



**HAL**  
open science

# Destin et comportement des spores du groupe *Bacillus cereus* chez des organismes modèles

Salma Hachfi

► **To cite this version:**

Salma Hachfi. Destin et comportement des spores du groupe *Bacillus cereus* chez des organismes modèles. Médecine humaine et pathologie. Université Côte d'Azur, 2022. Français. NNT : 2022COAZ6003 . tel-03917150

**HAL Id: tel-03917150**

**<https://theses.hal.science/tel-03917150v1>**

Submitted on 1 Jan 2023

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

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

# THÈSE DE DOCTORAT

## Destin et comportement des spores du groupe *Bacillus cereus* chez des organismes modèles

**Salma HACHFI**

Recherches effectuées au sein de

Institut Sophia-Agrobiotech,

UMR Université Côte d'Azur, INRAE 1355, CNRS 7254,

Equipe « **Bioinsecticides, environnement et santé** »

et

Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire

UMR Université Côte d'Azur, INSERM U1065,

Equipe « **Microbial virulence and inflammatory signaling in disease** »

**Présentée en vue de l'obtention  
du grade de docteur en**

**Immunologie et microbiologie  
d'Université Côte d'Azur**

**Dirigée par:** Armel Gallet

**Co-dirigée par:** Laurent Boyer

**Soutenue le:** 16/03/2022

**Devant le jury, composé de:**

Christine Coustau, DR CNRS, ISA, Présidente du jury

Bruno Lemaitre, Pr, EPFL, Suisse, Rapporteur

Philippe Gérard, DR INRAE, Micalis, Rapporteur

Bernard Charroux, DR CNRS, IBDM, Examineur

Armel Gallet, DR CNRS, ISA, Directeur de thèse

Laurent Boyer, DR INSERM, C3M, Co-Directeur de thèse

# **Destin et comportement des spores du groupe *Bacillus cereus* chez des organismes modèles**

## **Identification du jury :**

### **Président du jury**

Christine Coustau, Directrice de recherche, Centre national de la recherche scientifique (CNRS), Institut Sophia Agrobiotech (ISA)

### **Rapporteurs**

Bruno Lemaitre, Professeur, École Polytechnique Fédérale de Lausanne (EPFL)

Philippe Gérard, Directeur de recherche, Institut national de recherche pour l'agriculture, l'alimentation et l'environnement (INRAE), Microbiologie de l'Alimentation au service de la Santé (MICALIS)

### **Examineur**

Bernard Charroux, Directeur de recherche, Centre national de la recherche scientifique (CNRS), Institut de Biologie du Développement de Marseille (IBDM)

### **Directeurs de thèse**

Armel Gallet, Directeur de recherche, Centre national de la recherche scientifique (CNRS), Institut Sophia Agrobiotech (ISA)

Laurent Boyer, DR, Institut national de la santé et de la recherche médicale (INSERM), Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire (C3M)



# Résumé

Le groupe *Bacillus cereus* (*B. cereus*) regroupe des bactéries Gram-positives issues de l'environnement. Ces bactéries sont capables de sporuler quand les conditions sont défavorables. Les membres de ce groupe peuvent être impliqués dans des intoxications alimentaires représentant ainsi la troisième cause d'intoxication alimentaire en Europe et la deuxième en France. L'espèce *B. thuringiensis* (*Bt*) appartient au groupe *B. cereus* et se caractérise par la production de cristaux parasporaux contenant des toxines insecticides Cry ayant une forte spécificité d'action. Ainsi, les spores et les cristaux de *Bt* sont utilisés comme bioinsecticides pour lutter spécifiquement contre les larves de lépidoptères. Une fois les spores et les cristaux ingérés par les insectes cibles, les toxines Cry contenues dans le cristal sont libérées et détruisent l'épithélium intestinal. Ensuite, le passage et la germination des spores dans l'hémolymphe entraînent une mort rapide du ravageur par septicémie. L'utilisation accrue de ces bioinsecticides *Bt* pose la problématique des risques engendrés sur les organismes non ciblés.

En utilisant le modèle *Drosophila melanogaster* (un organisme non-cible de *Bt*), il a été montré que les formes végétatives de *Bt* sont rapidement éliminées de l'intestin. Cette élimination est due à l'activation de la réponse immunitaire innée locale. Cependant, des études disparates suggéraient que les spores de *Bt* pouvaient persister dans les intestins des mammifères. Afin d'étudier le comportement des spores dans l'intestin des organismes non-cibles et l'implication de la réponse immunitaire innée, j'ai utilisé deux modèles de laboratoire : *Drosophila melanogaster* et la souris. En premier lieu, j'ai pu montrer qu'après une ingestion ponctuelle, les spores persistent jusqu'à 10 jours dans l'intestin moyen des drosophiles et au moins 5 jours dans l'intestin grêle des souris. Ce résultat m'a conduit à étudier le devenir de ces spores dans l'intestin. J'ai ainsi montré, par une approche en microscopie à fluorescence sur intestins entiers, que les spores s'accumulaient et germaient préférentiellement dans les parties postérieures de l'intestin moyen de drosophile et de l'intestin grêle de souris. J'ai ensuite confirmé ces résultats qualitatifs par une approche quantitative en dénombrant les spores et les bactéries végétatives dans les différentes régions de l'intestin. J'ai enfin aussi pu généraliser ce mécanisme à de nombreuses spores appartenant au groupe *B. cereus*.

De plus, dans l'intestin moyen de la drosophile, la réponse immunitaire innée est localisée principalement dans les régions antérieures et se manifeste par une production d'espèces réactives de l'oxygène et de peptides antimicrobiens (PAMs). Mes résultats montrent que les spores n'induisent pas de réponse immunitaire intestinale. Étonnamment, j'ai même observé que la production de PAMs était réprimée. J'ai ensuite démontré que l'ingestion de spores induit l'expression de gènes codant pour des régulateurs négatifs (PGRP-SC1, -SC2 et -LB) de la réponse immunitaire innée au niveau intestinal. Enfin, en utilisant des combinaisons de mutants des deux voies de signalisation immunitaires, Imd et Toll, j'ai pu caractériser pour la première fois leur coexistence dans l'intestin moyen de la drosophile.

Dans un second temps, je me suis intéressée à la réponse inflammatoire induite par *Bt* en utilisant les macrophages de souris qui jouent un rôle prépondérant dans la mise en place d'une réponse immunitaire cellulaire. L'activation du complexe cytoplasmique, l'inflammasome NLRP3, a été identifié comme une des réponses inflammatoires au niveau des macrophages. J'ai montré que suite à l'infection des macrophages par les cellules végétatives, ces dernières étaient rapidement phagocytées. Suite à cette phagocytose, j'ai observé une activation de l'inflammasome NLRP 3. À l'inverse, j'ai montré que, bien que les spores soient phagocytées, aucune réponse inflammatoire n'est induite. Ces spores persistent alors dans les macrophages.

Mes travaux apportent des données scientifiques quant au comportement et au devenir des spores de *Bt* dans l'intestin d'organismes non-cibles et aiderons les autorités de Sécurité Alimentaire à mettre en place des mesures pour améliorer l'utilisation des biopesticides *Bt* afin de limiter leurs effets non intentionnels.

**Mots clé :** Le groupe *Bacillus cereus*, drosophile, souris, spores, réponse immunitaire innée

## Abstract

The *Bacillus Cereus* (*B cereus*) group consists of Gram-positive bacteria, commonly isolated from the environment. Members of this group are spore-forming bacteria commonly associated with food poisoning and represent the third cause of the foodborne outbreaks in Europe and the second in France. The most studied members of this group are *B. anthracis*, *B. cereus sensu stricto* (*Bc*), and *B. thuringiensis* (*Bt*) which are well known for their pathogenic activity. *Bt* is characterized by the production, during its sporulation, of a crystal containing insecticidal Cry toxins. Thanks to this entomopathogenic activity, bioinsecticides based on spores and crystals of *Bt* are used to specifically kill lepidopteran pests. Upon ingestion of *Bt* bioinsecticides (spores and toxin crystals), Cry toxins are released from the crystal and destroy the insect gut epithelium allowing spores to invade the internal milieu. Then spore germination in the hemolymph leads to the pest death by septicemia in less than 3 days. However, the increasing environmental dispersion of *Bt* products raises the question about their potential risks for non-target animals.

Using *Drosophila melanogaster* (a non-target organism), it has been previously shown that *Bt* vegetative cells are rapidly cleared from the intestine. This elimination is due to the activation of the local innate immune response. However, few studies suggest that *Bt* spores can persist in human and rodent intestines. To understand why and how spores persist in the gut of non-target organisms and the implication of the innate immune response in fighting spores, I have used two powerful models: *Drosophila melanogaster* and mice. First, I have shown that spores can persist, after acute ingestion, for up to 10 days in the *Drosophila* midguts and at least 5 days in mice small intestines. Then, I have shown, using a fluorescence microscopy approach on whole intestines that spores accumulated mainly in the posterior midgut of *Drosophila* and the posterior small intestine of mice where they could further germinate. I confirmed these data using quantitative monitoring of spores vs. vegetative bacteria accumulation *in vivo* in the intestines of *Drosophila* and mice. Interestingly, I have demonstrated that spores from many species of the *B cereus* group behave similarly to the *Bt* spores. Altogether, my data suggest that, in the posterior regions of the *Drosophila* midgut (and the small intestine of mice), the innate immune response is inefficient to promptly eliminate spores and germinated bacteria.

In *Drosophila* midgut, the local innate immune response (i.e. the production of Reactive Oxygen Species (ROS) and Anti-Microbial Peptides (AMPs)) occurs in the anterior regions. I have shown that, unlike vegetative cells, spores do not trigger ROS and AMPs production. Strikingly, I have even observed that spores inhibit AMPs production. Interestingly, I have found a transcriptional induction of negative regulators (e.g. PGRP-SC1, -SC2, and -LB) of the immune signaling pathways in the posterior region of the midgut in response to spore ingestion. Then, using *Drosophila* genetics, I have been the first to demonstrate that both immune pathways, Imd and Toll, coexisted in the *Drosophila* midgut, and ultimately participated in the intestinal persistence of the spores.

Finally, I have studied the inflammatory response to spores using *in vitro* culture of mouse macrophages. The NLRP3 inflammasome is a key platform of this response. I have shown that *Bt/Bc* vegetative cells were phagocytosed by macrophages triggering the NLRP3 inflammasome activation. Conversely, although spores were still phagocytosed, they did not activate the inflammasome pathway. Moreover, spores were able to persist alive within the macrophages.

My work provides scientific data on the behavior and fate of *Bt* spores in the gut of non-target organisms and will help food safety authorities to implement measures to improve the use of *Bt* biopesticides to limit their unintended effects.

**Keywords:** Bacillus cereus group, Drosophila, mice, spores, innate immune response

*Science is not only a disciple of reason but, also, one of romance and passion.*

*Stephen Hawking*

# Dédicaces

## **Je dédie cette thèse en premier à mes parents**

Tous les mots ne peuvent pas exprimer mon amour et ma gratitude. Je vous dédie cette thèse comme fruit de votre dévouement et l'expression de mon profond amour.

## **A la mémoire de mes grands-parents**

## **A la mémoire de ma tante partie très tôt**

Vous êtes toujours présents dans mon esprit et mon cœur. J'espère que là où vous êtes, vous serez fière de votre petite fille.

Que vos âmes reposent en paix.





# Table des matières

<b>Remerciements .....</b>	<b>13</b>
<b>Liste des figures.....</b>	<b>17</b>
<b>Liste des Tableaux .....</b>	<b>18</b>
<b>Liste des abréviations .....</b>	<b>19</b>
<b>Introduction bibliographique .....</b>	<b>23</b>
<b>Chapitre I : Interaction hôte-pathogène .....</b>	<b>24</b>
1. Présentation du concept .....	24
2. Classification des interactions hôtes-microorganismes .....	24
3. Différence entre pathogénicité et virulence .....	25
4. Les interactions hôtes-pathogènes alimentaires.....	25
<b>Chapitre II : Le groupe <i>Bacillus cereus</i>.....</b>	<b>27</b>
1. Caractéristiques générales et phylogénie.....	27
2. Cycle de vie.....	31
2.1. La bactérie végétative.....	31
2.2. Les propriétés de la spore .....	33
3. Écologie.....	37
<b>Chapitre III : Pathogénicité et facteurs de virulence du groupe <i>B. cereus</i> .....</b>	<b>38</b>
1. Pathogénicité de <i>B. cereus</i> .....	38

1.1.	Historique et incidence du groupe <i>B. cereus</i> en tant que pathogène alimentaire.	38
1.2.	La pathogénicité gastrointestinale liée au groupe <i>B. cereus</i> .....	39
1.2.1.	Le syndrome diarrhéique.....	40
1.2.2.	Le syndrome émétique .....	42
1.3.	Les infections nosocomiales liées au groupe <i>B. cereus</i> .....	43
2.	L'espèce <i>Bt</i> : un potentiel de virulence .....	44
2.1.	Historique et incidence de <i>Bt</i> en tant que biopesticide .....	44
2.2.	La pathogénicité insecticide de <i>Bt</i> .....	44
2.2.1.	Les principales toxines entomopathogènes de <i>Bt</i> .....	44
2.2.2.	Le mode d'action des toxines entomopathogènes Cry .....	45
2.2.3.	Les effets non intentionnels de <i>Bt</i> .....	48
<b>Chapitre IV : L'intestin : un organe conservé au cours de l'évolution .....</b>		<b>50</b>
1.	Description générale.....	50
2.	Le choix du modèle <i>Drosophila melanogaster</i> .....	51
3.	Conservation physiologique et cellulaire de l'intestin .....	52
<b>Chapitre V : Réponse intestinale aux agressions des pathogènes entériques.....</b>		<b>57</b>
1.	Le microbiote intestinal et son implication immunitaire .....	57
2.	Les barrières physiques .....	58
3.	Activation de la voie DUOX.....	60
4.	La perception intestinal des pathogènes et réponse humorale .....	61
4.1.	Role des TLR dans l'immunité intestinale .....	62

4.2.	Role des NLR dans l'immunité intestinale .....	64
4.3.	Role des PGRP dans l'immunité intestinale.....	66
5.	Les effecteurs antimicrobiens conservés.....	73
6.	Maintien de l'homéostasie cellulaire intestinale et régénération.....	78
7.	La perméabilité intestinale .....	79
<b>Chapitre VI : Réponse systémique face aux agressions par des pathogènes entériques .....</b>		<b>83</b>
1.	La réponse cellulaire .....	83
2.	La phagocytose .....	85
3.	La réponse humorale.....	86
3.1.	Les voies Toll et TLR .....	86
3.2.	Les voies Imd et TNF .....	88
3.3.	Coopération entre les voie immunitaire Toll et Imd en réponse systémique chez la drosophile.....	90
<b>Travaux de thèse .....</b>		<b>91</b>
Objectifs de la thèse.....		92
Résultats .....		94
Chapitre I. L'évasion des spores du groupe <i>B. cereus</i> aux réponses immunitaires innées locales permet leur persistance au niveau intestinal.....		94
<u>Complementary results .....</u>		<u>143</u>
Chapitre II. Détournement des défenses immunitaires des macrophages par les spores de <i>Bacillus thuringiensis</i> .....		151
<b>Discussion et perspectives .....</b>		<b>165</b>
1.	Evaluation du potentiel de virulence des bioinsecticides à base de <i>Bacillus thuringiensis</i> ( <i>Bt</i> )	

chez des organismes non-cibles .....	166
2. Implication de la réponse immunitaire innée dans le processus de persistance des spores au niveau intestinal.....	176
<b>Conclusion générale.....</b>	<b>185</b>
<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>177</b>
<b>Annexes .....</b>	<b>214</b>



## Remerciements

Je souhaite commencer par remercier en premeir l'**Académie 3 d'excellence "Espace, environnement, risques et résilience"**, l'**IDEX UCA<sup>JEDI</sup>** d'avoir financé ce travail de thèse. Je remercie également mes rapporteurs **Pr. Bruno Lemaitre** et **Dr. Philippe Gérard** d'avoir accepté de faire partie de ce jury de thèse et d'évaluer mon travail. Merci aussi à **Dr. Christine Cousteau** d'être la présidente de ce jury. J'adresse un immense merci à **Dr. Bernard Charroux** d'avoir pris part à mes trois comités de thèse et d'en être l'examineur aujourd'hui. Merci également à mon deuxième membre de comité de thèse **Dr. Carmelo Luci**. Je vous remercie tous les deux pour vos conseils et vos critiques positives.

Je remercie tout particulièrement mon directeur de thèse **Armel Gallet**. Je pense que je ne te remercierai jamais assez pour tout ce que tu as fait pour moi. Merci de m'avoir ouvert la toute première fois les portes de ton labo et d'avoir cru en moi. Merci de m'avoir initié et transmis ta passion pour la recherche fondamentale. Merci de m'avoir donné cette chance de travailler à tes côtés. Tu as été bien plus qu'un directeur de thèse, nous avons partagé tant de choses. Mais par ces quelques lignes, tu sais désormais que tu as ma reconnaissance éternelle et toute mon admiration pour tes qualités humaines et scientifiques. Merci pour ton calme, ton positivisme et tes encouragements. Tu m'as vue craquer, rigoler (et même râler). Tu m'as appris à être patiente, même si ça n'a pas été évidant parfois. Je te remercie de m'avoir témoigné de ta confiance à plusieurs reprises. Tu a été là pour les hauts comme pour les bas.

Un grand Merci à mon co-directeur de thèse **Laurent Boyer**. Merci infiniment d'avoir cru en ce projet. Merci de m'avoir donné l'opportunité de travailler à tes côtés. Ça a été un grand plaisir pour moi. Nos échanges étaient toujours enrichissants. Saches que j'ai appris énormément de toi. Merci pour tes remarques qui m'ont poussé à aller chercher encore loin et en contribuer à l'aboutissement de cette thèse. Je te remercie pour la confiance et l'autonomie que tu m'as accordée ainsi que pour tes conseils scientifiques.

Je remercie également tous les membres de l'équipe bio-insecticides, environnement et santé (BES) à l'institut Sophia Agrobiotech. Je remercie tout particulièrement **Raphael** pour son aide et ses conseils qui ont contribué à l'avancement du projet. J'adresse aussi un grand merci à **Marcel** pour toutes les discussions qu'on a eu et surtout pour ses blagues qui pour moi n'ont pas été toujours évidentes à comprendre. Merci aussi à **Marie-Paule** pour sa grande contribution au projet. C'est en particulier grâce à toi qu'on a réussi à développer ces petites perles fluo 'les spores rouges vertes' dont je suis très fière. Je te remercie pour tout ce que tu m'as transmis. Je dois ensuite adresser un grand merci à **Alexandra** pour avoir contribué à mon encadrement pendant mes deux stages (d'ingénieur et de M2), et d'avoir contribué énormément à mes travaux de thèse. Merci d'avoir été ma confidente pendant ces années et d'avoir été toujours de bon conseil. C'était un grand plaisir d'avoir partagé avec toi le même bureau et je pense que je ne te remercierai jamais assez. J'adresse un grand merci à **Arnaud** notre plus jeune doctorant. Merci de m'avoir supporté dans les bons et les mauvais moments. Travailler avec toi a été vraiment agréable. Je te remercie pour ta gentillesse et ta disponibilité. Merci pour ton humeur de chaque lundi matin avant le café. Je tiens à te dire désolée d'avoir été un peu dure avec toi pendant tes préparations orales. Je ne te remercierai jamais assez d'avoir relu mon manuscrit un samedi. Tu peux partir à Paris l'esprit tranquille, je veillerai bien sur ta chaise. Un dernier point important n'oublie jamais qu'il faut parler à ses petites drosophiles parce qu'elles le sentent. Merci également à **Rihab** pour tous ce que tu m'as appris lors de mon premier passage au labo. Je ne te remercierai jamais assez pour ta

patience, ton aide, ta gentillesse. Tu es une personne magnifique que j'ai eu la chance de la côtoyer pendant quelques moi.

