même(s) flagelle(s) pour la nage et l'essaimage, cependant certaines espèces possèdent des flagelles distincts pour chacun des deux modes de mobilité, comme par exemple des flagelles latéraux inductibles pour le swarming et des flagelles polaires pour le swimming ([McCarter 2004](#)).

- **Disposition des flagelles**

Le nombre et la distribution (arrangement, position) des flagelles sur la surface bactérienne varie entre les espèces (Figure 8):

- L'appareil flagellaire est dit **monotriche** et **polaire** lorsque les cellules ne possèdent qu'un seul flagelle situé à une extrémité ou à proximité d'une extrémité de la cellule, ce qui est le cas de *Vibrio cholerae* ou *Pseudomonas aeruginosa*.
- La flagellation **lophotriche et polaire** se définit par l'existence d'une touffe de flagelles présente à une extrémité de la bactérie, par exemple chez *Helicobacter pylori* et *Vibrio fischeri*;
- La flagellation est qualifiée de **bipolaire** ou **d'amphitriche** lorsque les flagelles sont présents aux deux extrémités de la cellule.
- La flagellation est dite **péritriche** lorsque des flagelles sont disposés sur toute la surface de la bactérie, comme chez *E.coli*, *Salmonella enterica* ou *B. cereus*

([Chevance and Hughes 2008](#)). Le type **péritriche** d'arrangement flagellaire est fréquemment trouvé chez les bactéries pathogènes ([Kirov 2003](#)).

Un nombre limité de bactéries possède un double système de flagelles. Ces deux systèmes sont entièrement distincts et peuvent être exprimés simultanément, Il s'agit des flagelles polaires constitutifs et des flagelles latéraux inductibles (exprimés dans les environnements visqueux et sur les surfaces). Ce double système peut être trouvé chez *Vibrio alginolyticus* ([Kawagishi, Maekawa et al. 1995](#)), *Aeromonas spp.* ([Shimada, Sakazaki et al. 1985](#)) *Azospirillum brasilense* ([Tarrand, Krieg et al. 1978](#)), *Rhodospirillum centenum* *Helicobacter mustelae* ([O'Rourke, Lee et al. 1992](#)).

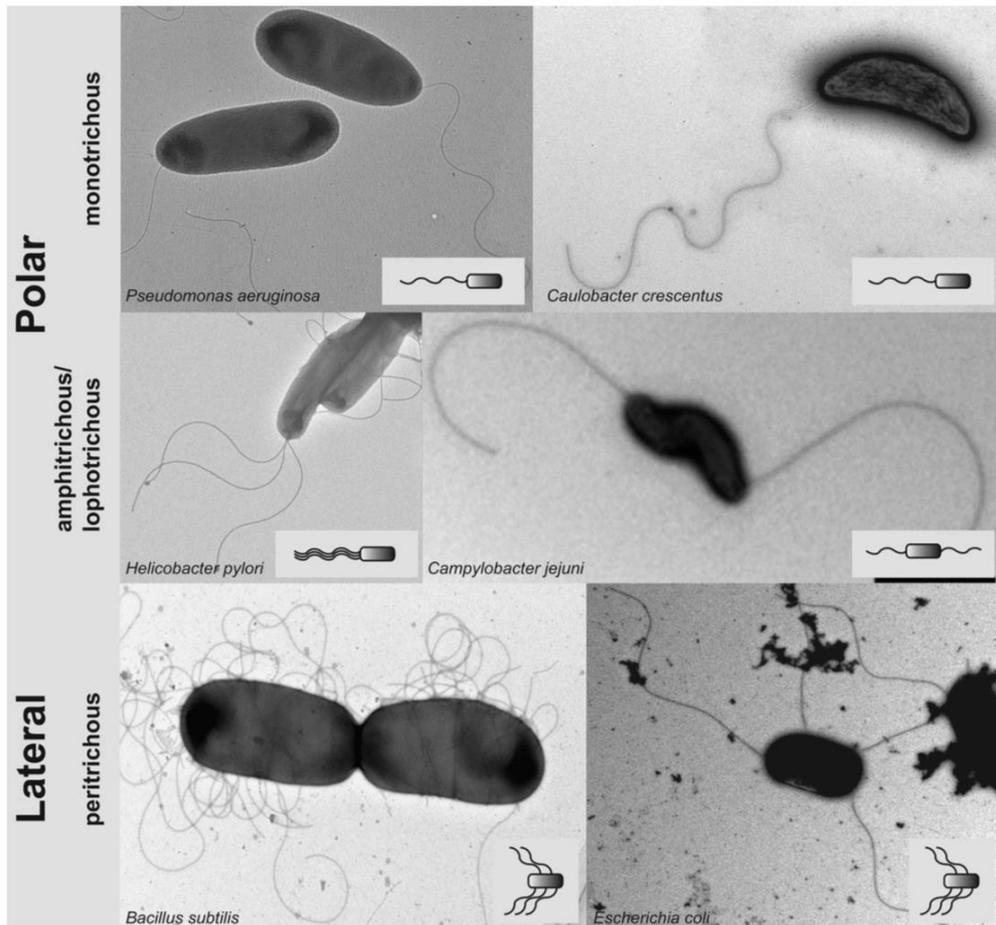


FIGURE 8. Observation par coloration négative par microscopie électronique des différentes dispositions des flagelles.

Le flagelle monotriche de *P. aeruginosa*, et de *C. crescentus*, de la bactérie lophotriche *H. pylori*, la flagellation amphitriche de *C. jejuni* et les bactéries peritriche de *B. subtilis* et *E. coli*. (Un schéma accompagne chaque photographie pour mieux visualiser la localisation de(s) flagelle(s) ([Schuhmacher, Thormann et al. 2015](#)).

B. Biosynthèse et structure du flagelle.

Les flagelles des bactéries Gram- et Gram+ sont identiques pour les éléments essentiels, mais le flagelle des bactéries Gram- traverse la membrane externe qui est absente chez les bactéries Gram+ (Figure 9).

Le flagelle est un assemblage protéique de 3 parties : (a) le corps basal composé d'un cylindre central et d'une série d'anneaux superposés, (b) une structure courte incurvée en crochet et (c) un long filament hélicoïdal ([Imada 2018](#)); ([Liu and Ochman 2007](#)) ([Buttner 2012](#)) (Figure 10)

a) Le corps basal

Le corps basal ancre l'appareil flagellaire dans l'enveloppe bactérienne. Chez *Salmonella typhimurium*, il est composé de quatre anneaux localisés dans ([Aldridge, Karlinsey et al. 2006](#)):

- Le cytoplasme (anneau C)
- La membrane interne (anneau MS)
- Le peptidoglycane (anneau P)
- La membrane externe (anneau L).

Le corps basal renferme le **moteur flagellaire**, qui opère par un mécanisme rotatoire. Il est subdivisé en deux composants majeurs : le rotor réversible, prolongé par un arbre de transmission constitué par la tige, et le stator, qui est une structure immobile.

- **Le rotor réversible**, c'est à dire capable de tourner dans les deux sens, est composé de l'anneau MS et d'un anneau C localisé du côté cytoplasmique de l'anneau MS. L'anneau C est constitué des protéines FliG, liées d'une façon non covalente à l'anneau MS et des protéines FliM et FliN. La protéine FliG génère le mouvement et les protéines FliM et FliN permettent de changer le sens de rotation du moteur, en réponse à des stimuli. Cette réponse nécessite l'interaction entre FliM et des protéines chimiosensorielles appelées « Che » ([Jarrell and McBride 2008](#)) ([Minamino, Imada et al. 2008](#)).

Le stator est composé de quatre copies de la protéine MotA et de deux copies de la protéine MotB ([Berg 2003](#)). Ces protéines sont présentes dans la membrane et entourent les anneaux MS et C. MotB est ancré dans le peptidoglycane grâce à un peptidoglycan-binding domain, ce qui maintient le stator en place pendant que MotA interagit avec FliG pour induire le mouvement et produire l'énergie nécessaire à la rotation du rotor([Blair and Berg 1991](#), [Blair, Kim et al. 1991](#)) ([Suzuki, Yonekura et al. 1998](#)) ([Charon, Cockburn et al. 2012](#))

Le corps basal comprend aussi l'**appareil d'exportation**, localisé à l'intérieur du pore central de l'anneau MS ([Suzuki, Yonekura et al. 1998](#)). Cet appareil appartient à la famille des systèmes de sécrétion de type III (SST3s) qui est utilisé par les Gram- pour sécréter les facteurs de virulence ([Galan and Wolf-Watz 2006](#)).

La biosynthèse débute par l'anneau MS, avec la protéine FliF ([Yonekura, Maki et al. 2000](#)) et continue avec l'anneau C (FliG, FliM et FliN). ([Brown, Terrazas et al. 2007](#)). L'assemblage continue avec l'appareil de sécrétion de type III flagellaire, constitué du groupe de protéines (FlhA, FlhB, FliH, FliI, FliO, FliP, FliQ et FliR). Enfin, ce sont les anneaux P (FlgA et FlgI) puis L (FlgH) qui sont synthétisés. (([Liu and Ochman 2007](#))).

b) Le crochet

La biosynthèse du flagelle continue avec le crochet : une structure tubulaire qui relie le filament au corps basal. Le crochet est très flexible et agit comme un joint universel. Il permet l'articulation entre la tige, qui a une seule direction angulaire de rotation, et le filament, qui possède différentes directions angulaires de rotation. Chez les bactéries à flagellation peritriches comme *Salmonella*, le crochet permet aux flagelles de se réunir en faisceau, un élément nécessaire pour réaliser la nage linéaire de ces bactéries. Le crochet est constitué d'environ 130 sous-unités de la protéine FlgE. FlgD a un rôle d'échafaudage permettant à FlgE d'initier sa polymérisation ([Moriya, Minamino et al. 2006](#)) ([Ohnishi, Ohto et al. 1994](#)) La liaison entre le crochet et le filament a lieu grâce aux protéines FlgK et FlgL ([Homma and Iino 1985](#)).

c) Le filament

Le filament est une longue structure en forme hélicoïdale. Il fonctionne en vis d'Archimède et agit comme un propulseur. La longueur du filament peut aller de 10 à 15 µm et le diamètre est de 20 nm ([Macnab 2003](#)). Il est constitué de 10 000 à 40 000 unités de FliC ([Liu and Ochman 2007](#)). FliC est transportée à travers le canal du filament vers son extrémité distale, sous le chapeau (FliD), où elle polymérise avec les autres FliC pour assurer l'élongation du filament ([Inaba, Hashimoto et al. 2013](#)) ;([Holmes, Holley et al. 2003](#)) ; ([Macnab 2003](#)) ; ([Diepold and Armitage 2015](#))). L'ATPase FliI fournit l'énergie nécessaire à l'appareil de sécrétion pour sécréter FliC et construire le filament (([Konishi, Kanbe et al. 2009](#)))([Bardy, Ng et al. 2003](#)) ([Macnab 2003](#)).

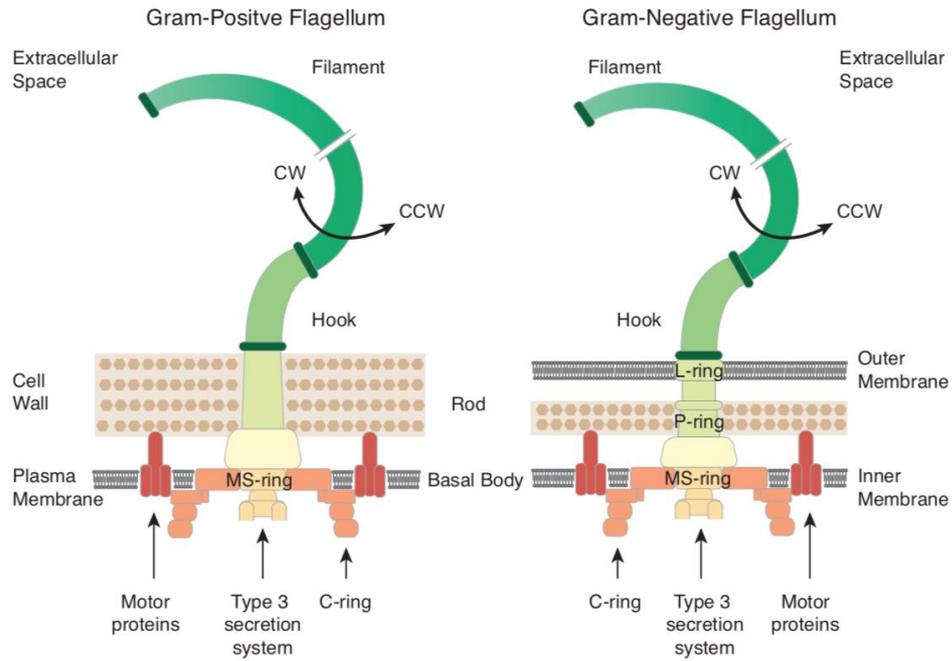


FIGURE 9 Schéma de l'appareil flagellaire des bactéries gram + (gauche) et gram - (droite).

Les composants majeurs sont codés par couleur : le corps basal (en rouge et jaune), l'anneau (en vert pâle), le crochet (en vert clair) et le filament (en vert). La rotation du flagelle peut se faire dans le sens des aiguilles d'une montre (clockwise CW) ou dans le sens inverse des aiguilles d'une montre (counterclockwise CCW). Le flagelle des bactéries Gram- a un anneau L dans la membrane externe et un anneau P dans le plan du peptidoglycane et de l'espace périplasmique, et un anneau MS localisé à l'intérieur de la membrane cytoplasmique. Les anneaux L et P forment une bague de serrage à travers laquelle la tige pénètre dans la membrane externe. Ces deux anneaux ne sont pas présents chez les bactéries Gram+ ([Schuhmacher, Thormann et al. 2015](#)).

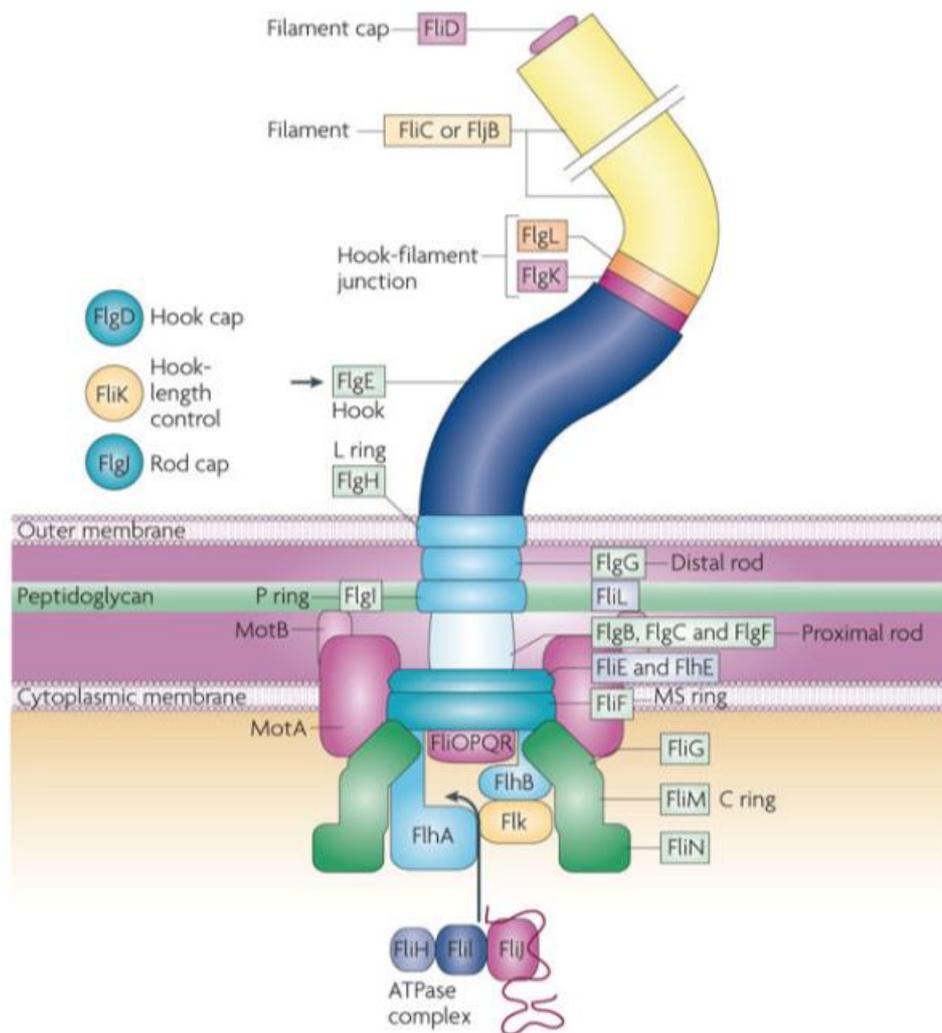


FIGURE 10 Schéma représentatif des composants moléculaires impliqués dans la biosynthèse du flagelle de *Salmonella enterica* (CHEVANCE AND HUGHES 2008)

d) Expression des gènes flagellaires

L'ordre d'assemblage des composants flagellaires est, en partie, la conséquence de l'expression séquentielle des gènes flagellaires. Chez des bactéries comme *E. coli* et *S. typhimurium*, l'assemblage flagellaire est strictement régulé sous forme d'une hiérarchie transcriptionnelle à trois niveaux (Jarrell and McBride 2008) :

- La **classe I** comprend uniquement les régulateurs majeurs FlhC et FlhD, essentiels pour la transcription des gènes de classe II (Aldridge and Hughes 2002).
- Les gènes de **classe II** codent pour les protéines impliquées dans l'assemblage du complexe corps basal-crochet et de l'appareil d'exportation (Ohnishi, Kutsukake et

[al. 1990](#)). Le facteur sigma FliA (sigma 28), requis pour la transcription des gènes de classe III, est lui aussi codé par un gène de classe II ([Ohnishi, Kutsukake et al. 1990](#)).

- L'expression des gènes de **classe III** est nécessaire pour le fonctionnement et l'assemblage flagellaire tardifs. Ces gènes codent pour les protéines associées au crochet, les flagellines, les protéines du moteur (MotA, MotB) et les protéines du chimiotactisme Che ([Chilcott and Hughes 2000](#)). La transcription des gènes de classe III est réprimée par le facteur anti-sigma FlgM. Lorsque la mise en place du complexe corps basal-crochet-appareil d'exportation flagellaire est achevée ([Muller, Jones et al. 1992](#)), le facteur anti-sigma FlgM est exporté par ce système d'exportation, FliA est alors libéré et la transcription des gènes de classe III débute ([Williams, Yamaguchi et al. 1996](#)). L'appareil d'exportation du flagelle passe de l'exportation des protéines de la tige et du crochet à l'exportation des protéines du filament.

Cette régulation génétique à trois niveaux n'est pas universelle. Par exemple, chez *Pseudomonas aeruginosa* le système de régulation des gènes flagellaires fonctionne à quatre niveaux et certains spirochètes utilisent principalement la régulation post-traductionnelle ([Aldridge, Karlinsey et al. 2006](#)) ([Aldridge and Hughes 2002](#)).

Chez *B. subtilis*, les protéines impliquées dans l'assemblage et la fonction de l'appareil flagellaire et de la chimiotaxie sont codées par des gènes regroupés dans un opéron de 2,6 kb, nommé *fla/che*, qui est localisé au niveau du chromosome. Cet opéron comprend les gènes de structure et de régulation requis pour la mobilité de la bactérie ([West, Estacio et al. 2000](#)). Chez la souche *B. thuringiensis 407*, deux gènes, *flaA* et *flaB*, séparés par un terminateur, sont responsables de la synthèse des flagellines qui constituent le filament de l'appareil flagellaire. Houry et al, en 2010 ont étudié l'expression du gène *flaA* dans différentes conditions. En culture planctonique, la transcription de *flaA* augmente en phase exponentielle et atteint un pic lors de la phase de transition entre la phase exponentielle et stationnaire ; puis diminue rapidement en phase stationnaire. Lors de la formation d'une pellicule par cette souche, la transcription de *flaA* est très élevée dans un biofilm âgé de 24h mais diminue progressivement avec la maturation de celui-ci. Cette diminution est probablement due à une diminution du nombre de bactéries mobiles dans

le biofilm. Les résultats montrent également que *flaA* est toujours exprimé dans un biofilm âgé de 60h.

e) **La nage bactérienne**

La mobilité de type 'swimming' est mieux décrite chez les bactéries à flagellation péritriche, mais présente des points communs avec les autres types de flagellation (Figure 11)

Le sens de rotation des flagelles détermine le type de mouvement de la bactérie. La rotation dans le sens inverse des aiguilles d'une montre projette la bactérie en direction linéaire, la rotation dans le sens contraire provoque un 'tumbling' (une culbute) et la bactérie roule sur elle-même. Le tumbling est un évènement très bref, il dure moins d'une seconde, et est essentiel parce qu'il conduit à modifier la direction de la nage (([Harshey 2003](#), [Harshey, Kawagishi et al. 2003](#), [Macnab 2003](#)). Chez les bactéries péritriches, lors de la nage linéaire, les flagelles répartis autour de la paroi bactérienne, s'associent en faisceau dans l'axe de la bactérie, et forment le 'bundle' flagellaire.

Mobiles grâce aux flagelles, les bactéries sont capables de s'orienter grâce au chimiotactisme. En présence de substances attractives ou répulsives, les périodes de nage linéaire sont plus longues et le tumbling moins fréquent : les bactéries sont projetées dans la direction du gradient de concentration ou s'en éloignent, respectivement. Le tactisme des bactéries sera détaillé dans la partie suivante.

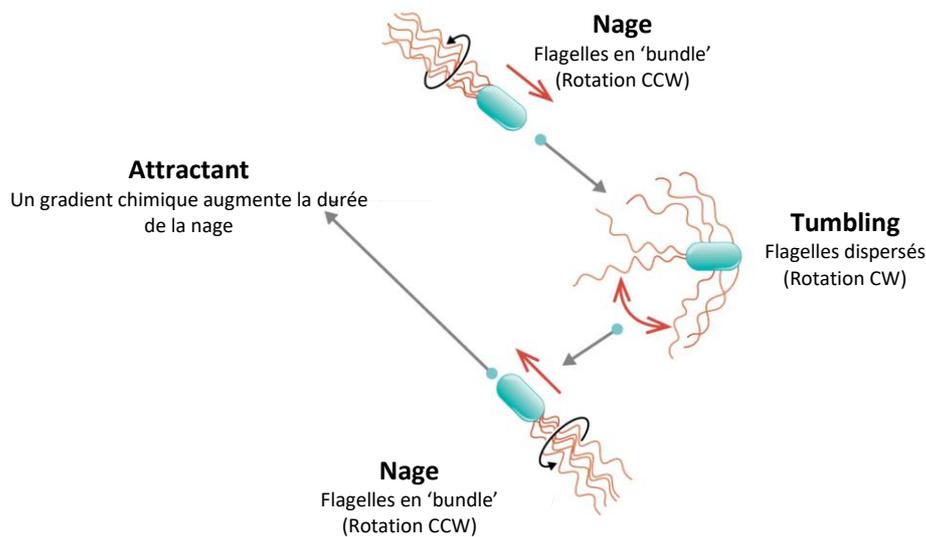


FIGURE 11 Schéma descriptif du mécanisme de la nage des bactéries péritriches.

En absence d'un attractant, la rotation des flagelles alterne entre une rotation dans le sens des aiguilles d'une montre (CW, la bactérie fait du 'tumbling') et dans le sens inverse des aiguilles d'une montre (CCW, la bactérie nage) mais sans mouvement orienté. Avec la présence d'un gradient chimique d'attractant, la durée de la nage augmente et le 'tumbling' diminue. C'est la chimiotaxie : la bactérie nage en orientant sa direction vers une concentration croissante de l'attractant (modifiée d'après [https://bio.libretexts.org/Bookshelves/Microbiology/Book%3AMicrobiology_\(OpenStax\)/03%3A_The_Cell/3.03%3A_A_Unique_Characteristics_of_Prokaryotic_Cells](https://bio.libretexts.org/Bookshelves/Microbiology/Book%3AMicrobiology_(OpenStax)/03%3A_The_Cell/3.03%3A_A_Unique_Characteristics_of_Prokaryotic_Cells)).

f) Le flagelle et la formation du biofilm

Pour la majorité des bactéries mobiles, le rôle le plus important du flagelle dans la formation du biofilm est de permettre aux bactéries d'atteindre et aussi d'adhérer au niveau d'une surface. De plus, la mobilité permet de surmonter les forces répulsives entre la surface et la bactérie ([Watnick and Kolter 1999](#)). Lors de l'étape d'initiation, *P. aeruginosa* nage tout au long de la surface comme pour effectuer un balayage permettant de trouver l'emplacement approprié pour le contact initial, avant l'attachement sur la surface ([O'Toole, Kaplan et al. 2000](#)). Le flagelle peut prendre un autre rôle qu'organelle de mouvement : Par exemple, chez *Aeromonas spp.* le flagelle joue le rôle d'adhésine ([Kirov 2003](#)). Il peut être également impliqué dans le développement ultérieur du biofilm. *Serratia marcesens* élargit la colonisation des surfaces en utilisant le swarming, qui lui-même requiert les flagelles ([Lai, Soo et al. 2005](#)). Chez *P. aeruginosa*, la mobilité flagellaire est impliquée dans la formation de la structure en forme de champignon du biofilm ([Barken, Pamp et al. 2008](#)). De même, un mutant non flagellé de *V. parahaemolyticus* est incapable de former un biofilm possédant une structure tridimensionnelle ([Yildiz and Visick 2009](#))

Pour résumer, ces travaux démontrent l'implication du flagelle à différentes étapes de formation des biofilms :

- Le flagelle *via* le chimiotactisme permet à la bactérie de nager vers les nutriments associés à une surface, ou de nager vers les signaux générés par des cellules attachées à une surface abiotique.
- La mobilité flagellaire pourrait permettre à la bactérie de surmonter les forces répulsives qui existent entre elle-même et la surface et favoriser le passage à une adhésion irréversible.
- La mobilité flagellaire pourrait permettre aux bactéries ayant déjà adhéré à une surface, et qui sont en train de se diviser, de se propager *via* le swarming sur toute la surface.
- La mobilité peut jouer un rôle dans la structure tridimensionnelle du biofilm.
- Le flagelle joue un rôle dans la dispersion du biofilm et dans la colonisation d'autres surfaces.

C. Le tactisme des bactéries

La mobilité est l'un des moyens d'adaptation adoptée par les bactéries et débute par les étapes d'attraction (ou de répulsion) qui permettent l'installation des bactéries dans un milieu convenable à leur croissance. Le chimiotactisme est défini comme le mouvement dirigé de cellules mobiles dans des gradients de divers paramètres physico-chimiques ([Alexandre 2010](#)). Les nutriments, comme les acides aminés, les sucres et les acides organiques et des facteurs tels que le dioxygène (accepteur final d'électron), la lumière ou la température peuvent affecter le métabolisme bactérien. Tous ces facteurs physico-chimiques agissent comme des signaux du milieu extracellulaire pour les cellules et leur détection dépend de la présence de récepteurs membranaires spécifiques du signal détecté, ainsi que la sensibilité de cette détection ([Alexandre 2010](#)). Ces récepteurs sont des Methyl-accepting Chemotaxis Proteins (MCP) qui activent la voie de transduction du signal chimiotactique, aboutissant au changement du sens de rotation du moteur flagellaire ([Wadhams and Armitage 2004](#)) ; ([Alexandre 2010](#)). Ils se composent d'au moins une région senseur et une région de transduction/signalisation ([Alexandre 2010](#)).

a) Détection des signaux extracellulaires par les MCPs

Les Methyl-accepting Chemotaxis Proteins (MCPs) sont généralement formés des trois domaines suivants ([Schweinitzer and Josenhans 2010](#)) (

Figure 12)

- Le domaine **MA** (**Methyl-Accepting**), localisé dans le cytoplasme.
- Le domaine **HAMP** (pour **H**istidine kinases, **A**denylyl cyclases, **M**ethyl-accepting chemotaxis proteins, and **P**hosphatases), localisé dans le cytoplasme.
- Un ou plusieurs **domaine(s) senseur(s)**, sont localisé(s) dans le cytoplasme ou le périplasma des bactéries Gram-. Chez les bactéries Gram+ , ces domaines peuvent être présents au niveau du cytoplasme ou bien dans la région extracellulaire quand il possède une ou plusieurs région(s) transmembranaire(s) pour l'ancrer dans la membrane cytoplasmique.

1. Le domaine MA

C'est le domaine de transduction/signalisation. Ce domaine est méthylé ou déméthylé lorsqu'il est lié à une molécule de signalisation, grâce aux protéines CheR et CheB. Le domaine MA interagit directement avec les protéines CheW et CheA dans le cytoplasme.

2. Le domaine HAMP

Ce domaine, en changeant de conformation, contrôle la méthylation du domaine MA et la phosphorylation de la protéine CheA. En présence d'un attractant, le domaine HAMP change de conformation, induisant la déméthylation du domaine MA. Dans ce cas, la protéine CheA n'est pas phosphorylée et son rôle de kinase n'est pas activé. Au contraire, en présence d'une substance répulsive, le domaine HAMP change de conformation, le domaine MA est méthylé, CheA est phosphorylée et son rôle de kinase activé. CheA-P transfère son phosphate à CheY. La phosphorylation de cette protéine est importante pour la transduction du signal chimiotactique (cette partie sera détaillée ultérieurement). Par ailleurs, des études ont montré qu'une mutation du domaine HAMP entraînant l'activation de CheA-P induit le mouvement désordonné des bactéries ([Alexandre 2010](#)).