**Rouba**, my lab partner mais qui est devenue au fil des années une amie puis une sœur. On a tellement vécu de choses toute les deux dans ce labo B318. Nos conversations, nos fous rires, nos superbes résultats et même nos moments de déceptions, je pense qu'on a partagé la totale pendant ces années. Mais je tiens à te dire que je suis toujours jalouse de tes photos d'intestin de drosos ! Grace à toi maintenant je parle trop bien le libanais. Merci pour cette belle amitié. Tu m'as tellement manqué ces derniers mois mais je te souhaite beaucoup de réussite pour ce nouvel postdoc au Danemark. Qui sait un jour peut-être on réalisera notre rêve et on se réunira pour une nouvelle aventure. Tchou Tchou Rouba.

Ensuite, Je remercie tous les membres de l'équipe 6 du C3M (Microbial virulence and inflammatory signaling in deseases) pour leurs échanges, avis et conseils sur mes travaux de thèse. Je les remercie infiniment pour leur bonne humeur. Un petit mot en particulier à **Patrick** pour sa gentillesse, sa bonne humeur et sa disponibilité. Merci Patrick pour ton implication dans ce projet. Merci pour tous ces moments passer à l'animalerie même pendant les weekends. Ta manière de parler aux petites souris m'a fait toujours rire. J'ai eu vraiment de la chance de travailler avec toi... Ensuite, je remercie **Greg** pour sa disponibilité, ses conseils et ses blagues, merci de m'avoir initié aux gavages (pas toujours évident pour moi) et de m'avoir formé au biospace. J'ai adoré aller avec vous deux à l'animalerie. Je remercie également **Dorota** (CMU de Monaco) de m'avoir initié à la dissection des intestins des souris et ainsi d'avoir contribuer à la mise en place du protocole murin. Je remercie aussi **Anne** pour nos échanges et merci de m'avoir initié à la culture cell et au western blot et de m'avoir appris à réaliser de très beaux Time lapse. Merci à **Céline** pour ses conseils en bio mol aussi pour toutes ses histoires et surtout pour la menthe qu'elle nous apporter... Je remercie également **Orane** pour ses conseils pendant mes labs meetings ça a été très enrichissant. Pour finir je remercie tous les jeunes de l'équipe 6 pour leur bonne humeur et leur gentillesse en particulier **Juan, Alissa, Cédric, Loïc et Océane**.

Je remercie très chaleureusement nos collaborateurs de L'ANSES maison d'Alfort à Paris en particulier **Mathilde**. Mathilde, tu as une place particulière dans ces remerciements. Travailler avec toi a été une vraie opportunité pour moi. Merci pour tous ce que tu m'as apporté. J'ai adoré ta bonne humeur et ta joie de vivre. Je te remercie également pour la relecture de mon manuscrit. Je garderai toujours un bon souvenir de tes passages au labo (surtout nos lâchers de droso au labo et nos petites expérimentations qu'on faisait à part). Merci pout tout !

Je remercie également le **service bactériologie au CHU** de Nice pour leur implication dans ce projet en particulier **Pr. Raymond Ruimy** et **Dr. Romain Lotte** et **Alicia Chevalier**.

Également un grand merci **Valérie Grandjean**, merci de m'avoir encadré pendant mon stage de M1. Merci pour le temps passé à la paillasse pour me faire découvrir le modèle murin. Tu as été la première personne à m'avoir initié sur ce modèle. Je ne te remercierai jamais assez pour cette belle aventure. Je suis très heureuse de t'avoir eu comme encadrante. Merci pour ton soutien quotidien même pendant ces années de thèse.

Parce que le doctorat n'est pas que le labo, Je tiens à remercier toutes les personnes que j'ai pu côtoyer pendant toutes ces années. Merci à tous les jeunes de l'ISA, en particulier, **Rahim**, j'ai toujours admiré ta zénitude et ton calme mais surtout tes histoires. Bon courage pour ta recherche de post-doc (en



Tardigrade j'espère) et prend bien soin d'Ilona car tu as de la chance de l'avoir. **Salomé et Mélina** vous êtes adorables les filles et bon courage pour la suite de vos thèses ! vous serez les prochaines. **Dries** ça a été très agréable de partager le labo avec toi et maintenant tu mérites un peu de repos. Je te souhaite un bon voyage et surtout pédales bien au sud d'Amérique. **Laura** tu nous as tellement manqué. Merci pour tous ces moments qu'on a partagés ensemble. Je remercie également tous les jeunes du C3M en particulier **Marina**. Tu es une personne magnifique. Bravo pour tout ce que tu as accompli et merci pour tous ces souvenirs qu'on a créé depuis le master. **Lauriane** tu es adorable j'ai adoré te connaître et bon courage pour la suite.

Une pensée particulière à **mes petites drosos et mes petites souris** qui ont tellement contribué à cette thèse.

En dehors de la thèse, je voudrais commencer par remercier sincèrement **Yara**. Depuis ce jour à la Fac (cours écologie moléculaire si je me rappelle bien) nous ne nous sommes plus quittées. La thèse a fait que nous rapprocher et depuis on est devenue les inséparables. Merci d'être là et d'être ma confidente. Merci de m'avoir fait voyager au Liban (appris à parler le dialecte, goûter à la bonne cuisine et surtout écouter tes chansons bizarres) tout en restant en France. Tous ces moments passés ensemble, notre voyage à Barcelone et 'nos futurs voyages' si un jour on se met d'accord sur la destination ont fait que nous rapprocher. J'ai adoré tout ce qu'on a vécu les bons et les mauvais moments. Merci de m'avoir donné l'opportunité de connaître ton adorable famille surtout la lady **Rana**. Yara je ne te remercierai jamais de m'avoir soutenue et d'avoir été toujours présente. La page de la thèse se tourne mais ce ne sera qu'un nouveau chapitre pour nous deux. Je t'aime très fort ma petite sœur.

Ensuite, je remercie **Hawraa** pour sa question quotidienne (kif thèse ?). Merci pour ta gentillesse, ton grand cœur et tes plats très délicieux les uns que les autres. Je me régala à chaque fois. Je remercie ensuite **Mariem** pour sa bonne humeur et sa joie de vivre. Tu es une personne magnifique. Merci pour notre rituelle de chaque année la raclette et surtout de m'avoir fait goûter le mekdous j'en suis tombée amoureuse. Merci **Soumaya** pour tes conseils et toutes nos belles conversations. Tu nous manques tellement. Les filles Yara, Hawraa, Meriem et Soumaya merci pour votre soutien et toutes ces soirées.

Mes remerciements ne seraient pas complets sans avoir remercier **Sarah et Anthony**. Cet adorable couple. Merci à vous deux. Sarah j'ai eu vraiment de la chance de te rencontrer. Depuis, tu es devenue une sœur pour moi. Merci pour cette grande amitié. Je ne me suis jamais sentie loin du pays grâce à toi. Merci pour tes encouragements. Merci d'avoir veillé sur moi et surtout merci pour la personne que tu es. Je t'aime très fort Sarah.

Je remercie tout **particulièrement Louise, Ana, Arnaud C, Ghyslaine, Saiko, Samuel, Thomas et Emilie**. Merci pour tout ce que vous m'avez apporté chacun de vous dès le premier jour de mon arrivée en France. Merci pour tous ces moments qu'on a partagés ensemble (soirées, bêtises, voyages...). Je vous souhaite tout le bonheur du monde

Pour finir, Je tiens à remercier énormément ma famille :

A **Souha**, ma grande sœur, merci d'avoir été toujours là pour moi. Je suis fier de t'avoir comme sœur. Je te remercie également pour ton soutien depuis mon plus jeune âge. Tu as toujours veillé sur moi. Merci et surtout prends bien soin de Trésor !

A **Yasmine**, ma petite sœur. Je pense que je ne te le dis pas assez mais je suis fière de t'avoir dans ma vie. Tu as si vite grandi et je suis très fière de la personne que tu es devenue. Saches que je serai toujours là pour toi

Souha et Yasmine, on a évolué main dans la main et nous continuerons ce long chemin ensemble. Sachez que je vous aime !

A **mes parents**, sans votre soutien et vos encouragements je ne serai jamais devenue la personne que je suis aujourd'hui. Merci de m'avoir encouragé et de m'avoir donné l'opportunité de continuer mes études en France. Ces années loin de vous n'ont pas été toujours faciles mais il a été essentiel pour moi de savoir que quoi qu'il arrive, vous seriez là pour m'aider à rebondir. J'ai conscience de la chance incroyable que j'ai eu de grandir à vos côtés. Merci pour votre présence si rassurante, votre dévouement au quotidien pour que mes sœurs et moi ayons la vie la plus belle. Je ne vous remercierai jamais assez pour tout ce que vous avez fait et tout ce que vous continuez à faire pour moi. Grâce à vous j'ai pu accomplir ce rêve j'espère que je vous rends aujourd'hui fière. Merci pour tout ! Je vous aime papa maman

# Liste des figures

Figure 1 : Arbre phylogénétique représentatif du groupe <i>B. cereus</i> .....	30
Figure 2: Cycle de vie <i>B. cereus</i> .....	32
Figure 3: La spores du groupe <i>B. cereus</i> .....	35
Figure 4 : Le processus de sporulation du groupe <i>B. cereus</i> .....	36
Figure 5: Description des 2 principaux syndromes présents lors d'intoxication alimentaire liée au groupe <i>B. cereus</i> .....	40
Figure 6: Mode d'action de l'espèce <i>Bt</i> sur les larves de lépidoptères .....	47
Figure 7 : Représentation schématique de l'anatomie intestinale chez la drosophile et la souris	54
Figure 8: Comparaison de la disposition intestinale des mammifères et de la drosophile.....	56
Figure 9 : Expression des différents Toll-like receptors (TLR) le long de l'épithélium intestinal chez la souris .....	64
Figure 10 : Activation de l'inflammasome NLRP3.....	66
Figure 11: Comparaison des structures des protéines de reconnaissance du peptidoglycane (PGRPs) chez la drosophile et les mammifères et leur principale fonction.....	68
Figure 12 : Activation des voies immunitaires au niveau de l'intestin de la drosophile.....	70
Figure 13 : Régionalisation de l'activation de la voie immunitaires Imd et de ces cibles au niveau de l'intestin de la drosophile .....	72
Figure 14 : Les voies de signalisation cellulaires impliquées dans la régénération de l'épithélium intestinal chez la drosophile suite à une infection.....	79
Figure 15: Disposition des différentes jonctions cellulaires au niveau intestinal chez la drosophile et les vertébrés .....	81
Figure 16 : Conservation des voies immunitaires .....	88
Figure 17: Conservation des voies immunitaires.....	90

<b>Figure 18: <i>Pglyrp2</i> expression profiling in different parts of mice small intestine after <i>Bt</i> spores oral gavage .....</b>	<b>145</b>
<b>Figure 19 : Role of the acidic conditions on spore fate.....</b>	<b>150</b>
<b>Figure 20 : Exposition des spores de <i>Bt</i> à des irradiations UV pendant 2 heures.....</b>	<b>167</b>
<b>Figure 21 : Recontamination par les spores de <i>Bt</i> chez le modèle murin. (A).....</b>	<b>169</b>
<b>Figure 22 : Quantification de la charge bactérienne 30 minutes et 5 jours après l’ingestion ponctuelle de spores de <i>Bt</i> chez la drosophile adulte.....</b>	<b>170</b>
<b>Figure 23: L’ingestion des spores de <i>Btk SA-11</i> provoquent des désagréments intestinaux représentée par des diarrhées et des vomissements.....</b>	<b>174</b>
<b>Figure 24: Evaluation de la survie suite à l’injection de différentes de cellules végétatives de <i>Btk SA-11</i> chez le modèle murin.....</b>	<b>175</b>
<b>Figure 25: Hypothèse sur l’éventuelle coopération des voies Toll et Imd au niveau des postérieures de l’intestin moyen chez le modèle drosophile .....</b>	<b>180</b>
<b>Figure 26: Réponse des macrophages au infections par des cellules végétatives de <i>Bt</i> .....</b>	<b>182</b>
<b>Figure 27: Expansion du tissu adipeux abdominal suite au gavage par des spores de <i>Bt</i>.....</b>	<b>183</b>

## Liste des Tableaux

<b>Tableau 1 : Caractéristiques des syndromes d’intoxications alimentaires liées au groupe <i>B. cereus</i> .....</b>	<b>39</b>
<b>Tableau 2 : Caractéristiques des différents peptides antimicrobiens chez la drosophile.....</b>	<b>74</b>

# Liste des abréviations

ADN: Acide DésoxyriboNucléique ADNc

ANI: identité nucléotidique moyenne

APN: Aminopeptidase

ARN: Acide RiboNucléique

ASC: apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD

*B. anthracis*: l'espèce *Bacillus anthracis*

*B. cereus*: Le groupe *Bacillus cereus*

*Bc ss*: l'espèce *Bacillus cereus sensu stricto*

*B. cytotoxicus*: l'espèce *Bacillus cytotoxicus*

BMDM: Bone marrow-derived macrophage

*B. mycoides*: l'espèce *Bacillus mycoides*

*B. pseudomycooides*: l'espèce *Bacillus pseudomycooides*

*Bt*: l'espèce *Bacillus thuringiensis*

*Btk*: la sous-espèce *Bacillus thuringiensis* ssp. *kurstaki*

*Bti*: la sous-espèce *Bacillus thuringiensis* ssp. *israelensis*

*Bta*: la sous-espèce *Bacillus thuringiensis* ssp. *aizawai*

*Btm*: la sous-espèce *Bacillus thuringiensis* ssp. *morrisoni*

*B. toyonensis*: l'espèce *Bacillus toyonensis*

*B. weihenstephanensis*: l'espèce *Bacillus weihenstephanensis*

CFU: Colony Forming Units

CLR: C-type Lectin Receptors

Cry: Crystal (protéines cristallines)

CSI: Cellules Souches Intestinales

Cyt: Proteines cytolitique

CytK: cytotoxine K

DIAP1: Death-associated inhibitor of apoptosis 1

DI: Delta

Dome: Domeless

Dpp: Decapentaplegic

DSS: sulfate de sodium de dextrane

Duox: Dual oxidase

EB: Enteroblastes

EC: Enterocytes

*Ecc: Erwinia carotovora carotovora*

EEC: Cellules entéroendocrines

EEP : Précurseurs de cellules entéroendocrines

EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor

Esg: Escargot

FPR: formylated peptide receptors

Hpo: Hippo

JAK-STAT: Janus Kinase/signal transducer and activator of transcription

JA: Jonctions adhérentes

JS Jonctions serrées

HBL: hémolysine BL

IKK: IkappaB Kinase

IL-1 $\beta$ : Interleukin 1 Beta

Imd: Immune Deficiency

Gsdmd: Gasdermine D

Lgr5: Leucin-rich G protein-coupled receptor 5

LPS: LipoPolySaccharide

LRR: Leucine-Rich Repeat

Lys: lysosome

MAMP: Microbial Associated Moecular Pattern

MEE: MultiLocus Enzym Electrophorese

MLST: MultiLocus Sequence Typing

NF- $\kappa$ B: Nuclear Factor-Kappa B »

NHE: Entérotoxine non hémolytique

NLR: Nod-Like Receptor

NOD: Nucleotide-binding Oligomerisation Domain

OGM: Organisme génétiquement modifié

PAM: Peptide anti-microbien

PAMP: Pathogen Associated Molecular Pattern

*Pe: Pseudomonas entomophila*

PGN: peptidoglycan

PGRP (ou PGLYRP): Peptidoglycan Recognition Protein

PM: Membrane péritrophique

Pros: Prospero

PRR: Pattern Recognition Receptors

RNAi: ARN interference

ROS: Espèces réactives d'oxygène

Spz: Spätzle

Su(H): Supressor of Hairless

TA: Cellules Amplificatrices transitoires

TAB2: TAK1-Binding Protein 2

TAK1: Transforming growth factorb-Activated Kinase 1

TIAC: Toxi-Infections Alimentaires Collectives

TIR: Toll-IL-receptor

TGF- $\beta$ : Transforming Growth Factor- $\beta$

TLR: Toll-Like Receptor

TNF- $\alpha$ : Tumor-Necrosis Facteur alpha

TNFR1: Tumour Necrosis Factor- $\alpha$  receptor).

Upd: Unpaired like protein

Vip: Vegetative insecticidal protein

Yki: Yorkie



# **Introduction bibliographique**

# **Chapitre I : Interaction hôte-pathogène**

## **1. Présentation du concept**

Le terme « interaction hôte-microorganisme » fait référence à la manière dont un microbe (virus, bactérie, champignon, viroïde ou autre) interagit avec son hôte. En effet, ces microorganismes, plus communément appelés microbes, sont omniprésents. Chaque jour, nous en ingérons, en inhalons et en transportons des milliers. A l’instar de la bactérie *Listeria monocytogenes*, certains sont capables de s’adapter à l’environnement de l’hôte, voire, de contourner sa réponse immunitaire pour y survivre et l’infecter (Corr and O’Neill, 2009). De fait, le terme « microbe » est, par abus de langage, souvent associé à la maladie, mais ce n’est pas toujours le cas.

## **2. Classification des interactions hôtes-microorganismes**

Plusieurs études ont essayé de classer ces microorganismes en fonction de leur potentiel pathogène. Par exemple, en 1914, Zinsser a réaffirmé la classification proposée à l'origine par Bail pour classer les microbes (Zinsser and Dwyer, 2014) . Cette classification est basée sur trois catégories :

- Les saprophytes purs, incapables d’induire une maladie, quelles que soient les circonstances ;
- Les parasites purs, qui provoquent invariablement la maladie ; et
- Les demi-parasites, une catégorie intermédiaire, capable de provoquer des maladies dans certaines circonstances.

Cette troisième catégorie a été particulièrement étudiée avec l’émergence de certaines maladies infectieuses chez des patients présentant une déficience immunitaire. Le concept d'opportunisme microbien leur a été attribué pour contrer les visions de la pathogénicité microbienne avec une vision plus centrée sur l'hôte. Le concept d'opportunisme microbien considère que des germes opportunistes possèdent un potentiel pathogène qui se manifeste chez un hôte présentant un système immunitaire affaibli (Armstrong, 1993; Poindexter and Washington, 1974)

Face à la complexité de ces interactions et l'émergence de nouveaux pathogènes, les études menées pour comprendre ces interactions deviennent de plus en plus nombreuses.

En effet, ces interactions hôte-microbe peuvent aller de l'élimination du microbe jusqu'à la mort de l'hôte, faisant intervenir des états de persistance, de colonisation et de commensalisme, qui peuvent évoluer pour provoquer une infection. C'est dans ce contexte que sont nés les termes « pathogénicité » et « virulence ».

### **3. Différence entre pathogénicité et virulence**

Bien que les termes « virulence » et « pathogénicité » soient souvent utilisés de manière semblable, ils ont des définitions différentes (Coleman et al., 2011).

La pathogénicité se définit par la capacité à provoquer une maladie chez des organismes hôtes sensibles. En revanche, la virulence a longtemps été définie comme une propriété microbienne intrinsèque qui distingue le pathogène du non pathogène (Sacristán and García-Arenal, 2008). Cette définition a évolué car plusieurs études ont montré que les facteurs de l'hôte jouent un rôle critique dans les interactions hôte-microbe. Par exemple, certains microbes dits virulents sont avirulents chez les hôtes dotés d'une immunité compétente, tandis que les microbes qui sont généralement avirulents peuvent provoquer des maladies chez les hôtes immunodéprimés. Ainsi, la virulence n'est pas une caractéristique microbienne distincte mais, plutôt un phénomène complexe, dynamique et changeant, qui comprend à la fois l'hôte et les facteurs microbiens. Elle est définie comme la mesure de la capacité à causer une infection chez l'hôte (Sacristán and García-Arenal, 2008).