3. Le domaine senseur

Ce domaine, également nommé « Ligand-Binding Region » (LBR), est la partie qui permet de détecter un ou des signaux attractifs et/ou répulsifs. Il existe deux types de MCP : les **chimiorécepteurs** et les **récepteurs** qui détectent **l'énergie** ([Alexandre 2010](#)). Les chimiorécepteurs se caractérisent par un domaine senseur généralement capable de détecter des gradients de concentrations de molécules comme les acides aminés, les sucres, les acides nucléiques et des peptides. Les récepteurs tactiques pour l'énergie détectent des variations du niveau énergétique.

Concernant l'évolution de leurs séquences, en général, les différents domaines fonctionnels des *mcp* ne sont pas soumis aux mêmes pressions de sélection. En effet, le domaine MA interagit avec les protéines Che, qui elles sont responsables de la transduction du signal chimiotactique des MCP à la protéine FliM du flagelle, ce domaine est donc très conservé et est présent dans tous les MCP connues à ce jour ([Krell, Lacal et al. 2011](#)). A l'inverse, les domaines senseurs évoluent plus rapidement que le domaine MA. La variabilité de leurs séquences s'explique par le fait que les MCPs sont capables de détecter une large gamme de familles de molécules et de signaux différents qui varient en fonction de l'environnement dans lequel se trouvent les bactéries ([Krell, Lacal et al. 2011](#))

▪ Les chimiorécepteurs

Chez *E. coli*, quatre types de MCP avec un domaine senseur périplasmique sont connus et regroupés sous le nom de Tsr: Tar, Tap et Trg et Tsr. Ils partagent le même domaine InterPro IPR003122 : le domaine TarH (**T**axis towards **A**spartate and **R**elated amino acids and **H**omologs). Ils détectent la sérine, le maltose et l'aspartate, les dipeptides et les pyrimidines, le galactose et le ribose ([Weerasuriya, Schneider et al. 1998](#), [Hazelbauer, Falke et al. 2008](#), [Hazelbauer 2012](#)).

Les récepteurs **Tsr** et **Tar** sont sensibles aux changements du pH cytoplasmique, du glycérol et de la température. La détection de différentes molécules est probablement due à une cible différente au niveau du domaine senseur du récepteur. Par exemple, c'est la région transmembranaire du récepteur qui serait sensible à la détection du phénol. ([Pham and Parkinson 2011](#)). De plus, une baisse de pH induit une réponse attractive avec Tar tandis qu'elle induit une répulsion par Tsr. Cette réponse différente est due à des

variations d'acides aminés au niveau du domaine HAMP entre ces deux types de récepteurs ([Umemura, Matsumoto et al. 2002](#), [Pham and Parkinson 2011](#)).

Le récepteur **Tap** (taxis toward peptides) et le 'dipeptide-binding protein' (DBP), une protéine présente dans le périplasme d'*Escherichia coli*, détectent les dipeptides présents dans le milieu et contrôlent la réponse tactique de la bactérie. Contrairement à Tar et Tas, le récepteur Tap n'est pas abondant au niveau de la membrane. De plus, la présence de Tap, même si le gène codant pour la protéine est présent sur un plasmide à fort nombre de copie, n'est pas suffisante pour générer une rotation (CW) des flagelles et activer le 'tumbling', les cellules nagent en continu, sans pouvoir changer d'orientation ([Weerasuriya, Schneider et al. 1998](#)).

Le récepteur **Trg** régule la réponse tactique de la bactérie en présence de ribose ou galactose ([Nowlin, Bollinger et al. 1987](#)).

Chez *B. subtilis*, plusieurs gènes homologues aux gènes codant les MCPs d'*E. coli* ont été identifiés ([Hanlon and Ordal 1994](#)). L'analyse de génome révèle l'existence de quatre 'open reading frames' (ORFs) : *mcpA*, *mcpB*, *tlpA*, et *tlpB*, localisés au niveau du chromosome mais ne faisant pas partie de l'opéron *fla/che*. Chacun de ces gènes code pour une protéine de 72 kDa. Ces protéines présentent une forte homologie de séquence avec les chimiorécepteurs d'autres organismes. La délétion des gènes *mcpA* et *mcpB* entraîne une perte de la chimiotaxie, pour le glucose ou l'alpha-méthyl-glucoside et des acides aminés comme l'aspartate, l'asparagine, la glutamine et l'histidine, respectivement. A l'inverse, l'inactivation de *tlpA* et *tlpB*, n'entraîne pas une perte de la chimiotaxie chez la bactérie mais plutôt une capacité d'agrégation plus importante en comparaison avec la souche sauvage. Ceci est probablement due à la modification des propriétés de la surface des bactéries. Une étude récente a montré la sensibilité de ces quatre récepteurs au changement de pH du milieu de la bactérie. En effet, les récepteurs McpA et TlpA détectent le pH acide et les récepteurs McpB et TlpB détectent le pH alcalin du milieu ([Tohidifar, Plutz et al. 2020](#)).

Les domaines **Cache**, pour Ca^{2+} channels and chemotaxis receptors, sont largement présents chez les bactéries. Ils détectent également des petites molécules présentes dans le périplasme comme les acides aminés, les sucres et des acides organiques

([Anantharaman and Aravind 2000](#), [Mougel and Zhulin 2001](#), [Zhulin, Nikolskaya et al. 2003](#), [Dolphin 2012](#), [Sisti, Ha et al. 2013](#)).

- **Les récepteurs tactiques de l'énergie**

L'étude de l'aérotaxie chez différentes espèces a montré que les bactéries utilisent plusieurs stratégies pour détecter l'oxygène dans leur environnement.

Les mécanismes moléculaires impliqués dans l'aérotaxie les plus étudiés sont ceux d'*E. coli*. Cette bactérie ne détecte pas directement l'oxygène, mais une modification du système de transport d'électrons fonctionnel. En réponse à une variation du taux d'oxygène, les composants moléculaires respiratoires localisés au niveau de la membrane, comme les cofacteurs, subissent une réduction ou bien une oxydation, ce qui modifie la force proton-motrice au niveau de la membrane de la bactérie ([Taylor and Zhulin 1999](#)). Ce sont les récepteurs Aer (pour **Aer**otaxis receptor) et Tsr qui détectent une altération du transport électrons, à travers une modification du potentiel réducteur de la force proton-motrice ou bien par le flux d'électrons. Ces composants respiratoires sont étroitement liés, ce qui rend difficile de déterminer un mécanisme spécifique pour l'aérotaxie de *E. coli*. Tsr détecte une modification au niveau de la force proton-motrice alors que Aer détecte la variation du potentiel réducteur au niveau de la membrane ([Edwards, Johnson et al. 2006](#)). Tous ces mécanismes permettent à la bactérie de mesurer la variation de l'énergie interne de la cellule. Elle est donc capable de s'échapper d'un milieu pauvre en apport énergétique, comme dans des conditions d'hypoxie ou bien des milieux à pH extrême et s'orienter vers un milieu favorable à sa croissance ([Taylor and Zhulin 1999](#)).

Au niveau des récepteurs Aer, c'est à partir du domaine cytoplasmique PAS (pour **P**eriod circadian protein), **A**h receptor nuclear translocator protein, **S**ingle-minded protein) ([Ponting and Aravind 1997](#), [Zhulin, Johnson et al. 1997](#), [Zhulin, Rowsell et al. 1997](#), [Moglich and Moffat 2007](#)) qu'a lieu la détection d'une variation en concentration en O₂, du potentiel redox et de la lumière. La spécificité de la détection dépend des cofacteurs associés avec le domaine PAS comme l'hème pour le dioxygène ([Key and Moffat 2005](#)), la flavine mononucléotide (FMN) ([Moglich and Moffat 2007](#)) et la flavine adénine dinucléotide (FAD) ([Key, Hefti et al. 2007](#)) pour détecter des changements au niveau du

potentiel réducteur de la cellule ou bien l'acide 4-hydroxycinnamic pour la lumière (4-HCA) ([Pellequer, Wager-Smith et al. 1998](#))

Trois classes de PAS sont connus ([Manson, Armitage et al. 1998](#), [Alexandre, Greer et al. 2000](#), [Gosink, Buron-Barral et al. 2006](#), [Xie, Ulrich et al. 2010](#), [Armitano, Mejean et al. 2013](#)):

- La première classe groupe les **Aer** qui sont ancrés dans la membrane cytoplasmique grâce aux régions transmembranaires.
- La deuxième classe groupe les **AerC**. Ce sont des MCP cytoplasmiques.
- Une troisième classe comprend des MCP ancrés à la membrane. Cette classe de récepteurs, à l'inverse des deux autres, ne dépend pas de la présence d'un cofacteur pour fonctionner.

Le récepteur HemAT (pour heme-based aerotaxis transducer) de *B. subtilis* est un récepteur cytoplasmique localisé au niveau des pôles de la cellule. Ce récepteur contient au niveau de son domaine senseur une molécule d'hème. C'est à travers la liaison des molécules d'O₂ avec la molécule d'hème, que HemAT modulent l'aérotaxie de la bactérie. En effet, cette liaison induit un changement de la conformation du domaine HAMP et une activation de la voie de signalisation aérotactique ([Yoshida, Ishikawa et al. 2012](#), [Collins, Lacal et al. 2014](#)).

D'autres domaines sont également connus comme les **GAF** et les **CHASE** ([Zhulin, Nikolskaya et al. 2003](#), [Cheung and Hendrickson 2010](#), [Krell, Lacal et al. 2011](#)):

- Le domaine **GAF** (pour cGMP- dependent phosphodiesterase, Adenylyl cyclases, and *E. coli* FhlA (formate hydrogen lyase transcriptional activator)) détecte le cAMP (cyclic adenosine monophosphate) et le cGMP (cyclic guanosine monophosphate) ([Jager, Russwurm et al. 2012](#)) ([Alexandre, Greer et al. 2000](#)).
- Le domaine **CHASE** (pour Cyclase/Histidine kinase-Associated Sensing Extracellular) détecte les petites molécules comme la cytokinine (phytohormone) ou des peptides ([Henry and Crosson 2011](#)).

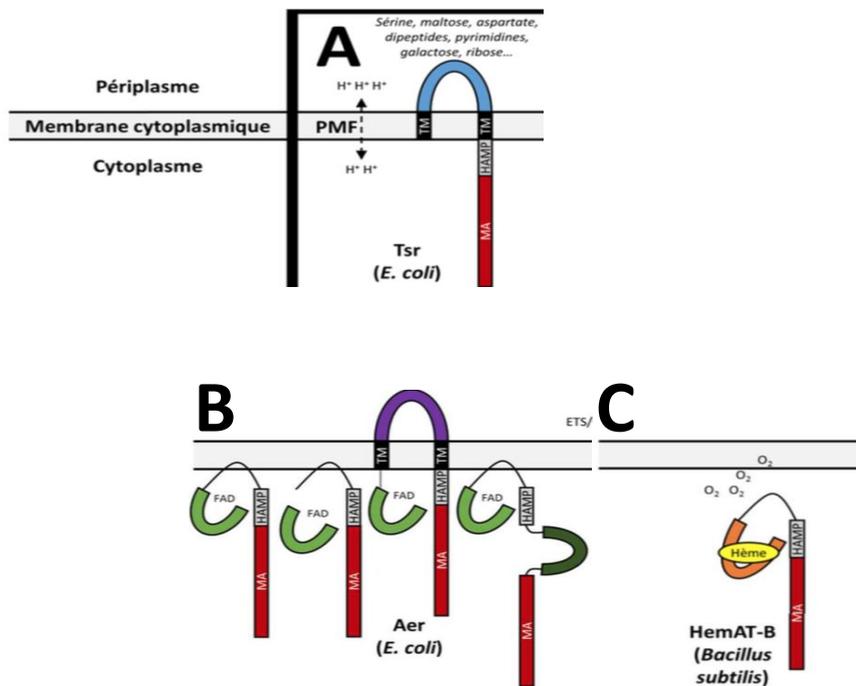


FIGURE 12 Représentation schématique des structures des MCPs présentes chez les bactéries.

Les régions TM (TransMembranaire), le domaine MA et le domaine HAMP de tous les récepteurs sont représentés en noir, rouge et gris respectivement.

A- La famille des récepteurs Tsr d'*E. coli*. Le domaine senseur périplasmique de type Tsr, Tar, Tap et Trg sont représentés en bleu. **B-** La famille des récepteurs Aer d'*E. coli*. Les domaines PAS sont représentés, suivant leur classe, en vert. Les domaine senseur périplasmique est représenté en violet. **C-** Le récepteur HemAT-B de *Bacillus subtilis*. La molécule d'hème est représentée en jaune.

Abréviations : PMF (Force Proton Motrice), ETS (Système de Transport d'électrons), FAD (Flavine adénine dinucléotide), PAS (Period circadian protein, Ah receptor nuclear translocator protein, Single-minded protein) ([Alexandre 2010](#)) ([Schweinitzer and Josenhans 2010](#)).

b) Organisation spatiale des MCPs

En général, les MCPs sont organisés en trimères d'homodimères ([Wadhams and Armitage 2004](#)) ([He and Bauer 2014](#)) ([Briegel, Ortega et al. 2009](#)). Un trimère est constitué d'un groupe de trois homodimères identiques ou différents ([Studdert and Parkinson 2004](#)) ([Gosink, Buron-Barral et al. 2006](#)). Un homodimère est formé de deux copies d'un même MCP. Les MCPs sont généralement disposés en cluster aux pôles de la cellule bactérienne mais peuvent être aussi cytoplasmiques ([He and Bauer 2014](#)) ([Maddock and Shapiro 1993](#)) ([Lybarger and Maddock 2000](#)) ([Sourjik and Berg 2000](#)). Cette organisation en cluster est importante parce qu'elle permet d'amplifier le signal détecté ([Kentner and Sourjik 2006](#)) ([Hazelbauer, Falke et al. 2008](#)). Ainsi, une bactérie qui possède des MCPs est capable de détecter des molécules faiblement concentrées ([Boldog, Grimme et al. 2006](#)).

▪ Rôles des microdomaines membranaires fonctionnels

Il existe, au niveau de la membrane bactérienne des microdomaines membranaires fonctionnels (MMFs). Ces domaines regroupent un cluster de protéines impliquées dans des processus spécifiques comme la sécrétion de protéases ou bien la transduction du signal cellulaire, comme les récepteurs de l'appareil chimiosenseur ([Matsumoto, Kusaka et al. 2006](#)). Les MMFs sont localisés au niveau de radeaux lipidique (ou lipid rafts) ont la composition est différente de celle du reste de la membrane, ce qui affecte directement la fonctionnalité de ces domaines ([Simons and Ikonen 1997](#)). L'utilisation de colorants spécifiques des phospholipides membranaires chargés comme le nonyl-acridine orange (NAO) révèle la présence de lipid rafts enrichis en cardiolipine, et en autres lipides chargés négativement, au niveau des pôles et du septum des bactéries comme *Escherichia coli* et *Bacillus subtilis*. Cette localisation polaire des lipid rafts suggère l'existence d'un lien avec certains processus cellulaires comme la division ou la morphogénèse de la bactérie ([Mileykovskaya and Dowhan 2000](#), [Kawai, Shoda et al. 2004](#), [Mileykovskaya and Dowhan 2009](#)).

Il existe au niveau de ces rafts, des protéines chaperons, dont le rôle est d'assurer le bon fonctionnement des processus cellulaires importants pour la bactérie ([Babuke and Tikkanen 2007](#)). Par exemple, les flotillines sont des protéines membranaires localisées exclusivement au niveau des rafts lipidiques. Elles sont considérées comme des marqueurs pour la localisation des radeaux lipidiques. Les flotillines sont des protéines chaperons chargées de recruter les protéines présentes au niveau de ces domaines fonctionnels. Elles jouent un rôle également dans l'oligomérisation, et donc assurent le bon fonctionnement des protéines localisées au niveau des rafts. Le rôle de la flotilline est donc important pour l'ensemble des processus cellulaires associés aux rafts, comme la polarisation cellulaire, le trafic des molécules au niveau de la membrane et la transduction des signaux, et aussi pour le fonctionnement des domaines senseurs des MCPs ([Bray, Levin et al. 1998](#)). Par conséquent, la perturbation de l'activité de la flotilline affecte plusieurs processus cellulaires nécessaires pour la bactérie. Chez *B. subtilis* la double délétion des gènes *floT*, qui code pour la flotilline, et *floA*, qui code pour une protéine flotilline-like, entraîne une déficience au niveau de la morphologie cellulaire, de la chimiotaxie/mobilité et de l'efficacité de transformation de la bactérie. La délétion de *floT* seul affecte sévèrement la chimiotaxie de la bactérie ([Dempwolff, Moller et al. 2012](#)).

Chez *E. coli*, la protéine YqiK, une prohibitine homologue à la flotilline, est impliquée dans la médiation de la réponse au stress par la bactérie. Le mutant *E. coli yqiK* montre une capacité de mobilité plus importante que la souche sauvage, la mobilité étant un des nombreux phénotypes affectés. Ces résultats suggèrent que YqiK assure la mise en place, au niveau des rafts, des protéines impliquées dans la médiation de plusieurs voies de signalisation membranaires ([Padilla-Vaca, Vargas-Maya et al. 2019](#)).

c) Transduction du signal chimiotactique

Le mécanisme moléculaire impliqué dans la transduction du signal chimiotactique bactérien a été essentiellement étudié chez *E. coli* et *S. typhimurium* ([He and Bauer 2014](#)). Il se fait à partir d'une voie de signalisation impliquant des signaux à deux composants.

Une série d'étapes de phosphorylation initiée par CheA transmet l'information détectée par les MCPs au(x) moteur(s) flagellaire(s) ([Alexandre 2010](#)):

1. Les protéines **CheR** (une méthyltransferase : méthylation du domaine MA des MCP en présence d'un répulsif) et **CheB** (une méthylestérase : déméthylation du domaine MA en présence d'un attractant) assurent un niveau de méthylation toujours stable des MCP, en absence de molécule de signalisation. En présence d'un répulsif, le domaine HAMP change de conformation, la protéine CheR méthyle le domaine MA du MCP, la protéine **CheA** ([Kentner and Sourjik 2006](#)) une histidine kinase organisée en dimère, est alors activée. Une des protéines CheA catalyse le transfert d'un groupement phosphate de l'ATP à l'autre protéine CheA du dimère. Ce groupement phosphate est ensuite transféré sur un résidu aspartyl de la protéine **CheY** ([Wadhams and Armitage 2004](#))
2. La forme **CheY-P** se lie ensuite à la protéine **FliM** du moteur flagellaire et augmente la probabilité de sens de rotation horaire (CW) du flagelle ([Porter, Wadhams et al. 2011](#)). La bactérie fait du tumbling pour qu'elle puisse orienter son mouvement dans son environnement ([Hazelbauer, Falke et al. 2008](#))
3. A son tour, la phosphatase **CheZ** déphosphoryle CheY-P ([Baker, Wolanin et al. 2006](#))

L'activation de CheA est donc nécessaire pour phosphoryler la protéine CheY, qui est la composante indispensable de la voie de transduction du signal du système chimiosenseur ([Baker, Wolanin et al. 2006](#))

La protéine CheB est phosphorylée par CheA-P. L'activité méthylestérase **CheB-P** est alors activée, ce qui augmente la dé-méthylation des MCPs. La déméthylation des MCPs entraîne une réduction de la capacité d'autophosphorylation de CheA ([Wadhams and Armitage 2004](#)) et limite alors le sens de rotation horaire (CW) du flagelle, et donc le tumbling de la bactérie.

Pour résumer, en présence d'un répulsif, **CheR méthyle** les MCPs, **CheA** et **CheY** sont **phosphorylés**, **CheY-P interagit avec FliM**, le flagelle tourne dans le sens des aiguilles d'une montre (CW), la **bactérie** est en mode 'tumbling', elle effectue un **mouvement désordonné**. En présence d'un attractant, **CheB-P déméthyle** les MCPs, **CheA est déphosphorylée** et **CheZ déphosphoryle CheY** ([Porter, Wadhams et al. 2011](#)) Le flagelle tourne dans le sens inverse des aiguilles d'une montre (CCW sens par défaut), la **bactérie nage** vers l'attractant (Figure 13).

Il est intéressant de noter que les bactéries possèdent une mémoire chimiotactique ([Amin and Hazelbauer 2012](#)) ([Hazelbauer 2012](#)) ([Vladimirov, Lebedz et al. 2010](#)). Lorsqu'elles sont présentes dans un gradient de concentration, cette mémoire permet aux bactéries de comparer les concentrations précédentes à la concentration actuelle et de s'orienter vers la concentration idéale ([Szurmant, Bunn et al. 2004](#)). La mémoire chimiotactique dépend de la vitesse de méthylation et déméthylation des MCPs. La méthylation étant plus lente que la déméthylation (qui est une réponse par défaut), elle constitue la base du mécanisme de la mémoire chimiotactique des bactéries qui permet la comparaison des concentrations rencontrées dans le passé ([Vladimirov and Sourjik 2009](#)). Par exemple, *E. coli* et *Salmonella* ont une mémoire chimiotactique d'environ une seconde, la mémoire optimale étant de 1 à 10 secondes ([Stock and Koshland 1981](#)) ([Koshland 1974](#))

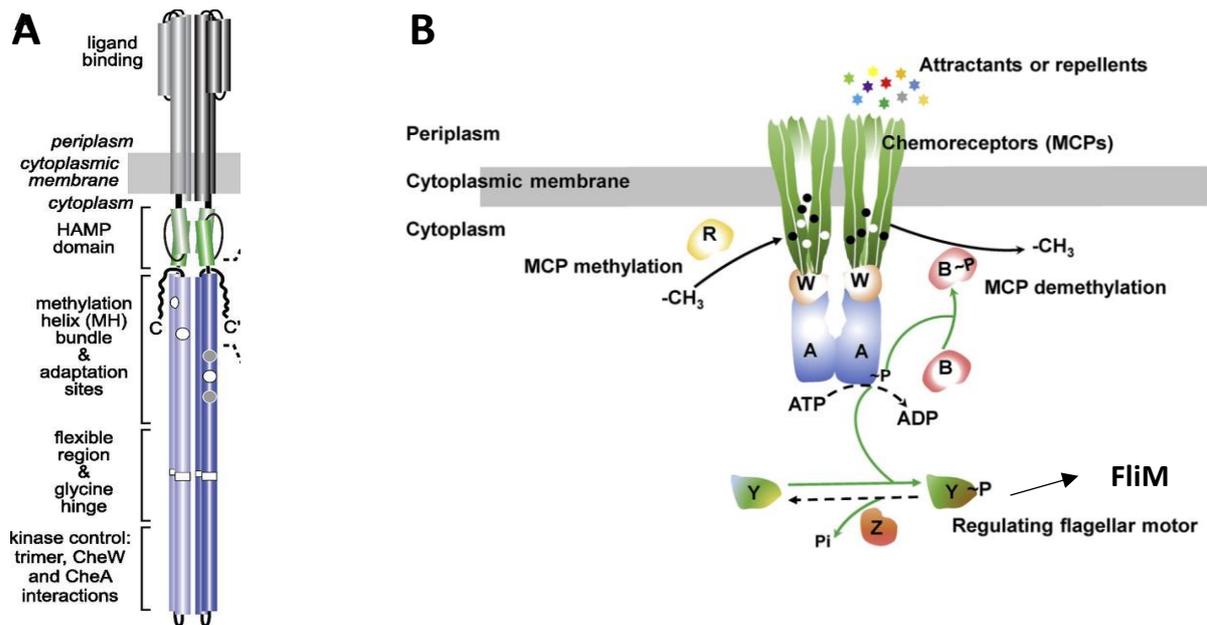


FIGURE 13 Représentation schématique du récepteur Tsr d'*E. coli* et de la voie de signalisation impliquée dans la transduction du signal chimiotactique.

A- Représentation d'un homodimère et des domaines caractéristiques du récepteur Tsr d'*E. coli*. Les cercles représentent des résidus glutaminyl (gris) et glutamyl (blanc) conservés et qui sont les substrats pour les enzymes d'adaptation CheB and CheR (Flack and Parkinson 2018).

B- Plusieurs trimères de dimère de MCPs se regroupent aux pôles de la cellule et forment un cluster de chimiorécepteurs. Le récepteur, avec les molécules CheW et CheA, forment un complexe de signalisation.

En réponse à une diminution de la concentration d'attractants, le MCP active l'autophosphorylation de CheA. La forme active CheA-P transfère son groupement phosphate à CheY ou CheB.

CheY-P interagit avec la protéine FliM, au niveau du moteur flagellaire, pour changer le sens de rotation du flagelle de CCW à CW. CheZ est une phosphatase qui accélère la déphosphorylation de CheY-P et inhibe rapidement le signal induisant le changement du sens de rotation du flagelle. CheB-P agit en tant que méthylesterase pour déméthyliser les groupement méthyle au niveau des MCPs, et CheR-P, une méthyletransférase, interagit avec les MCPs et catalyse leur méthylation. La phosphorylation de ces deux protéines constitue un système d'adaptation sensoriel et agit sous forme de boucle rétroactive qui maintient le niveau de méthylation des MCPs. La méthylation des MCPs favorise leur capacité à activer CheA.

Les cercles pleins indiquent une méthylation (cercle noirs) des MCPs ou une non méthylation (cercles blanc) des sites des MCPs. Les fleches noirs indiquent un flux de groupement méthyles.

Abréviations: A, CheA; B, CheB; R, CheR; W, CheW; Y, CheY; Z, CheZ; ~P, groupement phosphate; Pi, phosphate inorganique; -CH₃: groupement méthyle (Parales and Ditty 2018).

D. Mobilité, tactisme et formation de la pellicule

D'une manière générale, la formation d'une pellicule à l'interface air/ liquide se fait d'une façon similaire pour toutes les espèces. A un temps précoce, les cellules nagent et colonisent l'interface air/liquide pour former une monocouche et ensuite le biofilm au niveau de la surface. La nage, la chimiotaxie et l'aérotaxie sont des éléments clés qui affectent la migration des bactéries planctoniques. L'importance de chaque élément dépend de l'espèce et leur délétion peut, dans certains cas, complètement abolir la formation du biofilm ([Holscher, Bartels et al. 2015](#))

Pour *B. subtilis* et *P. aeruginosa*, la formation de la pellicule est retardée chez les mutants *B. subtilis* Δ *hag* et *P. aeruginosa* Δ *flgK* dépourvus de leurs flagelles, complètement immobiles. La morphologie du biofilm produit par ces mutants, identique à celles des souches sauvages, démontre que la nage n'est pas essentielle pour la formation de la pellicule pour ces deux espèces. Ce retard peut s'expliquer par le fait qu'une minorité de bactéries immobiles atteignent la surface, grâce au mouvement Brownien (mouvement passif), et par division cellulaire, initient la formation de la pellicule. En effet, lorsque la densité bactérienne dans le milieu est suffisamment élevée, le retard des mutants *B. subtilis* Δ *hag* and *P. aeruginosa* Δ *flgK* n'est plus observé. Les bactéries présentes à proximité de l'interface peuvent initier la formation de la pellicule. Cette observation renforce l'hypothèse qu'un mouvement orienté des bactéries vers la surface facilite, mais n'est pas essentiel pour la formation du biofilm. Par contre, le mutant *flaA* de *B. cereus*, dépourvu de ses flagelles, est incapable de former une pellicule sur l'interface air/liquide.

La présence de substances attractives au niveau de l'interface air/liquide, attire et incite les bactéries à orienter leur trajectoire, *via* la chimiotaxie, pour atteindre la surface et former un biofilm ([Porter, Wadhams et al. 2011](#)). Lorsque des co-cultures de *B. subtilis*, composées d'une souche *wild-type* et d'un mutant non chimiotactile, sont réalisées pour former une pellicule, la souche *wild-type* présente un avantage par rapport au mutant lors de la formation du biofilm. Ceci suggère que la détection des signaux est un élément important pour assurer une co-colonisation de la pellicule. Ces mutants sont mobiles et peuvent détecter des signaux extracellulaires, mais sont incapables de traduire le signal perçu en un mouvement dirigé, à cause d'une déficience au niveau de la voie de signalisation impliquée dans la transduction du signal. Dans ce cas, les bactéries nagent

d'une façon aléatoire et celles qui atteignent l'interface participent à la formation de la pellicule.

Pour plusieurs espèces, l'interface air/liquide représente un environnement favorable pour l'approvisionnement en oxygène. Chez *B. subtilis*, la détection d'un gradient d'oxygène est un élément important pour initier la migration des bactéries vers l'interface air/liquide. En effet, lorsque le mutant $\Delta hemAT$, un mutant incapable de détecter l'oxygène, est mis en co-culture avec la souche sauvage, il perd l'avantage lors de la co-colonisation d'une pellicule. Ce mutant, capable de se déplacer mais pas de s'orienter vers des conditions plus favorables, nage également d'une façon aléatoire et sa capacité à former une pellicule est retardée ([Hou, Larsen et al. 2000](#)).

Yamamoto *et al.* ont montré que la formation d'une pellicule par la souche *P. aeruginosa* PAO1 est moins importante dans un milieu déplété en oxygène, suggérant que chez *P. aeruginosa* l'aérotaxie est un élément important pour la bactérie dans ces conditions de culture ([Yamamoto, Arai et al. 2011](#)). Une perte totale de la capacité à former une pellicule a été observé chez des mutants d'aérotaxie de *S. oneidensis*. De plus, la maturation d'une pellicule, initialement formée par une souche *wild type* de *S. oneidensis* en présence d'oxygène, a été bloquée dans des conditions d'anoxie ([Armitano, Méjean et al. 2013](#)). Une étude récente a montré que la phosphorylation de la protéine de chimiotaxie CheY3 est essentielle pour la formation de la pellicule. En effet, CheY3 est un composant essentiel de la voie de signalisation impliquée dans le mécanisme de transduction du signal ([Boyeldieu, Ali Chaouche et al. 2020](#)). De même, en condition d'anoxie, *E. coli* ne forme pas de biofilm à l'interface air/liquide ([Colon-Gonzalez, Mendez-Ortiz et al. 2004](#)). Ces études mettent en évidence l'importance l'appareil flagellaire et du système de chimiotactisme pour une progression normale des étapes précoces de formation d'une pellicule.