En outre, la pathogénicité est une variable qualitative, c'est-à-dire qu'elle est définie par sa présence ou absence, tandis que la virulence est une variable quantitative, c'est-à-dire qu'elle est représentée par l'ampleur des dommages qu'elle cause. Bien qu'elles diffèrent selon plusieurs interprétations, la pathogénicité et la virulence sont toutes les deux des variables microbiennes qui ne peuvent être exprimées que chez un hôte prédisposé, soulignant que chacune dépend des variables de l'hôte.

### **4. Les interactions hôtes-pathogènes alimentaires**

Les agents pathogènes d'origine alimentaire causent un grand nombre de maladies ayant des effets importants sur la santé humaine et l'économie.

Ces micro-organismes pathogènes peuvent se présenter sous forme de **bactéries** (exemple : *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio spp.*, *Yersinia enterocolitica*), **virus** (exemple : *Hepatitis A* et *Norovirus*) ou **parasites** (exemple : *Cyclospora cayetanensis*, *Toxoplasma gondii* et *Trichinella spiralis*). Tous ces microbes peuvent provoquer une maladie d'origine alimentaire.

Une pathologie d'origine alimentaire survient lorsqu'un agent pathogène est ingéré *via* la nourriture et qu'il est capable de s'adapter aux réponses de son hôte, ou lorsqu'un agent pathogène produisant une toxine entérique infecte un produit alimentaire. Cette toxine est par la suite ingérée par l'hôte. Ainsi, les maladies d'origine alimentaire sont généralement classées soit en intoxication (infection toxi-alimentaire) soit en intoxication alimentaire. Les intoxications alimentaires résultent de l'ingestion de microorganismes viables, capables d'envahir la muqueuse intestinale, et de perturber sa physiologie (Cliver & Riemann, 2002). Contrairement aux intoxications alimentaires, les intoxications découlent de l'ingestion de toxines bactériennes préformée dans l'aliment.

Les bactéries sporulantes occupent une place importante parmi les microorganismes préjudiciables en raison de leur ubiquité et de leur capacité à passer sous forme de spores thermorésistantes qui les rendent particulièrement adaptées aux aliments traités. Le danger engendré par ce groupe de bactéries est leur capacité à produire des enzymes ainsi que des toxines susceptibles d'altérer la qualité des aliments et d'engendrer des troubles digestifs (Granum, 1994). Ces contaminations microbiologiques représentent des risques majeurs sur le plan sanitaire. Les industries agroalimentaires ont développé des stratégies pour détruire les contaminants sous leur forme végétative mais, aux vues de leur résistance, la maîtrise de la contamination due aux spores demeure un enjeu capital (Tétart and Didier., 2009). Les espèces sporulantes les plus décrites comme pathogènes alimentaires pour l'Homme sont *Clostridium perfringens* et *Bacillus cereus sensu lato* (ou groupe *Bacillus cereus*).

Dans le cadre de ma thèse, je me suis focalisée sur l'étude du devenir et du comportement des spores des espèces *Bacillus cereus sensu stricto* et *Bacillus thuringiensis* dans l'intestin. Ces deux espèces appartiennent au groupe *B. cereus* et sont connues pour provoquer des altérations digestives chez de nombreux organismes.

## Chapitre II : Le groupe *Bacillus cereus*

### 1. Caractéristiques générales et phylogénie

Le terme *Bacillus* signifie une forme de bâtonnet, et *cereus* peut être traduit du latin par colonie d'aspect cireux. Le nom reflète donc la forme microscopique facilement reconnaissable du groupe *B. cereus*. Les membres de ce groupe appartiennent à la famille des *Bacillaceae*. Le groupe *B. cereus* est décrit également par sa capacité à former des spores résistantes en conditions dites défavorables ou extrêmes.

Ce groupe comprend au moins 8 espèces étroitement apparentées dont les plus décrites sont : *B. anthracis*, *B. cereus sensu stricto* (*Bc ss*), *B. thuringiensis* (*Bt*), *B. mycooides*, *B. pseudomycooides*, *B. weihenstephanensis*, *B. cytotoxicus* et plus récemment *B. toyonensis* a été validée comme une nouvelle souche (Jiménez et al., 2013).

Certaines espèces de ce groupe sont connues pour provoquer diverses maladies tandis que d'autres semblent être non nocives :

- *B. cereus sensu stricto* (*Bc ss*) est décrit comme un opportuniste alimentaire touchant l'Homme.
- *B. anthracis* est l'agent causal de l'anthrax ou la maladie de charbon. C'est une pathologie mortelle aiguë chez les mammifères. Il a également été utilisé comme agent de bioterrorisme.
- *B. thuringiensis* (*Bt*) est utilisé comme agent de biocontrôle ciblant certains insectes nuisibles.
- *B. weihenstephanensis* est une espèce psychrotolérante c'est-à-dire qui peut pousser à des températures inférieures à 7°C mais pas supérieur à 43°C (cette caractéristique est à la base de sa différenciation avec *B. cereus*) (Lechner et al., 1998)
- *B. mycooides* et *B. pseudomycooides* forment des colonies rhizoïdes sur gélose et peuvent être uniquement différenciés en fonction de l'ARNr 16S (Jackson and Nakamura 1995; Nakamura 1998). *B. mycooides* est également un membre psychrotolérant du groupe *B. cereus* (Guinebretière et al. 2008). Ces souches n'ont pas été reconnues comme des agents pathogènes (Guinebretière et al. 2008).

- *B. cytotoxicus* est une espèce du groupe *B. cereus*, décrite en 2013 sur la base de sa thermotolérance (croissance jusqu'à 50-53°C). Il a été décrit comme associé à des intoxications alimentaires sévères. Cette espèce est également caractérisée par la présence du gène codant pour la cytotoxine K-1 (CytK-1) (Guinebretière et al. 2013b). CytK est une toxine diarrhéique du groupe *B. cereus*, jouant un rôle dans le déclenchement d'intoxications gastro-intestinales (Lund et al., 2000). Il existe deux variants de la cytotoxine K : CytK-1 et CytK-2 qui partagent 89% d'identité. Les études ont montré que le variant CytK-2 est cinq fois moins toxique que le variant CytK-1 sur les cellules Caco-2 et Vero (Fagerlund et al., 2004).
- *B. toyonensis* est représenté par une seule souche isolée du sol au Japon, et est utilisé comme probiotique chez l'animal (Jiménez et al. 2013). *B. toyonensis* a été distingué des autres espèces du groupe *B. cereus* par la méthode du calcul de l'identité nucléotidique moyenne (ANI) (Jiménez et al. 2013). Cette technique a été établie par Konstantinidis et ses collaborateurs, proposant d'utiliser l'ensemble des gènes de chaque génome comme des potentiels marqueurs phylogénétiques. Pour cela, les séquences de l'ensemble des gènes d'un génome A sont alignées bioinformatiquement sur l'ensemble des gènes d'un génome B. La moyenne des pourcentages d'identité des alignements est ensuite calculée en utilisant les meilleures correspondances pour chaque gène du génome A avec le génome B (Konstantinidis and Tiedje, 2005).

La taxonomie du groupe *B. cereus* est très complexe et régulièrement débattue mais les travaux de Guinebretière et collaborateurs publiés en 2010 et 2013, ont permis de proposer une classification des différentes espèces en sept groupes phylogénétiques (Guinebretière et al. 2010; Guinebretière et al. 2013a) (Figure 1).

En effet, les souches regroupées dans le groupe I (*B. pseudomycoïdes*) et le groupe VI (*B. weihenstephanensis* et *B. mycoïdes*) semblent être des espèces différentes et elles n'ont pas été décrites comme liées à des intoxications alimentaires. Leur potentiel opportuniste reste incertain (Stenfors et al., 2002). Le groupe VII regroupe les différentes souches de *B. cytotoxicus*.

En revanche, les souches de *Bc ss*, *Bt* et *B. anthracis* sont réparties dans les groupes II, III, IV et V et décrites pour être très proches.

À la suite des comparaisons des gènes de ménages par les techniques de MultiLocus Sequence Typing (MLST) et MultiLocus Enzym Electrophorese (MEE), il a été suggéré que *Bc*, *Bt* et *B. anthracis* pouvaient être regroupés en une seule et unique espèce (Helgason et al., 2000). De

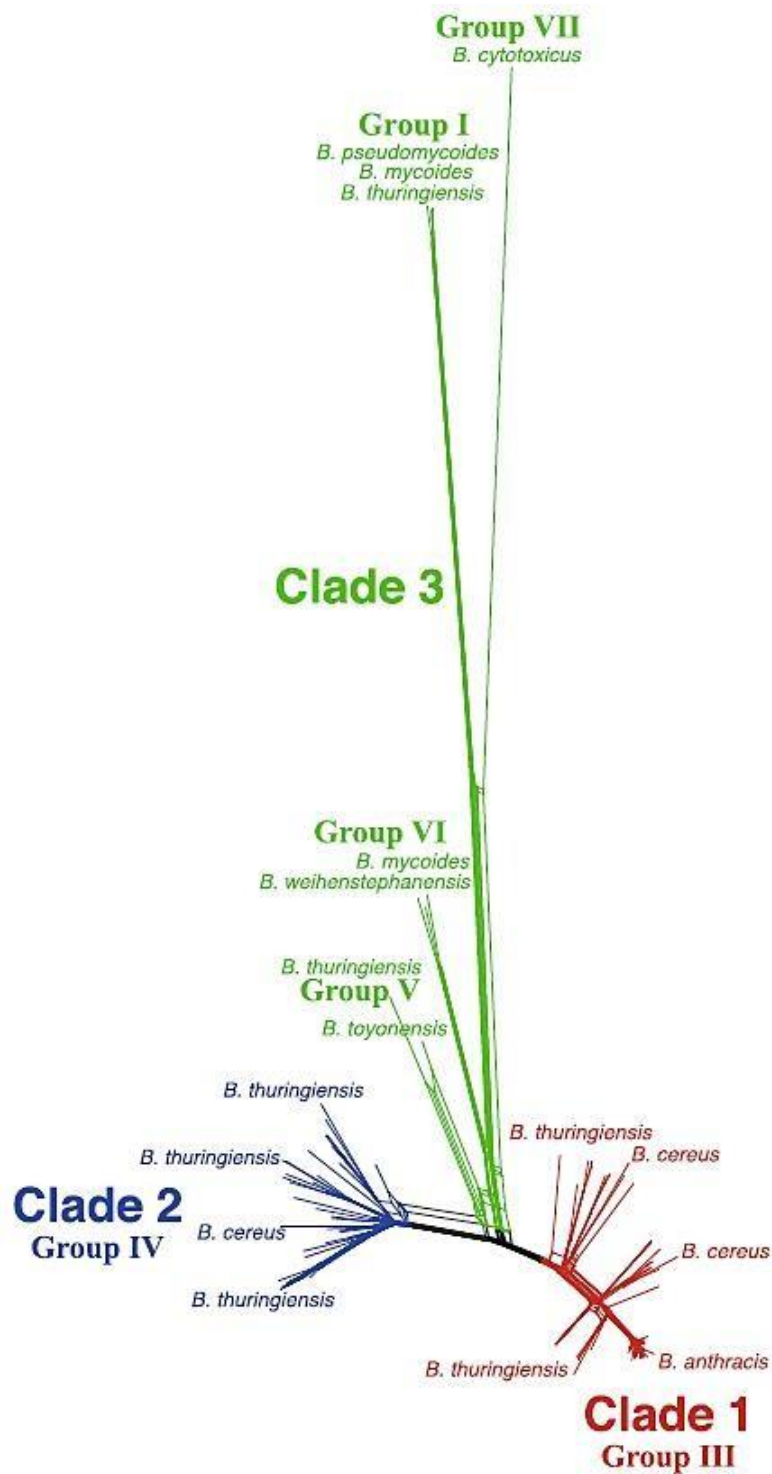
plus, une similarité de séquence des gènes de l'ARNr 16S très élevée (> 99 %) de *B. anthracis*, *Bc ss* et *Bt* a été aussi observée (Sacchi et al., 2002).

De ce fait, *Bc ss*, *B. anthracis* et *Bt* pourraient être considérées comme une même espèce. Il ne faut tout de même pas nier qu'il existe chez ces bactéries d'autres caractéristiques discriminatoires, souvent liées à des facteurs de virulence codés par des gènes plasmidiques (Rasko et al., 2005). Pour complexifier cette question, ces facteurs de virulence peuvent se présenter sous forme 'Toxines' peuvent être échangés naturellement entre ces trois espèces par des transferts horizontaux (van der Auwera et al., 2007 ; Yuan et al., 2010)

Ainsi une souche de *Bt* qui perd ses plasmides pourrait devenir indiscernable d'un autre membre du groupe *B. cereus*.

Il est important de noter que la notion historique de la pathogénicité de *B. anthracis* ainsi que l'utilisation massive de *Bt* comme agent de biocontrôle ont pris le dessus sur les classifications taxonomiques. Ce qui fait que ces espèces sont, à tort, toujours considérées comme différentes et séparées.

Pour la suite de mon manuscrit, je me concentrerai sur les deux espèces *Bc ss* et *Bt* en raison de l'abondance des recherches liées à leur importance clinique mais aussi socio-économique.



**Figure 1** : Arbre phylogénétique représentatif du groupe *B. cereus*. Trois clades sont représentés en parallèle des 7 groupes phylogénétiques (I à VII) précédemment décrits (Bazinet, 2017)



## 2. Cycle de vie

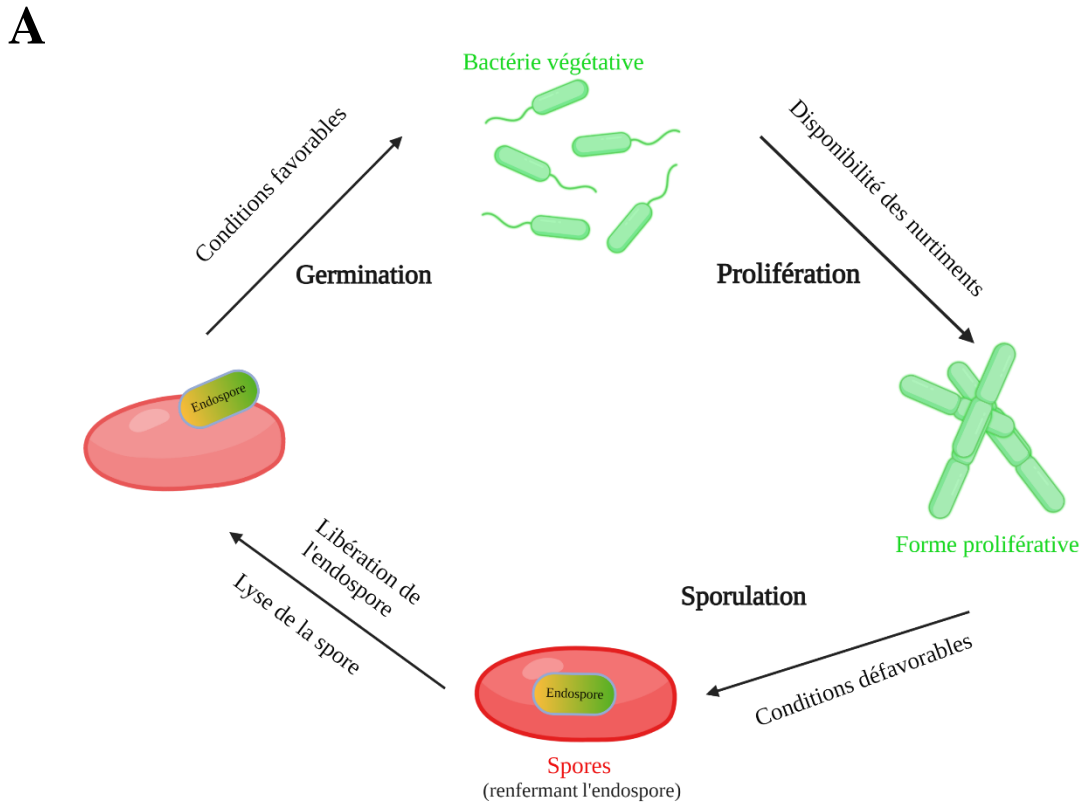
Le cycle de vie de la plupart des espèces du groupe *B. cereus* est caractérisé par deux phases : d'une part la division des cellules bactériennes et d'autre part la formation de la spore (Figure 2).

### 2.1. La bactérie végétative

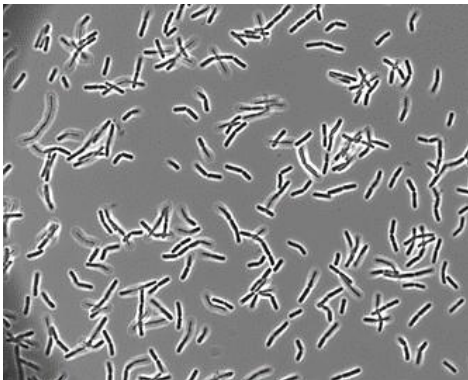
Les formes végétatives du groupe *B. cereus* se présentent sous forme de bacilles, Gram positif de 1,4 µm habituellement observés en paires ou en chaînettes courtes (Figure 2B). La plupart sont anaérobies facultatives et flagellées. Ces bacilles sont capables de se développer sur des milieux gélosés nutritif conventionnels, en formant des grandes colonies blanchâtres, granuleuses et aux contours irréguliers (Kramer and Gilbert, 1989). Leur croissance est observée à des températures se situant entre 7°C et 50°C selon l'espèce concernée, leur température optimale de croissance étant d'environ 37 °C.

Ces bactéries ont une structure constituée d'une membrane interne et d'un peptidoglycane épais afin de maintenir la forme et l'intégrité de la cellule, en l'absence de membrane externe.

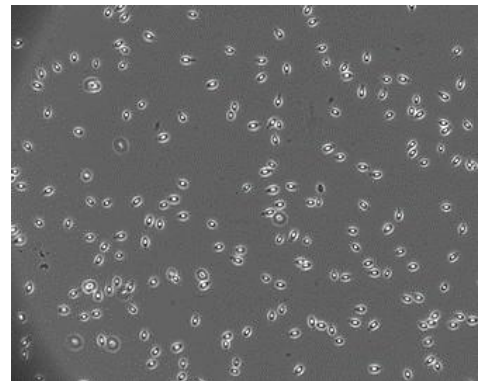
Ces cellules végétatives sont décrites pour avoir une incapacité à métaboliser le mannitol mais elles sont capables de synthétiser la lécithinase. Ces caractéristiques biochimiques permettent leur discrimination sur un milieu sélectif appelé milieu Mossel (Biomérieux).



**B**



**C**



**Figure 2: Cycle de vie *B. cereus*** (A) Les étapes du cycle de vie des espèces du groupe *B. cereus*. (B) Cellules végétatives observées en microscopie optique à contraste de phase (Ehrhardt et al., 2010) (C) Spores observées en microscopie optique à contraste de phase (Ehrhardt et al., 2010)

## 2.2. Les propriétés de la spore

Les spores bactériennes sont des formes cellulaires hautement spécialisées et différenciées, conçues pour survivre dans des conditions défavorables (Figure 2C). Leur structure est très différente de celle des cellules végétatives. En effet, ces spores sont formées par un noyau interne, entouré de 2 membranes (interne et externe) séparées par le cortex, puis d'une couche externe supplémentaire (Kutima and Foegeding, 1987) (Figure 3A).