Objectifs

Nos laboratoires s'intéressent, depuis plusieurs années, à l'étude de la formation du biofilm à l'interface air/liquide des espèces *B. cereus/thuringiensis*. En condition statique, les bactéries appartenant à ces espèces, forment une pellicule flottante qui couvre toute la surface du milieu de culture et un anneau, adhérent à la paroi du tube et qui rejoint la pellicule. Plusieurs composants moléculaires ont été découverts et leurs rôles ont été attribués à la formation de la matrice extracellulaire de ce biofilm. A titre d'exemple, la protéine CalY, formant des fibres amyloïdes ([Candela, Fagerlund et al. 2019](#)) et les polysaccharyles Cps et Eps, responsables de la formation de l'anneau et de la pellicule, respectivement (Racha Majed, thèse 2018). Cependant, et d'une manière générale, l'étape précoce du développement des biofilms mono espèces n'est pas assez décrite.

D'où le premier objectif de la thèse qui consiste en le suivi la cinétique d'évolution de la population planctonique lors de la formation d'un biofilm en interface air-liquide produit par *Bacillus thuringiensis*.

Dans un second temps, vue l'absence de toutes informations se rapportant aux molécules impliquées dans le recrutement des bactéries planctonique en cours de développement, le deuxième objectif de cette thèse fut de caractériser un nouveau mécanisme impliqué dans le recrutement des bactéries dans le biofilm de *B. thuringiensis*. L'approche expérimentale préalablement mise au point au laboratoire GME, et qui consiste en un dispositif quantitatif a permis la sélection de 15 gènes par criblage d'une banque de mutant obtenus par mutagenèse aléatoire. Notre travail s'est focalisé sur l'un de ces gènes *Bthur002-62720* et la caractérisation moléculaire et fonctionnelle pour la protéine pour laquelle il code.

Chapitre 2 - Résultats

Chapitre 2-1

Article 1 - Massive integration of planktonic cells within a developing biofilm

La croissance du biofilm est un phénomène dynamique qui résulte de la division cellulaire et de l'immigration des cellules planctoniques vers le biofilm (recrutement). Un état d'équilibre du biofilm est atteint lorsque le gain en biomasse, dû à la division des cellules du biofilm et au recrutement des cellules planctoniques est contrebalancé par l'essaimage (le détachement des cellules du biofilm), la mortalité et la sporulation ([Al-Bakri, Gilbert et al. 2004](#)). Le recrutement de cellules planctoniques par un biofilm préexistant peut se diviser en deux étapes :

- La migration des cellules planctoniques vers le biofilm, soit d'une façon aléatoire, les bactéries mobiles nagent vers la surface et rentrent en contact au hasard avec le biofilm, soit d'une façon spécifique, en réponse à certains stimuli tels que des molécules de quorum sensing, produites par les bactéries du biofilm.
- Une fois à proximité du biofilm, les cellules planctoniques l'intègrent, soit par des interactions physico-chimiques non spécifiques, soit par des interactions récepteur-ligand spécifiques.

Les données bibliographiques relatives au rôle du recrutement dans le développement d'un biofilm monospèce sont rares. A l'inverse, la bibliographie est plus riche concernant le recrutement d'espèces bactériennes pathogènes dans un biofilm préformé par d'autres espèces ([Liu and Li 2008](#)) ([Altman, McGrath et al. 2009](#)). L'installation d'une nouvelle espèce bactérienne au sein d'un biofilm préexistant offre un avantage aux deux populations, en favorisant les transferts génétiques horizontaux et en permettant la formation de consortiums métaboliques ([Roberts, Cheah et al. 2001](#)).

Concernant le recrutement chez *B. cereus* et *B. thuringiensis* ([Houry, Briandet et al. 2010](#), [Houry, Gohar et al. 2012](#)) ont démontré que les bactéries planctoniques mobiles sont capables d'intégrer un biofilm en immersion, formé en microplaques par *Bacillus cereus*. L'entrée de ces bactéries dans le biofilm entraîne la formation de 'canaux' dans la matrice et favorise une meilleure circulation d'oxygène et de nutriments pour la communauté résidente.

B. thuringiensis et *B. cereus* produisent également une pellicule sur une interface air/liquide dans des tubes en verre. Lors de son développement, l'échange qui a lieu entre la population planctonique et le biofilm n'est pas décrit jusque-là. D'où l'objectif de la première partie de cette étude qui est donc de suivre la cinétique d'évolution de la

population planctonique lors de la formation de la pellicule au niveau de l'interface air/liquide de la souche *Bacillus thuringiensis* 407 (*Bt* 407).

En mesurant, au cours du temps et par spectrophotométrie, l'évolution de la DO600 des bactéries planctoniques et du biofilm, nous avons observé une chute importante de la densité de la population planctonique quand la croissance du biofilm atteint un plateau. Dans les mêmes conditions, en utilisant d'autres souches du groupe *B. cereus*, ou bien un mutant non sporulant *Bt* 407 *spo0A*, incapables ou moins capables, de former des biofilms, on n'observe pas une diminution de la densité de la population planctonique au cours du temps. De plus, cette chute ne peut pas être attribuée à la sédimentation des bactéries au fond du tube. La mortalité cellulaire est difficile à estimer. En effet, la mesure d'enzyme cytosolique ou d'ADN, libérés lors de la lyse cellulaire n'est pas fiable, sachant que le biofilm de *B. cereus* ou *thuringiensis* libère de nombreuses protéases ou de nucléotidases. D'un autre côté, l'interface air/liquide étant une région riche en oxygène, la formation de la pellicule chez les espèces aérobies, est par conséquent conditionnée par la présence d'un gradient d'oxygène, qui attire les bactéries vers la surface pour former le biofilm. La lyse cellulaire des bactéries planctoniques, dans le milieu de culture en dessous du biofilm, pourrait être causé par le manque d'accès en oxygène, à cause de la présence de la pellicule à l'interface. Pour cette raison, nous avons créé des conditions anaérobiques au cours de la croissance bactérienne, en couvrant l'interface air/liquide en utilisant de l'huile végétale et nous avons suivi l'évolution de la croissance des bactéries planctoniques. En absence d'oxygène, la formation de la pellicule de *B. thuringiensis* est inhibée et le milieu de culture reste turbide, ce qui prouve qu'une croissance bactérienne a eu lieu dans ce milieu. De ce fait, la formation de la pellicule à l'interface, n'induit pas une mortalité cellulaire, si des bactéries planctoniques étaient toujours présentes dans le milieu de culture.

Nous avons également observé, par microscopie à epi-fluorescence, l'intégration de bactéries planctoniques dans un biofilm en cours de formation. Les bactéries planctoniques, fluorescentes à la GFP, se situent dans des zones spécifiques du biofilm, fluorescent à la mCherry. Ce sont des zones à faible densité bactérienne, ce qui suggère que les bactéries planctoniques s'installent plutôt dans des régions où l'oxygène et les nutriments sont encore accessibles.

Cette étude appuie l'existence d'un échange dynamique entre les deux populations, planctoniques et sessiles, lors du développement d'une pellicule par *B. thuringiensis*.

Cependant, les mécanismes moléculaires impliqués dans l'étape d'intégration des bactéries planctoniques dans le biofilm de *Bacillus thuringiensis* ne sont pas encore décrits.



Article

Massive integration of planktonic cells within a developing biofilm

Nay El-Khoury ^{1,2}, Imene Bennaceur ¹, Emilie Verplaetse ¹, Stéphane Aymerich ¹, Didier Lereclus ¹, Mireille Kallassy ² and Michel Gohar ^{1,*}

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

² University of Saint-Joseph, Laboratory of Biotechnology, Unité de Recherche Technologies et Valorisation Alimentaire, Beirut, Lebanon

* Correspondence: michel.gohar@inrae.fr

Received: 23 November 2020; Accepted: date; Published: date

Abstract: During biofilm growth, the coexistence of planktonic and sessile cells can lead to dynamic exchanges between the two populations. We have monitored the fate of these populations in glass tube assays, where the *Bacillus thuringiensis* 407 strain produces a floating pellicle. Time-lapse spectrophotometric measurements methods revealed that the planktonic population grew until the pellicle starts to be produced. Thereafter, the planktonic population decreased rapidly down to a value close to zero while the biofilm was in continuous growth, showing no dispersal until 120 h of culture. We found that this decrease was induced by the presence of the pellicle, but did not occur when oxygen availability was limited, suggesting that it was independent from cell death or cell sedimentation and that the entire planktonic population has integrated the biofilm. To follow the distribution of recruited planktonic cells within the pellicle, we tagged planktonic cells with GFP and sessile cells with mCherry. Fluorescence binocular microscopy observations revealed that planktonic cells, injected through a 24h-aged pellicle, were found only in specific areas of the biofilm, where the density of sessile cells was low, showing that spatial heterogeneity can occur between recruited cells and sessile cells in a monospecies biofilm.

Keywords: biofilm; *Bacillus cereus*; *Bacillus thuringiensis*; recruitment; heterogeneity

1. Introduction

Biofilm growth can be the result of sessile cells division or of the integration of incoming bacteria (planktonic cells recruitment). Planktonic cells recruitment is extensively described in some multispecies biofilms, such as the dental plaque. In this oral biofilm, the sequential recruitment of secondary or tertiary colonizers occurs through specific interactions with pioneers species [1]. For instance, *Porphyromonas gingivalis* fimbriae interact with a glyceraldehyde 3-phosphate deshydrogenase produced by *Streptococcus oralis*, a primary colonizer of the tooth enamel [2]. Planktonic cells integration within an existing biofilm enables bacteria devoid of biofilm-forming capacities, including pathogens, to colonize and sustain their persistence in numerous environments. Cell immigration into a mature biofilm has also a significant impact on microbial ecology since it promotes expansion of the genetic pool in the resident biofilm by horizontal DNA transfer between species [1,3,4]. It also enhances the resilience to adverse environmental conditions by increasing the variety of metabolic processes within the community and can lead to spatial heterogeneity of the biofilm through species stratification, according to their metabolic requirements [5].

Bacillus cereus and *Bacillus thuringiensis* are motile, facultative aerobic, spore forming bacteria that belong to the *Bacillus cereus sensu lato* group [6]. Both species are genetically very close, but while *B. thuringiensis* is used as a natural pesticide, having a wide range of entomopathogenic activity due to parasporal crystal proteins [7], *B. cereus* is a human pathogen, involved in food poisoning [8] and systemic or local infections [9]. *B. thuringiensis* and *B. cereus* are able to produce dense biofilms at the air/liquid interface [10]. The air-liquid interface is a suitable environment for the development of aerobic microorganisms, since it provides access to oxygen. In *Shewanella oneidensis* or *Pseudomonas fluorescens*, oxygen is required for pellicle formation at the air-liquid interface [11,12]. Planktonic bacteria movement toward the biofilm requires motility. *Bacillus subtilis* immotile mutant strain was shown to have a delay in pellicle formation compared to the wild-type strain [13], and immotile mutants of *B. thuringiensis* strain 407 do not produce biofilms [10].

Although the recruitment of planktonic cells by the biofilm has been the subject of a number of reports, dynamic studies of the interaction between the two populations when a pellicle is produced at an air-liquid interface have been seldom conducted. The objective of this study was to determine the fate of a planktonic population during the development of the biofilm at the air-liquid interface, in *B. thuringiensis*.

2. Materials and Methods

2.1. Strains and DNA manipulation

Strains used in this study are listed Table S1. The *B. thuringiensis* 407 Cry⁻ strain (*Bt407*) has been cured of its Cry plasmid [14]. *Bt407* forms thick biofilms and is genetically similar to *B. cereus* strains [15]. The *Bt407* ΔSpo0A strain was constructed by insertion of a kanamycin resistance cassette in spo0A [16]. The *B. cereus* strains included in this work were ATCC14579, AH829 and ATCC10987 [17].

Two strains were used for epifluorescence microscopy observations. The GFP- tagged *Bt407* strain, expressing constitutively GFP, was constructed by inserting *gfp* in the alpha amylase gene BTB_c12100 of the *Bt407* strain (chromosome accession number CP003889). DNA fragments corresponding to the chromosomal DNA regions upstream and downstream of BTB_c12100 were generated by PCR using the primer pairs AmyAFW - AmyARV and AmyBFW - AmyBRV, respectively (supplementary material Table S1). The *gfp* coding sequence, including the SarA promoter sequence, was amplified from pCM11 [18] using primers sGFPFW and sGFP RV (Table S2). The amplified DNA fragments and the *sarA* -*gfp* fragment were cloned between the *HindIII* and the *BamHI* sites of plasmid pRN5101 [19]. The resulting plasmid was used to transform the *Bt407* wild-type strain by electroporation [14], and *sarA-gfp* was inserted into the alpha amylase gene after allelic exchange by homologous recombination [20]. The corresponding strain was designated strain *Bt407-gfp*. The mCherry-tagged *Bt407* strain was constructed as follows. A 506 bp *SphI-XbaI* DNA fragment containing the *aphaIII* promoter was amplified from the pDG783 plasmid [21] by PCR, using the primers pAphaIII-F and pAphaIII-R (Table S2), and inserted in the pHT1618 plasmid [22]. A *KpnI-EcoRI* DNA fragment including an optimized RBS sequence and the *mCherryLGC* gene was generated by PCR from pHT304-18mCherry [23] with the mCherry-F and the mCherry-R primers, and inserted in pHT1618-pAphaIII. From the resulting plasmid, a 1268 bp *SphI-EcoRI* DNA fragment was amplified by PCR and inserted in pAT28 [24], giving rise to the pAT28-mCherry plasmid. This plasmid was transformed in the *Bt407* strain to obtain the *Bt407-mCherry* strain.

2.2. Time-course of planktonic- and biofilm-populations growth

A 100 ml Erlenmayer culture flask, filled with 10 ml LB, was seeded with one colony and grown at 30°C, 175 rpm until the exponential growth phase was reached. These pre-cultures were diluted to an OD₆₀₀ of 0.01 into fresh HCT culture medium [25] and 2 ml of this dilution were distributed in UV-sterilized 3.5 ml glass cuvettes (1mm x 1mm section) sealed with a sterile cotton plug. The OD₆₀₀ of the planktonic population below the biofilm was recorded *in situ* in time-lapse using a Shimadzu UV2501 spectrophotometer, for a duration of 48 h at 2 min intervals, and at a regulated temperature of 30°C. In

one experiment, 250 μ l of sterile mineral oil (paraffin oil) was poured on top of the culture medium. Each experiments was repeated three times, and representative curves are showed. Biofilms were produced in glass tubes as described earlier [10]. Briefly, pre-cultures, obtained as specified above, were diluted to an OD₆₀₀ of 0.01 into HCT. Two milliliters of the diluted culture were distributed in UV-sterilized glass tubes (10.8 mm internal diameter, 64 mm height). After different times of incubation (from 8 h to 60 h) at 30°C the 2 ml culture medium were removed using a Pasteur pipette and the OD₆₀₀ of the floating biofilm, thoroughly resuspended and vortexed in 2 ml PBS, was measured. The biofilm OD₆₀₀ is linearly and significantly related to the number of vegetative cells or spores contained within it, the two latter having the same absorbance [26]. Representative results of three replications are shown. In the two devices (biofilm and planktonic growth measurement), the same culture medium, incubation temperature and volume was used.. The cross-section surface were similar : 0.92 cm² vs 1 cm². The only difference was that the cross section was a square for planktonic culture growth measurement, and a circle for biofilm growth measurement, which makes comparisons between the two set of results possible.

2.3. Recruitment of *gfp*-tagged planktonic cells in a *mCherry*-tagged biofilm.

Biofilms were produced in the same way as above, except that the glass tubes height was 30 mm instead of 64 mm (same diameter). The *m-cherry* labeled *Bt407* strain was used to form the biofilm, and 50 μ l of a *gfp*-labelled *Bt407* planktonic cell culture were injected in the 2ml culture medium through the 12 h-old pellicle and near the bottom of the tube, using a 26-needle gauge and a micro-manipulator to avoid pellicle disturbance. The injected planktonic cells were taken from an exponential growth phase culture in HCT medium at an OD₆₀₀ of 1.0. Two ml of this culture were centrifuged at 3000 rpm and resuspended in 0.1 ml of sterile water (final OD after injection : 0.5). The glass tubes were observed 24 h later with a fluorescence stereomicroscope.

2.4. Time-course of the pellicle formation

A *Bt407 wt* culture in exponential phase was diluted to an OD₆₀₀ of 0.01 into HCT medium. 2.5 ml of the diluted culture was distributed in a sterile 5 ml beaker (1.8 cm diameter) closed by a sterile glass slide, and incubated at 30°C. Pictures were taken every 10 minutes with a digital camera for a duration of 48 h. Pictures were processed by Adobe Photoshop® CS6 to build an mp4 video file showing the pellicle growth over time.

3. Results

3.1. The planktonic population decreases when the biofilm grows

The *Bt407 wt* strain, when cultured in static conditions, produces a floating pellicle that covers the whole liquid surface [27]. In glass tubes assays, no pellicle was formed after 10 h of culture but the culture medium was turbid, consecutively to the planktonic population growth (Fig. 1). However, after 36 h or 120 h of incubation, a dense pellicle was produced and the culture medium reversed to a transparent state similar to the one observed at the onset of the experiment (0 h).

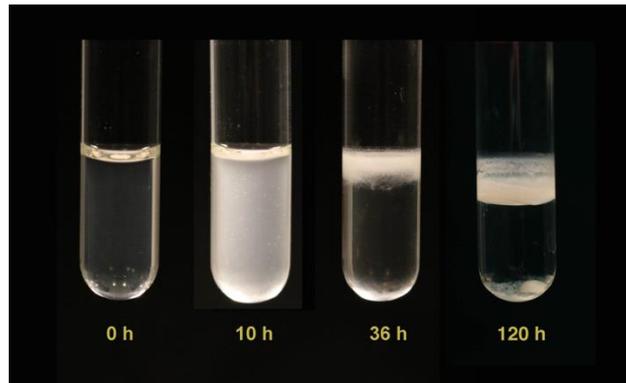


Figure 1. Biofilm formation and planktonic growth in glass tubes. The Bt407 strain was grown, in static conditions at 30°C, in HCT medium and in glass tubes. Pictures were taken at the start of the experiment (0 h), and after 10 h, 36 h or 120 h of incubation.

This observation suggested that the planktonic population vanished while the biofilm grew. To follow the fate of the planktonic population during biofilm growth, we recorded, by spectrophotometry, the time-course of bacterial density both in the pellicle and in the planktonic population (Fig. 2A). In the first hours of culture, the planktonic biomass increased rapidly until it reached a plateau at OD₆₀₀ 0.7, between 6.5 h and 12 h of incubation. At the end of this plateau, the biofilm could be detected for the first time and started its exponential growth, while the planktonic population density began to decrease. At the end of the biofilm growth, after 48 h of incubation, the planktonic population density was nearly down to zero (OD₆₀₀ 0.02). To confirm that the onset of the planktonic population decrease is simultaneous to biofilm growth, we monitored in the *Bt407* strain the pellicle formation for 41 h, in time-lapse and under a stereomicroscope. Pictures were taken every 10 minutes and assembled within a video (Video S1, supplementary material). The movie shows that the pellicle could be seen at the liquid surface between 14 h and 15 h after the start of the culture, and that after 16 h of incubation the biofilm growth increases exponentially, forming thick protrusions. After 30 h of incubation, the biofilm was fully completed. An analysis of the movie images shows that the surface covered by the biofilm increases sharply between 14 h and 17 h., after which the whole surface is covered (Fig. S1). The subsequent development of the biofilm can therefore be attributed an increase in thickness.

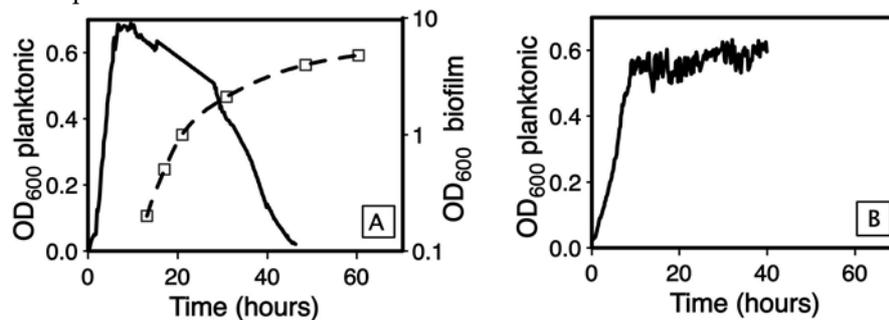


Figure 2. : Time-course of the OD₆₀₀ for planktonic or sessile populations in glass tube assay. A: strain Bt407; B: Bt407ΔSpo0A. Plain line: planktonic population; dotted line: sessile population. Left Y-axis : planktonic population OD₆₀₀, linear scale; Right Y-axis: biofilm OD₆₀₀, log-scale.

3.2. The biofilm is the cause of the planktonic population decrease

Because the start of planktonic population decrease was coincident with the onset of biofilm growth, we hypothesized that the planktonic population decrease was related to biofilm formation. To test this hypothesis, we used the sporulation-deficient mutant *Bt407* ΔSpo0A, which is unable to form a biofilm [28]. As shown Fig. 2B, the planktonic population grew rapidly until it reached a plateau at OD₆₀₀ 0.6, and thereafter showed no decrease until 48h of incubation. Therefore, the decrease in the planktonic population is a consequence of biofilm formation. To determine if the speed of decrease

depends on the biofilm biomass, we repeated the experiment with a set of *B. cereus* strains with variable abilities to form a pellicle (Fig. 3).

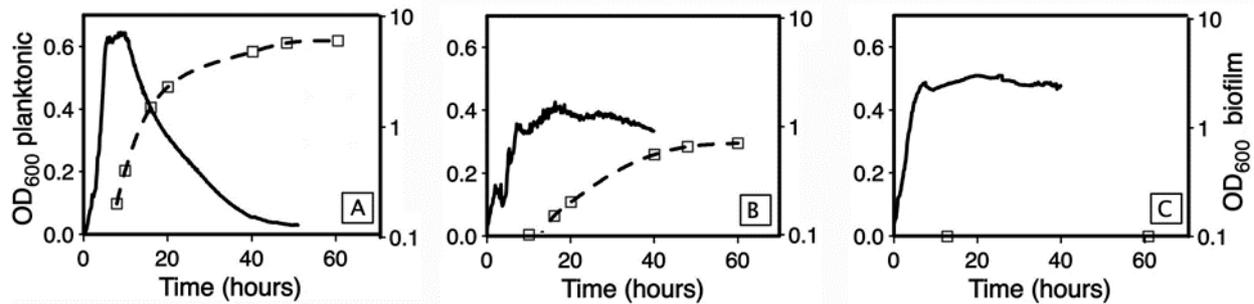


Figure 3. : Steepness of the planktonic population decrease as a function of biofilm formation ability. A: strain ATT10987; B: strain 1TCC14579; C: strain AH829. Plain line: planktonic population; dotted line: sessile population. Left Y-axis : planktonic population OD₆₀₀, linear scale; Right Y-axis: biofilm OD₆₀₀, log-scale. Assays in glass tubes.

The slope of planktonic OD₆₀₀ decrease was steep for strain ATCC10987 which produces dense biofilms [29], intermediate for strain ATCC14579 which produces poor biofilms and null for strain AH829 which is unable to form a biofilm. The relationship between the slope of planktonic OD₆₀₀ decrease and the ability to form a biofilm was linear ($r = 0.98$, $p < 0.05$) (Fig. 4).

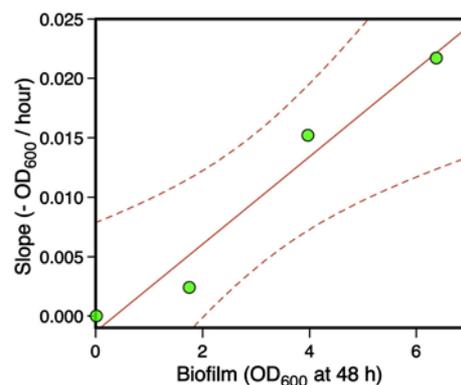


Figure 4. : Relation between the slope (OD₆₀₀/h) of the planktonic population decrease and the biomass of 48 h-aged biofilms. Data were obtained from strains *Bt407*, ATCC10987, ATCC14579 and AH829. The linear regression (slope vs biofilm) was significant ($p < 0.05$, $r = 0.98$).

3.3. The planktonic population is recruited within the biofilm.

Planktonic population decrease might be attributed to cell lysis, cell sedimentation or cell integration within the growing biofilm (recruitment). We measured the optical density of cells sedimented at the bottom of the tube. When resuspended in the initial culture volume, the sediment had an OD₆₀₀ of 0.16 ± 0.02 . It should be noted that this sediment includes not only cells from the planktonic population, but also biofilm pieces detached from the floating pellicle, which makes sedimentation unlikely to explain, by itself, the drop in planktonic OD₆₀₀. Cell mortality was difficult to estimate through measurement of released DNA or stable cytosolic proteins, because *B. thuringiensis* secretes a high number of degradative enzymes, including proteases and nucleotidases [30]. However, the reason why the biofilm could induce planktonic bacterial mortality is likely to be the limitation of oxygen exchanges, consecutively to the presence of a pellicle covering the whole surface since, even in the absence of a pellicle, the consumption of oxygen by the planktonic population leads to a low oxygen concentration in the culture medium (figure S2). To test this hypothesis, we followed over time the OD₆₀₀ of the planktonic population in a glass cuvette, in which the culture medium was covered by a layer of mineral oil, to suppress oxygen exchanges. In this condition, the planktonic population grew until it reached a peak at OD₆₀₀ 0.7, but did not decrease afterward (Fig. 5A). After 48 h of incubation, no biofilm

was produced and the culture medium was turbid, showing the presence of a planktonic population (Fig. 5B). Therefore, the micro-aerobic condition which prevails beneath the biofilm do not induce bacterial mortality, which means that the planktonic population decrease observed during biofilm growth is a consequence of recruitment.

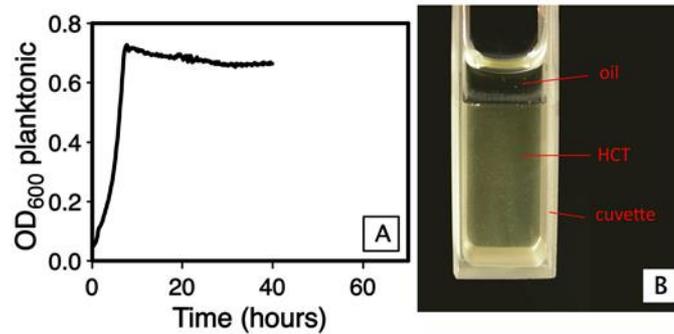


Figure 5. : Growth of *Bt407* in micro-aerobic condition. The culture was performed in static condition at 30°, in HCT medium and in a glass cuvette. A: Time-course of the OD₆₀₀ of the planktonic population. B: picture of the cuvette after 48 h of incubation.

3.4. Recruited bacteria are located in specific areas of the biofilm

To observe the integration of planktonic bacteria within the biofilm, we injected a GFP-tagged planktonic population through a 12 h-aged mCherry-tagged biofilm pellicle, in the culture medium beneath the biofilm. The biofilm was observed 24 h later with a fluorescence binocular microscope. The pellicle structure as seen in white light was heterogeneous, with clusters of high biomaterial density surrounded by material of lower density (Fig. 4). Live cells in the resident biofilm appeared as red-fluorescent macrocolonies scattered throughout the whole biofilm, in area of high biomaterial density. Interestingly, green-fluorescent macrocolonies were found in specific areas, where the density of biomaterial was high, but the density of red-fluorescent cells was low (Fig. 4, lower row)

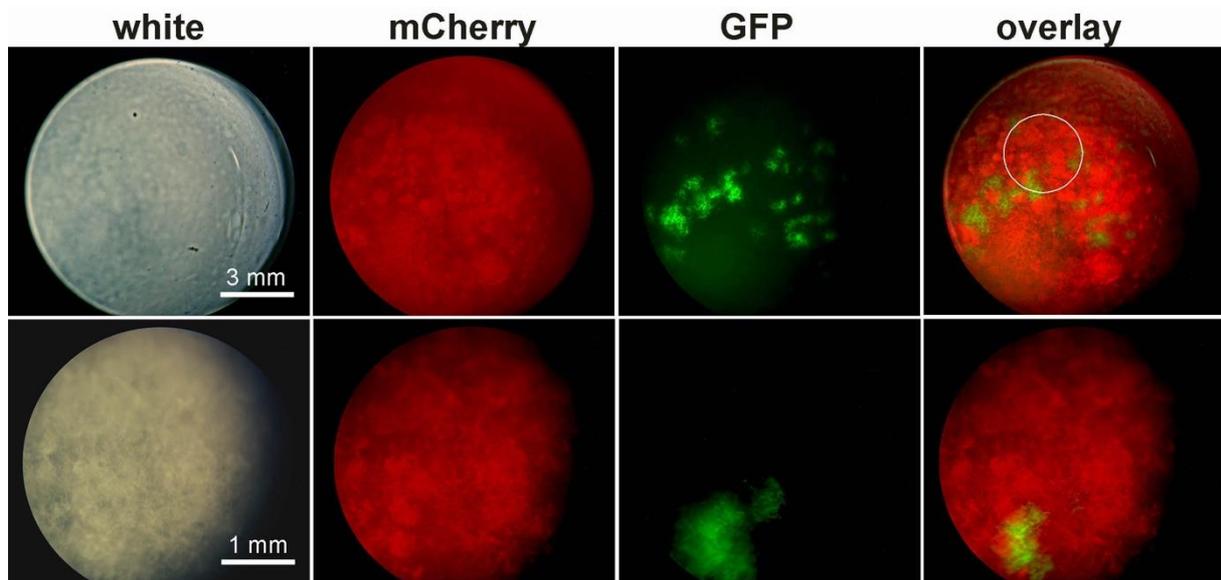


Figure 6. Recruitment of a GFP-tagged planktonic population in an mCherry-tagged biofilm. The biofilm, formed at the air liquid interface, was observed with a fluorescence binocular microscope. Upper row, view of whole biofilm surface. Bottom row, 3-fold magnification of a region near the center of the biofilm,

depicted by the white circle in the overlay of the upper row. The white bar gives the scale. White : white light; Overlay: overlay of the mcherry and the GFP channels.

4. Discussion

During the formation of a biofilm in a closed environment, two populations, sessile and planktonic, coexist and can exchange. Cells from the biofilm can migrate to the planktonic population while cells from the planktonic population can enter the biofilm. We found that, in the *B. thuringiensis* strain *Bt407*, which produces a floating pellicle, the planktonic population density drops to nearly zero when the biofilm reaches a steady state of growth. We used spectrophotometric methods to follow, in separate experiments but in very similar devices, the time-course of both populations. The planktonic population decrease starts when the biofilm initiates its growth. This observation is supported by a time-lapse photography of the pellicle formation, which reveals that the pellicle enters its exponential growth phase at the time when the planktonic population starts its decrease. However, the planktonic growth curve has already reached a maximum before the biofilm growth started, which suggests that planktonic bacteria were already in stationary phase of growth because of a deficiency in nutrients or in oxygen. But, since the planktonic population decrease did not occur in the *Spo0A* mutant, unable to produce a biofilm but motile [28], it should be a consequence of the pellicle formation. Using a set of strains with variable abilities to form a biofilm, we found that the rate of the planktonic population decrease was significantly correlated to the amount of biofilm produced, which confirms further that the biofilm is the cause of the planktonic population decrease.

The pellicle, which contains a high density of cells, is likely to reduce dramatically the dissolved oxygen in the culture medium, a situation which could lead to cell sedimentation or cell death. In *P. fluorescens*, pellicle colonizers consume oxygen, resulting in anoxia at a depth below 1.2 mm after a few hours [31]. However, *B. cereus*, which is closely related to *B. thuringiensis*, is a facultative aerobic bacterium shown to survive, although with a very low growth rate, in anaerobic conditions [32]. To determine if a low oxygen availability could, in *B. thuringiensis*, explain the planktonic population decrease, we limited air-liquid exchanges with a layer of mineral oil applied on the culture medium surface, a method already used in *P. fluorescens* to show that oxygen availability is a limiting factor for pellicle formation [12]. Despite oxygen limitation, the planktonic population did not decrease, at least until 48 h of culture, showing that the decrease observed when a pellicle is formed is independent from biofilm-induced changes in oxygen concentration. Therefore, the most likely explanation for the planktonic population decrease is its recruitment in the biofilm. However, recruitment is only part of the biofilm growth in *B. thuringiensis*, since the biofilm continued its growth while the planktonic population was already very low. In contrast, in some species such as *Legionella pneumophila*, the biofilm development relies mainly on a continuous recruitment rather than on sessile cells division [33].

We found that, in a young biofilm and while the planktonic population is still high, immigrant cells were located in specific areas of the biofilm, where the density of sessile cells was low. In *Listeria monocytogenes*, the biofilm exopolysaccharide matrix has been reported to prevent the immigration of planktonic cells [34], which could lead, in *B. thuringiensis*, to the confinement of incoming cells in area of low biomaterial density. Alternatively, the heterogeneous distribution of immigrant cells might be due to the presence in the pellicle of area in which nutrients and oxygen are present in higher quantity. Aerotaxis and chemotaxis could attract, in these micro-environments, cells from elsewhere in the pellicle or from the culture medium beneath the pellicle. Since we observed the pellicle with a fluorescence stereomicroscope, because confocal microscopy could not be used on a live floating pellicle, we did not determine the position of immigrant cells on the Z-axis. Therefore, planktonic cells could have migrated in the whole pellicle and reached secondarily suitable areas (Fig. 7A). Because the fluorescence microscopy observations took place 12 h after the injection of planktonic cells in the culture medium beneath the pellicle, the motile cells had enough time to join suitable area of the pellicle and turn into sessile cells. Alternatively, planktonic cells could have migrated directly to suitable areas located on the pellicle basal side (Fig. 7B). Immigrant cells were indeed shown to remain motile within the biofilm, at least for a few hours in *B. thuringiensis* [35], and were reported to migrate to the pellicle

in an oxygen gradient-dependent way in *B. subtilis* [13]. Interactions of freshly recruited bacteria with the biofilm matrix, as described in *Vibrio cholerae* [36,37], is unlikely to occur in the *Bt407* biofilm, since these interactions would limit bacterial movements.

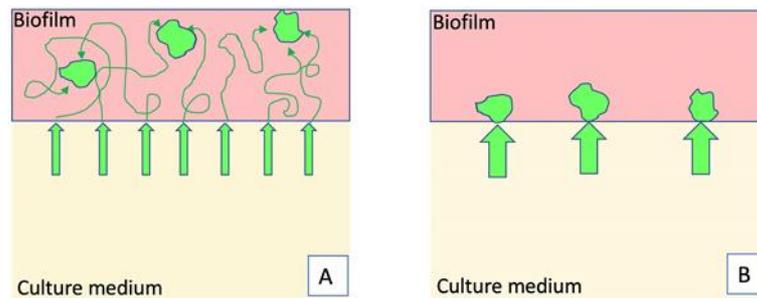


Figure 7. : Hypotheses to explain the integration of planktonic cells in specific areas of the biofilm. A: planktonic cells enter deeply in the pellicle, are motile, and settle in suitable areas. B: planktonic cells enter the pellicle directly in specific spots, located at the biofilm lower side.

While planktonic cells migrated to the surface to form a pellicle, there was no bacterial dispersal from the *Bt407* biofilm, at least until 120 h of culture (Fig. 1). In addition, no rise in the planktonic population was observed, even after 48 h of culture. Cell dispersal from the biofilm in *B. cereus* was shown to be strain-dependent. The ATCC14579 and the ATCC10789 strains were both capable of forming pellicles in Y1 medium, but only the ATCC14579 biofilm dispersed after 48 hours of culture [38]. Bacterial dispersal from the biofilm in *B. subtilis* usually occurs during biofilm maturation, when cells ‘escape’ the biofilm because nutrients availability becomes scarce [39]. The *Bt407* biofilm appears to be quite resilient to nutrient deprivation and can survive for at least 96 h of culture in the same conditions as the one used here [26]. One possible explanation for this high resilience is that in this strain the biofilm, after 48 hours of culture, contains mainly matrix components and spores [26], and could therefore be a long-lasting structure in which the biofilm protective properties enhances spores resistance to antimicrobials and to adverse environmental conditions.

5. Conclusions

In conclusion, we have shown in this work that, during the formation of a biofilm in static conditions at the air-liquid interface, one-way exchanges occur between the planktonic population and the biofilm. In the *Bt407* strain, the whole planktonic population is integrated in the biofilm while no biofilm dispersal is observed. Once integrated, the planktonic population do not mix with sessile cells, but are located in specific clusters of the biofilm pellicle. These results provide a nice example of massive immigration of planktonic cells in specific area of the biofilm, therefore contributing to its spatial heterogeneity.

Supplementary Materials: The following are available online at www.mdpi.com/xxx/s1, Table S1: List of strains used in this study, Table S2: List of primers used in this study, Video S1: Time-lapse observation of the *Bt407* wt pellicle formation.

Author Contributions: Conceptualization, M.G.; methodology, N.K and I.B.; formal analysis, N.K; writing—original draft preparation, N.K. and I.B.; writing—review and editing, M.G, S.A, D.L and MK.; supervision, M.G.; funding acquisition, M.G. and M.K. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: NK was funded by Campus France (Eiffel Excellence grant) and by the Research Council of the University Saint-Joseph de Beyrouth (FS101). I.B. was funded by the region Ile-de-France (DIM Astrea grant).

Acknowledgments: The project was supported by the Agence Universitaire de la Francophonie AUF- BMO within the “Projet de Cooperation Scientifique Inter-universitaire” program and by the Research Council of University Saint-Joseph de Beyrouth (FS151).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Kolenbrander, P.E.; Palmer, R.J.; Periasamy, S.; Jakubovics, N.S. Oral multispecies biofilm development and the key role of cell-cell distance. *Nature reviews. Microbiology* **2010**, *8*, 471-480, doi:10.1038/nrmicro2381.
2. Kolenbrander, P.E.; Palmer, R.J., Jr.; Rickard, A.H.; Jakubovics, N.S.; Chalmers, N.I.; Diaz, P.I. Bacterial interactions and successions during plaque development. *Periodontol.2000.* **2006**, *42*, 47-79.
3. Olsen, I.; Tribble, G.D.; Fiehn, N.-E.; Wang, B.-Y. Bacterial sex in dental plaque. *Journal of Oral Microbiology* **2013**, *5*, doi:10.3402/jom.v5i0.20736.
4. Roberts, A.P.; Cheah, G.; Ready, D.; Pratten, J.; Wilson, M.; Mullany, P. Transfer of TN916-like elements in microcosm dental plaques. *Antimicrob Agents Chemother* **2001**, *45*, 2943-2946, doi:10.1128/AAC.45.10.2943-2946.2001.
5. Nadell, C.D.; Xavier, J.B.; Foster, K.R. The sociobiology of biofilms. *FEMS Microbiol.Rev.* **2009**, *33*, 206-224.
6. Ehling-Schulz, M.; Lereclus, D.; Koehler, T.M. The *Bacillus cereus* Group: *Bacillus* Species with Pathogenic Potential. *Microbiol Spectr* **2019**, *7*, doi:10.1128/microbiolspec.GPP3-0032-2018.
7. Schnepf, E.; Crickmore, N.; Van Rie, J.; Lereclus, D.; Baum, J.; Feitelson, J.; Zeigler, D.R.; Dean, D.H. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.* **1998**, *62*, 775-806.
8. Kotiranta, A.; Lounatmaa, K.; Haapasalo, M. Epidemiology and pathogenesis of *Bacillus cereus* infections. *Microbes.Infect.* **2000**, *2*, 189-198.
9. Bottone, E.J. *Bacillus cereus*, a volatile human pathogen. *Clin. Microbiol. Rev.* **2010**, *23*, 382-398, doi:23/2/382.
10. Houry, A.; Briandet, R.; Aymerich, S.; Gohar, M. Involvement of motility and flagella in *Bacillus cereus* biofilm formation. *Microbiology* **2010**, *156*, 1009-1018, doi:10.1099/mic.0.034827-0.
11. Armitano, J.; Mejean, V.; Jourlin-Castelli, C. Aerotaxis governs floating biofilm formation in *Shewanella oneidensis*. *Environ Microbiol* **2013**, *15*, 3108-3118, doi:10.1111/1462-2920.12158.
12. Spiers, A.J.; Bohannon, J.; Gehrig, S.M.; Rainey, P.B. Biofilm formation at the air-liquid interface by the *Pseudomonas fluorescens* SBW25 wrinkly spreader requires an acetylated form of cellulose. *Mol Microbiol* **2003**, *50*, 15-27, doi:10.1046/j.1365-2958.2003.03670.x.
13. Holscher, T.; Bartels, B.; Lin, Y.C.; Gallegos-Monterrosa, R.; Price-Whelan, A.; Kolter, R.; Dietrich, L.E.P.; Kovacs, A.T. Motility, Chemotaxis and Aerotaxis Contribute to Competitiveness during Bacterial Pellicle Biofilm Development. *J Mol Biol* **2015**, *427*, 3695-3708, doi:10.1016/j.jmb.2015.06.014.
14. Lereclus, D.; Arantes, O.; Chaufaux, J.; Lecadet, M. Transformation and expression of a cloned delta-endotoxin gene in *Bacillus thuringiensis*. *FEMS Microbiol. Lett.* **1989**, *60*, 211-217.
15. Tourasse, N.J.; Helgason, E.; Okstad, O.A.; Hegna, I.K.; Kolsto, A.B. The *Bacillus cereus* group: novel aspects of population structure and genome dynamics. *Journal of Applied Microbiology* **2006**, *101*, 579-593.
16. Lereclus, D.; Agaisse, H.; Gominet, M.; Chaufaux, J. Overproduction of encapsulated insecticidal crystal proteins in a *Bacillus thuringiensis spo0A* mutant. *Biotechnology (N Y)* **1995**, *13*, 69-71.
17. Helgason, E.; Tourasse, N.J.; Meisal, R.; Caugant, D.A.; Kolsto, A.B. Multilocus sequence typing scheme for bacteria of the *Bacillus cereus* group. *Appl Environ Microbiol* **2004**, *70*, 191-201.
18. Lauderdale, K.J.; Malone, C.L.; Boles, B.R.; Morcuende, J.; Horswill, A.R. Biofilm dispersal of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* on orthopedic implant material. *J Orthop Res* **2010**, *28*, 55-61, doi:10.1002/jor.20943.
19. Lereclus, D.; Vallade, M.; Chaufaux, J.; Arantes, O.; Rambaud, S. Expansion of insecticidal host range of *Bacillus thuringiensis* by in vivo genetic recombination. *Biotechnology (N Y)* **1992**, *10*, 418-421.
20. Lecadet, M.M.; Chaufaux, J.; Ribier, J.; Lereclus, D. Construction of Novel *Bacillus thuringiensis* Strains with Different Insecticidal Activities by Transduction and Transformation. *Appl Environ Microbiol* **1992**, *58*, 840-849.
21. Guerout-Fleury, A.M.; Shazand, K.; Frandsen, N.; Stragier, P. Antibiotic-resistance cassettes for *Bacillus subtilis*. *Gene* **1995**, *167*, 335-336.
22. Lereclus, D.; Arantes, O. *spbA* locus ensures the segregational stability of pTH1030, a novel type of gram-positive replicon. *Mol Microbiol* **1992**, *6*, 35-46.
23. Verplaetse, E.; Slamti, L.; Gohar, M.; Lereclus, D. Cell Differentiation in a *Bacillus thuringiensis* Population during Planktonic Growth, Biofilm Formation, and Host Infection. *MBio* **2015**, *6*, e00138-00115.

24. Trieu-Cuot, P.; Carlier, C.; Poyart-Salmeron, C.; Courvalin, P. A pair of mobilizable shuttle vectors conferring resistance to spectinomycin for molecular cloning in *Escherichia coli* and in gram-positive bacteria. *Nucleic Acids Res.* **1990**, *18*, 4296.
25. Lecadet, M.M.; Blondel, M.O.; Ribier, J. Generalized Transduction in *Bacillus thuringiensis* var. berliner using Bacteriophage CP-54Ber. *J. Gen. Microbiol.* **1980**, *121*, 203-212.
26. El-Khoury, N.; Majed, R.; Perchat, S.; Kallassy, M.; Lereclus, D.; Gohar, M. Spatio-Temporal Evolution of Sporulation in *Bacillus thuringiensis* Biofilm. *Front Microbiol* **2016**, *7*, 1222, doi:10.3389/fmicb.2016.01222.
27. Candela, T.; Fagerlund, A.; Buisson, C.; Gilois, N.; Kolsto, A.B.; Okstad, O.A.; Aymerich, S.; Nielsen-Leroux, C.; Lereclus, D.; Gohar, M. CalY is a major virulence factor and a biofilm matrix protein. *Mol Microbiol* **2019**, *111*, 1416-1429, doi:10.1111/mmi.14184.
28. Fagerlund, A.; Dubois, T.; Okstad, O.A.; Verplaetse, E.; Gilois, N.; Bennaceur, I.; Perchat, S.; Gominet, M.; Aymerich, S.; Kolsto, A.B., et al. SinR controls enterotoxin expression in *Bacillus thuringiensis* biofilms. *PLoS One* **2014**, *9*, e87532, doi:10.1371/journal.pone.0087532.
29. Auger, S.; Ramarao, N.; Faille, C.; Fouet, A.; Aymerich, S.; Gohar, M. Biofilm formation and cell surface properties among pathogenic and nonpathogenic strains of the *Bacillus cereus* group. *Appl. Environ. Microbiol.* **2009**, *75*, 6616-6618, doi:AEM.00155-09
30. Gohar, M.; Gilois, N.; Graveline, R.; Garreau, C.; Sanchis, V.; Lereclus, D. A comparative study of *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus anthracis* extracellular proteomes. *Proteomics.* **2005**, *5*, 3696-3711.
31. Koza, A.; Moshynets, O.; Otten, W.; Spiers, A.J. Environmental modification and niche construction: developing O₂ gradients drive the evolution of the Wrinkly Spreader. *ISME J* **2011**, *5*, 665-673, doi:10.1038/ismej.2010.156.
32. Duport, C.; Thomassin, S.; Bourel, G.; Schmitt, P. Anaerobiosis and low specific growth rates enhance hemolysin BL production by *Bacillus cereus* F4430/73. *Arch Microbiol* **2004**, *182*, 90-95, doi:10.1007/s00203-004-0688-y.
33. Mampel, J.; Spirig, T.; Weber, S.S.; Haagensen, J.A.; Molin, S.; Hilbi, H. Planktonic replication is essential for biofilm formation by *Legionella pneumophila* in a complex medium under static and dynamic flow conditions. *Appl Environ Microbiol* **2006**, *72*, 2885-2895, doi:10.1128/AEM.72.4.2885-2895.2006.
34. Habimana, O.; Meyrand, M.; Meylheuc, T.; Kulakauskas, S.; Briandet, R. Genetic features of resident biofilms determine attachment of *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol* **2009**, *75*, 7814-7821, doi:AEM.01333-09.
35. Houry, A.; Gohar, M.; Deschamps, J.; Tischenko, E.; Aymerich, S.; Gruss, A.; Briandet, R. Bacterial swimmers that infiltrate and take over the biofilm matrix. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2012**, *109*, 13088-13093, doi:10.1073/pnas.1200791109.
36. Giglio, K.M.; Fong, J.C.; Yildiz, F.H.; Sondermann, H. Structural basis for biofilm formation via the *Vibrio cholerae* matrix protein RbmA. *J Bacteriol* **2013**, *195*, 3277-3286, doi:10.1128/JB.00374-13.
37. Smith, D.R.; Maestre-Reyna, M.; Lee, G.; Gerard, H.; Wang, A.H.; Watnick, P.I. *In situ* proteolysis of the *Vibrio cholerae* matrix protein RbmA promotes biofilm recruitment. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2015**, *112*, 10491-10496, doi:10.1073/pnas.1512424112.
38. Wijman, J.G.; de Leeuw, P.P.; Moezelaar, R.; Zwietering, M.H.; Abee, T. Air-liquid interface biofilms of *Bacillus cereus*: formation, sporulation, and dispersion. *Appl. Environ. Microbiol.* **2007**, *73*, 1481-1488.
39. Vlamakis, H.; Chai, Y.; Beaugard, P.; Losick, R.; Kolter, R. Sticking together: building a biofilm the *Bacillus subtilis* way. *Nat Rev Microbiol* **2013**, *11*, 157-168, doi:10.1038/nrmicro2960.

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



© 2020 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Chapitre 2-2

Article 2 - Polar localization of lipid rafts is dependent on plasmidic genes in *Bacillus thuringiensis*

Dans la première partie de nos résultats, nous avons démontré que lorsque la souche *B. thuringiensis* 407 (Bt 407 wt) produit des pellicules au niveau d'une interface air/liquide, il existe une corrélation positive entre la quantité du biofilm formé et la chute de DO des cellules planctoniques. Après avoir évalué la sédimentation et la mortalité cellulaire, dans ces conditions, nous avons conclu que cette décroissance de la densité cellulaire planctonique correspondrait majoritairement à un recrutement des cellules planctoniques par le biofilm en croissance exponentielle. La recherche de gènes spécifiquement impliqués dans ce phénomène nécessitait un dispositif adapté. Dans le cadre d'une étude antérieure, la mise au point d'un système de crible à grand échelle pour le recrutement a été réalisé. Une banque de mutants, obtenue par mutagenèse aléatoire, a été criblée pour identifier des mutants incapables d'intégrer leur propre biofilm. Le résultat de ce criblage a permis d'identifier parmi d'autres le gène *Bthur62720*, localisé au niveau d'un plasmide conservé, annoté BTB-9p dans la souche *B. thuringiensis* 407. Sa délétion entraîne une diminution du recrutement au niveau du biofilm de 80% par comparaison à la souche sauvage. Le produit de ce gène est une protéine de fonction inconnue, de 21 kDa. Nous n'avons pas trouvé d'homologue de *Bthur62720* chez d'autres espèces dans les bases de données. Les analyses *in silico* montrent que cette protéine présente un peptide signal en N-terminal et deux domaines transmembranaires en C-terminal. Cependant, les résultats de l'étude phénotypique montrent que ce mutant est affecté dans sa mobilité de type 'swimming' sur gélose molle. Un défaut de mobilité peut expliquer l'effet de *Bthur62720* sur le recrutement, sans qu'il soit nécessaire de faire intervenir des mécanismes spécifiques d'interaction entre la protéine et le biofilm.

Nous avons donc choisi de réorienter la deuxième partie de ce projet sur l'étude fonctionnelle du gène *Bthur62720*. Nous avons observé, au microscope, que les bactéries font des culbutes et sont incapables d'orienter leur mouvement dans leur milieu. Ce mutant n'a donc pas totalement perdu sa mobilité, mais plutôt sa capacité à orienter son mouvement, en d'autres termes, à faire de la nage linéaire. Concernant la localisation subcellulaire de la protéine, nous avons confirmé, par Western blot, la localisation de la protéine au niveau de la membrane cytoplasmique de la bactérie. De plus, en utilisant des

techniques d'imagerie cellulaire et d'immunocytochimie, nous avons visualisé la protéine au niveau des pôles et de la région septale de la cellule.

Ces résultats nous ont permis d'émettre l'hypothèse que le système chimiosenseur de la bactérie est affecté par l'absence de la protéine 62720 au niveau de la membrane. En effet, la chimiotaxie permet d'orienter le mouvement de la bactérie dans son milieu, en modifiant le sens de rotation de ses flagelles. C'est grâce à la présence d'un cluster de chimiorécepteurs au niveau des pôles de la membrane, que la bactérie est capable de détecter des gradients de molécules attractives. Ces signaux seront ensuite transmis à travers une voie de signalisation, composée des protéines cytoplasmiques, ce qui aboutit au changement de la rotation des flagelles de la bactérie. Les chimiorécepteurs sont localisés au niveau des domaines membranaires fonctionnels (FMMs). Ces domaines sont l'équivalent des radeaux lipidiques des cellules eucaryotes et possèdent une composition lipidique différente de celle du reste de la membrane. Au niveau de ces régions, il existe plusieurs protéines membranaires impliquées, soit dans des activités sensorielles de la bactérie, soit dans la morphologie bactérienne ou dans le processus de la division cellulaire. Le recrutement et la mise en place de toutes ces protéines au niveau des FMMs est assurée par des protéines chaperons, les plus connues étant les flotilines (Flo). Les Flos assurent l'intégrité de ces radeaux, l'oligomérisation et l'activation des protéines fonctionnelles localisées au niveau de ces radeaux lipidiques. Nous avons donc visualisé, en utilisant le NAO, un colorant spécifique des phospholipides membranaires, la disposition des radeaux lipidiques du mutant *Bthur62720*. Au niveau du mutant, nous n'observons plus de radeaux lipidiques au niveau des pôles et de la région septale, par comparaison avec la souche sauvage. La délétion de *Bthur62720* pourrait donc affecter la localisation des radeaux lipidiques au niveau des pôles de la cellule. Des expériences plus approfondies seront nécessaires pour mieux comprendre le rôle de la protéine 62720 au niveau de la membrane bactérienne.

Par ailleurs, du fait que ce gène est porté par un plasmide mobilisable, nous nous sommes intéressés à l'effet du gène *Bthur62720* chez la souche *B. cereus* ATCC 14579. Par électroporation, nous avons introduit dans cette souche le plasmide construit pour réaliser la complémentation du mutant, et nous avons évalué sa capacité à faire du 'swimming' sur gélose molle. Les résultats obtenus montrent que la protéine 62720 rend la souche ATCC 14579 hypermobile par rapport à la souche sauvage.

L'étude de la prévalence du plasmide BTB-9p au sein du groupe *cereus*, serait intéressante à mener pour mieux comprendre le rôle adaptatif de ce plasmide au sein de ce groupe.

Polar localization of lipid rafts is dependent on plasmidic genes in *Bacillus thuringiensis*

El-Khoury N.,^{1,2} Majed R.^{1,2,§}, Perchat S.¹, Lereclus D.¹, Kallassy M.², Gohar M.^{1,*}

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

² University of Saint-Joseph, Laboratory of Biotechnology, Unité de Recherche Technologies et Valorisation Alimentaire, Beirut, Lebanon

§ present address : Department of Physics, Cavendish Laboratory, University of Cambridge, United Kingdom

* Correspondence: michel.gohar@inrae.fr

Abstract

The *B. thuringiensis* cryptic plasmid BTP-9p carries ten open reading frames, two of which are in operon and encode for proteins of unknown function: Bthur62720 and Bthur62730. Both proteins display transmembrane domains and are predicted to be parietal. Western blots confirmed the parietal location of Bthur62720 and an sGFP-Bthur62720 protein fusion revealed that the protein was located at the cell poles and septal areas. We further found, with immunocytochemistry and cell permeation techniques, that the N-terminal extra-membranous domain of Bthur62720 was oriented toward the cytoplasmic side of the cell. In addition, after deletion of the *Bthur62720* gene, the bacterium lost its ability to swim and enters a continuous tumbling state. These results suggested that Bthur62720 could interact with the MCP chemoreceptors located in the lipid rafts. However, using the 10-N-nonyl acridine orange fluorescent dye, we found that the lipid rafts, located at the bacterial poles and the septum in the wild type strain, were randomly distributed after deletion of *Bthur62720*. Therefore, the *Bthur62720* – *Bthur62730* operon is required of the polar location of lipid rafts, itself necessary for the operation of the chemoreceptors signal transduction machinery. Impairment of this machinery, consecutively to the incorrect lipid rafts location, would lead to continuous tumbling.

Introduction

Plasmids are extrachromosomal elements which promote phenotypic bacterial diversity and play an important role in the dynamics and evolution of the bacterial genome, due to the gain or loss of genes that they harbor (Wiedenbeck and Cohan 2011). These genes can encode a variety of functions involved in the adaptation of the bacterium to its ecological niche (Gogarten, Doolittle et al. 2002) (Ochman, Lawrence et al. 2000). The *B. cereus* group has a great diversity of plasmid content (Lereclus, Lecadet et al. 1982) and a large part of the virulence and host specificity of *B. cereus sensu lato* species is due to these elements (Rasko, Altherr et al. 2005). The pXO1 and pXO2 large plasmids of the human lethal pathogen *B. anthracis* are required for the production of toxins and of a capsule (Moayeri et al., 2015), while the pCER270 large plasmid encodes genes involved in the production of the emetic toxin, a dodeca-depsipeptide, in food-borne pathogenic strains of *B. cereus* (Ehling-Schulz et al., 2015). Likewise, the entomopathogenic activity of *B. thuringiensis* is mainly due to the presence of the large Cry plasmids (Schnepf et al., 1998). Because these large plasmids harbor genes required for the pathogenic properties of the bacterium, they are extensively studied. In contrast, small plasmids, which are frequently considered as cryptic plasmids, are much less studied.

The *B. cereus* group displays a high diversity of nature and of number of plasmids per strain. *B. cereus sensu stricto* have an average of two plasmids per strain, totalizing 4.2% of total DNA, while *B. thuringiensis* contains an average of 6.4 plasmids per strain and its plasmidial DNA can make up to 11.2% of total DNA. The 407 strain of *B. thuringiensis* is particularly well provided in plasmids, having nine of them, including the cryptic plasmid BTP-9p. BTP-9p was recently described under the name pHT8.1 in the *B. thuringiensis* strain HD73 (Fazion, Perchat et al. 2018). This plasmid carries ten open reading frames, of which two, in operon and encoding for Rap8 and Phr8, has been characterized (Fazion, Perchat et al. 2018). The family of Rap and Phr proteins are quorum sensing systems, in which Rap is a phosphatase and Phr a signaling peptide inhibiting the activity of Rap. In *B. thuringiensis*, Rap8-Phr8 regulates biofilm formation and sporulation. Interestingly, the deletion of Phr8 affects the sporulation during insect infection, but not in *in vitro* cultures, highlighting the role of BTP-9p in the adaptation of the bacterium to its ecological niche (Fazion, Perchat et al. 2018). In addition to Rap8 and Phr8, BTP-9p carries 5 genes encoding hypothetical proteins. In the present work, we have analyzed the function of two of these genes, located immediately downstream from Rap8-Phr8 and organized in operon.

MATERIALS AND METHODS

Strains and DNA manipulations

The *E. coli* BL21 p GEX 62720 strain, was used to overexpress the recombinant GST-62720 for protein purification. The p GEX 62720 plasmid was constructed by inserting a 62720 coding sequence that expresses a truncated version of the protein, devoid of its signal peptide and its two transmembrane domains. DNA fragment were generated by PCR using the primer pairs 62720(p GEX)-F and 62720(p GEX)-R using the *Bt 407 cry*- chromosomal DNA as a matrix. The amplified DNA fragment was cloned between the *EcoRI* and the *BamHI* sites of plasmid p GEX. The constructed plasmid was inserted in the *E. coli* TG1 strain for amplification and then in *E. coli* BL21 for overexpression and purification of the recombinant protein. The *Bt 407-gfp* strain (article 1) is an acrySTALLIFEROUS *Bacillus thuringiensis* expressing constitutively GFP, was constructed by inserting *gfp* in the alpha amylase gene BTB_c12100 of the *Bt407* strain

Construction of Bt 407 pHT62720sgfp strain.