- **Le noyau interne ou endospore** représente la partie la plus inerte de la spore. Il renferme le matériel génétique de la cellule. C'est une forme déshydratée qui joue un rôle important dans la longévité, la dormance ainsi que la résistance des spores (Beaman, Pankratz, and Gerhardt 1972; Russell 2003).
- **La membrane interne** entoure l'endospore. Lors de la germination, la membrane interne devient la membrane cytoplasmique de la cellule végétative naissante. A l'état dormant, cette membrane interne est formée par des lipides qui sont en grande partie immobiles et qui acquièrent leur mobilité au moment de la germination (Cowan et al., 2004). En effet, la composition lipidique de la spore apparaît très similaire à celle de la cellule végétative (Griffiths and Setlow, 2009). En revanche, la composition protéique est différente. Bien que la membrane végétative contienne de nombreuses protéines, la membrane interne possède, en plus des protéines membranaires classiques, d'autres protéines très spécifiques. Ces protéines sont représentées par des transporteurs, mais aussi des récepteurs de germination (Setlow, 2006). La membrane interne joue aussi un rôle de barrière, ralentissant l'entrée de la plupart des molécules pouvant endommager l'ADN (Cortezzo et al., 2004). Cette structure représente ainsi, la structure de première importance impliquée dans la résistance des spores.
- **Le cortex** entoure la membrane interne. Il est constitué d'une épaisse couche peptidoglycane spécifique de la spore (hétéropolymère de deux dérivés glucidiques, la N-acétyl-glucosamine (NAG) et l'acide N-acétyl-muramique (NAM) et de différents acides aminés) (Vollmer, 2008). Le cortex des spores est important pour le maintien de la dormance des spores et leur résistance (Atrih and Foster, 2001). Pendant la germination des spores, le cortex doit être dégradé rapidement pour libérer l'endospore.
- La paroi de la cellule germante, représentant la paroi de la future cellule végétative, se trouve entre le cortex et la membrane interne. Sa composition en peptidoglycane semble

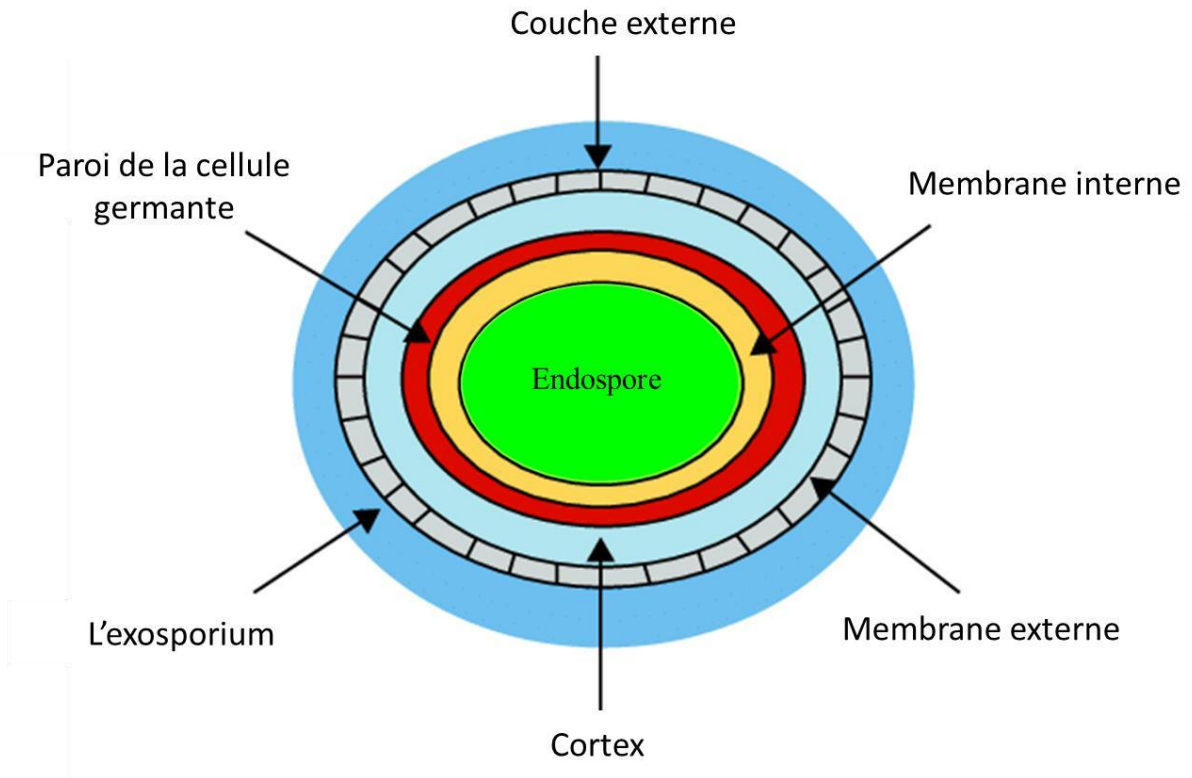
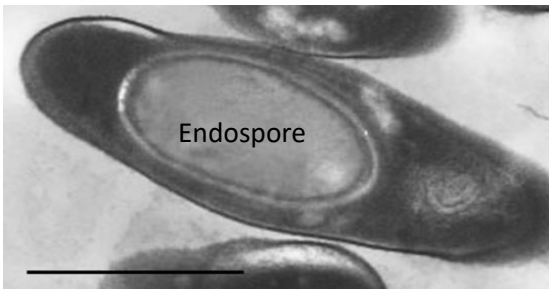
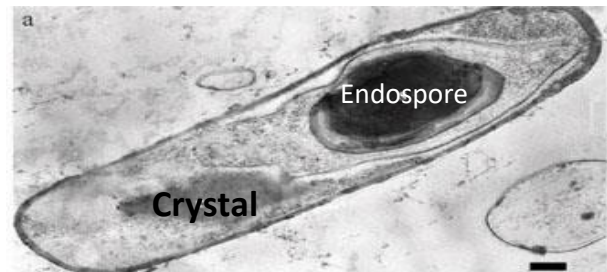
être identique à celle de la cellule végétative. **La membrane externe** entoure la couche du cortex et à l'heure actuelle son rôle reste encore mal défini. En effet, certaines études la considèrent perméable, même aux grosses molécules (Beaman et al. 1972; Black and Gerhardt 1961) alors d'autres études plus récentes la décrivent comme une barrière de la perméabilité (Beaman et al., 1982).

- **La couche externe** entoure la membrane externe et représente une structure protéique dynamique et complexe. Cette couche externe est généralement constituée de trois couches distinctes constituées de protéines et de petites quantités de lipides et de glucides. Ceux-ci permettent à la spore de résister aux agents oxydants et aux produits chimiques en bloquant les molécules toxiques (Setlow, 2006). Ainsi, ces spores sont extrêmement résistantes à la dessiccation, aux métaux lourds, aux radiations et à de nombreux agents stérilisants tels que la chaleur (les spores peuvent résister à une température bien supérieure à 95°C pendant 10 minutes) ou aux antibiotiques.

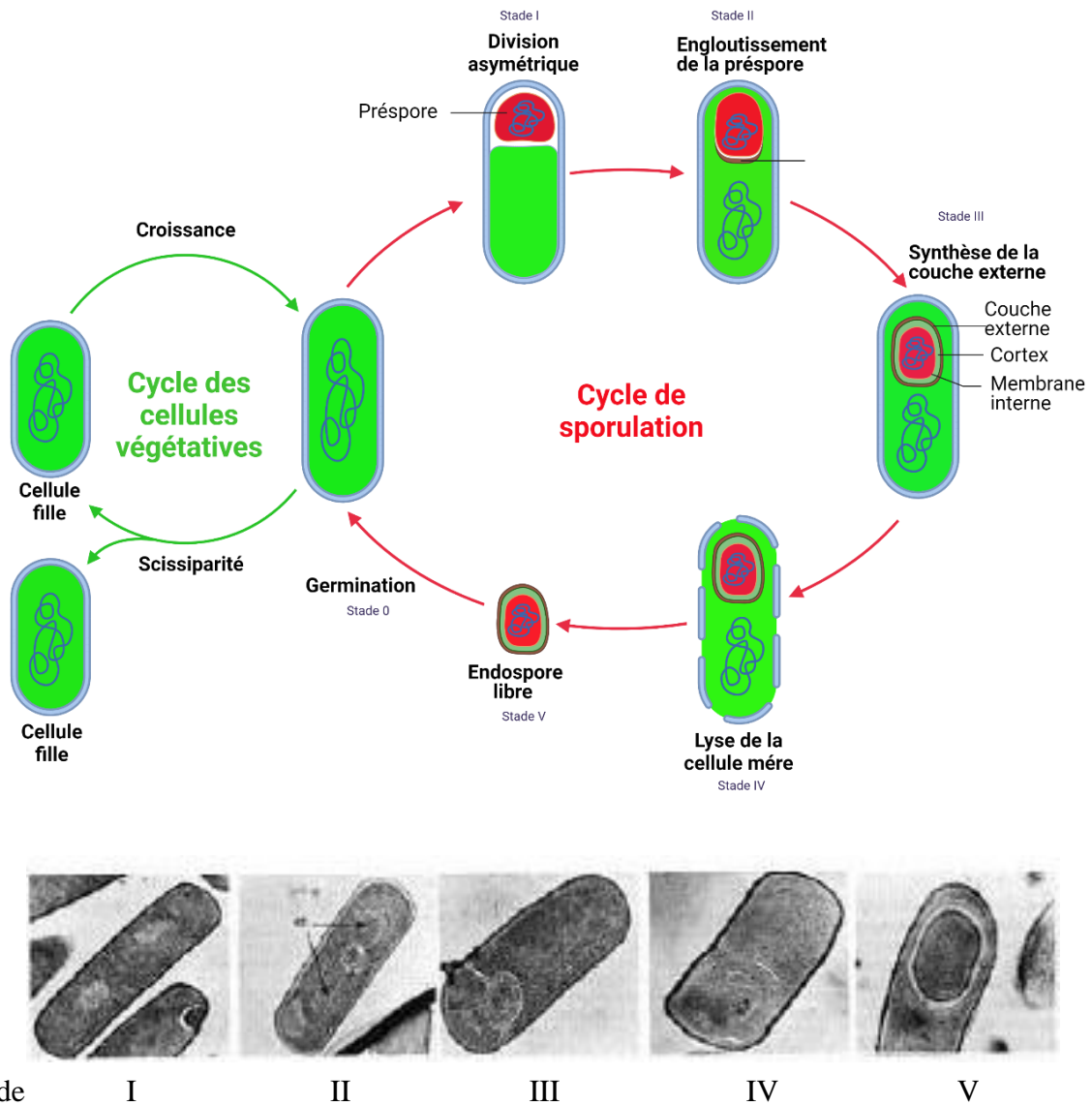
En plus de son pouvoir de résistance, la spore de l'espèce *Bt* présente une autre particularité. En effet, cette espèce assure son pouvoir pathogène par la présence de toxines entomopathogènes cristallines, synthétisées au moment de la sporulation (Fiuza et al., 2017). La spore de l'espèce *Bt* contient une endospore et un (voire plusieurs) cristal protéique (**Figure 3B**).

La formation de spores est un processus unique de division cellulaire asymétrique et la formation d'une petite cellule (endospore) qui sera engloutie ensuite par la plus grosse cellule (cellule mère). Finalement, ceci mène au sacrifice de la cellule bactérienne d'origine pour la production d'une seule spore (**Figure 4**).

La sporulation est une stratégie de survie et de dispersion très efficace des bactéries du groupe *B. cereus*. Cependant, la diversité des souches et les conditions de sporulation telles que la composition du milieu, la température et le pH peuvent affecter les caractéristiques des spores, y compris la résistance et la germination (Abee et al., 2011)

**A****B***B. cereus. s.s**B. thuringiensis*

**Figure 3:** La spores du groupe *B. cereus* (A) Schéma général de la structure de la spore bactérienne (l'échelle des différentes structures n'est pas respectée) (B) Les spores des espèces *Bc ss* et *Bt*



**Figure 4 :** Le processus de sporulation du groupe *B. cereus* (A) Les étapes de sporulation (B) Observation microscopique des différents stades de sporulation (Fisher, 2005)

### 3. Écologie

Les espèces du groupe *B. cereus* sont composées de bactéries omniprésentes dans le sol (Ehling-Schulz et al. 2005; Rosenquist et al. 2005a). Les spores et les bactéries végétatives de ce groupe ont aussi été isolées à partir d'aliments (Rosenquist et al., 2005b; Choma et al., 2000). Cette capacité à occuper plusieurs habitats écologiques peut être liée à la capacité de propagation passive des spores qui se trouvent ainsi en dehors de leurs habitats naturels.

La compréhension de l'écologie de ce germe a suscité beaucoup d'intérêt. Une étude apparue en 2006 a montré que le processus de germination et de prolifération des spores du groupe *B. cereus* pouvait se réaliser entièrement dans le sol avec un mode de vie saprophyte (Vilain et al., 2006). En revanche, l'étude de Margulis et ses collaborateurs a identifié un état prolifératif de certaines espèces du groupe *B. cereus* au niveau des intestins des insectes (Margulis et al., 1998).

La transmission des différentes souches du groupe *B. cereus* du sol aux mammifères peut se faire à travers la nourriture ou bien par des organismes en interaction directe avec le sol, représentant ainsi de vrais réservoirs de spores (plantes, insectes...). Dans ce contexte, il semble impératif de s'intéresser de plus près à l'espèce *Bt*, largement utilisée en tant qu'agent de biocontrôle. *Bt* est présent naturellement dans le sol et sur le feuillage des plantes sous forme de spores (Raymond and Federici, 2017). Présument dû à sa forte utilisation, il a pu être identifié dans l'eau et la nourriture. Cette dissémination peut être due aux adjuvants présents dans les produits commercialisés comme l'acide naphthalène-1-sulfonique qui garantit la mouillabilité et la dispersion des spores. D'autres adjuvants sont aussi présents dans les formulations commerciales mais on en ignore la nature et la fonction au regard du secret commercial. De plus, il a été rapporté que la demi-vie des cristaux de toxines entomopathogènes qui confèrent le pouvoir pathogène à *Bt* après épandage était de l'ordre de 5 à 7 jours (Hung et al., 2016a). Cette instabilité des cristaux incite les agriculteurs à renouveler les traitements (Konecka et al., 2014). La Commission Européenne autorise jusqu' à huit traitements espacés d'une semaine (SANCO/1541/08 – rev. 4 ; 13 décembre 2013). Ces traitements massifs peuvent conduire progressivement à une accumulation des spores de *Bt* dans l'environnement mais aussi sur les aliments traités.

# **Chapitre III : Pathogénicité et facteurs de virulence du groupe *B. cereus***

## **1. Pathogénicité de *B. cereus***

### **1.1. Historique et incidence du groupe *B. cereus* en tant que pathogène alimentaire.**

L'espèce *Bc ss* a été isolée pour la première fois à partir de l'air d'une étable par Frankland et Frankland en 1887 au Royaume Uni. Cette espèce a été caractérisée comme une bactérie, apparaissant généralement sous forme d'une cellule unique ou formant parfois des filaments plus longs. Dénommée ATCC 14579, cette souche est depuis considérée comme l'une des souches de référence au groupe *B. cereus*.

De 1947 à 1949, Steinar Hauge enquêta sur quatre cas de toxi-infections alimentaires collectives (TIAC), ayant affecté environ 600 personnes en Norvège. L'aliment incriminé était une sauce à la vanille préparée à partir d'amidon de maïs riche en spores de *Bc ss*. Ce dessert a été conservé à température ambiante et sa consommation a engendré des crampes abdominales et des diarrhées (Hauge, 1955). Depuis cette découverte, deux toxines de types complexes protéiques (Nhe et HBL) et une toxine simple (CytK) ont été décrites comme des entérotoxines responsables de ces symptômes diarrhéiques.

Cependant, en 1971, une intoxication à l'espèce *Bc ss* de type différent dit « émétique » reliée à la production de la céréulide (toxine préformée dans l'aliment) a été décrite pour la première fois au Royaume Uni. Ce type d'intoxication se caractérise par des crises aiguës de nausées et de vomissements, qui apparaissent entre 0.5 et 5 heures après l'ingestion d'un aliment contaminé (Ehling-Schulz et al., 2004).

Depuis le XX<sup>ème</sup> siècle, l'espèce *Bc ss* a été reconnu comme une bactérie alimentaire opportuniste responsable de ces deux types d'intoxication alimentaires. En 2019, le groupe *B. cereus* se plaçait au premier rang des causes de TIAC dues aux toxines bactériennes en Europe (Authority and European Centre for Disease Prevention and Control, 2021)

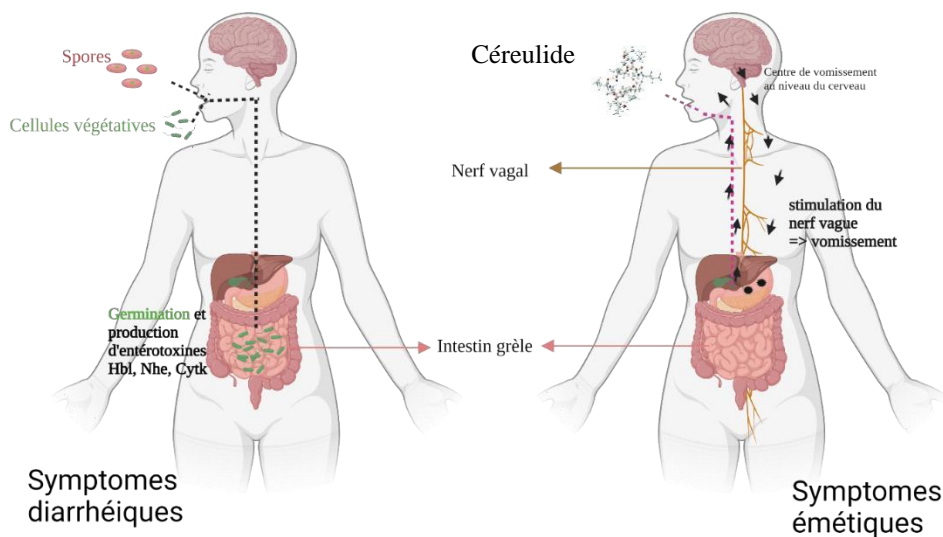


## 1.2. La pathogénicité gastrointestinale liée au groupe *B. cereus*

Le groupe *B. cereus* est connue pour être opportuniste pour l'Homme causant plusieurs types de maladies. Cette espèce à deux types de syndromes gastro-intestinaux dits diarrhéique ou émétique (Ehling-Schulz et al., 2004; Stenfors Arnesen et al., 2008). La pathogénicité de *B. cereus* est basée sur une panoplie de facteurs de virulence pouvant donner lieu à des symptômes diarrhéiques, et/ou émétiques (Tableau 1, Figure 5).

**Tableau 1** : Caractéristiques des syndromes d'intoxications alimentaires liées au groupe *B. cereus* (Stenfors Arnesen et al., 2008)

Caractéristiques	Syndrome diarrhéique	Syndrome émétique
<b>Toxines responsables</b>	Entérotoxine(s) (Nhe, Hbl, CytK)	Cérealide
<b>Lieu de sécrétion</b>	L'intestin grêle des mammifères	Préformée sur l'aliment
<b>Dose d'infection</b>	<10 <sup>5</sup> spores/cellules végétatives	8-10µg/kg de masse corporelle
<b>Temps d'incubation</b>	8-16 heures post ingestion	0.5-6 heures post ingestion
<b>Symptômes</b>	Crampes abdominales, diarrhée et parfois des vomissements	Nausées et vomissement



**Figure 5: Description des 2 principaux syndromes présents lors d'intoxication alimentaire liée au groupe *B. cereus***

### 1.2.1. Le syndrome diarrhéique

C'est la forme la plus diagnostiquée suite aux intoxications alimentaires provoquées par le groupe *B. cereus*. Ce syndrome est causé par l'ingestion de *B. cereus* sous la forme de spores ou de cellules végétatives (Stenfors Arnesen et al., 2008). Au cours de son cycle de vie, l'espèce *B. cereus* possède deux morphologies distinctes : les spores et les cellules végétatives, qui peuvent toutes 2 être ingérées avec l'alimentation. Les spores ne sont pas pathogènes et la cytotoxicité provient de facteurs de virulence exprimés par les cellules végétatives (Swick et al., 2016; Tam et al., 2006).