The *Bt 407 pHT62720sgfp* strain was constructed by inserting the GFP between the signal peptide and the transmembrane domain as follows: using the *Bt407* genomic DNA as a matrix, the *EcoRI* and *NcoI/PstI* restriction sites were inserted, respectively, in the 5' and 3' regions of a 450 bp fragment of the 5' region of the *Bthur62720* gene, by PCR amplification using the 62720_For and 62720_Nter primers (Table S1). Similarly, The *NcoI/PstI* and *HindIII* restriction sites were inserted, respectively, in the 5' and 3' regions of a 380 bp fragment of the 3' region of the *Bthur62720* gene using the 62720_Cter and 62720_Rev2 primers. Both fragments, containing overlapping ends with the *NcoI/PstI* restriction sites are hybridized also by PCR amplification. A third PCR is realized, using the hybridized fragment and the 62720_For and 62720_Rev2 primers, resulting in a 830 bp fragment containing a *EcoRI* restriction site in its 5' region, a *HindIII* restriction site in its 3' region and a *NcoI/PstI* in between the signal peptide and the transmembrane domains. This fragment was cloned between the *HindIII* and *EcoRI* restriction sites of the pHT304 plasmid. The resulting plasmid, pHT62720s was used to transform the *E. coli* TG1 strain. The *gfp* coding sequence was amplified from pCM11 using primers sGFP_For and sGFP_Rev. The amplified DNA fragment was cloned between *NcoI* and the *PstI*, respectively in the 5' and 3' regions. The pHT62720s and the *gfp* fragments were digested using the *NcoI* and *PstI* restriction enzymes. The resulting plasmid pHT62720sgfp was used to transform the *Bt407* strain. The resulting strain was designated *Bt 407 pHT62720sgfp*. The same plasmid was inserted, by electroporation, inside the *Bt 407 62720* mutant strain to study the functionality of the chimeric protein.

Construction of the Bthur62720 mutant. *Bthur0002_62720* gene was disrupted by insertion of a kanamycine resistance cassette. DNA fragment corresponding to the chromosomal DNA regions upstream and downstream of the *Bthur002_62720* genes locus respectively were generated by PCR using the primer pairs AM20F-AM20R and VA20F-VA20R (table S1). The Kana cassette was purified from plasmid pDR783 using the primer pairs KANA F and KANA R. The amplified DNA fragments and the Kana cassette were cloned between the *BamHI* and the *HindIII* sites of the pRN5101 plasmid. The resulting plasmid was used to transform the *Bt407-gfp* strain by electroporation, and the *Bthur62720* gene was deleted and replaced with the kanamycin cassette *via* allelic exchange by homologous recombination. The corresponding mutant strain was designated *Bt407-gfp Δ 62720*.

Construction of the complemented Bthur62720 mutant. Since *Bthur002_62720* is the first gene of a bicistronic operon, located upstream the *Bthur0002_62730* gene, the insertion of the

kanamycin resistance cassette to delete *Bthur002_62720* is likely to have also abolished the transcription of the *Bthur002_62730*. Therefore, both *Bthur002_62720* and *Bthur002_62730* were cloned for the construction of the complemented strain. Both genes were amplified with the *Bt 407 wild type* genomic DNA, using primers FWC62720 and RVC62730 (Table S1). The amplified DNA fragment was cloned between the PstI and the XbaI sites of the plasmid pHT304-18Z. The resulting plasmid pHT304-18Z Ω 62720-62730 was used to transform the 407 wild-type strain by electroporation. The corresponding strain was designated Δ 62720 pHT304-18Z Ω 62720-62730. The plasmid pHT304-18 Ω 62720-62730 was also used to transform the ATCC14579 wild type strain by electroporation.

Sporulation assay HCT sporulation medium (Lereclus, Arantés et al. 1989) was used to determine sporulation efficiency. The cultures were grown at 30°C with shaking at 175 r.p.m for 48 h and serial dilutions were plated in triplicate before and after heat treatment during 12 min at 80°C. The sporulation percentage was calculated as 100 X ratio between heat-resistant spores ml⁻¹ and total colony- forming units ml⁻¹. All experiments were repeated at least three times and mean values were calculated.

Biofilm formation assay

The strains used in this study were cultivated until exponential phase in LB medium and thereafter diluted into HCT fresh medium to an OD_{600nm} of 0.01. 2ml of the diluted culture were inoculated in 6 ml sterilized glass tubes and incubated at 30 °C. All experiments were repeated at least three times and mean values were calculated.

Motility assay

Swarming ability was determined on LB (0.7 %) agar plates. Strains were grown in LB medium at 30 °C until the culture reached an OD₆₀₀ of 1. A 10 μ l drop of each culture was spotted on an agar plate and incubated at 30 °C for six days.

Swimming ability was determined on LB (0.3 %) agar plates. Strains were grown in LB medium at 30 °C until the culture reached an OD₆₀₀ of 1. A 10 μ l drop was spotted on an agar plate of each culture and incubated at 30 °C overnight.

Flagella observation by transmission electron microscopy

The mutant strain was cultured in LB medium at 37°C. A bacterial suspension was harvested during exponential growth, pelleted, washed with PBS and centrifuged at 1000 rpm to avoid breaking the flagella. Cells were observed by transmission electron microscopy using a Hitachi HT 7700 microscope.

Antibody production and immunoblotting

The 62720 protein was overexpressed using the pGEX plasmid. The GST-tagged recombinant 62720 protein was purified using a Glutathione coupled SepharoseTM 4B resin (GE Healthcare). Anti-62720 serum was obtained from rabbits by four injections of the purified truncated protein. Injections and serum preparations were performed by Covalab (<http://www.Covalab.com>). Proteins from the membrane and cytoplasmic preparations of the *Bt 407* and mutant strains were resolved on 15% gels by SDS-PAGE with previous boiling of the samples. Gels were equilibrated in transfer buffer for 10 to 15 min and then electrophoretically transferred to pre-wetted PVDF membranes (0.2- μ m pore size; Bio-Rad) in a transfer apparatus (Bio-Rad) for 1h at 100V. PVDF membranes were incubated with monoclonal anti-62720 antibody (Covalab) and then with a peroxidase-conjugated secondary

antibody, which was detected by using a SuperSignal™ West Pico PLUS Chemiluminescent Substrates (ThermoFisher).

Immunostaining

Cells were grown in LB medium at 30°C until an hour after reaching stationary phase. Cells were fixed in phosphate-buffered saline (PBS) (pH 7.4) with a final concentration of 4% paraformaldehyde. Permeabilization of cells was performed with a solution of 1% Triton-X-100 in PBS for one hour. Purified anti-62720 antibodies and secondary Alexa594-conjugated goat anti-rabbit IgG antibodies (ThermoFisher) were used at 1:50 and 1:100 dilutions, respectively.

NAO staining of membrane phospholipids.

10-N-Nonyl acridine orange (NAO) (Thermo Fisher) was added to a final concentration of 2 µM to a cell culture in LB medium at 30°C that was harvested one hour after entry in stationary phase. Cells were incubated at room temperature for 15 min and washed with PBS. Fluorescence images were viewed by using a Zeiss Z1-AxioObserver fluorescence microscope. Green fluorescence from NAO was detected by using a standard GFP filter unit.

RESULTS

Bthur62720 and Bthur62730 encode putative membrane proteins

Bthur62720 and *Bthur62730* are found on a bi-cistronic operon carried on the 8.5 kb conserved plasmid BTB-9p (figure 1A). The two genes encode hypothetical proteins of unknown function. The product of *Bthur62720* (hereafter designated as 62720) is a 21 kDa protein with a predicted signal peptide and two C-terminal transmembrane domains (figure 1B). The product of *Bthur62730* (hereafter designated as 62730) is a 6.5 kDa protein which contains two transmembrane domains (figure 1C)

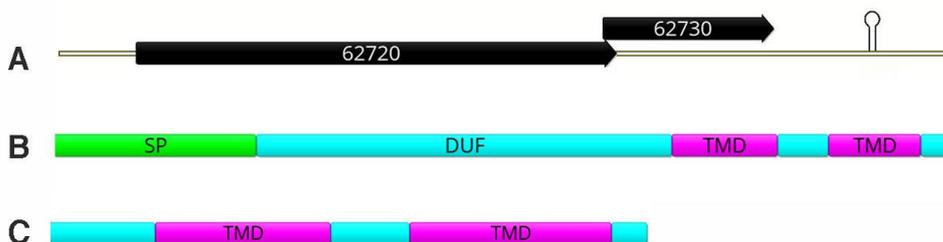


Figure 1 :genetic organization and protein structures

A : genetic organization of the *Bthur62720*- *Bthur62730* bicistronic operon.

B : putative structure of the 62720 protein.

C : putative structure of the 62730 protein.

SP : signal peptide; DUF : domain of unknown function; TMD : transmembrane domain

Inactivation of Bthur62720 has no effect on sporulation or growth

The sporulation efficiency, expressed as the percentage of spores relatively to the total number of cells, is not significantly different in the mutant strain as compared to the wild type strain ($p < 0.05$) (figure 2A), and the two strains display similar growth curves when cultured in LB medium at 30°C, until the stationary phase is reached (figure 2B).

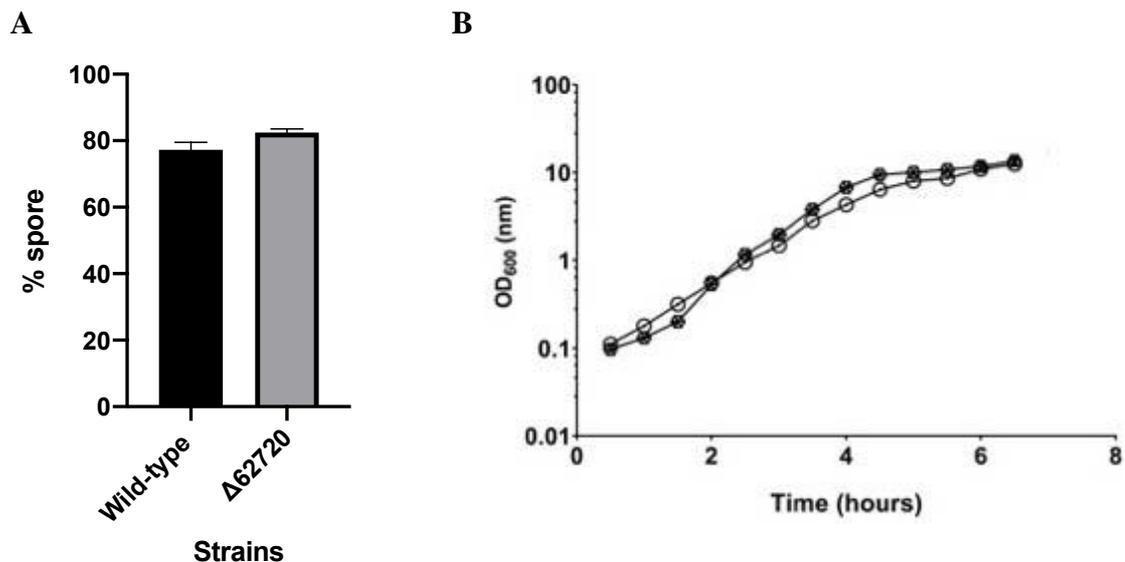


Figure 2: Sporulation efficiency and growth curves of the *B. thuringiensis* 407 strains
 A: sporulation efficiency of the wild type and of the *Bthur62720* mutant strains. Bars and error bars represent means \pm standard errors of the means.
 B: growth curves of the wild-type strain (dark circles) and of the mutant strain (open circles).
Swimming, but not swarming or flagellation, is highly impacted by Bthur62720 deletion
 Deletion of *Bthur62720* led to the complete loss of the mutant strain swimming capacity on soft agar plates as compared to the wild-type strain (figure 3A and figure 3B). Complementation of the mutant strain by *Bthur62720-62730* led to the partial restoration of the wild-type strain phenotype (figure 3C).

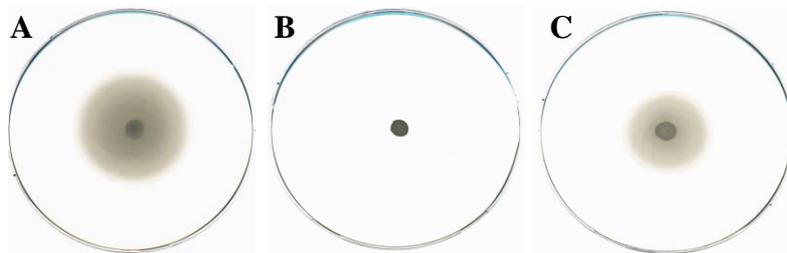


Figure 3 : Swimming assays with the *B. thuringiensis* 407 wild type and mutant strains
 Swimming assays were performed on 0.25% agar plates.
 A: wild type strain
 B: mutant strain Δ62720
 C: complemented strain Δ62720 pHT304-18Ω62720-62730

The diffuse halo surrounding the colony is due to bacterial swimming while the dark spot in the plate center is due to bacterial colony development. In contrast, deletion of *Bthur62720* did not affect the strain swarming capacity (figure 4).

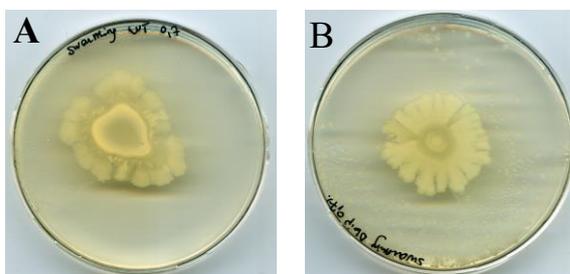


Figure 4 : Swarming assays with the *B. thuringiensis* 407 wild type and mutant strains
 Swarming assays were performed on 0.7% agar plates.
 A: wild type strain
 B: Δ62720 mutant strain

The unaffected swarming motility of the mutant strain suggested that the inability to swim of the mutant strain was not consecutive to the loss of the flagellar filament. We verified the presence of flagella filaments in the mutant harvested in exponential phase of growth using

transmission electron microscopy, and compared it to the *fla* filamentless mutant in the 407 strain.

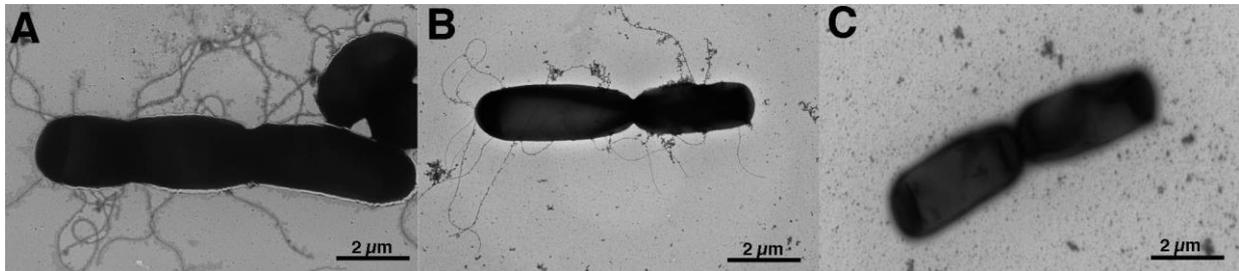


Figure 5 : Flagella filament presence in *B. thuringiensis* 407 strain.

The filament of the flagella was assessed by transmission electron microscopy in the wild type and in the *Bthur62720* mutant strain, and was compared to the *fla* mutant strain.

A: wild type strain

B: *Bthur62720* mutant strain

C: *fla* mutant strain

Because *Bthur62720* – *Bthur62730* was carried by a mobile genetic element which is not found in *B. cereus* strains, we ought to determine the effect of these genes on the swimming motility of the *B. cereus* strain ATCC14579. This strain was then transformed with the pHT304-18ZΩ62720-62730. As shown figure 6, the transformed strain was hypermotile as compared to the wild-type strain.

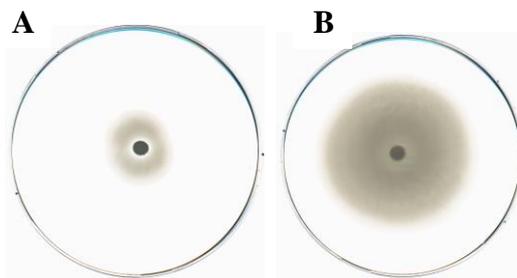


Figure 6 : Swarming assays with the *B. cereus* ATCC14579 wild type and transformed strains

Swimming assays were performed on 0.25% agar plates.

A: wild type strain

B: transformed strain with pHT304-18ZΩ62720-62730

Biofilm formation is not abolished upon Bthur62720 deletion

It has been reported earlier that the deletion of the *fla* gene, encoding a flagellin required for the production of the filament, led to unflagellated cells and to impaired biofilm formation at the air-liquid interface in the *B. thuringiensis* 407 strain (Houry, Briandet et al. 2010). However, in the same conditions, the $\Delta 62720$ mutant is still able to produce a biofilm, in amounts significantly different from the wild type strain (figure 7). The complemented $\Delta 62720$ mutant strain recovered the ability to produce a biofilm in amount similar to the wild type strain, while the Δfla strain was unable to form a biofilm, in accordance with previous reports.

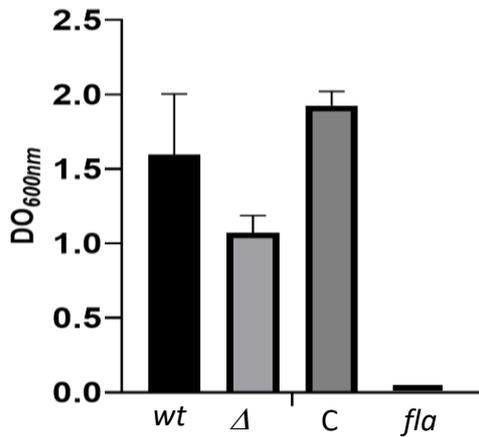


Figure 7 : Biofilm formation at the air-liquid interface with the *B. thuringiensis* 407 wild type and mutant strains

wt : wild type strain
 Δ : Δ62720 mutant strain
 C : complemented strain Δ62720 pHT304-18Ω62720-62730
 fla : Δfla mutant strain

The Bthur62720 mutant strain is motile but unable to perform linear swimming

The ability of the Δ62720 mutant strain to form a biofilm suggested that this strain kept some motility. To check this hypothesis, we recorded, by time-lapse microscopy, in contrast phase, the motility behavior of the wild type, the mutant and the complemented strains. These observations revealed that, while the wild type strain displayed a linear swimming behavior, the Δ62720 mutant strain showed a continuous tumbling state. The linear swimming motility was partially restored in the complemented mutant (movies Video S1, Video S2 and Video S3).

The 62720 protein is parietal and located at the cell poles and at septal areas

Western blot analysis revealed that the 62720 protein is detected exclusively in the cell wall fraction of the *Bt* 407 wild-type strain. No detection is observed in both the cytoplasmic or the cell wall fractions of the mutant strain. The positive control used in this assay is the truncated, transmembrane-less domains version of the 62720 protein (10 kDa), overexpressed in - and purified from the *E. coli* B121 strain.

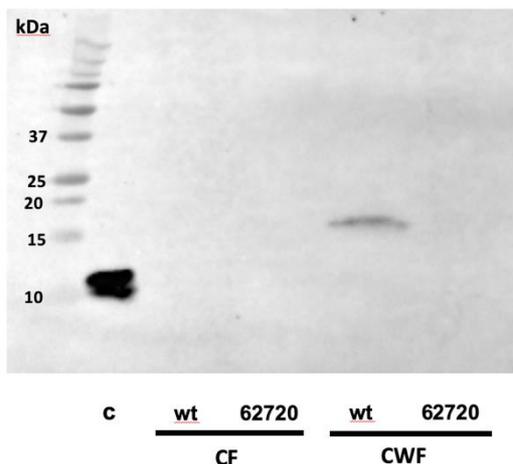


Figure 8 :Western blot on subcellular fractions of *B. thuringiensis* wild type and mutant strains

The Western blot was performed with an anti-62720 antibody. Molecular size ladder is shown on the left.

wt : wild type strain.
 62720 : Δ62720 mutant strain
 C : truncated 62720 pure protein purified from *E. coli*
 CF : cytoplasmic fraction
 CWF : cell wall fraction

The location of the 62720 protein within the cell wall was determined using a sGFP-62720 translation fusion, in which sGFP is inserted just behind the signal peptide. The translational fusion was cloned on the pHT304 plasmid. To determine if the 62720 protein was functional in the protein fusion, we transformed the Bthur62720 mutant strain with the pHT304-sGFP-62720 plasmid and determined the transformed strain swimming motility on soft agar plate. As shown figure S1, pHT304-sGFP-62720 restored partially the swimming ability of the mutant strain.

The location of the sGFP-62720 fusion protein was determined by fluorescence microscopy. The fusion protein was found only at the bacterial poles and at the septa (figure 9).

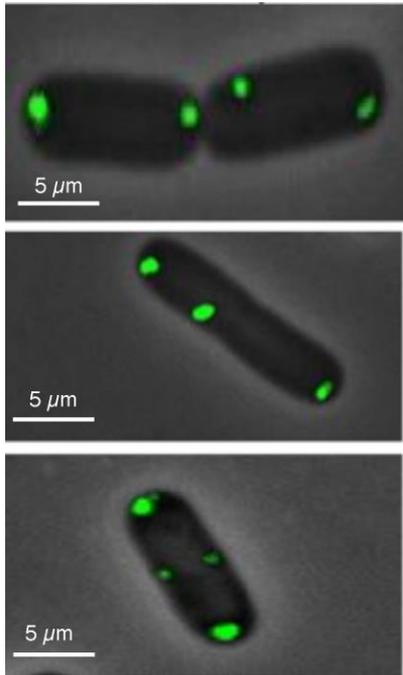


Figure 9 : Parietal location of the 62720 protein, as determined with a protein fusion.

The sGFP-62720 parietal location was determined by fluorescence microscopy. The 62720 protein was found as spots located at the poles and the septa of bacteria

The protein-fusion experiment revealed the polar and septal location of the 62720 protein but could not determine if the protein non-membranous domain was oriented toward the extracellular side of the cell wall or toward the cytoplasmic side of it. We used immunocytochemistry to determine the orientation of the protein in the cell wall. The different strains were treated with anti-62720 rabbit antibodies and AlexaFluor-595 labelled goat anti-rabbit antibodies, before and after permeabilization of the cytoplasmic membrane with Triton X100. As shown figure 10, the 62720 protein could not be detected, in any strain, before permeabilization. However, after permeabilization, the 62720 protein was observed at the cell poles and the septal area of the wild type strain and of the complemented strain. In the *Bthur62720* mutant strain, the 62720 protein could not be detected, even after permeabilization. These results show that the 62720 protein is located at poles and septa of the bacterium, and that its non-membranous domain, of unknown function, points toward the internal side of the cell.

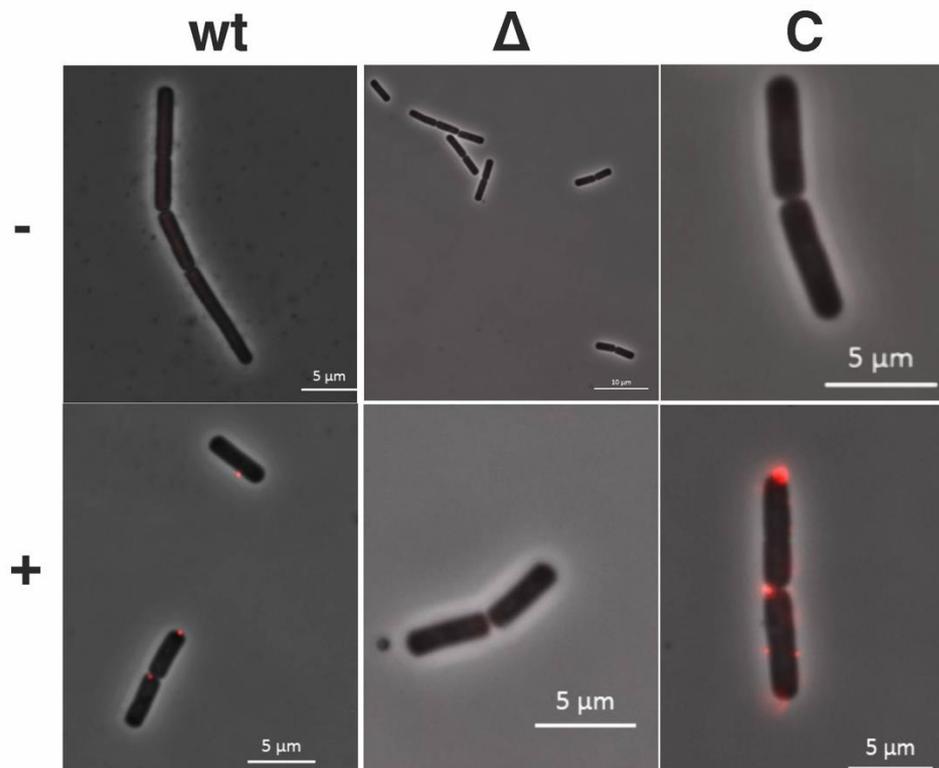


Figure 10 : Parietal location of the 62720 protein, as determined by immunochemistry. The wild type strain, the *Bthur62720* mutant strain and the complemented strain were treated with primary anti-62720 antibodies and secondary AlexaFluor-595 labelled secondary antibodies, before (-, first row) and after (+, second row) membrane permeabilization with Triton X100. And observed by fluorescence microscopy.

wt: wild type strain; Δ : *Bthur62720* mutant strain; C: complemented strain. sGFP-62720 parietal location was determined by fluorescence microscopy.

Lipid rafts distribution in the wild type and in the mutant strains

The polar location of the 62720 protein, and the continuous tumbling of the bacterium induced by its gene deletion, led us to hypothesize that this protein could act on the lipid rafts distribution in the cytoplasmic membrane. We used the 10-N nonyl acridine orange (NAO) fluorescent dye to monitor the effect of *Bthur62720* deletion on lipid rafts. NAO interacts with negatively charged phospholipids, such as cardiolipin, which are mainly found in lipid rafts. In the wild-type strain, upon treatment with NAO, green fluorescent areas are observed at the poles and septa in most cells (figure 11A). In contrast, in the *Bthur62720* mutant, the few fluorescence spots detected were not located in the poles nor at the septa (figure 11B). Complementation restored the distribution and the number of spots as detected in the wild type strain (figure 11C).

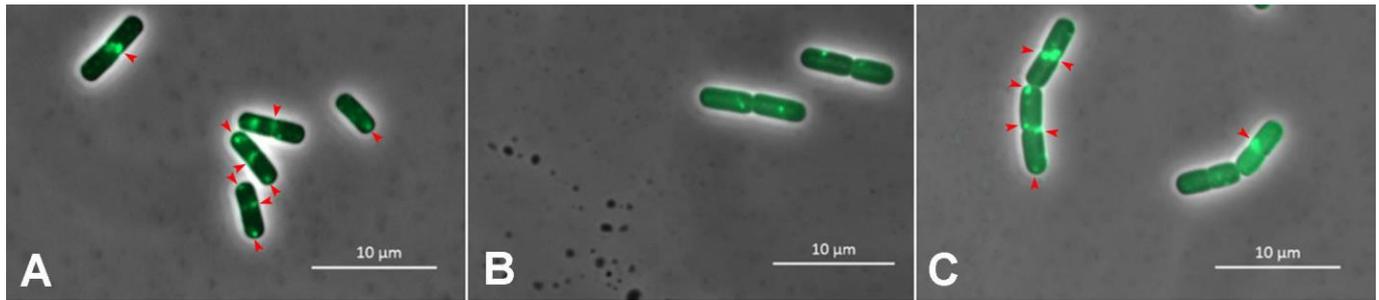


Figure 11 : Lipid rafts distribution

The wild type strain (A), the *Bthur62720* mutant strain (B) and the complemented strain (C) were treated NAO and observed in fluorescence microscopy. Lipid rafts revealed by NAO fluoresce in green. Red arrows point to fluorescence spots located at the bacterium poles or septum.

Discussion

In this study, we investigated the functions of the 62720 and 62730 proteins altogether. Deletion of *Bthur62720*, the first gene of the *Bthur62720 - Bthur62730* operon, is very likely to have a drastic effect on *Bthur62730* transcription, and we could not build the plasmid for complementation with *Bthur62720* alone. Indeed, despite numerous attempts, we failed to clone *Bthur62720* in *E. coli*, since all the recombinant clones contained codon stop mutations, suggesting that the 62720 protein is detrimental to *E. coli*. However, we could clone the whole *Bthur62720 - Bthur62730* operon in *E. coli*, meaning that if the 62720 protein is toxic to *E. coli*, this toxicity is cancelled by the 62730 protein.

The 62720 and 62730 proteins are absolutely required for swimming motility in *B. thuringiensis*, and it is likely that the loss of the BTB-9p plasmid which carries their genes would hinder the development of the bacterium in its ecological niche. This observation suggests that *Bthur62720 - Bthur62730* compensate for a genetic deficiency which could be the consequence of the adaptation of the strain to its ecological niche. Strains such as *B. cereus* ATCC14579, that do not have BTB-9p, are motile and their motility is enhanced when they are transformed with the complementation plasmid bearing the operon.