Le syndrome diarrhéique se caractérise par l'apparition de douleurs abdominales accompagnées de diarrhées et il peut être parfois associé à des vomissements. Ces symptômes apparaissent en moyenne entre 8 à 16 heures après l'ingestion d'une dose supérieure ou égale à  $10^5$  CFU/gramme d'aliment (Stenfors Arnesen et al. 2008) . J'attire votre attention sur le fait que cette dose est égale au seuil d'alerte fixé en France par la DGAL<sup>1</sup> (Direction générale de l'alimentation) pour le groupe *B. cereus*. Les symptômes diarrhéiques sont dus à des entérotoxines produites au sein du tube digestif. Les gènes codant pour ces entérotoxines se trouvent au niveau chromosomique et sont présents dans quasiment toutes les espèces du groupe

<sup>1</sup> DGAL : Direction générale de l'alimentation

*B. cereus* (Guinebretière et al. 2008, 2010). Actuellement, trois entérotoxines majeures peuvent être produites par *Bc ss* (Samapundo et al. 2011; Stenfors Arnesen et al. 2008) (**Tableau 1**) :

- **L'hémolysine BL (Hbl)** correspondant à un complexe de trois sous unités protéiques (L1, L2 et B). Elle est produite pendant la phase exponentielle de croissance bactérienne (Dromigny, 2008). La combinaison de ces trois sous unités est nécessaire pour assurer une activité maximale de la toxine Hbl. En effet, ces trois composantes entrent en contact avec les cellules épithéliales de l'hôte entraînant ainsi la formation de pores transmembranaires qui conduit à la lyse cellulaire (Ceuppens et al., 2011).
- **L'entérotoxine non hémolytique (Nhe)** est aussi composée d'un complexe de trois sous unités protéiques NheA, NheB et NheC (Granum 1999; Moravek et al. 2004). Tout comme Hbl la présence des trois sous unités permet une activité maximale de la toxine Nhe. Ce complexe protéique entraîne aussi une lyse cellulaire suite à la perturbation de l'intégrité des membranes épithéliales par la formation de pores transmembranaires (Fagerlund et al., 2008; Haug et al., 2010; Lindbäck et al., 2004).
- **La cytotoxine K (CytK)** est une toxine protéique. L'activité entérotoxique de CytK se traduit par la création de pores transmembranaires au niveau des cellules épithéliales de l'intestin (Senesi and Ghelardi, 2010). Elle existe sous deux formes, CytK-1 et CytK-2 qui présentent 89 % de similarité en séquence en acides aminés. Le gène *cytK-1* n'est présent que chez *B. cytotoxicus* (**se référer à la section II/1**), tandis que le gène *cytK-2* est présent chez la majorité des autres souches du groupe *B. cereus* (Brillard and Lereclus, 2004). CytK1 est plus cytotoxique que CytK2 sur des cellules épithéliales de type Caco-2 et Vero (Fagerlund et al., 2004)

L'étude de Guinebretière et ses collaborateurs (2010) a montré que le gène codant Nhe est présent dans quasiment toutes les souches du groupe *B. cereus* testés (Guinebretière et al., 2010). Le syndrome diarrhéique implique l'intervention d'une ou de plusieurs entérotoxines qui agissent en synergie. Cependant, ces entérotoxines ne résistent pas aux traitements thermiques ni au pH acide lors du passage dans l'estomac (Dromigny, 2008). Ceci signifie que le syndrome diarrhéique nécessite que les spores et/ou cellules végétatives survivent au passage dans l'estomac pour pouvoir produire par la suite ces toxines, dans l'intestin. De fait, la période d'incubation prolongée pour manifester des symptômes diarrhéiques est causée par le temps du transit dans le tractus gastro-intestinal, ainsi que par le temps requis pour la germination afin

d'atteindre un nombre de cellules bactériennes nécessaires capable de produire des entérotoxines.

### 1.2.2. Le syndrome émétique

Le syndrome émétique résulte d'une intoxication alimentaire et apparaît généralement entre 0.5 et 5 heures après l'ingestion d'un aliment contaminé. La rapidité de l'apparition de ces symptômes est due à l'ingestion d'une toxine pré-formée dans l'aliment (Stenfors Arnesen et al., 2008). Le syndrome émétique se caractérise par l'apparition de crampes abdominales suivies des vomissements importants, et peut conduire parfois à des déficiences hépatiques graves, voire même à des décès (Agata et al., 1994; Dierick et al., 2005; Ehling-Schulz et al., 2004; Hoton et al., 2005; Mahler et al., 1997; Naranjo et al., 2011; Teplova et al., 2006). Hormis ces cas graves, le rétablissement est généralement spontané après 6 à 24 heures.

Seule l'espèce *Bc ss* est décrite capable de causer le syndrome émétique qui repose sur l'ingestion d'une toxine appelée céréulide. Le céréulide est un dodecadepsipeptide cyclique de 1.2 kDa, formé par trois répétitions de deux acides aminés et de deux hydroxyle acides (D-O-Leu, D-Ala, L-O-Val and L-Val)<sub>3</sub> (Agata et al., 1994). Cette toxine est thermiquement stable, capable de résister à de forts traitements thermiques (121°C pendant 90 min), à une large gamme de pH (2-11) et même aux enzymes digestives telles que la pepsine ou la trypsine (Pirhonen et al., 2005; Agata et al., 1994). La production de cette toxine émétique est à lieu en fin de la phase exponentielle et atteint son maximum pendant la phase stationnaire de la croissance bactérienne (Thorsen and Holt, 2009). Il est reporté que cette toxine sous sa forme active se lie au récepteur 5-HT<sub>3</sub> au niveau des terminaisons vagues du tube digestif et provoque une stimulation du nerf vague, conduisant ainsi à des vomissements chez son hôte (Figure 5).

Les syndromes diarrhéique et émétique sont généralement de durée limitée, ne nécessitant pas d'intervention médicale. Cependant, si la maladie survient chez un sujet immunodéprimé, elle peut conduire à des complications sévères et même au décès. En effet, ces dernières années, plusieurs cas sévères et quelques cas mortels d'intoxication alimentaire liées à l'espèce *Bc ss* ont été rapportés, soulignant que sa virulence ne doit pas être sous-estimée (Mahler et al., 1997; Dierick et al., 2005; Naranjo et al., 2011).

Comme mentionné précédemment, l'incidence réelle du groupe *B. cereus* en tant qu'opportuniste alimentaire est sous-évaluée pour plusieurs raisons. D'une part, les intoxications alimentaires à *B. cereus* ne font l'objet d'une déclaration obligatoire qu'au niveau

des collectivités françaises et pas dans le reste du monde, donc, probablement sous-estimées dans les déclarations officielles. D'autre part, la courte durée des symptômes et leur manifestations bénignes ne poussent pas le patient à consulter un spécialiste.

### **1.3. Les infections nosocomiales liées au groupe *B. cereus***

En plus de son rôle bien connu dans les intoxications gastro-intestinales d'origine alimentaire, le groupe *B. cereus* peut également provoquer une large panoplie de maladies extra-digestives. C'est principalement le cas chez des personnes immunodéprimées. Contrairement aux maladies gastro-intestinales liées à *B. cereus*, le facteur clé de la virulence des maladies nosocomiales est largement inconnu, bien que plusieurs facteurs de virulence potentiels de *B. cereus* aient été décrits (Schoeni and Lee Wong, 2005).

En utilisant un modèle murin, Oda et ses collaborateurs ont montré qu'une des phospholipases de *B. cereus*, la sphingomyélinase, était produite en grande quantité par des isolats cliniques. Cette phospholipase est identifiée comme un facteur déterminant dans la survenue de décès par septicémie. Les auteurs ont aussi identifié *in vivo* que cette phospholipase induisait une diminution du stress oxydatif et d'une baisse de la phagocytose (Oda et al., 2012). Des études *in vitro* suggèrent aussi un rôle essentiel de la protéine inhibitrice immunitaire A (InhA) dans l'échappement à la réponse immunitaire des macrophages (Guillemet et al., 2010).

*B. cereus* est identifié comme responsable d'infections systémiques et locales chez des patients immunodéprimés. Le spectre des infections comprend la bactériémie, l'atteinte du système nerveux central (SNC) (méningite et abcès cérébraux), l'endophtalmie, la pneumonie et les infections cutanées (Bottone, 2010; Gaur et al., 2001). Les facteurs de risque les plus importants dans le déclenchement d'une infection nosocomiale liée à *B. cereus* chez des patients immunodéprimés sont : la transmission par voie intraveineuse, l'utilisation des cathéters contaminés et les plaies traumatiques ou chirurgicales. *B. cereus* a été aussi incriminé dans des infections systémiques chez des bébés prématurés qui en raison de leur état prématuré ont un système immunitaire pas encore mature (Lotte et al., 2017).

De nombreux cas d'infections à *B. cereus* ont été rapportés dans la littérature chez des bébés prématurés (Cormontagne et al., 2021), pouvant associer différents signes, tels qu'une détresse respiratoire et/ou cardiologique, une hypotension, une distension abdominale et parfois un choc septique ou une méningite. Lorsque le sepsis survient chez ces bébés prématurés, il peut

conduire au décès. Dans 40 % des cas décrits, l'infection par *B. cereus* aboutissait au décès du nouveau-né (Cormontagne et al., 2021).

## **2. L'espèce *Bt* : un potentiel de virulence**

### **2.1. Historique et incidence de *Bt* en tant que biopesticide**

*Bt* a été isolé pour la première fois en 1901 au Japon à partir de cadavres de vers à soie infectés (*Bombyx mori*). Quelques années plus tard, en 1911, un scientifique allemand, Ernst Berliner, a isolé une souche apparentée d'un cadavre de larve de pyrale de farine (*Ephestia kuehniella*), isolée dans un moulin à Thuringe. Il a ainsi nommé l'organisme *Bacillus thuringiensis*. Berliner a ensuite étudié la bactérie et observé la présence de corps d'inclusion à côté de la spore. Plus tard, l'activité insecticide a été attribuée à ces corps hautement réfringents, renommés « cristaux parasporaux ».

Sur la base de ses propriétés entomopathogènes, *Bt* a été rapidement commercialisé et utilisé comme biopesticide, son spectre d'activité était initialement considéré comme limité à quelques espèces de lépidoptères. Cependant, en 1977, la découverte des effets létaux de souches de *Bt*, de la sous espèce *israelensis*, contre les larves de moustiques, a encouragé la recherche d'autres *Bt* avec un potentiel d'action plus large.

Aujourd'hui, au niveau mondial, les biopesticides à base de *Bt* représentent plus de 50 % du marché mondial des bio-insecticides microbiens et leur utilisation ne cesse de croître en particulier en raison d'une volonté à réduire l'utilisation des pesticides chimiques (Lacey et al., 2015).

### **2.2. La pathogénicité insecticide de *Bt***

#### **2.2.1. Les principales toxines entomopathogènes de *Bt***

Comme mentionné auparavant, l'espèce *Bt* est caractérisée par la production d'un cristal protéique concomitante à la formation de l'endospore au cours du processus de la sporulation. Ce cristal protéique est composé de deux types de toxines insecticides de nature protéiques : Ce cristal peut être composé par des toxines Cry (pour Crystal), connues aussi sous le nom de  $\delta$ -endotoxines, ou par des toxines Cyt (pour Cytolytique). Ces toxines entomopathogènes sont portées par des plasmides et peuvent représenter jusqu'à 20 à 30% du poids sec de la spore

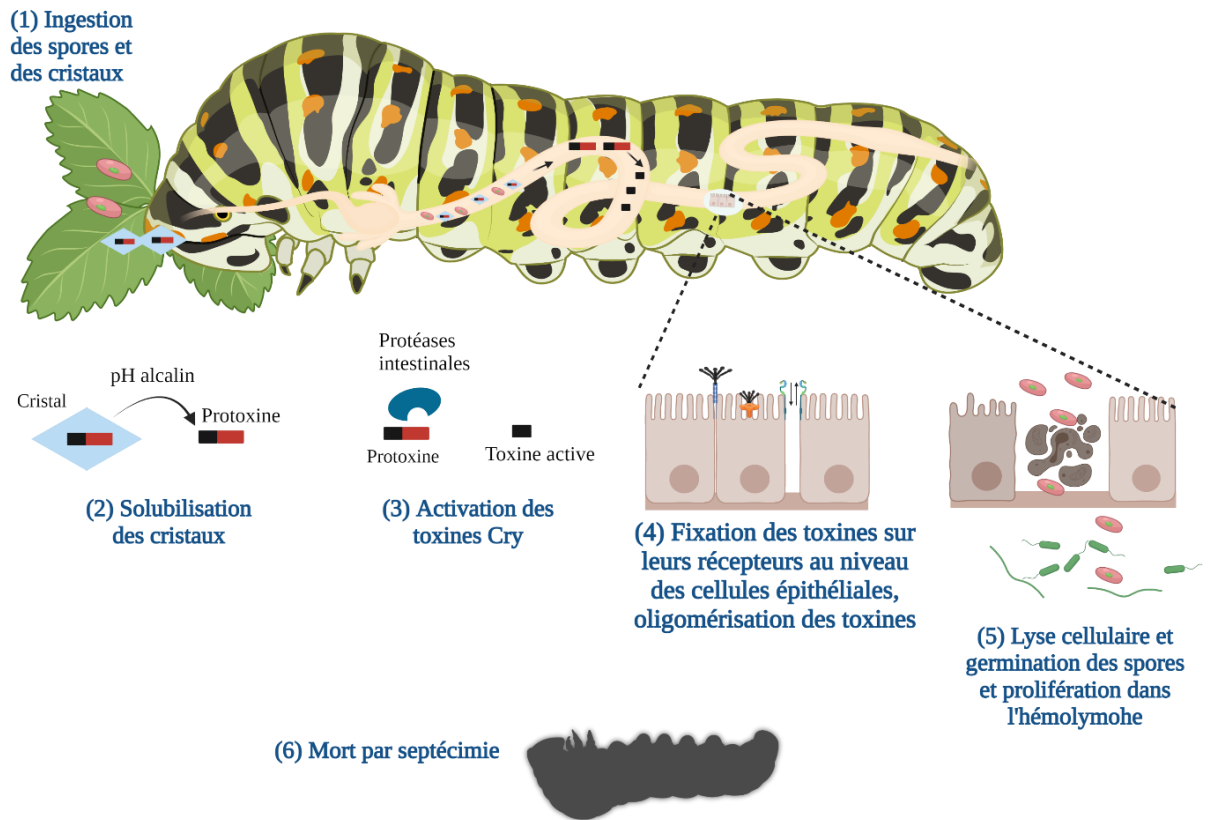
(Fiuza et al., 2017 ; Ehling-Schulz et al., 2019). Ces toxines insecticides sont actives contre les larves de plusieurs ordres d'insectes (lépidoptères, coléoptères et diptères) ainsi que, dans certains cas, contre des espèces d'autres phylums d'invertébrés (acariens, nématodes) ou encore contre des cellules cancéreuses humaines (Palma et al., 2014). Le large spectre d'action de l'espèce *Bt* repose essentiellement sur les toxines Cry. En effet, Les protéines Cyt sont principalement actives contre les larves de diptères et en particulier contre les moustiques. En se basant sur le spectre d'action des toxines Cry, on décrit à ce jour 80 sous-espèces de *Bt* identifiées (<http://www.bgsc.org/>). Ces sous-espèces sont capables de produire plus de 300 holotypes de toxines Cry parmi lesquelles 128 ont été identifiées comme présentant une activité insecticide (Adang et al., 2014; Frankenhuyzen, 2009). Seulement 4 sous-espèces sont commercialisées en tant que bioinsecticides : *Bt subsp. kurstaki* (*Btk*), *Bt subsp. aizawai* (*Bta*), *Bt subsp. israelensis* (*Bti*) et *Bt subsp. morrisoni* (*Btm*, également appelé *tenebrionis*) (<http://sitem.herts.ac.uk/aeru/bpdb/index.htm>). Chaque sous-espèce de *Bt* est capable de produire un ensemble protéique formé d'une à cinq toxines Cry différentes. Ce cocktail protéique confère une spécificité d'action envers différents ordres d'invertébrés ciblés (Palma et al., 2014). Les sous-espèce *Btk* et *Bta* sont les bioinsecticides les plus utilisés en agriculture et en sylviculture en raison de la spécificité d'action de leurs toxines Cry, qui ciblent l'un des ravageurs des cultures les plus problématiques : les larves de lépidoptères (Adang et al., 2014). L'utilisation de *Btm* est limitée à la protection des cultures de pommes de terre et *Bti* est utilisé contre les larves de moustiques en lutte anti-vectorielle. En plus de ces formulations commerciales de spores de *Bt*, dans certains pays où l'utilisation de plantes génétiquement modifiées (OGM) est acceptée, l'insertion des gènes de toxines Cry a permis de développer des plantes dotées d'une activité insecticide ciblée, du fait de la spécificité d'action des toxines utilisées.

### **2.2.2. Le mode d'action des toxines entomopathogènes Cry**

Le succès commercial de *Bt*, réside dans le fait que les toxines Cry agissent différemment des pesticides chimiques. En effet, le mode d'action des protéines Cry a été largement étudié (Vachon et al., 2012; Bravo et al., 2007). Pour simplifier, il faut savoir que la toxicité des protéines Cry peut s'expliquer par la formation soit de pores transmembranaires, soit de canaux ioniques qui vont engendrer une lyse cellulaire. La pathogénèse de *Bt* débute après ingestion par la larve de l'insecte, le pH alcalin de l'intestin moyen des insectes entraîne la solubilisation

du cristal protéique et conduit ainsi à la libération de protoxines inactives (d'environ 130 kDa). Celles-ci sont ensuite clivées par les protéases intestinales de l'insecte pour donner les formes activées (d'environ 65-67 kDa). Les toxines Cry activées peuvent alors traverser la membrane péritrophique (présente chez certains insectes, jouant un rôle équivalent au mucus des vertébrés ; **(se référer au section V/2)**). Ces toxines vont ensuite se fixer sur des récepteurs de l'hôte de types cadhérines, transporteurs ABC, aminopeptidases ou alcaline phosphatases, présents à la surface de l'épithélium intestinal (Bretschneider et al., 2016). Suite à cette fixation, les toxines s'oligomérisent et s'insèrent rapidement et de manière irréversible dans la membrane cellulaire, ce qui entraîne la formation de pores puis la lyse cellulaire (English and Slatin, 1992). En parallèle, les insectes ingèrent également les spores de *Bt*. Suite à la lyse des cellules épithéliales, ces endospores vont se trouver libres dans l'hémolymphe, milieu propice à leur germination et à leur prolifération. Il en résulte donc une septicémie conduisant à la mort de l'insecte au bout de 2 jours post-ingestion des produits *Bt* (Raymond et al., 2010; Soberón et al., 2009) **(Figure 6)**.





**Figure 6:** Mode d'action de l'espèce *Bt* sur les larves de lépidoptères

### 2.2.3. Les effets non intentionnels de *Bt*

Les principaux facteurs de virulence (Hbl, Nhe et CytK) cités auparavant comme impliqués dans la pathogénicité intestinale de *Bc ss* peuvent être aussi produits par l'espèce *Bt* (Johler et al., 2018; Ehling-Schulz et al., 2019). Je vous rappelle que la principale distinction entre ces deux espèces repose principalement sur l'expression de marqueurs plasmidiques spécifiques qui peuvent être perdus lors des épisodes de conjugaison microbienne (exemple les toxines Cry de *Bt*) (Kolstø et al., 2009). Malheureusement, les espèces *Bc ss* et *Bt* ne peuvent pas être différenciées lors des diagnostics cliniques ou de microbiologie alimentaire sous leur forme végétative. Ainsi, la contribution réelle de *Bt* dans les maladies gastro-intestinales et nosocomiales demeure actuellement très mal documentée.

En accord avec ce manque d'informations, l'Autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA) (efsa.2016.4524) et de l'Agence nationale de la sécurité alimentaire et de l'environnement (Anses) (Saisine n° 2013-SA-0039) ont mis en garde concernant les risques potentiels liés à la santé publique face à l'utilisation accrue de *Bt* en tant que bioinsecticide. Ces deux interventions se sont appuyées sur deux cas : Le premier a reporté le cas de trois membres d'une même famille de cinq personnes tombés malades (le 28 juillet 2012), et montrant des symptômes de nausées et diarrhées. En effet, ces trois personnes ont mangé tous de la même salade. Suite à des séries de prélèvements et d'expertises, l'agent causal prélevé de la salade a été identifié appartenant au groupe *B. cereus* et plus précisément identifié comme du *Bta*. La charge bactérienne prélevée de la salade été de l'ordre de  $2,59 \cdot 10^4$  à  $1,49 \cdot 10^5$  CFU/g ce qui ne dépasse pas les seuils d'alerte cités précédemment. Le deuxième cas faisait suite à l'alerte lancée par la direction générale de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des fraudes (DGCCRF<sup>2</sup>) après la détection d'une dose supérieure à  $10^5$  CFU/g de *B. cereus* sur des lots de persil frisé.

De plus, en 2008, McIntyre et ses collaborateurs ont ré-analysé 39 cas d'intoxications alimentaires dues à *B. cereus* et ont trouvé 4 cas (10%) imputables à *Bt* (e.g. détecté seul) et 11 cas (28%) associés à la présence conjointe de *Bt* et d'un autre *B. cereus*. Plus récemment en France, une analyse rétrospective de 250 épisodes de TIAC associés au groupe *B. cereus*, survenus entre 2007 et 2017, a révélé la présence de *Bt* dans 20 % des cas. De plus, dans 8 % des cas *Bt* était l'unique germe identifié (Bonis et al., 2021). Une identification génomique des

---

<sup>2</sup> DGCCRF : direction générale de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des fraudes

isolats de *Bt* a montré une proximité des isolats issus de TIAC avec ceux des souches commerciales et plus spécialement avec les souches des sous-espèces *aizawai* et *kurstaki* favorisant la piste d'une origine agricole pour la contamination à *Bt*. En effet, les auteurs ont associé la présence de crudités dans plus de 50 % des plats incriminés dans les épisodes de TIAC (Bonis et al., 2021)

Même si les études qui corrélient l'implication de *Bt* dans des intoxications alimentaires sont rares, il faut garder à l'esprit que comme *Bc ss*, *Bt* peut exprimer les mêmes facteurs de virulence. Il est donc important de réaliser qu'un événement d'intoxication alimentaire attribué à *Bc ss* pourrait être causé par *Bt*. De fait, la réalisation d'un test microscopique d'identification de la présence de cristaux parasporaux contenant des toxines pendant la sporulation est important et doit impérativement être effectué dans des suspicions de TIAC à *Bc ss*.

Pour causer une intoxication alimentaire, deux facteurs sont importants : l'agent pathogène, en l'occurrence *Bacillus cereus* (spores ou cellules végétatives) et l'état de l'hôte. En effet, les systèmes de défense de l'hôte sont un point clé pour modifier l'aptitude de l'infection et causer ou non des formes graves.

La découverte de plusieurs modèles d'études génétiquement maniables : *Arabidopsis thaliana* (Dodds and Rathjen, 2010), *Drosophila melanogaster* (Lemaitre et al., 1996), *Caenorhabditis elegans* (Millet and Ewbank, 2004), *Brachydanio rerio* (Trede et al., 2004) et *Mus musculus* (Cucchi et al., 2002) ont permis de décortiquer plusieurs infections causées chez l'Homme. Ces travaux ont notamment permis de décrire des mécanismes immunitaires conservés du règne des plantes à celui des vertébrés. Ces mécanismes associant la reconnaissance des pathogènes aux voies de signalisation contrôlant l'expression de la réponse à l'infection (Rahme et al., 2014).

# **Chapitre IV : L'intestin : un organe conservé au cours de l'évolution**

## **1. Description générale**

L'intestin représente un organe majeur et complexe doté de différentes fonctions :

- Une **fonction digestive permettant** l'absorption et la redistribution des aliments ingérés sous formes d'énergie afin assurant ainsi le développement, la reproduction et la survie de l'organisme (Wood et al., 1998)
- Une **fonction endocrine** : l'intestin est capable de produire un ensemble d'hormones qui vont participer à la régulation du transit intestinal, au contrôle de la prise alimentaire et au stockage des nutriments. Ceci permettra une régulation de l'activité d'autres organes, tels que le pancréas et le cerveau (Kabouridis and Pachnis, 2015; Abot et al., 2018).
- Une fonction **immunitaire** : En effet, les aliments que nous ingérons depuis notre plus jeune âge ne sont pas stériles pour la plupart. La fonction immunitaire du tractus gastro-intestinal permet de protéger l'organisme face aux pathogènes ingérés. Il est défini comme le principal porteur de cellules immunitaires au niveau de son épithélium (Peterson and Artis, 2014).

Il est donc évident que chez tous les métazoaires, le tractus intestinal est un organe essentiel pour l'intégration des informations nutritionnelles, les signaux hormonaux et les réponses immunitaires. Mais le plus petit dérèglement de ses fonctions peut avoir un impact sur la physiologie et la survie de l'organisme, pouvant conduire à des maladies complexes voire dévastatrices, telles que les maladies inflammatoires de l'intestin, les cancers intestinaux ou l'obésité. Il faut donc arriver à développer des approches simples afin de mieux comprendre toutes les fonctionnalités intestinales qui interviennent dans ses dérèglements. D'un autre côté, il faut garder en tête que ces approches ne peuvent pas être facilement mises en œuvre chez l'Homme. Ainsi, l'utilisation de modèles de laboratoires, pertinents et dotés d'une conservation de la physiologie et/ou de certaines voies de signalisation, facilitera la compréhension des interactions hôte-microbes. En effet, appréhender l'appareil intestinal chez des modèles vertébrés et/ou invertébrés permet de mener des études fonctionnelles et mécanistiques complexes, afin de déterminer la causalité des altérations associées aux diverses pathologies intestinales.

Certes, depuis des décennies, les interactions hôtes-pathogènes intestinaux font l'objet d'études utilisant des modèles qui possèdent de fortes ressemblances avec l'Homme, notamment les cultures de cellules mammifères ou les organoïdes (*in vitro*) et/ou l'utilisation de modèles murins (*in vivo*). En effet, acquérir une meilleure compréhension de la maladie et de son état évolutif permettra de développer des méthodes diagnostiques et des traitements plus efficaces. Pour ce faire, il est nécessaire de mener des recherches sur des animaux vivants. Bien que les études animales (dont plus de 95 % sont menées sur des souris) soient essentielles pour acquérir la compréhension nécessaire de processus pathologiques complexes, elles ne devraient être effectuées qu'après avoir épuisé les informations pouvant dériver d'autres outils tels que les lignées cellulaires. Ceci est dû aux faits que l'utilisation de ces modèles animaux doit obéir à des lois éthiques prenant en compte la sécurité animale et la reproductibilité des résultats. Il est en effet du devoir moral du chercheur d'honorer les animaux et de prendre en considération leurs capacités de détresse lorsqu'ils sont manipulés.

Dans ce contexte, l'apparition de modèles invertébrés puissants ayant des mécanismes physiologiques, cellulaires et immunitaires conservés, tel que la drosophile, a permis d'appréhender des mécanismes complexes tout en respectant l'enjeu sociétal du respect de l'éthique en expérimentation animale dans la recherche.

## **2. Le choix du modèle *Drosophila melanogaster***

La mouche du vinaigre, aussi appelée *Drosophila melanogaster*, est un insecte appartenant à l'ordre des diptères. C'est le modèle le plus étudié à travers le monde, ayant fait l'objet de près de 100 000 travaux de recherche (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>). Elle a été décrite pour la première fois par Johann Wihelm Meigen en 1830 mais c'est avec les travaux de Thomas Hunt Morgan au début du XX<sup>ème</sup> siècle (récompensés par le prix Nobel de Médecine et Physiologie en 1933) que la drosophile prend toute son ampleur comme un modèle d'étude génétique. En effet, deux siècles de recherche nous ont permis d'accumuler une multitude d'informations surtout dans les domaines de la génétique et de la biologie du développement.

À l'état sauvage, on rencontre cet insecte hygrophile dans les lieux humides, en particulier sur des fruits mûrs ou sur d'autres matières en fermentation puisque les œufs, les larves et les pupes des drosophiles ne se développent que dans ces milieux. La drosophile présente un dimorphisme sexuel avec des mâles qui sont un peu plus petits que les femelles. C'est un insecte prolifique

puisque'une femelle peut pondre entre 200 à 300 œufs. En tant qu'holométabole, le cycle de vie de *D. melanogaster* (environ 2 semaines à 25°C et un mois à 18°C) comprend l'embryogenèse, trois stades larvaires, un stade de pupaison qui se termine par l'émergence d'une mouche capable de voler et de se reproduire.

Dotée d'innombrables qualités, la drosophile s'est imposée au fil des dernières années comme un excellent modèle de laboratoire. Facile à élever, robuste, tolérante, et peu encombrante. De plus, la drosophile est un organisme pour lequel il existe de nombreux outils génétiques, cellulaires et moléculaires permettant l'étude de sa physiologie.

Depuis plusieurs années, le modèle drosophile ne cesse de gagner en popularité dans la compréhension de plusieurs maladies de types neurodégénératives, comportementales, génétiques et cancéreuses. D'autres études menées chez la drosophile ont contribué à de nouvelles découvertes en termes d'interactions hôte-pathogène, ainsi que dans le contrôle des maladies infectieuses. En effet, ces études ont permis d'identifier des caractéristiques évolutives conservées entre le modèle drosophile et les vertébrés, notamment au niveau des cascades immunitaires, des voies de signalisation et des régulateurs transcriptionnels. Pour exemple, les travaux de Bruno Lemaitre ont grandement contribué à l'identification d'identifier la présence d'un système immunitaire inné puissant, décrit comme conservé entre la drosophile et les mammifères ce qui a facilité l'intégration de la drosophile comme un vrai modèle dans les interactions hôtes pathogènes (Lemaitre et al., 1996, 1995).

### **3. Conservation physiologique et cellulaire de l'intestin**

L'anatomie intestinale chez les mammifères présente de fortes ressemblances avec le modèle drosophile. Il ne faut tout de même pas nier l'existence de quelques exceptions qui se sont manifestées au cours de l'évolution.

Chez les vertébrés et invertébrés, l'intestin se présente sous forme d'un long conduit régionalisé et bordé par une monocouche cellulaire issue de l'association de plusieurs types de cellules formant l'épithélium intestinal (Buchon et al., 2013b; Marianes and Spradling, 2013).

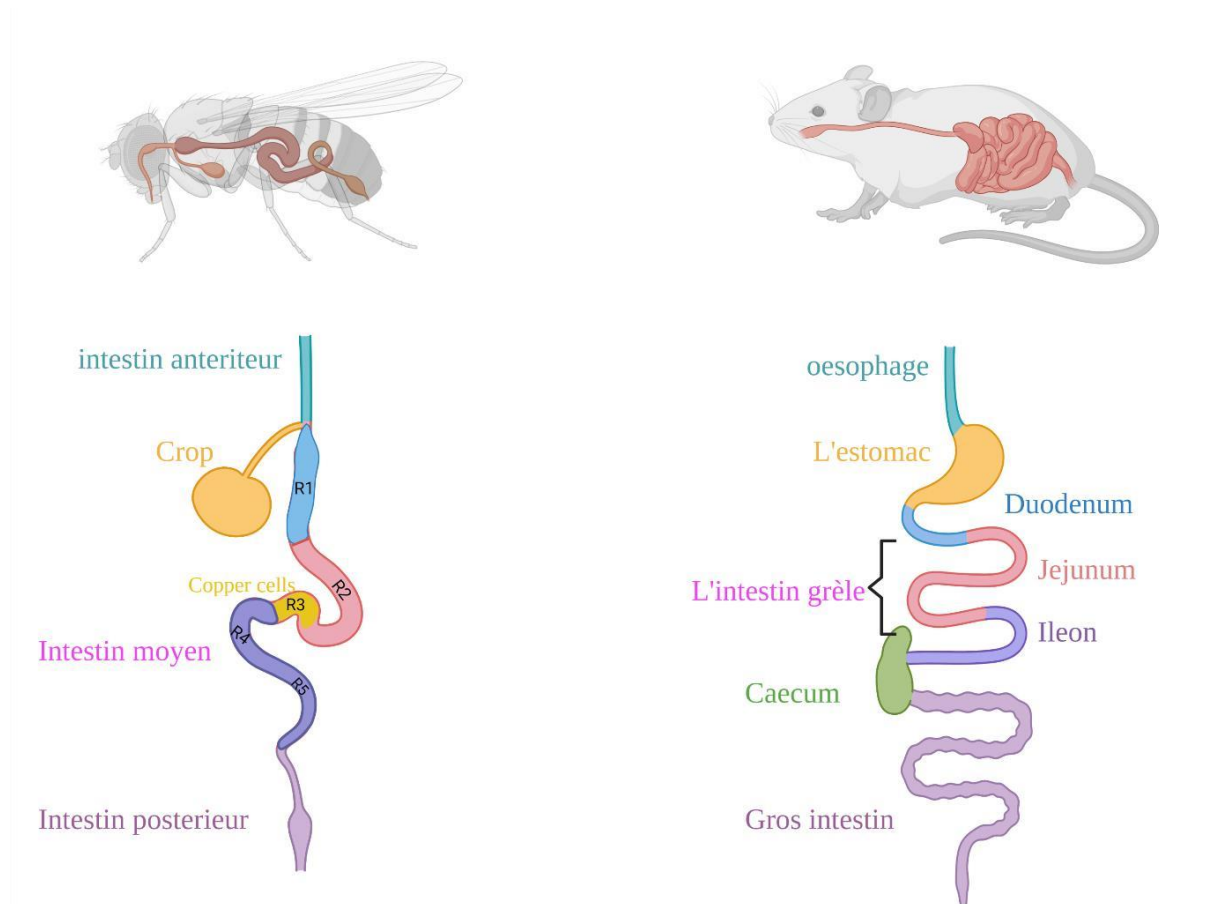
Chez les mammifères, le passage de la nourriture se fait au niveau de l'œsophage, puis arrive à l'estomac où le processus de digestion commence. Ensuite, les aliments atteignent l'intestin grêle lieu de digestion et d'absorption des nutriments. Les aliments indigestes finissent dans le gros intestin où se fait aussi le traitement de l'eau. De manière similaire, chez la drosophile, la

nourriture traverse en premier l'intestin antérieure (foregut en anglais) qui est l'équivalent fonctionnel de l'œsophage. Il formé chez la drosophile par le jabot (Crop) qui joue le rôle d'un organe de stockage. Le crop est localisé an amont du proventricule correspondant au point de départ de l'intestin moyen (midgut en anglais). L'intestin moyen est le siège de la digestion, l'absorption mais aussi des mécanismes de défenses. L'intestin de la drosophile se termine par l'intestin postérieur (hindgut en anglais), équivalent fonctionnel du colon et représente lieu d'échange de l'eau et des électrolytes. (Figure 7)

En plus, l'intestin antérieur et l'intestin postérieur chez la drosophile sont tous les deux d'origine ectodermique. Alors que l'intestin moyen chez la drosophile et l'intestin des mammifères dérivent tous de l'endoderme (Kedinger et al., 1987; Tepass and Hartenstein, 1994).

Si on s'intéresse du plus prêt aux lieux d'absorption des nutriments chez nos deux modèles, à savoir l'intestin moyen et l'intestin grêle. On trouve que chez les mammifères, l'intestin grêle est divisé en trois régions : la plus proximale est représentée par le duodénum suivit du jéjunum et enfin l'iléon représentant la partie la plus distale. De façon analogue, l'intestin moyen de la drosophile a été décrit pendant longtemps pour être composé par trois régions distinctes. Ceci revient aux travaux de Dubreuil et collaborateurs qui ont mis en évidence l'existence de cellules spécialisées dans le maintien de l'acidité appelée Copper cells (Dubreuil, 2004; Dubreuil et al., 2001). Cette étude a aussi permis de localiser cette région acide au milieu de l'intestin moyen et de le diviser ainsi en intestin moyen antérieur, région acide et intestin moyen postérieur. Ensuite, plusieurs études, utilisant diverses approches (morphométriques, histologiques et transcriptomique), ont décrit un autre type de régionalisation de l'intestin moyen. Ils l'ont subdivisé en 6 régions distinctes (R0 à R5). Cette régionalisation correspond mieux à la structure intestinale chez les mammifères. En effet, la R1 correspondrait à la partie distale du duodénum, quant au R2 elle est l'équivalent du jéjunum. Ces deux régions participent principalement à la digestion des aliments et jouent un rôle immunitaire important. Les régions R4 et R5 correspondraient à l'iléon connue pour sa capacité d'absorption. En plus ces deux régions postérieures et principalement la R4 sont très étudiées chez la drosophile pour leur puissante capacité de régénération. La R3 représente la région acide des « coppers cells ». Cette partie est absente chez les mammifères mais elle mime le rôle de l'estomac en permettant de contrôler l'abondance microbienne et la digestion des aliments (Figure 7). En 2013, un autre type de régionalisation utilisant des marqueurs transcriptionnels plus spécifiques a été proposée

par Marianes et ses collaborateurs ainsi que Buchon et collaborateurs. Ces deux études ont permis d'établir une régionalisation plus complexe de l'intestin moyen et l'ont divisé en 10 à 14 régions (Marianes and Spradling, 2013; Buchon et al., 2013b) (<http://flygutseq.buchonlab.com/>; <https://flygut.epfl.ch/>; <https://www.flymai.org/scRNA/gut/>).



**Figure 7 : Représentation schématique de l'anatomie intestinale chez la drosophile et la souris**

Une autre différence anatomique a été acquise au cours de l'évolution. Elle réside dans la surface occupée par l'épithélium intestinal. En effet, chez la drosophile, l'intestin moyen est formé par un épithélium plat alors que chez les mammifères, cette monocouche est décrite, au niveau de l'intestin grêle, composée par une série de dépressions formée par des villosités et des cryptes (Crosnier et al., 2006). Mais malgré cette différence structurale, on distingue une forte conservation cellulaire de l'épithélium intestinal (Barker et al., 2007 ; Micchelli and Perrimon, 2006 ; Ohlstein and Spradling, 2006 ; Sangiorgi and Capecchi, 2008 ; Takashima et al., 2008) (Figure 8).