The inability of the mutant strain to swim is not the consequence of a defect in flagellation, as shown by transmission electronic microscopy. However, while the *Bthur62720* mutant strain is unable to swim, it tumbles continuously. Linear swimming requires that the flagellar motor rotates counterclockwise (CCW) (Alexandre 2010). Clockwise (CW) rotation of the flagellar motor results in continuous tumbling, the phenotype observed with the mutant strain. The direction of rotation of the flagellar motor depends on chemoreceptors called Methyl-accepting chemotaxis proteins (MCPs) (Collins, Lacal et al. 2014) (Glekas, Cates et al. 2011). Upon stimulation of the MCP chemoreceptors, a phosphorelay signal transduction system, mediated by cytoplasmic chemotaxis proteins that interact with the flagellar apparatus, is activated and trigger CW or CCW rotation (Alexandre 2010). The continuous tumbling of the mutant strain keeps the bacteria in suspension in the culture medium, which can explain why this mutant is able to produce a biofilm while the fla mutant cannot.

Clusters of chemoreceptors are often located at the cell poles, as reported for the MCPs family of *Bacillus subtilis* or the Tsr receptors of *E. coli* (Koler, Peretz et al. 2018) (Bunn and Ordal 2003). These receptors are located in specific areas of the membrane where bacteria organize signal transduction, protein secretion, and transport processes (Bramkamp and Lopez 2015).

These areas are equivalent to the lipid rafts of eukaryotic cells and are called functional membrane microdomains (FMM) (Lopez and Kolter 2010, Bramkamp and Lopez 2015, Lopez 2015). FMM can be detected with specific lipid dyes such as 10-N nonyl-acridine orange [NAO]) which binds to negatively charged lipid domains at the cell poles and at the division septum in *E. coli* and *B. subtilis* (Mileykovskaya and Dowhan 2000, Kawai, Shoda et al. 2004). The 62720 protein is predicted to be located at the cell surface, with two C-terminal transmembrane domains anchoring the protein to the cell membrane. Immunoblot analysis confirmed the 62720 protein localization at the bacterial membrane and, with the use of an sGFP-62720 protein fusion, we observed the polar and septal location of the protein. We further demonstrated that the extra-membranous domain of the protein was oriented toward the inside of the cell, using immunochemistry and cell permeabilization techniques. This subcellular location of the 62720 protein, together with its effect on motility, brought us to the hypothesis that the 62720 and 62730 proteins were in interaction with the FMM. The detection of the FMM with NAO demonstrated that, while these membranous domains are located at the poles and septa in the wild-type and the complemented strains, this is not the case in the *Bthur62720* mutant strain. Several hypotheses could explain how the 62720-62730 proteins stabilize FMM at the poles and in septal areas. These proteins could interact with the bacterial cytoskeleton, in a way similar to FtsZ (Cabeen and Jacobs-Wagner 2010) and help to maintain the lipid rafts in polar and septal areas. They could also display a flotillin-like activity. Bacterial lipid rafts or FMMs harbor specific proteins. One of them are referred to as flotillins. They are membrane-bound chaperones that recruit the proteins needed to be located in lipid rafts to be active and facilitate their interaction and oligomerization (Bramkamp and Lopez 2015). For *B. subtilis* and *E. coli*, several flotillin mutants lose their swimming or chemotaxis capacity (Dempwolff, Moller et al. 2012, Padilla-Vaca, Vargas-Maya et al. 2019). Flotillin deletion also disturbs membrane integrity, fluidity and permeability which may also indirectly affect bacterial chemotaxis, by altering the gradient sensing of the cell, or other stress related phenotypes (Zielinska, Savietto et al. 2020) (Miller and Koshland 1977).

Funding: NK was funded by Campus France (Eiffel Excellence grant) and by the Research Council of the University Saint-Joseph de Beyrouth (FS101).

Acknowledgments: The project was supported by the Agence Universitaire de la Francophonie AUF- BMO within the “Projet de Cooperation Scientifique Inter-universitaire” program and by the Research Council of University Saint-Joseph de Beyrouth (FS151).

We thank Christine Longin for the transmission electron microscopy experiments

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Alexandre, G. (2010). "Coupling metabolism and chemotaxis-dependent behaviours by energy taxis receptors." Microbiology (Reading) **156**(Pt 8): 2283-2293.

Bramkamp, M. and D. Lopez (2015). "Exploring the existence of lipid rafts in bacteria." Microbiol Mol Biol Rev **79**(1): 81-100.

Bunn, M. W. and G. W. Ordal (2003). "Transmembrane organization of the *Bacillus subtilis* chemoreceptor McpB deduced by cysteine disulfide crosslinking." J Mol Biol **331**(4): 941-949.

Cabeen, M. T. and C. Jacobs-Wagner (2010). "The bacterial cytoskeleton." Annu Rev Genet **44**: 365-392.

Collins, K. D., J. Lacal and K. M. Ottemann (2014). "Internal sense of direction: sensing and signaling from cytoplasmic chemoreceptors." Microbiol Mol Biol Rev **78**(4): 672-684.

Dempwolff, F., H. M. Moller and P. L. Graumann (2012). "Synthetic motility and cell shape defects associated with deletions of flotillin/reggie paralogs in *Bacillus subtilis* and interplay of these proteins with NfeD proteins." J Bacteriol **194**(17): 4652-4661.

Fazion, F., S. Perchat, C. Buisson, G. Vilas-Bôas and D. Lereclus (2018). "A plasmid-borne Rap-Phr system regulates sporulation of *Bacillus thuringiensis* in insect larvae." Environmental Microbiology **20**(1): 145-155.

Glekas, G. D., J. R. Cates, T. M. Cohen, C. V. Rao and G. W. Ordal (2011). "Site-specific methylation in *Bacillus subtilis* chemotaxis: effect of covalent modifications to the chemotaxis receptor McpB." Microbiology (Reading) **157**(Pt 1): 56-65.

Gogarten, J. P., W. F. Doolittle and J. G. Lawrence (2002). "Prokaryotic evolution in light of gene transfer." Mol Biol Evol **19**(12): 2226-2238.

Kawai, F., M. Shoda, R. Harashima, Y. Sadaie, H. Hara and K. Matsumoto (2004). "Cardiolipin domains in *Bacillus subtilis* marburg membranes." J Bacteriol **186**(5): 1475-1483.

Koler, M., E. Peretz, C. Aditya, T. S. Shimizu and A. Vaknin (2018). "Long-term positioning and polar preference of chemoreceptor clusters in *E. coli*." Nat Commun **9**(1): 4444.

Lereclus, D., O. Arantés, J. Chaufaux and M. M. Lecadet (1989). "Transformation and expression of a cloned 6-endotoxin gene in *Bacillus thuringiensis*." FEMS Microbiology Letters **60**: 211-217.

Lereclus, D., M. M. Lecadet, J. Ribier and R. Dedonder (1982). "Molecular relationships among plasmids of *Bacillus thuringiensis*: conserved sequences through 11 crystalliferous strains." Mol Gen Genet **186**(3): 391-398.

Lopez, D. (2015). "Molecular composition of functional microdomains in bacterial membranes." Chem Phys Lipids **192**: 3-11.

Lopez, D. and R. Kolter (2010). "Functional microdomains in bacterial membranes." Genes Dev **24**(17): 1893-1902.

Mileykovskaya, E. and W. Dowhan (2000). "Visualization of phospholipid domains in *Escherichia coli* by using the cardiolipin-specific fluorescent dye 10-N-nonyl acridine orange." J Bacteriol **182**(4): 1172-1175.

Miller, J. B. and D. E. Koshland, Jr. (1977). "Membrane fluidity and chemotaxis: effects of temperature and membrane lipid composition on the swimming behavior of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*." J Mol Biol **111**(2): 183-201.

Ochman, H., J. G. Lawrence and E. A. Groisman (2000). "Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation." Nature **405**(6784): 299-304.

Padilla-Vaca, F., N. I. Vargas-Maya, N. U. Elizarraras-Vargas, A. Rangel-Serrano, L. R. Cardoso-Reyes, T. Razo-Soria, J. Membrillo-Hernandez and B. Franco (2019). "Flotillin

homologue is involved in the swimming behavior of Escherichia coli." Arch Microbiol **201**(7): 999-1008.

Rasko, D. A., M. R. Altherr, C. S. Han and J. Ravel (2005). "Genomics of the Bacillus cereus group of organisms." FEMS Microbiol Rev **29**(2): 303-329.

Wiedenbeck, J. and F. M. Cohan (2011). "Origins of bacterial diversity through horizontal genetic transfer and adaptation to new ecological niches." FEMS Microbiol Rev **35**(5): 957-976.

Zielinska, A., A. Savietto, A. de Sousa Borges, D. Martinez, M. Berbon, J. R. Roelofsen, A. M. Hartman, R. de Boer, I. J. Van der Klei, A. K. Hirsch, B. Habenstein, M. Bramkamp and D. J. Scheffers (2020). "Flotillin-mediated membrane fluidity controls peptidoglycan synthesis and MreB movement." Elife **9**.

Chapitre 3 - Discussion et perspectives

L'objectif initial de ce projet de thèse était d'étudier, au niveau de la population puis au niveau des mécanismes moléculaires impliqués, le phénomène de recrutement de bactéries planctoniques dans leur biofilm, en interface air-liquide, chez *B. thuringiensis*. Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à l'étude du comportement de la population planctonique au cours de la formation du biofilm. Dans un second temps, et afin d'identifier les gènes impliqués spécifiquement dans le recrutement, nous avons eu recours à des résultats obtenus précédemment au laboratoire, suite à la mise en place d'un dispositif expérimental qui a permis de cribler une banque de mutants obtenue par mutagenèse aléatoire pour leur capacité à être recrutés dans un biofilm. Parmi plusieurs gènes identifiés, nous avons sélectionné le gène *Bthur62720*, dont la délétion impacte fortement le recrutement et qui est présent sur un plasmide mobilisable et codant pour une protéine de fonction inconnue. Ce plasmide possède deux gènes codant pour le système de quorum sensing *rap-phr*, impliqué dans la régulation de la sporulation de *B. thuringiensis* dans les cadavres d'insectes, qui avaient été l'objet d'une étude au laboratoire GME. C'est dans ce cadre que nous avons souhaité préciser la fonction de cette protéine.

1- RÔLE DU RECRUTEMENT DES CELLULES PLANCTONIQUES DANS LE DÉVELOPPEMENT DU BIOFILM

Des travaux antérieurs avaient montré, en utilisant les flow-cells comme dispositif expérimental, l'entrée durable de cellules planctoniques dans un biofilm en immersion de *B. thuringiensis* (Houry, Briandet et al. 2010, Houry, Gohar et al. 2012). Suite à cette observation, nous avons choisi de travailler sur des biofilms en interface air/liquide formés en tube de verre, une condition où *B. thuringiensis* forme rapidement des biofilms denses, en vue de mieux comprendre les cinétiques de croissance et les mécanismes moléculaires impliqués dans l'intégration des bactéries planctoniques dans le biofilm. La première étape a été de suivre la cinétique d'évolution des populations planctonique et sessile lors de la formation d'un biofilm en tube de verre à l'interface air-liquide, pour des souches de *B. thuringiensis/cereus* ayant différentes capacités de formation de biofilm. Les résultats obtenus montrent qu'il existe une corrélation positive entre la quantité de biofilm formé et la chute de DO600, qui est due au recrutement des bactéries planctoniques par le biofilm et pas à la sédimentation ou la lyse cellulaire. De plus,

l'observation, pas microscopie à épifluorescence, de l'intégration des bactéries planctoniques dans un biofilm préformé révèle que leur distribution spatiale est hétérogène au sein du biofilm.

En perspective à ce travail, il serait intéressant d'étudier l'intégration de bactéries planctoniques d'espèces pathogènes dans un biofilm formé par *B. cereus* ou *B. thuringiensis*. En utilisant la microscopie confocale à balayage laser, nous pouvons observer, d'une façon plus fine, l'installation hétérogène des bactéries planctoniques dans la pellicule.

Cette approche nous permettra de mieux comprendre l'aspect écologique impliqué dans la formation de biofilm multi-espèce.

2- IDENTIFICATION ET CARACTERISATION DU GENE *BTHUR002_62720*.

Nous nous sommes demandés si le recrutement est un phénomène purement stochastique, qui dépend de la concentration des cellules planctoniques en contact avec le biofilm, ou s'il est un phénomène actif, qui requiert des déterminants génétiques spécifiques chez la bactérie.

Pour ce faire, dans le cadre d'une thèse réalisée au laboratoire GME, un dispositif expérimental (Peg Essay) avait été mis au point en vue de la recherche de gènes impliqués dans le recrutement des bactéries planctoniques par le biofilm. Suite au criblage d'une banque de mutants par transposition (mini-Tn10), parmi les clones testés, 15 clones différents ont été significativement affectés avec un pourcentage de recrutement en baisse de 21% à 63% par rapport à la souche sauvage. Parmi ces clones, certains sont touchés dans des gènes codant soit pour des protéines hypothétiques, des régulateurs, des transporteurs, ou des protéines impliquées dans les mécanismes de réparation de l'ADN. Nous avons choisi de travailler sur le gène *Bthur62720*, dont l'inactivation entraîne un défaut important de recrutement, celui-ci étant ramené à 21% par rapport à la souche sauvage. Les expériences de délétion et de complémentation de ce gène confirment le phénotype observé. Ces données suggèrent que le gène *Bthur62720* joue un rôle important dans le processus d'intégration des cellules planctoniques dans le biofilm.

En tube de verre, lors de la formation du biofilm avec le mutant *Bthur62720* en interface air-liquide, nous avons constaté que la population planctonique de ce

mutant ne présente pas de décroissance. De plus, ce mutant n'est pas affecté dans sa capacité à former des biofilms.

Sachant que le recrutement dépend en partie du mouvement des bactéries vers le biofilm, nous avons testé la mobilité flagellaire du mutant. Les études phénotypiques montrent que la délétion de *Bthur62720* affecte la nage linéaire, mais pas le tumbling ni la présence de flagelles à la surface des cellules. De plus, nous avons localisé la protéine 62720 aux pôles et régions septales de la bactérie. Sachant que les chimiorécepteurs de la bactérie sont souvent localisés au niveau des radeaux lipidiques des pôles de la cellule, nous avons émis l'hypothèse que 62720 affecte le bon fonctionnement des chimiorécepteurs de la bactérie. Pour visualiser la distribution des radeaux lipidiques aux niveau des pôles nous avons observé, nous avons utilisé le colorant 10-N-nonyl acridine orange (NAO). Les résultats obtenus révèlent que cette délétion désorganise la distribution des radeaux lipidiques. Ceci suggère que la protéine 62720 stabilise les radeaux lipidiques aux pôles de la cellule. La localisation polaire de ces radeaux serait nécessaire pour le regroupement des chimiorécepteurs, lui-même requis pour assurer une fonction normale de chimiotaxie et donc, la nage linéaire. Au niveau de ces radeaux lipidiques, il existe des protéines membranaires nommées flotillines. Elles sont localisées exclusivement au niveau des radeaux lipidiques et permettent le recrutement, l'oligomérisation et l'activation des protéines impliquées dans des voies de signalisation ([Bramkamp and Lopez 2015](#)). Chez *B. subtilis* et *E. coli*, la délétion de gènes codant pour des flotillines induisent une perte de la nage ou de la chimiotaxie ([Padilla-Vaca, Vargas-Maya et al. 2019](#)) ainsi qu'une perturbation de l'intégrité, de la fluidité et de la perméabilité de la membrane. Ceci peut aussi affecter plusieurs voies de signalisation activées en cas de stress, mais aussi la chimiotaxie ou l'aérotaxie de la bactérie en altérant sa capacité de détection du gradient chimique du milieu externe ([Dempwolff, Moller et al. 2012](#), [Zielinska, Saviotto et al. 2020](#)). En perspective, il serait intéressant d'évaluer la chimiotaxie du mutant et, en parallèle, de tester plusieurs phénotypes liés à la réponse au stress de la bactérie, comme la croissance à basse température ou bien la résistance aux antibiotiques, par comparaison à la souche sauvage. Une analyse de la composition, protéique et lipidique des radeaux lipidiques du mutant est également intéressante et pourrait confirmer une altération de la perméabilité ou la fluidité de

la membrane, au cas où le mutant présente une réponse au stress différente de celle de la souche sauvage.

D'un autre côté, le gène *Bthur62720* fait partie d'un opéron bi-cistronique et est porté par le plasmide annoté BTB-9p dans la souche *B. thuringiensis 407 wt*. Le second gène de l'opéron, *Bthur62730*, dont le cadre de lecture chevauche celui de *Bthur62720* de 16 nucléotides, code pour une protéine hypothétique, également prédite pour être localisée au niveau de la membrane. Sachant que *Bthur62720* fait partie d'un opéron, son inactivation, par insertion d'une cassette de résistance à la kanamycine dans le sens inverse de sa transcription, empêche probablement l'expression du second gène. De ce fait, la complémentation de la souche mutante a été réalisée avec les deux gènes de l'opéron. De façon intéressante, nous n'avons pas réussi à compléter la souche mutante uniquement avec le gène *Bthur62720*. En effet, il était impossible de cloner le gène seul chez *E. coli*. Les clones recombinants obtenus présentaient tous des mutations créant des codons stop. Il serait intéressant de déterminer si le gène *Bthur62720* seul est létal pour l'espèce *E. coli* et pour *B. thuringiensis*, en exprimant le gène *Bthur62720* sous le contrôle d'un promoteur inductible. Si l'hypothèse de létalité est confirmée et les deux gènes sont requis pour le clonage et la complémentation, ceci suggère que la présence des deux protéines est requise pour un bon fonctionnement de la membrane bactérienne. Il serait donc intéressant d'étudier une possible interaction entre les deux protéines au niveau de la membrane, en utilisant la technique de double hybride et en essayant de colocaliser les deux protéines par microscopie à épifluorescence. Au final, cette étude nous a permis de montrer l'implication d'un gène plasmidique dans la distribution des radeaux lipidiques au niveau de la membrane. Ce mode d'action affecte indirectement la nage linéaire de la bactérie.

En ce qui concerne l'identification de déterminants moléculaires impliqués l'intégration de bactéries planctoniques dans un biofilm, il serait intéressant de cribler un plus grand nombre de clones pour détecter d'autres gènes candidats impliqués dans ce phénomène.

3-DISTRIBUTION DU GENE *BTHUR62720* DANS LE GROUPE *B. CEREUS SENSU LATO*

Après avoir recherché la présence du gène *Bthur62720* dans la banque NCBI, il s'est avéré que ce gène est présent chez des souches de *Bacillus thuringiensis*, et est localisé exclusivement au niveau d'un plasmide détecté chez certaines souches de *B. thuringiensis* où il est entièrement conservé. Chez *B. thuringiensis* 407 wt, la souche modèle de nos laboratoires, le plasmide qui porte *Bthur62720* et *Bthur62730* est annoté BTB-9p. Du fait que ce plasmide porte ces deux gènes jouant un rôle dans la mobilité de type 'swimming' et que *B. thuringiensis* est mobile et possède un appareil flagellaire péritriche bien décrit, plusieurs questions sont soulevées :

- Quelles sont les conséquences de l'absence de ces deux gènes au sein des souches de *B. cereus* ou de *B. thuringiensis*, au niveau adaptatif et ainsi qu'au niveau de leur distribution écologique ?
- Quel serait la distribution de ce plasmide au sein de l'espèce *thuringiensis* et du groupe *cereus* ?
- Pourquoi certaines souches de l'espèce *thuringiensis* ont besoin de ce plasmide pour assurer la mobilité de type 'swimming' ?

Nous avons montré que ce gène augmente la capacité de mobilité des souches ne le possédant pas naturellement et auxquelles il est transféré. A cette fin, nous avons transformé la souche ATCC14579 avec le plasmide *pHT304-18 Z Ω 62720-62730* et nous avons ensuite comparé sa mobilité par rapport à celle de la souche sauvage ATCC14579. Les résultats montrent qu'après transformation la souche ATCC14579 présente une hypermobilité par rapport à la souche sauvage. Au vu de ces résultats, il serait intéressant de tester si ce gène augmente la capacité de mobilité dans un plus grand nombre de souches, ne possédant pas ce plasmide, du groupe *cereus*.

Dans la littérature, les plasmides ont toujours été considérés comme étant des éléments génétiques accessoires du génome bactérien, offrant dans certains cas des avantages à la bactérie. Les travaux entretenus durant ce projet de thèse ont contribué à illustrer le rôle joué par le plasmide BTB-9p dans l'adaptation de *B. thuringiensis* à sa niche écologique.

Références

Abee, T., A. T. Kovacs, O. P. Kuipers and S. van der Veen (2011). "Biofilm formation and dispersal in Gram-positive bacteria." Curr Opin Biotechnol **22**(2): 172-179.

Agaisse, H., M. Gominet, O. A. Okstad, A. B. Kolsto and D. Lereclus (1999). "PlcR is a pleiotropic regulator of extracellular virulence factor gene expression in *Bacillus thuringiensis*." Mol Microbiol **32**(5): 1043-1053.

Agata, N., M. Ohta, Y. Arakawa and M. Mori (1995). "The *bceT* gene of *Bacillus cereus* encodes an enterotoxigenic protein." Microbiology (Reading) **141** (Pt 4): 983-988.

Al-Bakri, A. G., P. Gilbert and D. G. Allison (2004). "Immigration and emigration of *Burkholderia cepacia* and *Pseudomonas aeruginosa* between and within mixed biofilm communities." Journal of Applied Microbiology **96**(3): 455-463.

Aldridge, P. and K. T. Hughes (2002). "Regulation of flagellar assembly." Curr Opin Microbiol **5**(2): 160-165.

Aldridge, P., J. E. Karlinsey, E. Becker, F. F. Chevance and K. T. Hughes (2006). "Flk prevents premature secretion of the anti-sigma factor FlgM into the periplasm." Mol Microbiol **60**(3): 630-643.

Alexandre, G. (2010). "Coupling metabolism and chemotaxis-dependent behaviours by energy taxis receptors." Microbiology (Reading) **156**(Pt 8): 2283-2293.

Alexandre, G., S. E. Greer and I. B. Zhulin (2000). "Energy taxis is the dominant behavior in *Azospirillum brasilense*." J Bacteriol **182**(21): 6042-6048.

Altman, S. J., L. K. McGrath, C. A. Souza, J. K. Murton and A. K. Camper (2009). "Integration and decontamination of *Bacillus cereus* in *Pseudomonas fluorescens* biofilms." J Appl Microbiol **107**(1): 287-299.

Amin, D. N. and G. L. Hazelbauer (2012). "Influence of membrane lipid composition on a transmembrane bacterial chemoreceptor." J Biol Chem **287**(50): 41697-41705.

Anantharaman, V. and L. Aravind (2000). "Cache - a signaling domain common to animal Ca(2+)-channel subunits and a class of prokaryotic chemotaxis receptors." Trends Biochem Sci **25**(11): 535-537.

Armitano, J., V. Mejean and C. Jourlin-Castelli (2013). "Aerotaxis governs floating biofilm formation in *Shewanella oneidensis*." Environ Microbiol **15**(11): 3108-3118.

Armitano, J., V. Mejean and C. Jourlin-Castelli (2014). "Gram-negative bacteria can also form pellicles." Environ Microbiol Rep **6**(6): 534-544.

Armitano, J., V. Méjean and C. Jourlin-Castelli (2013). "Aerotaxis governs floating biofilm formation in *Shewanella oneidensis*." Environmental Microbiology: n/a-n/a.

Auger, S., E. Krin, S. Aymerich and M. Gohar (2006). "Autoinducer 2 affects biofilm formation by *Bacillus cereus*." Appl Environ Microbiol **72**(1): 937-941.

Azakami, H., H. Nakashima, H. Akimichi, Y. Noiri, S. Ebisu and A. Kato (2006). "Involvement of N-acetyl-D-galactosamine-specific lectin in biofilm formation by the periodontopathogenic bacterium, *Eikenella corrodens*." Biosci Biotechnol Biochem **70**(2): 441-446.

Azeredo, J., N. F. Azevedo, R. Briandet, N. Cerca, T. Coenye, A. R. Costa, M. Desvaux, G. Di Bonaventura, M. Hebraud, Z. Jaglic, M. Kacaniova, S. Knochel, A. Lourenco, F. Mergulhao, R. L. Meyer, G. Nychas, M. Simoes, O. Tresse and C. Sternberg (2017). "Critical review on biofilm methods." Crit Rev Microbiol **43**(3): 313-351.

Babuke, T. and R. Tikkanen (2007). "Dissecting the molecular function of reggie/flotillin proteins." Eur J Cell Biol **86**(9): 525-532.

Bai, F., T. Minamino, Z. Wu, K. Namba and J. Xing (2012). "Coupling between switching regulation and torque generation in bacterial flagellar motor." Phys Rev Lett **108**(17): 178105.

Baker, M. D., P. M. Wolanin and J. B. Stock (2006). "Systems biology of bacterial chemotaxis." Curr Opin Microbiol **9**(2): 187-192.

Bardy, S. L., S. Y. M. Ng and K. F. Jarrell (2003). "Prokaryotic motility structures." Microbiology (Reading) **149**(Pt 2): 295-304.

Barken, K. B., S. J. Pamp, L. Yang, M. Gjermansen, J. J. Bertrand, M. Klausen, M. Givskov, C. B. Whitchurch, J. N. Engel and T. Tolker-Nielsen (2008). "Roles of type IV pili, flagellum-mediated motility and extracellular DNA in the formation of mature multicellular structures in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms." Environ Microbiol **10**(9): 2331-2343.

Beecher, D. J. and A. C. L. Wong (2000). "Tripartite haemolysin BL: isolation and characterization of two distinct homologous sets of components from a single *Bacillus cereus* isolate." Microbiology (Reading) **146** (Pt 6): 1371-1380.

Berg, H. C. (2003). "The rotary motor of bacterial flagella." Annu Rev Biochem **72**: 19-54.

Berry, C., S. O'Neil, E. Ben-Dov, A. F. Jones, L. Murphy, M. A. Quail, M. T. Holden, D. Harris, A. Zaritsky and J. Parkhill (2002). "Complete sequence and organization of pBtoxis, the toxin-coding plasmid of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*." Appl Environ Microbiol **68**(10): 5082-5095.

Billings, N., A. Birjiniuk, T. S. Samad, P. S. Doyle and K. Ribbeck (2015). "Material properties of biofilms-a review of methods for understanding permeability and mechanics." Rep Prog Phys **78**(3): 036601.

Blair, D. F. and H. C. Berg (1991). "Mutations in the MotA protein of *Escherichia coli* reveal domains critical for proton conduction." J Mol Biol **221**(4): 1433-1442.

Blair, D. F., D. Y. Kim and H. C. Berg (1991). "Mutant MotB proteins in *Escherichia coli*." J Bacteriol **173**(13): 4049-4055.

Boldog, T., S. Grimme, M. Li, S. G. Sligar and G. L. Hazelbauer (2006). "Nanodiscs separate chemoreceptor oligomeric states and reveal their signaling properties." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(31): 11509-11514.

Boles, B. R. and A. R. Horswill (2012). "Swimming cells promote a dynamic environment within biofilms." Proc Natl Acad Sci U S A **109**(32): 12848-12849.

Borlee, B. R., A. D. Goldman, K. Murakami, R. Samudrala, D. J. Wozniak and M. R. Parsek (2010). "*Pseudomonas aeruginosa* uses a cyclic-di-GMP-regulated adhesin to reinforce the biofilm extracellular matrix." Mol Microbiol **75**(4): 827-842.

Boyeldieu, A., A. Ali Chaouche, M. Ba, F. A. Honore, V. Mejean and C. Jourlin-Castelli (2020). "The phosphorylated regulator of chemotaxis is crucial throughout biofilm biogenesis in *Shewanella oneidensis*." NPJ Biofilms Microbiomes **6**(1): 54.

Bramkamp, M. and D. Lopez (2015). "Exploring the existence of lipid rafts in bacteria." Microbiol Mol Biol Rev **79**(1): 81-100.

Branda, S. S., F. Chu, D. B. Kearns, R. Losick and R. Kolter (2006). "A major protein component of the *Bacillus subtilis* biofilm matrix." Molecular Microbiology **59**(4): 1229-1238.

Branda, S. S., J. E. Gonzalez-Pastor, S. Ben-Yehuda, R. Losick and R. Kolter (2001). "Fruiting body formation by *Bacillus subtilis*." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(20): 11621-11626.

Branda, S. S., J. E. Gonzalez-Pastor, E. Dervyn, S. D. Ehrlich, R. Losick and R. Kolter (2004). "Genes involved in formation of structured multicellular communities by *Bacillus subtilis*." J Bacteriol **186**(12): 3970-3979.

Bravo, A., S. S. Gill and M. Soberon (2007). "Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control." Toxicon **49**(4): 423-435.

Bray, D., M. D. Levin and C. J. Morton-Firth (1998). "Receptor clustering as a cellular mechanism to control sensitivity." Nature **393**(6680): 85-88.

Briegel, A., D. R. Ortega, E. I. Tocheva, K. Wuichet, Z. Li, S. Chen, A. Muller, C. V. Iancu, G. E. Murphy, M. J. Dobro, I. B. Zhulin and G. J. Jensen (2009). "Universal architecture of bacterial chemoreceptor arrays." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(40): 17181-17186.

Brown, P. N., M. Terrazas, K. Paul and D. F. Blair (2007). "Mutational analysis of the flagellar protein *FliG*: sites of interaction with *FliM* and implications for organization of the switch complex." J Bacteriol **189**(2): 305-312.

Buttner, D. (2012). "Protein export according to schedule: architecture, assembly, and regulation of type III secretion systems from plant- and animal-pathogenic bacteria." Microbiol Mol Biol Rev **76**(2): 262-310.

Candela, T., A. Fagerlund, C. Buisson, N. Gilois, A. B. Kolsto, O. A. Okstad, S. Aymerich, C. Nielsen-Leroux, D. Lereclus and M. Gohar (2019). "CalY is a major virulence factor and a biofilm matrix protein." Mol Microbiol **111**(6): 1416-1429.