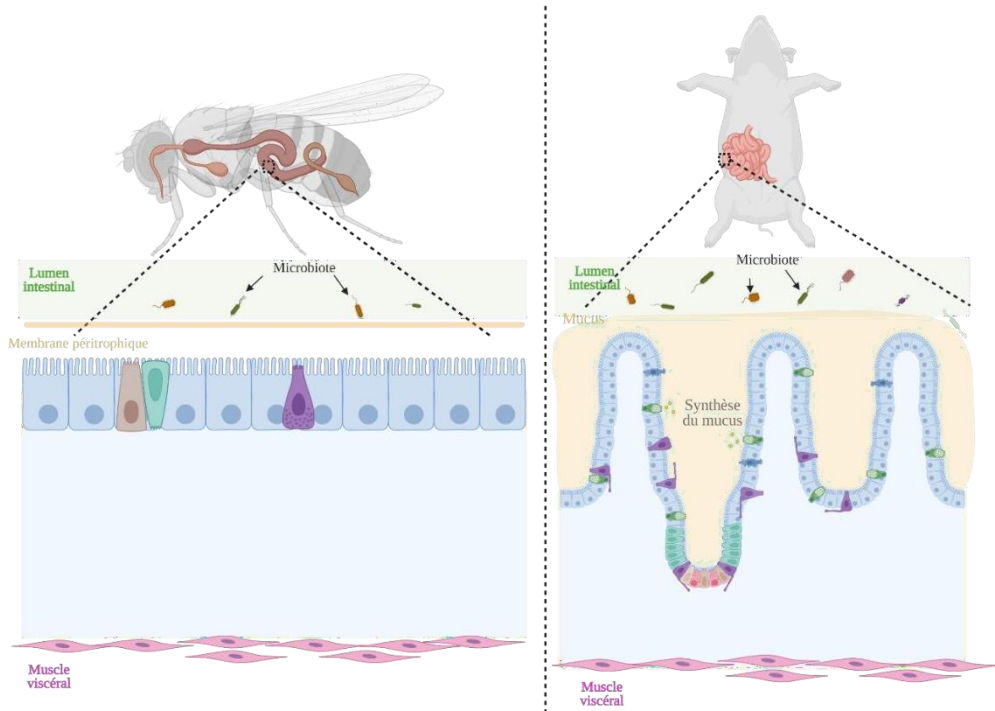
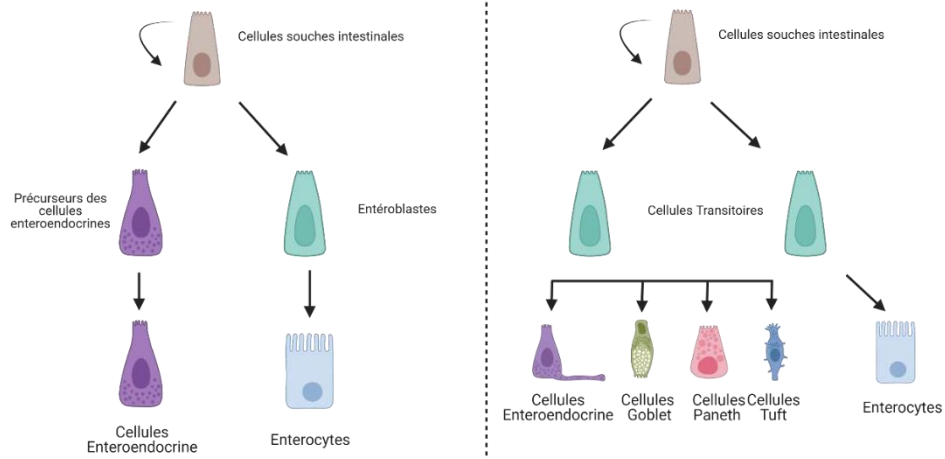


Si on se concentre sur le modèle murin, on trouve que leurs cryptes sont capables de régénérer l'équivalent de 300 cellules intestinales par jour (Casali and Batlle, 2009). Cet atout de renouvellement continu implique la présence de cellules souches intestinales (CSI) identifiées soit par l'expression du facteur de transcription (*Bmi1*) soit par la présence des récepteurs couplés aux protéines G (*Lgr5*). Ces CSI, localisées au niveau basal des cryptes, sont capables de se diviser en cellules progénitrices transitoires (TA : transient amplifying cells). Ces dernières possèdent la capacité de se déplacer progressivement au niveau des villosités tout en se multipliant intensément. Ces cellules TA se différencient soit en cellules absorbantes, ou entérocytes (EC), soit en cellules sécrétrices (Scoville et al., 2008 ; Barker et al., 2007 ; Crosnier et al., 2006). Chez les mammifères, les cellules sécrétrices regroupent les cellules entéroendocrines (EEC) (sécrétrices d'hormones), les cellules de Paneth (cellules immunitaires capables de produire des peptides antimicrobiens et facteurs de croissances), les cellules gobelets (produisent le mucus) et les cellules tufts impliquées dans les infections parasitaires (Jiang and Edgar, 2012; Zwick et al., 2019).

De façon similaire, chez la drosophile, on retrouve aussi CSI localisées au niveau basal de l'épithélium intestinal. Ces CSI sont reconnues par la co-expression du facteur de transcription Escargot (Esg) et du ligand de la voie de signalisation Notch nommé Delta (Dl). Ces CSI donnent naissance à des EC et à des EEC. Plusieurs études suggéraient qu'avant leur différenciation, les CSI se divisent de manière asymétrique en EB et en cellule souche auto-renouvelable (Bardin et al., 2010; Micchelli and Perrimon, 2006; Ohlstein and Spradling, 2006; Perdigoto et al., 2011). Cependant, des études récentes proposent un autre mécanisme en s'appuyant sur l'existence d'un progéniteur spécifique aux EE, appelés précurseurs EEP qui expriment un autre marqueur spécifique appelé Piezo (He et al., 2018; Kapuria et al., 2012; Zeng et al., 2015).

Enfin, chez la drosophile, et à la différence des mammifères, les cellules de Paneth, goblet et tuft sont absentes mais leurs fonctions restent assurées par les EC en termes de production de peptides antimicrobiens et par les EEC en ce qui concerne la sécrétion d'hormones.

Pour conclure, malgré la divergence évolutive, l'intestin de la drosophile représente un excellent modèle pour étudier de nombreux aspects de la physiologie et des maladies intestinales humaines (Apidianakis and Rahme, 2011; Jiang et al., 2017).

**A****B**

**Figure 8: Comparaison de la disposition intestinale des mammifères et de la drosophile (A) Composition cellulaire (B) lignage cellulaire chez les mammifères et la drosophile.**

## **Chapitre V : Réponse intestinale aux agressions des pathogènes entériques**

La survie est corrélée avec une bonne adaptation au monde des micro-organismes. En effet, toutes les surfaces des épithéliums digestifs participent au maintien d'une barrière efficace contre différents types d'agressions. Les voies digestives ont perfectionné des systèmes de défenses complexes afin de répondre aux diverses agressions. Ces réponses défensives ont pour rôle de préserver l'intégrité de l'hôte et de son microbiote, sans pour autant induire des processus inflammatoires délétères responsables de dommages collatéraux.

### **1. Le microbiote intestinal et son implication immunitaire**

Le microbiote intestinal est formé par des bactéries commensales assurant plusieurs fonctionnalités, telles que l'amélioration de la digestion, l'absorption des nutriments, le contrôle des pathogènes ou encore le maintien de l'homéostasie intestinale (Saulnier et al., 2009; Sekirov et al., 2010; Broderick et al., 2014). Afin de préserver l'intégrité de l'hôte, ces bactéries commensales doivent rester étroitement contrôlées (Eberl, 2018).

La colonisation intestinale débute immédiatement après la naissance et on dénombre chez l'Homme jusqu'à  $10^{13}$  à  $10^{14}$  micro-organismes hébergés dans le tube digestif. La composition et la distribution de ce microbiote varient selon l'âge, l'état de santé, et potentiellement selon le régime alimentaire (Lozupone et al., 2012). On distingue, chez les mammifères, jusqu'à 1000 espèces formant le microbiote intestinal réparties en quatre phylums : *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria* et *Bacteroidetes*.

Il faut noter que la répartition le long du tube digestif varie considérablement selon les différentes régions de l'intestin. Du fait de leur acidité, l'estomac et le duodénum ne contiennent que très peu d'espèces commensales. Aussi, il a été démontré que les troubles gastriques chez certains patients étaient corrélés avec une forte colonisation bactérienne de l'estomac ce qui engendre des complications inflammatoires (Naylor and Axon, 2003). Or, plus on s'éloigne de ces régions à pH acide, plus le nombre des microorganismes commensaux augmente. En effet, l'iléon héberge plusieurs espèces de bactéries aérobies ou anaérobies, dont des *Enterobacter* et *Lactobacillus*.

Si on compare la diversité bactérienne des mammifères à celle de la drosophile, on trouve qu'elle est très faible chez cette dernière. Selon la littérature, la flore commensale des drosophiles héberge moins d'une vingtaine d'espèces du genre *Acetobacter* et *Lactobacillus* (Staubach et al., 2013; Wong et al., 2011). Un point important est que le genre *Lactobacillus* a été aussi isolée du microbiote humain (Buchon et al., 2014).

Chez la drosophile, la surface très limitée occupée par le lumen intestinal et les variations physio-chimiques affectent la distribution et la composition des micro-organismes qui le peuplent (Sommer et al., 2016). À titre d'exemple, tamponner l'acidité de la région des « copper cells » (la petite zone acide située au milieu de l'intestin moyen) est corrélé avec une forte colonisation bactérienne des régions postérieurs R4 et R5 de l'intestin moyen entraînant ainsi une dysbiose. (Li et al., 2016; Storelli et al., 2018).

L'utilisation de modèles animaux axéniques a permis d'identifier le microbiote comme une composante majeure de la physiologie intestinale. Plusieurs études ont montré que sa présence contribuait à l'établissement d'une expression basale des voies immunitaires. En utilisant le modèle drosophile, Blum et ses collaborateurs ont montré que les mouches présentant un microbiote normal étaient moins sensibles que les mouches axéniques aux infections par des *Serratia marcescens* et *Pseudomonas aeruginosa* (Blum et al., 2013). De même, chez les souris, les voies immunitaires et la production des cytokines semblent dépendre du microbiote (Kennedy et al., 2018).

Les réponses immunitaires de l'hôte sont des régulateurs importants du microbiote. Le répertoire immunitaire conservé comprend des réponses physiques mais aussi des réponses humorales, caractérisées par la libération de peptides antimicrobiens (PAMs) et des espèces réactives d'oxygène (ROS). Ces voies immunitaires sont induites en réponse à des micro-organismes commensaux ou pathogènes.

## **2. Les barrières physiques**

Les barrières physiques sont considérées comme des mécanismes clés pour minimiser le contact entre les bactéries et l'épithélium intestinal. Ceci est accompli en partie en renforçant les barrières physiques par la production et l'assemblage d'une épaisse couche à la surface épithéliale. Chez les insectes dont la drosophile, cette barrière est formée par la membrane

péritrophique alors que c'est le mucus qui joue ce rôle chez les mammifères. Ces barrières physiques sont primordiales dans la protection des CSI, siège du maintien de l'homéostasie intestinale (Figure 8).

Chez les mammifères le mucus se présente sous forme d'un gel viscoélastique tapissant la lumière intestinale. Ce mucus est produit par les cellules Goblets qui sont dispersées entre les entérocytes à travers l'épithélium intestinal (Johansson et al., 2013). Cette structure est composée de 95% d'eau, environ 5% de mucines et moins de 1% de molécules diverses (IgA, protéines cellulaires, cellules épithéliales exfoliées, etc.).

Les mucines sont des glycoprotéines de haut poids moléculaire. Elles se répartissent en deux types : sécrétées et transmembranaires. Les mucines sécrétées, dont le principal gène est *MUC2*, assurent les propriétés rhéologiques du mucus (élasticité, viscosité et adhérence...). Les travaux de Babu et ses collaborateurs ont montré que des changements dans la composition des mucines sécrétées pouvaient conduire à l'apparition de certaines maladies comme la colite ulcéreuse et la gastrite causées par le germe *Helicobacter pylori* (Babu et al., 2006). Le mucus peut aussi être considéré comme la première ligne de défense physique intestinale contre les agents pathogènes microbiens (Hasnain et al., 2013; Shekels et al., 2001). En effet, les mucines viennent se fixer à certains motifs bactériens afin d'empêcher les microbes d'atteindre l'épithélium intestinale. De plus, les mucines transmembranaires sont impliquées dans des processus inflammatoires et cancéreux. En effet, la surexpression de certaines mucines est corrélée avec une formation de tumeurs cancéreuses, alors qu'un déficit en mucines transmembranaires est lié à des dysfonctionnements intestinaux qui se manifestent par une augmentation de la perméabilité intestinale, une colite, de l'inflammation et/ou une dysbiose (van Putten and Strijbis, 2017). Le mucus participe donc à la réponse immunitaire innée en créant un environnement sélectif pour la communauté du microbiote et définit ainsi les propriétés physiques de la couche du mucus.

Chez les invertébrés, la membrane péritrophique est une barrière physique acellulaire, semi-perméable qui délimite deux espaces, l'espace endo-péritrophique ou lumière intestinale et l'espace ecto-péritrophique situé entre la membrane et l'épithélium. Cette matrice est composée de chitine, de protéoglycanes et de glycoprotéines (Glasheen et al., 2010). La membrane péritrophique est continuellement synthétisée par les cellules de l'intestin antérieur

(proventricule) et forme une structure continue le long de l'intestin. Elle joue un rôle similaire au mucus en empêchant les microorganismes situés dans la lumière intestinale d'interagir directement avec les cellules épithéliales, et constitue également une barrière biochimique qui séquestre et parfois inactive les toxines ingérées (Storelli et al., 2018)

Jusqu'à présent ont décrit au moins 30 gènes exprimés par les entérocytes de la région R1 de l'intestin moyen et identifiés comme analogues aux mucines chez la drosophile mais dont le rôle reste à déterminer. Il faut savoir que le rôle de la membrane péritrophique dans les mécanismes de défense intestinale a été récemment identifié par les travaux de Buchon et collaborateurs. A l'issue d'infections orales par une bactérie exogène *Erwinia carotovora carotovora 15(Ecc15)*, une analyse transcriptomique globale a été réalisée. Les auteurs ont réussi à identifier une surexpression des gènes codant pour des protéines à domaine chitine ou péritrophine. (Buchon et al., 2009b). De plus, Kuraishi *et al.* ont décrit le rôle d'une protéine nommée Drosocrystalline dans la formation de la membrane péritrophique et ont montré que son inactivation induisait une réduction de la taille de la membrane péritrophique, associé à une perte d'étanchéité intestinale (Kuraishi et al., 2011). Enfin, il semble qu'en plus de fonctionner comme une barrière physique, la membrane péritrophique ou le mucus, limitent la pénétration bactérienne en formant une barrière de diffusion qui concentre les peptides antimicrobiens près de la surface des cellules épithéliales (Meyer-Hoffert et al., 2008).

### **3. Activation de la voie DUOX**

Malgré la divergence évolutive, les réponses de l'hôte aux bactéries ingérées restent conservées et se manifestent en premier lieu par la production des espèces réactives d'oxygène (ROS), suivie par l'expression des peptides antimicrobiens (PAMs) (Buchon et al., 2013a).

Les ROS dérivent d'une réduction incomplète des métabolites de l'oxygène. Ce sont des molécules de courte durée de vie. Ils sont surtout induits en réponse à des infections chez pratiquement tous les organismes eucaryotes. La production des ROS représente un mécanisme primordial dans la perception et le contrôle microbien. (Kotchoni and Gachomo, 2006). Les réactifs oxygénés sont souvent induits par deux enzymes NADPH conservées : la dual oxydase (Duox), qui génère du peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) et de l'acide hypochloreux (HOCl), tandis que la NADPH oxydase (Nox) ne génère que du  $H_2O_2$  (Buchon et al., 2014). Chez les mammifères et les invertébrés, les ROS interviennent dans la stimulation de la prolifération

cellulaire et le contrôle des bactéries commensales (Bonfini et al., 2016; Jones et al., 2013). Chez les mammifères, sept NADPH oxydases phagocytaires ont été identifiées : Nox-1, Nox-2, Nox-3, Nox-4, Nox-5, Duox-1 et Duox-2 (Lambeth, 2004; Sumimoto, 2008). Les principales oxydases exprimées le long du tractus gastro-intestinal des mammifères sont les Nox1, induite au niveau de l'iléon, et Duox2 localisée préférentiellement au niveau du duodénum (el Hassani et al., 2005; Matziouridou et al., 2018). Leurs paralogues ont été identifiés chez la drosophile et nommés aussi Nox1 et Duox2 (Lambeth, 2004; Sumimoto, 2008). En raison de l'existence de ces paralogues entre les mammifères et la drosophile et le fait que l'activation des ROS est mieux documentée chez cet invertébré, je me focaliserai dans la suite de ce paragraphe sur le modèle drosophile. En effet, l'ingestion des microorganismes pathogènes, par les mouches, induit la production de ROS extracellulaires de type HOCl, entièrement dépendants de l'activité de l'enzyme Duox 2 (Kim and Lee, 2014). Étant donné que les cellules épithéliales déclenchent leurs mécanismes de défenses suite à des attaques microbiennes, certaines études suggèrent que les ROS dépendants de la DUOX agissent comme un bactériostatique limitant la prolifération des pathogènes au niveau intestinal (Ha et al., 2005; Benguettat et al., 2018).

Récemment, des molécules d'uracile dérivées des bactéries se sont révélées être inductrice de l'activation de la voie DUOX. L'uracile agit comme un signal spécifique des bactéries pathogènes sur des récepteurs spécifiques couplés aux protéines G localisés sur la surface des entérocytes (Lee et al., 2015, 2013). Cette reconnaissance permet à l'hôte de distinguer les micro-organismes à uracile-positif (agents pathogènes ou pathobiontes), des microorganismes à uracile-négatif (bactéries commensales ou symbiotes). Cet uracile peut induire une activation de la Duox et donc une production des ROS de types HOCl. Ces derniers ont été identifiés comme indispensables au déclenchement de spasmes viscéraux permettant une élimination très rapide du pathogène au bout de 30 à 90 minutes après ingestion (Lee and Hase, 2014; Benguettat et al., 2018; Du et al., 2016b). Alors que les mutations de la voie Duox rendent les drosophiles plus sensibles aux infections, causant une mortalité accrue (Ha et al., 2005), la surproduction des ROS conduit à un stress oxydatif cellulaire, provoquant des dommages au niveau de la structure épithéliale et favorisant ainsi la formation des tumeurs (Khansari et al., 2009).

#### **4. La perception intestinal des pathogènes et réponse humorale**

L'intestin a pour rôle de reconnaître les pathogènes responsables d'infection tout en régulant son microbiote intestinal. Cette reconnaissance est déclenchée par des signaux microbiens

appelés MAMP (« Microbial Associated Molecular Pattern ») qui regroupent des motifs conservés chez les différents micro-organismes. Quand ces signaux dérivent d'un pathogène, on les appelle PAMP (« Pathogen Associated Molecular Pattern »). Ces PAMPs peuvent se présenter sous forme de lipo-polysaccharides (LPS), de fragment du peptidoglycane (PGN) (se qui est reconnu par les recpteurs membranaire sont des morceaux/fragments du PGN qui sont relargués puis détectés appelées des muuropeptides. Mais pour se rapprocher au langage scientifique utilisée dans les publication scientifique j'utiliserai par la suite le terme PGN) , tri ou de  $\beta$ -1, 3-glucanes (Takeuchi and Akira, 2010).

Le PGN est un composant majeur de la paroi bactérienne, qui assure le maintien de l'intégrité de la cellule. Il se compose de chaînes de glycanes réticulées entre elles par des chaînes latérales peptidiques. Selon le 3<sup>ème</sup> résidu situé au niveau des chaînes latérales, on peut classer les PGN en deux catégories : la plupart des bactéries à Gram-positif possèdent une L-lysine (Lys-PGN) en 3<sup>e</sup> position de leur pont peptidique, tandis que les bactéries à Gram-négatif et la bactérie Gram-positif *Bacillus subtilus* possèdent un acide méso-diaminopimélique (Dap-PGN) (Wheeler et al., 2014). Aussi, au niveau de la membrane externe des bactéries à Gram négatif, le PGN est recouvert par du LPS et des phospholipides. Le LPS n'est libéré qu'en phase de croissance ou de division cellulaires.

Les mammifères sont dotés d'un panel de recepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (PRR, acronyme de Pattern Recognition Receptor), tels que les TLR (« Toll Like Receptors »), les CLR (« C-type Lectin Receptors ») et FPR (« formylated peptide receptors »), qui représentent des récepteurs membranaires. Aussi, on trouve chez les mammifères des récepteurs cytoplasmiques de type NLR (« Nod Like Receptors »), ou des récepteurs appelés PGRP (« Peptidoglycan Recognition Protein ») (Liwinski et al., 2020; Takeuchi and Akira, 2010). À l'heure actuelle, les fonctions de certains de ces récepteurs sont encore mal connues. Dans cette section, je me focaliserai sur les récepteurs les plus documentés chez les mammifères et invertébrés à savoir : TLR, NLR et PGRP.