Cardoso, P., F. Fazion, S. Perchat, C. Buisson, G. Vilas-Boas and D. Lereclus (2020). "Rap-Phr Systems from Plasmids pAW63 and pHT8-1 Act Together To Regulate Sporulation in the *Bacillus thuringiensis* Serovar *kurstaki* HD73 Strain." Appl Environ Microbiol **86**(18).

Cardoso, P. F., S. Perchat, L. A. Vilas-Boas, D. Lereclus and G. T. Vilas-Boas (2019). "Diversity of the Rap-Phr quorum-sensing systems in the *Bacillus cereus* group." Curr Genet **65**(6): 1367-1381.

Carpentier, B. and O. Cerf (1993). "Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry." The Journal of Antimicrobial Chemotherapy **75**(6): 499-511.

Carpentier, B. and O. Cerf (1993). "Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry." J Appl Bacteriol **75**(6): 499-511.

Ceri, H., M. E. Olson, C. Stremick, R. R. Read, D. Morck and A. Buret (1999). "The Calgary Biofilm Device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms." J Clin Microbiol **37**(6): 1771-1776.

Chapman, M. R., L. S. Robinson, J. S. Pinkner, R. Roth, J. Heuser, M. Hammar, S. Normark and S. J. Hultgren (2002). "Role of *Escherichia coli* curli operons in directing amyloid fiber formation." Science **295**(5556): 851-855.

Charon, N. W., A. Cockburn, C. Li, J. Liu, K. A. Miller, M. R. Miller, M. A. Motaleb and C. W. Wolgemuth (2012). "The unique paradigm of spirochete motility and chemotaxis." Annu Rev Microbiol **66**: 349-370.

Cheung, J. and W. A. Hendrickson (2010). "Sensor domains of two-component regulatory systems." Curr Opin Microbiol **13**(2): 116-123.

Chevance, F. F. and K. T. Hughes (2008). "Coordinating assembly of a bacterial macromolecular machine." Nat Rev Microbiol **6**(6): 455-465.

Chilcott, G. S. and K. T. Hughes (2000). "Coupling of flagellar gene expression to flagellar assembly in *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* and *Escherichia coli*." Microbiol Mol Biol Rev **64**(4): 694-708.

Christensen, B. B., C. Sternberg, J. B. Andersen, R. J. Palmer, Jr., A. T. Nielsen, M. Givskov and S. Molin (1999). "Molecular tools for study of biofilm physiology." Methods Enzymol **310**: 20-42.

Christiansson, A., A. S. Naidu, I. Nilsson, T. Wadstrom and H. E. Pettersson (1989). "Toxin production by *Bacillus cereus* dairy isolates in milk at low temperatures." Appl Environ Microbiol **55**(10): 2595-2600.

Christison, C. A., D. Lindsay and A. von Holy (2007). "Cleaning and handling implements as potential reservoirs for bacterial contamination of some ready-to-eat foods in retail delicatessen environments." J Food Prot **70**(12): 2878-2883.

Cohan, F. M. and A. F. Koepfel (2008). "The origins of ecological diversity in prokaryotes." Curr Biol **18**(21): R1024-1034.

Collins, K. D., J. Lalac and K. M. Ottemann (2014). "Internal sense of direction: sensing and signaling from cytoplasmic chemoreceptors." Microbiol Mol Biol Rev **78**(4): 672-684.

Colon-Gonzalez, M., M. M. Mendez-Ortiz and J. Membrillo-Hernandez (2004). "Anaerobic growth does not support biofilm formation in Escherichia coli K-12." Res Microbiol **155**(7): 514-521.

Costerton, W. J., Z. Lewandowski, D. E. Caldwell, D. R. Korber, H. M. Lappin-Scott and J. W. Costerton (1995). "Microbial Biofilms." Annual Review of Microbiology **49**(1): 711-745.

Crickmore, N., C. Berry, S. Panneerselvam, R. Mishra, T. R. Connor and B. C. Bonning (2020). "A structure-based nomenclature for Bacillus thuringiensis and other bacteria-derived pesticidal proteins." J Invertebr Pathol: 107438.

Crickmore, N., D. R. Zeigler, J. Feitelson, E. Schnepf, J. Van Rie, D. Lereclus, J. Baum and D. H. Dean (1998). "Revision of the nomenclature for the Bacillus thuringiensis pesticidal crystal proteins." Microbiol Mol Biol Rev **62**(3): 807-813.

Cucarella, C., M. A. Tormo, C. Ubeda, M. P. Trotonda, M. Monzon, C. Peris, B. Amorena, I. Lasa and J. R. Penades (2004). "Role of biofilm-associated protein bap in the pathogenesis of bovine Staphylococcus aureus." Infect Immun **72**(4): 2177-2185.

Davey, M. E. and G. A. O'Toole (2000). "Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics." Microbiology and molecular biology reviews : MMBR **64**(4): 847-867.

Davies, D. G., M. R. Parsek, J. P. Pearson, B. H. Iglewski, J. W. Costerton and E. P. Greenberg (1998). "The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm." Science **280**(5361): 295-298.

Declerck, N., L. Bouillaut, D. Chaix, N. Rugani, L. Slamti, F. Hoh, D. Lereclus and S. T. Arold (2007). "Structure of PlcR: Insights into virulence regulation and evolution of quorum sensing in Gram-positive bacteria." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(47): 18490-18495.

Dempwolff, F., H. M. Moller and P. L. Graumann (2012). "Synthetic motility and cell shape defects associated with deletions of flotillin/reggie paralogs in Bacillus subtilis and interplay of these proteins with NfeD proteins." J Bacteriol **194**(17): 4652-4661.

Di Franco, C., E. Beccari, T. Santini, G. Pisaneschi and G. Tecce (2002). "Colony shape as a genetic trait in the pattern-forming Bacillus mycoides." BMC Microbiol **2**: 33.

Diepold, A. and J. P. Armitage (2015). "Type III secretion systems: the bacterial flagellum and the injectisome." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **370**(1679).

Djordjevic, D., M. Wiedmann and L. A. McLandsborough (2002). "Microtiter plate assay for assessment of Listeria monocytogenes biofilm formation." Appl Environ Microbiol **68**(6): 2950-2958.

Dolphin, A. C. (2012). "Calcium channel auxiliary alpha2delta and beta subunits: trafficking and one step beyond." Nat Rev Neurosci **13**(8): 542-555.

Donlan, R. M., J. W. Costerton, R. M. Donlan and J. W. Costerton (2002). "Biofilms : Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms." Clinical Microbiology **15**(2): 167-193.

Drobniowski, F. a. (1993). "and Related Species." **6**(4): 324-338.

Drobniowski, F. A. (1993). "Bacillus cereus and related species." Clinical Microbiology Reviews **6**(4): 324-338.

Dubois, T., S. Perchat, E. Verplaetse, M. Gominet, C. Lemy, M. Aumont-Nicaise, R. Grenha, S. Nessler and D. Lereclus (2013). "Activity of the Bacillus thuringiensis NprR-NprX cell-cell communication system is co-ordinated to the physiological stage through a complex transcriptional regulation." Mol Microbiol **88**(1): 48-63.

Dunne, W. M., Jr. (2002). "Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately?" Clin Microbiol Rev **15**(2): 155-166.

Edmonds, J. M., P. J. Collett, E. R. Valdes, E. W. Skowronski, G. J. Pellar and P. A. Emanuel (2009). "Surface sampling of spores in dry-deposition aerosols." Appl Environ Microbiol **75**(1): 39-44.

Edwards, J. C., M. S. Johnson and B. L. Taylor (2006). "Differentiation between electron transport sensing and proton motive force sensing by the Aer and Tsr receptors for aerotaxis." Mol Microbiol **62**(3): 823-837.

Ehling-Schulz, M., M. H. Guinebretiere, A. Monthan, O. Berge, M. Fricker and B. Svensson (2006). "Toxin gene profiling of enterotoxic and emetic *Bacillus cereus*." FEMS Microbiol Lett **260**(2): 232-240.

Ehling-Schulz, M., D. Lereclus and T. M. Koehler (2019). "The *Bacillus cereus* Group: *Bacillus* Species with Pathogenic Potential." Microbiol Spectr **7**(3).

Ehling-Schulz, M., B. Svensson, M. H. Guinebretiere, T. Lindback, M. Andersson, A. Schulz, M. Fricker, A. Christiansson, P. E. Granum, E. Martlbauer, C. Nguyen-The, M. Salkinoja-Salonen and S. Scherer (2005). "Emetic toxin formation of *Bacillus cereus* is restricted to a single evolutionary lineage of closely related strains." Microbiology (Reading) **151**(Pt 1): 183-197.

El-Khoury, N., R. Majed, S. Perchat, M. Kallassy, D. Lereclus and M. Gohar (2016). "Spatio-Temporal Evolution of Sporulation in *Bacillus thuringiensis* Biofilm." Frontiers in microbiology **7**(August): 1222-1222.

Fagerlund, A., T. Dubois, O. A. Okstad, E. Verplaetse, N. Gilois, I. Bennaceur, S. Perchat, M. Gominet, S. Aymerich, A. B. Kolsto, D. Lereclus and M. Gohar (2014). "SinR controls enterotoxin expression in *Bacillus thuringiensis* biofilms." PLoS One **9**(1): e87532.

Faille, C., T. Benezech, G. Midelet-Bourdin, Y. Lequette, M. Clarisse, G. Ronse, A. Ronse and C. Slomianny (2014). "Sporulation of *Bacillus* spp. within biofilms: a potential source of contamination in food processing environments." Food Microbiol **40**: 64-74.

Faille, C., T. Bnzech, G. Midelet-Bourdin, Y. Lequette, M. Clarisse, G. Ronse, A. Ronse and C. Slomianny (2014). "Sporulation of *Bacillus* spp. within biofilms: A potential source of contamination in food processing environments." Food Microbiology **40**: 64-74.

Fayad, N., M. Kallassy Awad and J. Mahillon (2019). "Diversity of *Bacillus cereus sensu lato mobilome*." BMC Genomics **20**(1): 436.

Fico, S. and J. Mahillon (2006). "TasA-tasB, a new putative toxin-antitoxin (TA) system from *Bacillus thuringiensis* pGI1 plasmid is a widely distributed composite mazE-doc TA system." BMC Genomics **7**: 259.

Flack, C. E. and J. S. Parkinson (2018). "A zipped-helix cap potentiates HAMP domain control of chemoreceptor signaling." Proc Natl Acad Sci U S A **115**(15): E3519-E3528.

Flemming, H.-c. and J. Wingender (2010). "The biofilm matrix." Nature reviews. Microbiology **8**(9): 623-633.

Galan, J. E. and H. Wolf-Watz (2006). "Protein delivery into eukaryotic cells by type III secretion machines." Nature **444**(7119): 567-573.

Gelis-Jeanvoine, S., A. Canette, M. Gohar, T. Caradec, C. Lemy, M. Gominet, P. Jacques, D. Lereclus and L. Slamti (2017). "Genetic and functional analyses of *krs*, a locus encoding kurstakin, a lipopeptide produced by *Bacillus thuringiensis*." Res Microbiol **168**(4): 356-368.

Gillis, A., N. Fayad, L. Makart, A. Bolotin, A. Sorokin, M. Kallassy and J. Mahillon (2018). "Role of plasmid plasticity and mobile genetic elements in the entomopathogen *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis*." FEMS Microbiol Rev **42**(6): 829-856.

Gogarten, J. P., W. F. Doolittle and J. G. Lawrence (2002). "Prokaryotic evolution in light of gene transfer." *Mol Biol Evol* **19**(12): 2226-2238.

Gohar, M., K. Faegri, S. Perchat, S. Ravnum, O. A. Okstad, M. Gominet, A. B. Kolsto and D. Lereclus (2008). "The PlcR virulence regulon of *Bacillus cereus*." *PLoS One* **3**(7): e2793.

Gonzalez, J. M., Jr., B. J. Brown and B. C. Carlton (1982). "Transfer of *Bacillus thuringiensis* plasmids coding for delta-endotoxin among strains of *B. thuringiensis* and *B. cereus*." *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**(22): 6951-6955.

Gonzalez, J. M., Jr., H. T. Dulmage and B. C. Carlton (1981). "Correlation between specific plasmids and delta-endotoxin production in *Bacillus thuringiensis*." *Plasmid* **5**(3): 352-365.

Gosink, K. K., M. C. Buron-Barral and J. S. Parkinson (2006). "Signaling interactions between the aerotaxis transducer Aer and heterologous chemoreceptors in *Escherichia coli*." *J Bacteriol* **188**(10): 3487-3493.

Gotz, F. (2002). "Staphylococcus and biofilms." *Mol Microbiol* **43**(6): 1367-1378.

Granum, P. E., S. Brynstad and J. M. Kramer (1993). "Analysis of enterotoxin production by *Bacillus cereus* from dairy products, food poisoning incidents and non-gastrointestinal infections." *Int J Food Microbiol* **17**(4): 269-279.

Granum, P. E. and H. Nissen (1993). "Sphingomyelinase is part of the 'enterotoxin complex' produced by *Bacillus cereus*." *FEMS Microbiol Lett* **110**(1): 97-100.

Guinebrière, M. H., S. Auger, N. Galleron, M. Contzen, B. de Sarrau, M. L. de Buyser, G. Lamberet, A. Fagerlund, P. E. Granum, D. Lereclus, P. de Vos, C. Nguyen-The and A. Sorokin (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**(1): 31-40.

Gutiérrez, D., S. Delgado, D. Vázquez-Sánchez, B. Martínez, M. L. Cabo, A. Rodríguez, J. J. Herrera and P. García (2012). "Incidence of staphylococcus aureus and analysis of associated bacterial communities on food industry surfaces." *Applied and Environmental Microbiology* **78**(24): 8547-8554.

Guttenplan, S. B., K. M. Blair and D. B. Kearns (2010). "The EpsE flagellar clutch is bifunctional and synergizes with EPS biosynthesis to promote *Bacillus subtilis* biofilm formation." *PLoS Genet* **6**(12): e1001243.

Hanlon, D. W. and G. W. Ordal (1994). "Cloning and characterization of genes encoding methyl-accepting chemotaxis proteins in *Bacillus subtilis*." *J Biol Chem* **269**(19): 14038-14046.

Harshey, R. M. (2003). "Bacterial motility on a surface: many ways to a common goal." *Annu Rev Microbiol* **57**: 249-273.

Harshey, R. M., I. Kawagishi, J. Maddock and L. J. Kenney (2003). "Function, diversity, and evolution of signal transduction in prokaryotes." *Dev Cell* **4**(4): 459-465.

Hazelbauer, G. L. (2012). "Bacterial chemotaxis: the early years of molecular studies." *Annu Rev Microbiol* **66**: 285-303.

Hazelbauer, G. L., J. J. Falke and J. S. Parkinson (2008). "Bacterial chemoreceptors: high-performance signaling in networked arrays." *Trends Biochem Sci* **33**(1): 9-19.

He, K. and C. E. Bauer (2014). "Chemosensory signaling systems that control bacterial survival." *Trends Microbiol* **22**(7): 389-398.

Helgason, E., O. A. Okstad, D. A. Caugant, H. A. Johansen, A. Fouet, M. Mock, I. Hegna and A. B. Kolsto (2000). "*Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis*--one species on the basis of genetic evidence." *Appl Environ Microbiol* **66**(6): 2627-2630.

Henrichsen, J. (1972). "Bacterial surface translocation: a survey and a classification." *Bacteriol Rev* **36**(4): 478-503.

Henry, J. T. and S. Crosson (2011). "Ligand-binding PAS domains in a genomic, cellular, and structural context." Annu Rev Microbiol **65**: 261-286.

Heukelekian, H. and a. Heller (1940). "Relation between Food Concentration and Surface for Bacterial Growth." Journal of bacteriology **40**(4): 547-558.

Heydorn, A., A. T. Nielsen, M. Hentzer, C. Sternberg, M. Givskov, B. K. Ersboll and S. Molin (2000). "Quantification of biofilm structures by the novel computer program COMSTAT." Microbiology (Reading) **146 (Pt 10)**: 2395-2407.

Hinsa, S. M., M. Espinosa-Urgel, J. L. Ramos and G. A. O'Toole (2003). "Transition from reversible to irreversible attachment during biofilm formation by *Pseudomonas fluorescens* WCS365 requires an ABC transporter and a large secreted protein." Mol Microbiol **49**(4): 905-918.

Holliday, R., P. M. Preshaw, L. Bowen and N. S. Jakubovics (2015). "The ultrastructure of subgingival dental plaque, revealed by high-resolution field emission scanning electron microscopy." BDJ Open **1**: 15003.

Holmes, A. J., M. P. Holley, A. Mahon, B. Nield, M. Gillings and H. W. Stokes (2003). "Recombination activity of a distinctive integron-gene cassette system associated with *Pseudomonas stutzeri* populations in soil." J Bacteriol **185**(3): 918-928.

Holscher, T., B. Bartels, Y. C. Lin, R. Gallegos-Monterrosa, A. Price-Whelan, R. Kolter, L. E. P. Dietrich and A. T. Kovacs (2015). "Motility, Chemotaxis and Aerotaxis Contribute to Competitiveness during Bacterial Pellicle Biofilm Development." J Mol Biol **427**(23): 3695-3708.

Homma, M. and T. Iino (1985). "Excretion of unassembled hook-associated proteins by *Salmonella typhimurium*." J Bacteriol **164**(3): 1370-1372.

Hou, S., R. W. Larsen, D. Boudko, C. W. Riley, E. Karatan, M. Zimmer, G. W. Ordal and M. Alam (2000). "Myoglobin-like aerotaxis transducers in Archaea and Bacteria." Nature **403**(6769): 540-544.

Houry, A., R. Briandet, S. Aymerich and M. Gohar (2010). "Involvement of motility and flagella in *Bacillus cereus* biofilm formation." Microbiology **156**(Pt 4): 1009-1018.

Houry, A., R. Briandet, S. Aymerich and M. Gohar (2010). "Involvement of motility and flagella in *Bacillus cereus* biofilm formation." Microbiology (Reading) **156**(Pt 4): 1009-1018.

Houry, A., M. Gohar, J. Deschamps, E. Tischenko, S. Aymerich, A. Gruss and R. Briandet (2012). "Bacterial swimmers that infiltrate and take over the biofilm matrix." Proceedings of the National Academy of Sciences **109**(32): 13088-13093.

Hsueh, Y. H., E. B. Somers, D. Lereclus and A. C. Wong (2006). "Biofilm formation by *Bacillus cereus* is influenced by PlcR, a pleiotropic regulator." Appl Environ Microbiol **72**(7): 5089-5092.

Huber, B., K. Riedel, M. Kothe, M. Givskov, S. Molin and L. Eberl (2002). "Genetic analysis of functions involved in the late stages of biofilm development in *Burkholderia cepacia* H111." Mol Microbiol **46**(2): 411-426.

Hughes, C. V., P. E. Kolenbrander, R. N. Andersen and L. V. Moore (1988). "Coaggregation properties of human oral *Veillonella* spp.: relationship to colonization site and oral ecology." Appl Environ Microbiol **54**(8): 1957-1963.

Iatsenko, I., A. Nikolov and R. J. Sommer (2014). "Identification of distinct *Bacillus thuringiensis* 4A4 nematicidal factors using the model nematodes *Pristionchus pacificus* and *Caenorhabditis elegans*." Toxins (Basel) **6**(7): 2050-2063.

Imada, K. (2018). "Bacterial flagellar axial structure and its construction." Biophys Rev **10**(2): 559-570.

Inaba, S., M. Hashimoto, J. Jyot and S. Aizawa (2013). "Exchangeability of the flagellin (FliC) and the cap protein (FliD) among different species in flagellar assembly." Biopolymers **99**(1): 63-72.

Jager, R., C. Russwurm, F. Schwede, H. G. Genieser, D. Koesling and M. Russwurm (2012). "Activation of PDE10 and PDE11 phosphodiesterases." J Biol Chem **287**(2): 1210-1219.

Jarrell, K. F. and M. J. McBride (2008). "The surprisingly diverse ways that prokaryotes move." Nat Rev Microbiol **6**(6): 466-476.

Jimenez, G., M. Urdiain, A. Cifuentes, A. Lopez-Lopez, A. R. Blanch, J. Tamames, P. Kampfer, A. B. Kolsto, D. Ramon, J. F. Martinez, F. M. Codoner and R. Rossello-Mora (2013). "Description of *Bacillus toyonensis* sp. nov., a novel species of the *Bacillus cereus* group, and pairwise genome comparisons of the species of the group by means of ANI calculations." Syst Appl Microbiol **36**(6): 383-391.

Kalamara, M., M. Spacapan, I. Mandic-Mulec and N. R. Stanley-Wall (2018). "Social behaviours by *Bacillus subtilis*: quorum sensing, kin discrimination and beyond." Mol Microbiol **110**(6): 863-878.

Kawagishi, I., Y. Maekawa, T. Atsumi, M. Homma and Y. Imae (1995). "Isolation of the polar and lateral flagellum-defective mutants in *Vibrio alginolyticus* and identification of their flagellar driving energy sources." J Bacteriol **177**(17): 5158-5160.

Kawai, F., M. Shoda, R. Harashima, Y. Sadaie, H. Hara and K. Matsumoto (2004). "Cardiolipin domains in *Bacillus subtilis* marburg membranes." J Bacteriol **186**(5): 1475-1483.

Kentner, D. and V. Sourjik (2006). "Spatial organization of the bacterial chemotaxis system." Curr Opin Microbiol **9**(6): 619-624.

Key, J., M. Hefti, E. B. Purcell and K. Moffat (2007). "Structure of the redox sensor domain of *Azotobacter vinelandii* NifL at atomic resolution: signaling, dimerization, and mechanism." Biochemistry **46**(12): 3614-3623.

Key, J. and K. Moffat (2005). "Crystal structures of deoxy and CO-bound bjFixLH reveal details of ligand recognition and signaling." Biochemistry **44**(12): 4627-4635.

Kirkeby, S., A. K. Hansen, A. d'Apice and D. Moe (2006). "The galactophilic lectin (PA-IL, gene LecA) from *Pseudomonas aeruginosa*. Its binding requirements and the localization of lectin receptors in various mouse tissues." Microb Pathog **40**(5): 191-197.

Kirov, S. M. (2003). "Bacteria that express lateral flagella enable dissection of the multifunctional roles of flagella in pathogenesis." FEMS Microbiol Lett **224**(2): 151-159.

Klayman, B. J., P. A. Volden, P. S. Stewart and A. K. Camper (2009). "*Escherichia coli* O157:H7 requires colonizing partner to adhere and persist in a capillary flow cell." Environ Sci Technol **43**(6): 2105-2111.

Kobayashi, K. (2007). "*Bacillus subtilis* pellicle formation proceeds through genetically defined morphological changes." J Bacteriol **189**(13): 4920-4931.

Kolenbrander, P. E. (2000). "Oral microbial communities: biofilms, interactions, and genetic systems." Annu Rev Microbiol **54**: 413-437.

Kolenbrander, P. E., R. J. Palmer, S. Periasamy and N. S. Jakubovics (2010). "Oral multispecies biofilm development and the key role of cell-cell distance." Nature reviews. Microbiology **8**(7): 471-480.

Konishi, M., M. Kanbe, J. L. McMurry and S. Aizawa (2009). "Flagellar formation in C-ring-defective mutants by overproduction of FliI, the ATPase specific for flagellar type III secretion." J Bacteriol **191**(19): 6186-6191.

Koshland, D. E., Jr. (1974). "Chemotaxis as a model for sensory systems." FEBS Lett **40**(0): suppl:S3-9.

Krell, T., J. Lacal, F. Munoz-Martinez, J. A. Reyes-Darias, B. H. Cadirci, C. Garcia-Fontana and J. L. Ramos (2011). "Diversity at its best: bacterial taxis." Environ Microbiol **13**(5): 1115-1124.

Kronstad, J. W. and H. R. Whiteley (1984). "Inverted repeat sequences flank a *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene." J Bacteriol **160**(1): 95-102.

Lai, H. C., P. C. Soo, J. R. Wei, W. C. Yi, S. J. Liaw, Y. T. Horng, S. M. Lin, S. W. Ho, S. Swift and P. Williams (2005). "The RssAB two-component signal transduction system in *Serratia marcescens* regulates swarming motility and cell envelope architecture in response to exogenous saturated fatty acids." J Bacteriol **187**(10): 3407-3414.

Latasa, C., A. Roux, A. Toledo-Arana, J. M. Ghigo, C. Gamazo, J. R. Penades and I. Lasa (2005). "BapA, a large secreted protein required for biofilm formation and host colonization of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis." Mol Microbiol **58**(5): 1322-1339.

Latasa, C., C. Solano, J. R. Penades and I. Lasa (2006). "Biofilm-associated proteins." C R Biol **329**(11): 849-857.

Lechner, S., R. Mayr, K. P. Francis, B. M. Pruss, T. Kaplan, E. Wiessner-Gunkel, G. S. Stewart and S. Scherer (1998). "*Bacillus weihenstephanensis* sp. nov. is a new psychrotolerant species of the *Bacillus cereus* group." Int J Syst Bacteriol **48 Pt 4**: 1373-1382.

Lemon, K. P., A. M. Earl, H. C. Vlamakis, C. Aguilar and R. Kolter (2008). "Biofilm development with an emphasis on *Bacillus subtilis*." Curr Top Microbiol Immunol **322**: 1-16.

Lemon, K. P., D. E. Higgins and R. Kolter (2007). "Flagellar motility is critical for *Listeria monocytogenes* biofilm formation." J Bacteriol **189**(12): 4418-4424.

Lereclus, D., M. M. Lecadet, J. Ribier and R. Dedonder (1982). "Molecular relationships among plasmids of *Bacillus thuringiensis*: conserved sequences through 11 crystalliferous strains." Mol Gen Genet **186**(3): 391-398.

Liang, X., Y. Y. Chen, T. Ruiz and H. Wu (2011). "New cell surface protein involved in biofilm formation by *Streptococcus parasanguinis*." Infect Immun **79**(8): 3239-3248.

Liang, Y., H. Gao, J. Chen, Y. Dong, L. Wu, Z. He, X. Liu, G. Qiu and J. Zhou (2010). "Pellicle formation in *Shewanella oneidensis*." BMC Microbiol **10**: 291.

Liu, R. and H. Ochman (2007). "Stepwise formation of the bacterial flagellar system." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(17): 7116-7121.

Liu, Y., Q. Lai, M. Goker, J. P. Meier-Kolthoff, M. Wang, Y. Sun, L. Wang and Z. Shao (2015). "Genomic insights into the taxonomic status of the *Bacillus cereus* group." Sci Rep **5**: 14082.

Liu, Y. and J. Li (2008). "Role of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm in the initial adhesion, growth and detachment of *Escherichia coli* in porous media." Environ Sci Technol **42**(2): 443-449.

Locsei, J. T. and T. J. Pedley (2009). "Bacterial tracking of motile algae assisted by algal cell's vorticity field." Microb Ecol **58**(1): 63-74.

Lucking, G., M. K. Dommel, S. Scherer, A. Fouet and M. Ehling-Schulz (2009). "Cereulide synthesis in emetic *Bacillus cereus* is controlled by the transition state regulator AbrB, but not by the virulence regulator PlcR." Microbiology (Reading) **155**(Pt 3): 922-931.

Lybarger, S. R. and J. R. Maddock (2000). "Differences in the polar clustering of the high- and low-abundance chemoreceptors of *Escherichia coli*." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(14): 8057-8062.

Macnab, R. M. (2003). "How bacteria assemble flagella." Annu Rev Microbiol **57**: 77-100.

Maddock, J. R. and L. Shapiro (1993). "Polar location of the chemoreceptor complex in the Escherichia coli cell." Science **259**(5102): 1717-1723.

Majed, R., C. Faille, M. Kallassy and M. Gohar (2016). "Bacillus cereus Biofilms-same, only different." Frontiers in Microbiology **7**(JUL): 1-16.

Manson, M. D. (1992). "Bacterial motility and chemotaxis." Adv Microb Physiol **33**: 277-346.

Manson, M. D., J. P. Armitage, J. A. Hoch and R. M. Macnab (1998). "Bacterial locomotion and signal transduction." J Bacteriol **180**(5): 1009-1022.

Martinez, A., S. Torello and R. Kolter (1999). "Sliding motility in mycobacteria." J Bacteriol **181**(23): 7331-7338.

Matsumoto, K., J. Kusaka, A. Nishibori and H. Hara (2006). "Lipid domains in bacterial membranes." Mol Microbiol **61**(5): 1110-1117.

Mattick, J. S. (2002). "Type IV pili and twitching motility." Annu Rev Microbiol **56**: 289-314.

McCarter, L. L. (2004). "Dual flagellar systems enable motility under different circumstances." J Mol Microbiol Biotechnol **7**(1-2): 18-29.

McCoy, W. F., J. D. Bryers, J. Robbins and J. W. Costerton (1981). "Observations of fouling biofilm formation." Can J Microbiol **27**(9): 910-917.

McDougald, D., S. A. Rice, N. Barraud, P. D. Steinberg and S. Kjelleberg (2011). "Should we stay or should we go: mechanisms and ecological consequences for biofilm dispersal." Nat Rev Microbiol **10**(1): 39-50.

Meer, R. R., J. Baker, F. W. Bodyfelt and M. W. Griffiths (1991). "Psychrotrophic Bacillus spp. in Fluid Milk Products: A Review." J Food Prot **54**(12): 969-979.

Mileykovskaya, E. and W. Dowhan (2000). "Visualization of phospholipid domains in Escherichia coli by using the cardiolipin-specific fluorescent dye 10-N-nonyl acridine orange." J Bacteriol **182**(4): 1172-1175.

Mileykovskaya, E. and W. Dowhan (2009). "Cardiolipin membrane domains in prokaryotes and eukaryotes." Biochim Biophys Acta **1788**(10): 2084-2091.

Minamino, T., K. Imada and K. Namba (2008). "Molecular motors of the bacterial flagella." Curr Opin Struct Biol **18**(6): 693-701.

Mitchell, J. G., L. Pearson, S. Dillon and K. Kantalis (1995). "Natural assemblages of marine bacteria exhibiting high-speed motility and large accelerations." Appl Environ Microbiol **61**(12): 4436-4440.

Moglich, A. and K. Moffat (2007). "Structural basis for light-dependent signaling in the dimeric LOV domain of the photosensor YtvA." J Mol Biol **373**(1): 112-126.

Moriya, N., T. Minamino, K. T. Hughes, R. M. Macnab and K. Namba (2006). "The type III flagellar export specificity switch is dependent on FliK ruler and a molecular clock." J Mol Biol **359**(2): 466-477.

Mougel, C. and I. B. Zhulin (2001). "CHASE: an extracellular sensing domain common to transmembrane receptors from prokaryotes, lower eukaryotes and plants." Trends Biochem Sci **26**(10): 582-584.

Muller, V., C. J. Jones, I. Kawagishi, S. Aizawa and R. M. Macnab (1992). "Characterization of the fliE genes of Escherichia coli and Salmonella typhimurium and identification of the FliE protein as a component of the flagellar hook-basal body complex." J Bacteriol **174**(7): 2298-2304.

Nowlin, D. M., J. Bollinger and G. L. Hazelbauer (1987). "Sites of covalent modification in Trg, a sensory transducer of Escherichia coli." J Biol Chem **262**(13): 6039-6045.

O'Rourke, J., A. Lee and J. G. Fox (1992). "An ultrastructural study of *Helicobacter mustelae* and evidence of a specific association with gastric mucosa." *J Med Microbiol* **36**(6): 420-427.

O'Toole, G., H. B. Kaplan and R. Kolter (2000). "Biofilm formation as microbial development." *Annu Rev Microbiol* **54**: 49-79.

O'Toole, G. A. and R. Kolter (1998). "Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development." *Mol Microbiol* **30**(2): 295-304.

Ochman, H., J. G. Lawrence and E. A. Groisman (2000). "Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation." *Nature* **405**(6784): 299-304.

Ohnishi, K., K. Kutsukake, H. Suzuki and T. Iino (1990). "Gene *fliA* encodes an alternative sigma factor specific for flagellar operons in *Salmonella typhimurium*." *Mol Gen Genet* **221**(2): 139-147.

Ohnishi, K., Y. Ohto, S. Aizawa, R. M. Macnab and T. Iino (1994). "FlgD is a scaffolding protein needed for flagellar hook assembly in *Salmonella typhimurium*." *J Bacteriol* **176**(8): 2272-2281.

Okada, M., I. Sato, S. J. Cho, H. Iwata, T. Nishio, D. Dubnau and Y. Sakagami (2005). "Structure of the *Bacillus subtilis* quorum-sensing peptide pheromone ComX." *Nat Chem Biol* **1**(1): 23-24.

Okinaka, R., K. Cloud, O. Hampton, A. Hoffmaster, K. Hill, P. Keim, T. Koehler, G. Lamke, S. Kumano, D. Manter, Y. Martinez, D. Ricke, R. Svensson and P. Jackson (1999). "Sequence, assembly and analysis of pX01 and pX02." *J Appl Microbiol* **87**(2): 261-262.

Padilla-Vaca, F., N. I. Vargas-Maya, N. U. Elizarraras-Vargas, A. Rangel-Serrano, L. R. Cardoso-Reyes, T. Razo-Soria, J. Membrillo-Hernandez and B. Franco (2019). "Flotillin homologue is involved in the swimming behavior of *Escherichia coli*." *Arch Microbiol* **201**(7): 999-1008.

Palma, L., D. Munoz, C. Berry, J. Murillo and P. Caballero (2014). "Bacillus thuringiensis toxins: an overview of their biocidal activity." *Toxins (Basel)* **6**(12): 3296-3325.

Parales, R. E. and J. L. Ditty (2018). "Chemotaxis to Atypical Chemoattractants by Soil Bacteria." *Methods Mol Biol* **1729**: 255-280.

Patino-Navarrete, R. and V. Sanchis (2017). "Evolutionary processes and environmental factors underlying the genetic diversity and lifestyles of *Bacillus cereus* group bacteria." *Res Microbiol* **168**(4): 309-318.

Pellequer, J. L., K. A. Wager-Smith, S. A. Kay and E. D. Getzoff (1998). "Photoactive yellow protein: a structural prototype for the three-dimensional fold of the PAS domain superfamily." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(11): 5884-5890.

Periasamy, S., N. I. Chalmers, L. Du-Thumm and P. E. Kolenbrander (2009). "*Fusobacterium nucleatum* ATCC 10953 requires *Actinomyces naeslundii* ATCC 43146 for growth on saliva in a three-species community that includes *Streptococcus oralis* 34." *Appl Environ Microbiol* **75**(10): 3250-3257.

Pham, H. T. and J. S. Parkinson (2011). "Phenol sensing by *Escherichia coli* chemoreceptors: a nonclassical mechanism." *J Bacteriol* **193**(23): 6597-6604.

Pinchuk, G. E., C. Ammons, D. E. Culley, S. M. Li, J. S. McLean, M. F. Romine, K. H. Nealson, J. K. Fredrickson and A. S. Beliaev (2008). "Utilization of DNA as a sole source of phosphorus, carbon, and energy by *Shewanella* spp.: ecological and physiological implications for dissimilatory metal reduction." *Appl Environ Microbiol* **74**(4): 1198-1208.

Ping, L. (2012). "Cell orientation of swimming bacteria: from theoretical simulation to experimental evaluation." *Sci China Life Sci* **55**(3): 202-209.

Ponting, C. P. and L. Aravind (1997). "PAS: a multifunctional domain family comes to light." Curr Biol **7**(11): R674-677.

Porter, S. L., G. H. Wadhams and J. P. Armitage (2011). "Signal processing in complex chemotaxis pathways." Nat Rev Microbiol **9**(3): 153-165.

Rajkovic, A., M. Uyttendaele, A. Vermeulen, M. Andjelkovic, I. Fitz-James, P. in 't Veld, Q. Denon, R. Verhe and J. Debevere (2008). "Heat resistance of Bacillus cereus emetic toxin, cereulide." Lett Appl Microbiol **46**(5): 536-541.

Ramarao, N. and V. Sanchis (2013). "The pore-forming haemolysins of bacillus cereus: a review." Toxins **5**(6): 1119-1139.

Rasko, D. A., M. R. Altherr, C. S. Han and J. Ravel (2005). "Genomics of the Bacillus cereus group of organisms." FEMS Microbiology Reviews **29**(2): 303-329.

Rasko, D. A., M. J. Rosovitz, O. A. Okstad, D. E. Fouts, L. Jiang, R. Z. Cer, A. B. Kolsto, S. R. Gill and J. Ravel (2007). "Complete sequence analysis of novel plasmids from emetic and periodontal Bacillus cereus isolates reveals a common evolutionary history among the B. cereus-group plasmids, including Bacillus anthracis pXO1." J Bacteriol **189**(1): 52-64.

Rickard, A. H., P. Gilbert, N. J. High, P. E. Kolenbrander and P. S. Handley (2003). "Bacterial coaggregation: An integral process in the development of multi-species biofilms." Trends in Microbiology **11**(2): 94-100.

Rieu, A., N. Aoudia, G. Jegou, J. Chluba, N. Yousfi, R. Briandet, J. Deschamps, B. Gasquet, V. Monedero, C. Garrido and J. Guzzo (2014). "The biofilm mode of life boosts the anti-inflammatory properties of Lactobacillus." Cell Microbiol **16**(12): 1836-1853.

Roberts, A. P., G. Cheah, D. Ready, J. Pratten, M. Wilson and P. Mullany (2001). "Transfer of TN916-like elements in microcosm dental plaques." Antimicrob Agents Chemother **45**(10): 2943-2946.

Rocha-Estrada, J., A. E. Aceves-Diez, G. Guarneros and M. de la Torre (2010). "The RNPP family of quorum-sensing proteins in Gram-positive bacteria." Appl Microbiol Biotechnol **87**(3): 913-923.

Romero, D., C. Aguilar, R. Losick and R. Kolter (2010). "Amyloid fibers provide structural integrity to Bacillus subtilis biofilms." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **107**(5): 2230-2234.

Rutherford, S. T. and B. L. Bassler (2012). "Bacterial quorum sensing: its role in virulence and possibilities for its control." Cold Spring Harb Perspect Med **2**(11).

Schnepf, E., N. Crickmore, J. Van Rie, D. Lereclus, J. Baum, J. Feitelson, D. R. Zeigler and D. H. Dean (1998). "Bacillus thuringiensis and its pesticidal crystal proteins." Microbiol Mol Biol Rev **62**(3): 775-806.

Schoeni, J. L. and A. C. Wong (2005). "Bacillus cereus food poisoning and its toxins." J Food Prot **68**(3): 636-648.

Schuhmacher, J. S., K. M. Thormann and G. Bange (2015). "How bacteria maintain location and number of flagella?" FEMS Microbiol Rev **39**(6): 812-822.

Schweinitzer, T. and C. Josenhans (2010). "Bacterial energy taxis: a global strategy?" Arch Microbiol **192**(7): 507-520.

Shimada, T., R. Sakazaki and K. Suzuki (1985). "Peritrichous flagella in mesophilic strains of Aeromonas." Jpn J Med Sci Biol **38**(3): 141-145.

Simons, K. and E. Ikonen (1997). "Functional rafts in cell membranes." Nature **387**(6633): 569-572.

Sisti, F., D. G. Ha, G. A. O'Toole, D. Hozbor and J. Fernandez (2013). "Cyclic-di-GMP signalling regulates motility and biofilm formation in Bordetella bronchiseptica." Microbiology (Reading) **159**(Pt 5): 869-879.

Slamti, L. and D. Lereclus (2002). "A cell-cell signaling peptide activates the PlcR virulence regulon in bacteria of the *Bacillus cereus* group." *EMBO J* **21**(17): 4550-4559.

Slamti, L. and D. Lereclus (2005). "Specificity and polymorphism of the PlcR-PapR quorum-sensing system in the *Bacillus cereus* group." *J Bacteriol* **187**(3): 1182-1187.

Smith, D. R., M. Maestre-Reyna, G. Lee, H. Gerard, A. H. J. Wang and P. I. Watnick (2015). "In situ proteolysis of the *Vibrio cholerae* matrix protein RbmA promotes biofilm recruitment." *Proceedings of the National Academy of Sciences* **112**(33): 10491-10496.

Smith, R. A. (1991). "A systems approach to understanding problems and solutions in the healthcare security field." *J Healthc Prot Manage* **7**(2): 57-71.

Soberon, M., L. E. Fernandez, C. Perez, S. S. Gill and A. Bravo (2007). "Mode of action of mosquitocidal *Bacillus thuringiensis* toxins." *Toxicon* **49**(5): 597-600.

Sourjik, V. and H. C. Berg (2000). "Localization of components of the chemotaxis machinery of *Escherichia coli* using fluorescent protein fusions." *Mol Microbiol* **37**(4): 740-751.

Stock, J. B. and D. E. Koshland, Jr. (1981). "Changing reactivity of receptor carboxyl groups during bacterial sensing." *J Biol Chem* **256**(21): 10826-10833.

Stoodley, P., K. Sauer, D. G. Davies and J. W. Costerton (2002). "Biofilms as complex differentiated communities." *Annu Rev Microbiol* **56**: 187-209.

Studdert, C. A. and J. S. Parkinson (2004). "Crosslinking snapshots of bacterial chemoreceptor squads." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(7): 2117-2122.

Suzuki, H., K. Yonekura, K. Murata, T. Hirai, K. Oosawa and K. Namba (1998). "A structural feature in the central channel of the bacterial flagellar FliF ring complex is implicated in type III protein export." *J Struct Biol* **124**(2-3): 104-114.

Szurmant, H., M. W. Bunn, S. H. Cho and G. W. Ordal (2004). "Ligand-induced conformational changes in the *Bacillus subtilis* chemoreceptor McpB determined by disulfide crosslinking in vivo." *J Mol Biol* **344**(4): 919-928.

Tarrand, J. J., N. R. Krieg and J. Dobereiner (1978). "A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov." *Can J Microbiol* **24**(8): 967-980.

Taylor, B. L. and I. B. Zhulin (1999). "PAS domains: internal sensors of oxygen, redox potential, and light." *Microbiol Mol Biol Rev* **63**(2): 479-506.

Thorsen, L., B. M. Hansen, K. F. Nielsen, N. B. Hendriksen, R. K. Phipps and B. B. Budde (2006). "Characterization of emetic *Bacillus weihenstephanensis*, a new cereulide-producing bacterium." *Appl Environ Microbiol* **72**(7): 5118-5121.

Tielker, D., S. Hacker, R. Loris, M. Strathmann, J. Wingender, S. Wilhelm, F. Rosenau and K. E. Jaeger (2005). "*Pseudomonas aeruginosa* lectin LecB is located in the outer membrane and is involved in biofilm formation." *Microbiology (Reading)* **151**(Pt 5): 1313-1323.

Tohidifar, P., M. J. Plutz, G. W. Ordal and C. V. Rao (2020). "The Mechanism of Bidirectional pH Taxis in *Bacillus subtilis*." *J Bacteriol* **202**(4).

Tolker-Nielsen, T., U. C. Brinch, P. C. Ragas, J. B. Andersen, C. S. Jacobsen and S. Molin (2000). "Development and dynamics of *Pseudomonas* sp. biofilms." *Journal of Bacteriology* **182**(22): 6482-6489.

Turnbull, P. C. (1981). "*Bacillus cereus* toxins." *Pharmacol Ther* **13**(3): 453-505.

Umamura, T., Y. Matsumoto, K. Ohnishi, M. Homma and I. Kawagishi (2002). "Sensing of cytoplasmic pH by bacterial chemoreceptors involves the linker region that connects the

membrane-spanning and the signal-modulating helices." J Biol Chem **277**(2): 1593-1598.

Vaningelgem, F., M. Zamfir, F. Mozzi, T. Adriany, M. Vancanneyt, J. Swings and L. De Vuyst (2004). "Biodiversity of exopolysaccharides produced by *Streptococcus thermophilus* strains is reflected in their production and their molecular and functional characteristics." Appl Environ Microbiol **70**(2): 900-912.

Verplaetse, E., L. Slamti and M. Gohar (2015). "Cell Differentiation in a *Bacillus thuringiensis* Population during Planktonic Growth , Biofilm Formation , and Host Infection." **6**(3): 1-10.

Vilain, S., J. M. Pretorius, J. Theron and V. S. Brozel (2009). "DNA as an adhesin: *Bacillus cereus* requires extracellular DNA to form biofilms." Appl Environ Microbiol **75**(9): 2861-2868.

Vladimirov, N., D. Lebedz and V. Sourjik (2010). "Predicted auxiliary navigation mechanism of peritrichously flagellated chemotactic bacteria." PLoS Comput Biol **6**(3): e1000717.

Vladimirov, N. and V. Sourjik (2009). "Chemotaxis: how bacteria use memory." Biol Chem **390**(11): 1097-1104.

Vlamakis, H., C. Aguilar, R. Losick and R. Kolter (2008). "Control of cell fate by the formation of an architecturally complex bacterial community." Genes and Development **22**(7): 945-953.

Vlamakis, H., Y. Chai, P. Beauregard, R. Losick and R. Kolter (2013). "Sticking together: building a biofilm the *Bacillus subtilis* way." Nature Reviews Microbiology **11**(3): 157-168.

Wadhams, G. H. and J. P. Armitage (2004). "Making sense of it all: bacterial chemotaxis." Nat Rev Mol Cell Biol **5**(12): 1024-1037.

Waters, C. M. and B. L. Bassler (2005). "Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria." Annu Rev Cell Dev Biol **21**: 319-346.

Watnick, P. I. and R. Kolter (1999). "Steps in the development of a *Vibrio cholerae* El Tor biofilm." Mol Microbiol **34**(3): 586-595.

Watnick, P. I. and R. Kolter (1999). "Steps in the development of a *Vibrio cholerae* El Tor biofilm." Molecular Microbiology **34**(3): 586-595.

Watnick, P. I., C. M. Lauriano, K. E. Klose, L. Croal and R. Kolter (2001). "The absence of a flagellum leads to altered colony morphology, biofilm development and virulence in *Vibrio cholerae* O139." Mol Microbiol **39**(2): 223-235.

Weerasuriya, S., B. M. Schneider and M. D. Manson (1998). "Chimeric chemoreceptors in *Escherichia coli*: signaling properties of Tar-Tap and Tap-Tar hybrids." J Bacteriol **180**(4): 914-920.

West, J. T., W. Estacio and L. Marquez-Magana (2000). "Relative roles of the *fla/che* P(A), P(D-3), and P(sigD) promoters in regulating motility and sigD expression in *Bacillus subtilis*." J Bacteriol **182**(17): 4841-4848.

Whitchurch, C. B., T. Tolker-Nielsen, P. C. Ragas and J. S. Mattick (2002). "Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation." Science **295**(5559): 1487.

Wijman, J. G. E., P. P. L. A. De Leeuw, R. Moezelaar, M. H. Zwietering and T. Abee (2007). "Air-liquid interface biofilms of *Bacillus cereus*: Formation, sporulation, and dispersion." Applied and Environmental Microbiology **73**(5): 1481-1488.

Williams, A. W., S. Yamaguchi, F. Togashi, S. I. Aizawa, I. Kawagishi and R. M. Macnab (1996). "Mutations in *fliK* and *flhB* affecting flagellar hook and filament assembly in *Salmonella typhimurium*." J Bacteriol **178**(10): 2960-2970.

Xie, Z., L. E. Ulrich, I. B. Zhulin and G. Alexandre (2010). "PAS domain containing chemoreceptor couples dynamic changes in metabolism with chemotaxis." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(5): 2235-2240.

Yamamoto, K., H. Arai, M. Ishii and Y. Igarashi (2011). "Trade-off between oxygen and iron acquisition in bacterial cells at the air-liquid interface." FEMS Microbiol Ecol **77**(1): 83-94.

Yildiz, F. H. and K. L. Visick (2009). "Vibrio biofilms: so much the same yet so different." Trends Microbiol **17**(3): 109-118.

Yonekura, K., S. Maki, D. G. Morgan, D. J. DeRosier, F. Vonderviszt, K. Imada and K. Namba (2000). "The bacterial flagellar cap as the rotary promoter of flagellin self-assembly." Science **290**(5499): 2148-2152.

Yoshida, Y., H. Ishikawa, S. Aono and Y. Mizutani (2012). "Structural dynamics of proximal heme pocket in HemAT-Bs associated with oxygen dissociation." Biochim Biophys Acta **1824**(7): 866-872.

Zhang, W. J., C. L. Santini, A. Bernadac, J. Ruan, S. D. Zhang, T. Kato, Y. Li, K. Namba and L. F. Wu (2012). "Complex spatial organization and flagellin composition of flagellar propeller from marine magnetotactic ovoid strain MO-1." J Mol Biol **416**(4): 558-570.

Zhulin, I. B., M. S. Johnson and B. L. Taylor (1997). "How do bacteria avoid high oxygen concentrations?" Biosci Rep **17**(3): 335-342.

Zhulin, I. B., A. N. Nikolskaya and M. Y. Galperin (2003). "Common extracellular sensory domains in transmembrane receptors for diverse signal transduction pathways in bacteria and archaea." J Bacteriol **185**(1): 285-294.

Zhulin, I. B., E. H. Rowsell, M. S. Johnson and B. L. Taylor (1997). "Glycerol elicits energy taxis of Escherichia coli and Salmonella typhimurium." J Bacteriol **179**(10): 3196-3201.

Zobell, C. E. (1943). "The Effect of Solid Surfaces upon Bacterial Activity." Journal of bacteriology **46**(1): 39-56.

Supplementary material

Article 1- Massive integration of planktonic cells within a developing biofilm

Table S1 : Strains used in this study

| Primer names | Primer sequences | Restriction sites |
|--------------|--|-------------------|
| AMYAFW | 5'- CGGGAT CCCAACTCCGGAAGTGATGTGAA-3' | BamHI |
| AMYARV | 5'- TTGGCGCG CCCGCACGTCTACTCCATCG-3' | AscI |
| AMYBFW | 5'- GGTAA CAACGAACAACAGGTAATTGATGCAAT-3' | BstEII |
| AMYBRV | 5'- CCAAGCTT CATTCACACCAACGATTAAGGAGAT-3' | HinDIII |
| SGFPFW | 5'- TTGGCGCG CCCGCCAGTGCCAAGCTTCTG-3' | AscI |
| SGFPRV | 5'- GGGTA ACCGCTTCCGGCTCGTATGTTGTG-3' | BstEII |
| pAphaIII-F | 5'-acat gcatgc GAACCATTTGAGGTGATAGG-3' | SphI |
| pAphaIII-R | 5'- TCTAGACT TTTCTACAGTATTT-3' | XbaI |
| mCherry-F | 5'- GGTACC ACATAAGGAGGAACTA-3' | KpnI |
| mCherry4 | 5'-cg GAATTCTT ACTTATATAATTC-3' | EcoRI |

| Strains | species | description | reference |
|----------------------|-------------------------|--|-----------------|
| <i>Bt407</i> | <i>B. thuringiensis</i> | wild-type strain | 15 |
| <i>Bt407 ΔSpo0A</i> | <i>B. thuringiensis</i> | Insertion of a kanamycin resistance cassette in <i>spo0A</i> | 17 |
| <i>Bt407-sGfp</i> | <i>B. thuringiensis</i> | Constitutive expression of GFP | this study |
| <i>Bt407-mCherry</i> | <i>B. thuringiensis</i> | Constitutive expression of mCherry | this study |
| ATCC14579 | <i>B. cereus</i> | wild-type strain | ATCC collection |
| ATCC10987 | <i>B. cereus</i> | wild-type strain | ATCC collection |
| AH829 | <i>B. cereus</i> | wild-type strain | 18 |

Table S2 : Primers used in this study. Bold letters represent the restriction sites

Article 2- Polar localization of lipid rafts is dependent on plasmidic genes in *Bacillus thuringiensis*

Table S1. Primers used in this study

| | | |
|-------------------|--|---------|
| AM20F | 5'- CGCGGATCCCAAT TAAAAGAACACACA-3' | BamHI |
| AM20R | 5'- GCTCTAGACCCT TAAAGTTTATTATTC-3' | XbaI |
| VA20F | 5'-AAA ACTGCAGATT TATGGAGGTAAGTGTGC-3' | PstI |
| VA20R | 5'- CCCAAGCTTT TTTCAACTCGCCACCGA-3' | HindIII |
| KANA F | 5'-AAA ACTGCAGGATA AACCCAGCGAACCA-3' | PstI |
| KANA R | 5'- GCTCTAGAGACAT CTAAATCTAGGTAC-3' | XbaI |
| FWPROMO 62720 | 5'-AAA ACTGCAGTCT TTTTCCCAATTCAATAATTC-3' | PstI |
| RVPROMO 62720 | 5'- GCTCTAGA AATTGTTGTTATTTGTAGTTGCCG-3' | XbaI |
| FWC62720 | 5'-AAA ACTGCAGTCT TTTTCCCAATTCAATAATTCC-3' | PstI |
| RVC62720 | 5'- GCTCTAGATT GAACTTTTATCCATAAATTGCAC-3' | XbaI |
| Amp62720Eco R1 | 5'- CCGGAATTC CTGTTGCAGAAGAATACTT-3' | EcoRI |
| GFPFor | ATTTTGAATAATAAACTTAAGGGGATGAAATTTGGAGGATGATTAT TTATGAGCAAAGGAGAAGAA | |
| AmontRev | TTCTTCTCCTTTGCTCATAAATAATCATCCTCCAAATTCATCCCCT TAAGTTTATTATTCAAAT | |
| AvalFor | TACAAAGGATCCCACCACCACCACCACCCTAAAAGTTCAATTTTAA AACAAATGTATTTTATTTT | |

| | | |
|---------------------|--|-------|
| GFPRev | AAAATAAAATACATTTGTTTTAAAATTGAACTTTTAGTGGTGGTGG TGGTGGTGGGATCCTTTGTA | |
| VA20R2 | 5' - CATGCCATGGCTTTT CAACTCGCCACCGA -3' | NcoI |
| 62720(p GEX)- F3 | 5' - CCGGAATTCGCAACTACAAATAACAACAATATAATACAAAC -3' | EcoRI |
| 62720(p GEX)- R3 | 5' - CCGCTCGAGTTAGTCATATAAAGCATCTTTCATGCAAC -3' | XhoI |

Titre : Intégration des bactéries planctoniques dans le biofilm et étude fonctionnelle du gène plasmidique *Bthur62720* chez *Bacillus thuringiensis*

Mots clés : *Bacillus thuringiensis*, biofilm, cellules planctoniques

Résumé : *Bacillus thuringiensis* est capable de former un biofilm à l'interface air-liquide dans des tubes en verre en condition statique. Pendant la formation du biofilm, deux populations coexistent : une population sessile qui flotte sur le milieu de culture et une population planctonique, située dans le milieu de culture sous la pellicule. En utilisant des méthodes spectrophotométriques, nous avons suivi l'évolution de la croissance des bactéries planctoniques et du biofilm de la souche *B. thuringiensis* 407. Les résultats obtenus montrent qu'au moment où la biomasse sessile augmente rapidement, la population planctonique chute brutalement et descend jusqu'à une valeur proche de zéro. Cette chute de la population planctonique n'est pas observée avec le mutant *spoOA* de la souche 407 ou avec des souches incapables de former un biofilm, et ne peut pas être attribuée à la sédimentation ou à la lyse cellulaire. Elle est donc consécutive à un recrutement massif des cellules planctoniques par le biofilm en formation. Nous avons visualisé, par microscopie à épi-fluorescence, l'intégration des bactéries planctoniques de la souche 407 dans son biofilm préformé. Les bactéries recrutées sont localisées dans des zones restreintes du biofilm, où la densité des cellules sessiles est faible, ce qui révèle une distribution spatiale hétérogène des cellules immigrantes au sein du biofilm. Pour identifier les mécanismes impliqués dans le recrutement des cellules planctoniques dans le biofilm, nous avons criblé une banque de mutants de la souche 407 obtenus par mutagenèse aléatoire, pour leur capacité à intégrer un biofilm pré-existant. L'un des mutants de la banque, fortement affecté dans sa capacité à intégrer un biofilm, est touché dans le gène *Bthur62720*. Celui-ci est porté par le plasmide BTB-9P et code pour une protéine de 21 kDa. Cette protéine est sans homologue, et présente un peptide signal, un domaine N-terminal de fonction inconnue et un domaine C-terminal membranaire. En utilisant deux méthodes, l'immunocytochimie et la fusion traductionnelle avec la GFP, nous avons montré que cette protéine est pariétale, polaire et que son domaine N-terminal est cytoplasmique. À l'aide d'un marqueur des phospholipides chargés, le 10-N-nonyl acridine orange, nous avons montré que la délétion de *Bthur62720* désorganise la distribution des radeaux lipidiques, qui apparaissent essentiellement polaires chez la souche 407 sauvage. De plus, cette délétion affecte fortement la nage linéaire, mais pas la culbute, ni la présence de flagelles. Ces résultats nous permettent de formuler l'hypothèse que *Bthur62720* stabilise les radeaux lipidiques aux pôles. La localisation polaire de ces radeaux, en permettant la formation des complexes de chémorécepteurs, serait nécessaire pour assurer la nage linéaire.

Title: Integration of planktonic bacteria in the biofilm and functional analysis of the Bthur62720 gene in *Bacillus thuringiensis*

Keywords: *Bacillus thuringiensis*, biofilm, planktonic cells

Abstract: *Bacillus thuringiensis* is able to produce a pellicle at the air-liquid interface in glass tubes under static conditions. During biofilm formation, two populations coexist: a sessile floating population and a planktonic population, located in the culture medium beneath the pellicle. Using spectrophotometric measurements, we followed the growth of both populations during the *B. thuringiensis* 407 pellicle formation. Our results show that while the biofilm biomass increases rapidly, the planktonic population growth drops sharply. This decrease is not observed with the 407 spoOA mutant or for strains unable to form a biofilm, and cannot be attributed to cell lysis or cell sedimentation. Therefore, it is the result of a massive integration of planktonic cells in the preformed pellicle. We also visualized, using epi-fluorescence microscopy, the integration of planktonic bacteria of the 407 strain in its preformed biofilm. The recruited cells are located in restricted areas of the biofilm, where the density of sessile cells is low, revealing a heterogeneous spatial distribution of the immigrant cells within the biofilm. To identify the mechanisms involved in the recruitment of planktonic cells in the biofilm, we screened a bank of mutants of the 407 strain, obtained by random mutagenesis, for their ability to integrate a pre-existing biofilm. One of the mutants in the library is strongly affected in its ability to integrate a biofilm. This deficiency is caused by the disruption of the *Bthur62720* gene, which is carried by the BTB-9p plasmid and encodes a 21 kDa protein. This protein has no homolog and in silico analysis predict a signal peptide, a N-terminal domain of unknown function and a C-terminal membrane domain. Using immunocytochemistry and translational fusion assays with GFP, we showed that this protein is parietal, polar and that its N-terminal domain is cytoplasmic. With a specific dye of charged membrane phospholipids, 10-N-nonyl acridine orange, we showed that the deletion of Bthur002_62720 disorganizes the lipid rafts distribution, which appear essentially polar in wild type strain 407. Moreover, this deletion strongly affects linear swimming, but not bacterial tumbling or the presence of flagella. These results allow us to hypothesize that Bthur62720 stabilizes the lipid rafts located at the cell poles. The polar localization of these rafts, required for the clustering of chemoreceptors, would be necessary to ensure a normal chemotaxis function and thus, bacterial swimming.