#### **4.1. Role des TLR dans l'immunité intestinale**

Les TLR ont été les premiers PRR identifiés chez les vertébrés et sont nommés ainsi en raison de leurs similitudes avec les récepteurs Toll chez la drosophile (Lemaitre et al., 1996). On compte aujourd'hui 13 TLR chez la souris (TLR1 à TLR13) et 10 chez l'Homme (TLR1 à

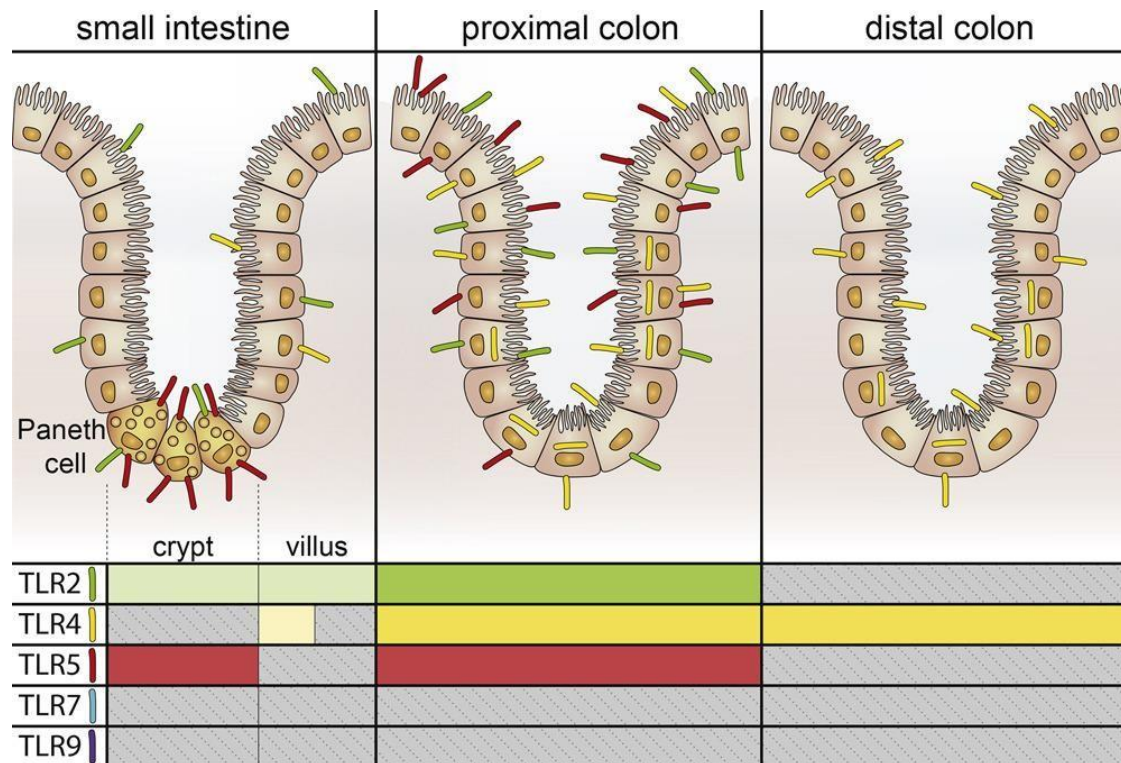


TLR10). Les TLR sont formés par deux domaines : un ectodomaine caractérisé par la présence des motifs répétés riches en leucine (LRR), et un domaine de signalisation cytoplasmique appelé Toll-IL-receptor (TIR). Les TLR sont capables de détecter les PAMPs par la présence des motifs LRR (Leucine rich repeats) (Takeda and Akira, 2003). Certains TLRs sont décrits comme membranaires (TLR1/2/4/5/6), alors que d'autres (TLR3/7/8/9) sont cytoplasmiques (Takeda and Akira, 2003). En ce qui concerne les TLR10/11/12/13, leurs caractéristiques et leurs fonctions restent à ce jour mal documentées.

Plusieurs études menées avec le modèle souris ont mis en évidence le rôle joué par les différents TLR au niveau de l'épithélium intestinal des mammifères. À titre d'exemple, l'étude de Chassaing et collaborateurs a montré que la délétion spécifique de TLR5 au niveau épithélial entraînait une dysbiose microbienne et une inflammation, suggérant que TLR5 jouait un rôle dans le contrôle des interactions hôte-microbiote (Chassaing et al., 2014). Deux autres études menées sur l'identification du rôle de TLR4 ont montré que sa surexpression augmentait spécifiquement le risque de développer une colite ou un cancer colorectal (Fukata et al., 2011). Dheer et ses collaborateurs ont aussi exprimé constitutivement TLR4 au niveau des épithéliums intestinaux. Ils ont révélé une augmentation de la colonisation bactérienne associée à une altération de la barrière épithéliale corrélée avec une surexpression des gènes des peptidiques antimicrobiens et à une différenciation altérée des cellules épithéliales (Dheer et al., 2016). Collectivement, ces études suggèrent que la signalisation des TLR existe aussi au niveau des EC considérées jusqu'à présent uniquement comme des cellules absorbantes. Tout comme chez la drosophile, les EC mammifères peuvent jouer un rôle central dans la détection et la réponse aux microbes commensaux et pathogènes *in vivo*.

Pour définir les types cellulaires exprimant les TLR dans l'intestin, Price et ses collaborateurs ont généré des souris dans lesquelles les loci endogènes *Tlr2*, *Tlr4*, *Tlr5*, *Tlr7* ou *Tlr9* ont été modifiés pour exprimer un rapporteur fluorescent. Ils ont trouvé que le TLR2 était exprimé en faibles quantités au niveau des EC de l'intestin grêle, alors que le TLR4 était exprimé en faibles quantités dans les villosités de l'intestin grêle. Fait intéressant, ils ont trouvé que TLR5 n'était exprimé que par les cellules de Paneth au niveau des cryptes intestinales. L'expression des TLR par l'épithélium colique serait en revanche assez différente : dans le côlon proximal, TLR2, TLR4 et TLR5 sont exprimés dans tout l'épithélium, tandis que TLR4 est le seul TLR exprimé dans le côlon distal (Price et al., 2018). Cette régionalisation peut être liée à la présence du microbiote intestinal. En effet, l'intestin grêle et le côlon abritent une composition et une densité

assez différentes de bactéries commensales (Donaldson et al., 2015) (Figure 9).



**Figure 9 : Expression des différents Toll-like receptors (TLR) le long de l'épithélium intestinal chez la souris.** TLR2 est représenté en vert, TLR4 en jaune, TLR5 en rouge, TLR7 en bleu et TLR9 en violet. Les nuances claires indiquent une faible expression et les nuances foncées indiquent une forte présence. La couleur grise indique l'absence du récepteur (Price et al., 2018)

## 4.2. Role des NLR dans l'immunité intestinale

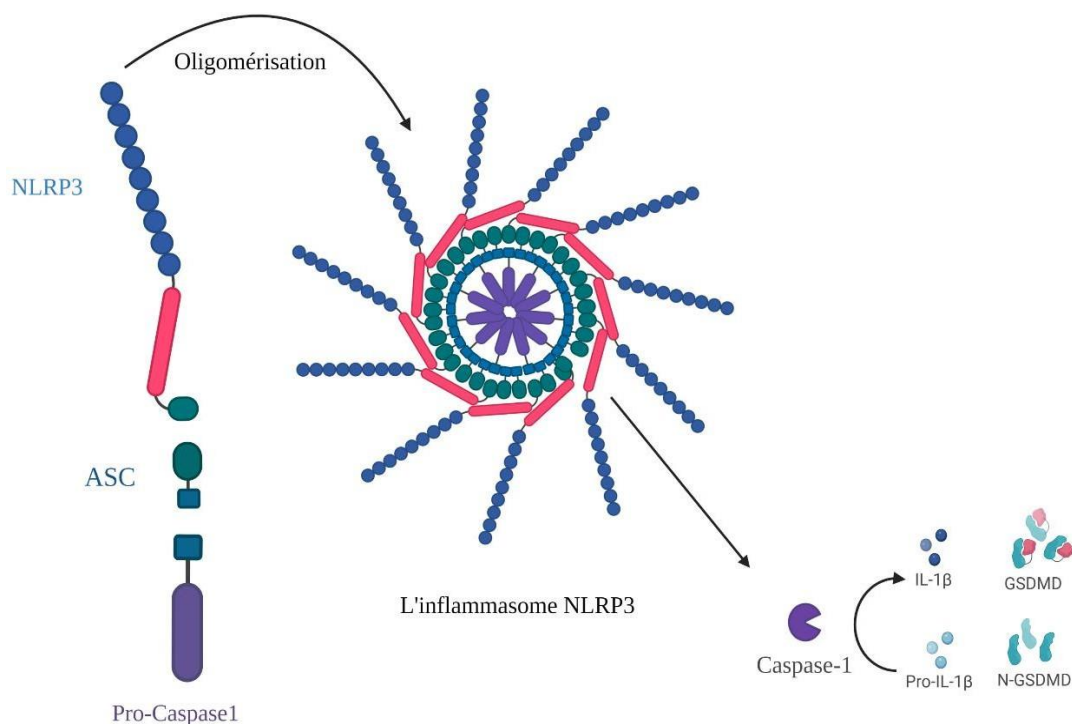
Une autre famille de PRR, essentielle dans la perception des microorganismes, est représentée par les protéines NLR (Nod-Like Receptor) (Hooper and MacPherson, 2010). Les NLR partagent une même structure composée de trois domaines : un domaine N-terminal variable, un domaine central de liaison aux nucléotides NBD ou NACHT (NAIP, CIITA, HET-E, and TP1) et un domaine de 20 à 30 acides aminés riches en leucine en partie C-terminal (LRR).

Il existe plus de 20 protéines NLR identifiées chez l'homme et plus de 30 chez la souris, divisées en groupes basés sur leurs structures à l'extrémité N-terminale. On distingue, par exemple, le groupe NLRP qui contient un domaine pyrine, tandis que le groupe NLRC présente un domaine

d'activation et de recrutement des caspases (Kanneganti et al., 2007). Les récepteurs cytoplasmiques NOD1 et NOD2 sont les membres de la famille NLRC les mieux décrits. Ils reconnaissent des fragments de PGN bactérien (Chamaillard et al., 2003; Heim et al., 2019). Tout comme les TLR, l'expression des NOD varie à travers l'épithélium intestinal. Par exemple, chez l'humain, le récepteur NOD1 est fortement exprimé dans le côlon (Kim et al., 2004). À l'inverse NOD2 est peu exprimé au niveau du côlon. En revanche, il est exprimé par les cellules de Paneth dans l'intestin grêle (Hisamatsu et al., 2003; Eckmann and Karin, 2005; Cario, 2005). Une fois activés, les récepteurs NOD recrutent et activent RIP2. Ce dernier induit une signalisation via TAK1 afin d'activer les facteurs de transcription NF- $\kappa$ B et AP-1 et entraîne ainsi la transcription des gènes codant les cytokines tels que TNF $\alpha$ , IL-6, IRF4, CXCL8 et CCL20 (Ferrand et al., 2019). Les récepteurs NOD sont primordiales dans la réponse immunitaire. En effet, les souris *Nod2*<sup>-/-</sup> présentent une expression altérée des peptides antimicrobiens (PAMs) associée à une augmentation du nombre et de la diversité de bactéries microbiotiques et une capacité très réduite à empêcher les infections par des bactéries pathogènes (Biswas et al., 2012; Rehman et al., 2011).

Les inflammasomes participent aussi à la réponse immunitaire des mammifères (Lamkanfi and Dixit, 2017). Il existe différents types d'inflammasomes qui détectent les motifs microbiens (NLRP 1, 3, 4, 6, 7, 12). Les inflammasomes représentent un complexe de protéines cytosoliques capables de reconnaître divers signaux de stress, de microbes exogènes et de signaux de danger endogènes. La définition de l'inflammasome a été attribuée pour la première fois en 2002, suite aux travaux de Martinon et collaborateurs. Ils ont découvert qu'il jouait un rôle essentiel dans les infections microbiennes et également dans la régulation des réponses immunitaires (Martinon et al., 2002). Il existe des relations de coopérations entre différents types de PRR. Ainsi l'activation des TLR augmente le niveau d'expression de l'inflammasome NLRP3 et favorise son activation (Gros Lambert et al., 2018). L'inflammasome NLRP3 est le mieux décrit. NLRP3 joue un rôle critique et bien défini dans la réponse immunitaire innée de l'hôte à un large éventail de stimuli (Dufies et al., 2021). L'inflammasome NLRP3 contribue aussi à la régulation de l'homéostasie intestinale (Hirota & Nakajima, 2017).

Le complexe multiprotéique de l'inflammasome NLRP3 se compose des PRR-NLRP3, de la protéine Speck-like (ASC) associée à la protéine adaptatrice contenant un domaine de recrutement de la caspase et la protéine effectrice Caspase-1 (Kelley et al., 2019). La formation de l'inflammasome active la Caspase 1 ce qui permet la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires IL-1 $\beta$  et IL-18 sous leur forme active. En outre, l'inflammasome NLRP3 initie davantage la pyroptose via un clivage activateur de la Gasdermine D (Gsdmd), qui forme des pores dans la membrane plasmique et agit comme la molécule exécutive de la pyroptose (Shi et al., 2017) (Figure 10).



**Figure 10 : Activation de l'inflammasome NLRP3**

### 4.3. Role des PGRP dans l'immunité intestinale

Chez la drosophile, seul le PGN est décrit comme le PAMP capable de déclencher une réponse immunitaire contrairement aux mammifères, chez qui les mécanismes de défenses peuvent être aussi induits par le LPS (Leulier et al., 2003; Kaneko and Silverman, 2005). Les PGN sont reconnus, chez les vertébrés et invertébrés, par des récepteurs spécifiques connus sous le nom

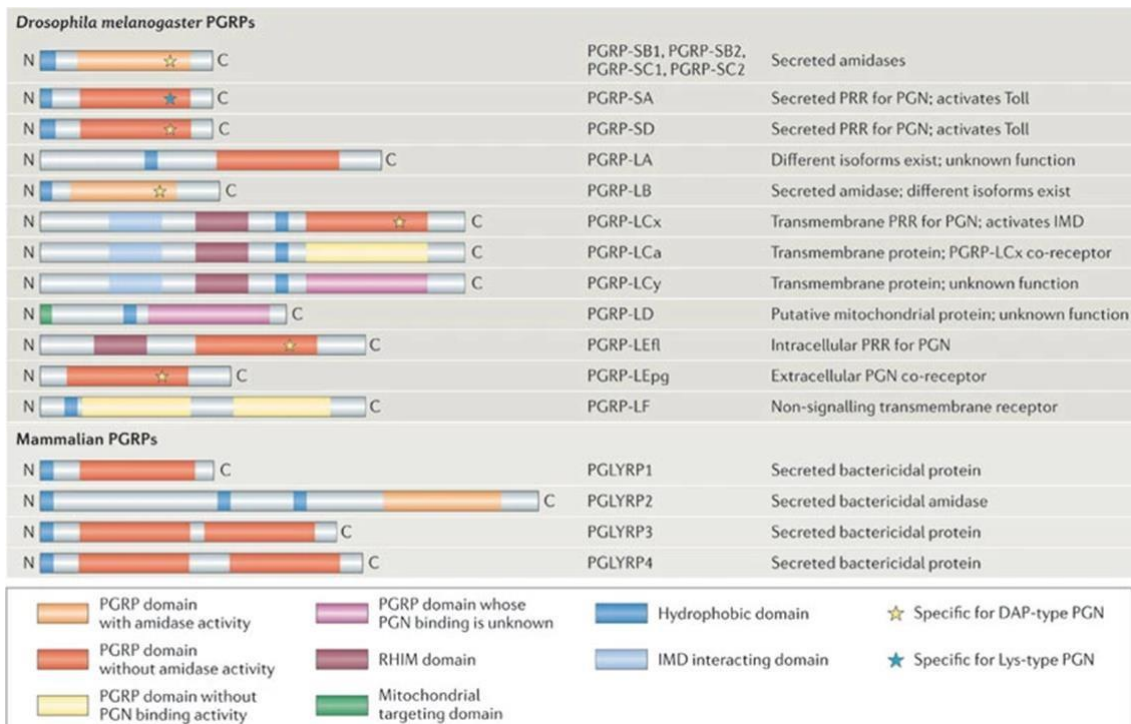
de PGRP (Peptidoglycan Recognition Protein).

Les PGRP ont été identifiés pour la première fois chez *Bombix mori* et leurs homologues ont été ensuite décrits chez la drosophile, puis chez les mammifères. Ces protéines sont présentes chez la drosophile au niveau des épithéliums ou dans le corps gras (équivalent fonctionnel du foie chez les mammifères). En revanche, chez les mammifères, on les retrouve secrétées et exprimées au niveau des neutrophiles, du foie, des épithéliums mais aussi dans de sécrétions telles que la salive et la sueur (Royet et al., 2011).

Quatre PGRP ont été identifiés dans le génome de la souris et de l'Homme. Ces PGRP mammifères ont été initialement nommés PGRP-S (court=short), PGRP-L (long), et PGRP-Ia et PGRP-Ib (intermédiaires) (Liu et al., 2001). Ces désignations ont été modifiées par le Comité de Nomenclature des Gènes en PGLYRP1, PGLYRP2, PGLYRP3 et PGLYRP4, respectivement.

Les PGLYRP1, PGLYRP3 et PGLYRP4 possèdent une fonction bactéricide (Dziarski & Gupta, 2006). Alors que PGLYRP-2 est une amidase capable de cliver le PGN (Dziarski and Gupta, 2006). Des travaux sur les modèles de colite induite par le Dextran Sulfate Sodium (DSS) chez la souris, montrent que PGLYRP-3 coopèrent avec Nod2 pour contrecarrer les effets de la colite et empêcher l'apparition de dysbioses (Saha et al., 2010). Cependant le rôle des PGLYRPs au niveau intestinal chez les mammifères demeure très mal documenté. Dans ce contexte, je me focaliserai sur les connaissances acquises sur ce type de récepteurs chez le modèle drosophile, chez qui ces protéines ont été largement étudiées.

Pour commencer, il faut savoir que l'identification des fonctions des différents PGRP a été initialement élaborée, chez la drosophile, dans le cadre de la réponse immunitaire systémique localisée au niveau du corps gras (**se référer au chapitre V**), puis transposée aux mécanismes de défenses locaux. Chez le modèle drosophile, la famille des PGRP est composée par treize membres (Werner et al., 2000; Kaneko and Silverman, 2005). Ces PGRP possèdent un domaine commun similaire à l'amidase de type II des bactériophages. Certains PGRP ont conservé cette fonction amidase, tandis que d'autres l'ont perdu et se présentent uniquement comme des récepteurs (Kim et al., 2003; Royet and Dziarski, 2007). On regroupe ces PGRP en 2 catégories distinctes en fonction de leurs tailles (Mengin-Lecreulx and Lemaitre, 2005) : des protéines courtes secrétées : PGRP- SA, SB1, SB2, SC1A, SC1B, SC2 et SD, et des protéines longues transmembranaires : PGRP-LA, -LC, -LE, -LB, LD et -LF (**Figure11**).



**Figure 11: Comparaison des structures des protéines de reconnaissance du peptidoglycane (PGRPs) chez la drosophile et les mammifères et leur principale fonction.** (Royet et al., 2011)

En effet, parmi les treize PGRP identifiés, seulement quatre seraient impliqués dans la reconnaissance des PGN (Dap ou Lys) et l'activation des cascades immunitaires de types NF- $\kappa$ B, à savoir PGRP-SA, -SD, -LC et -LE.

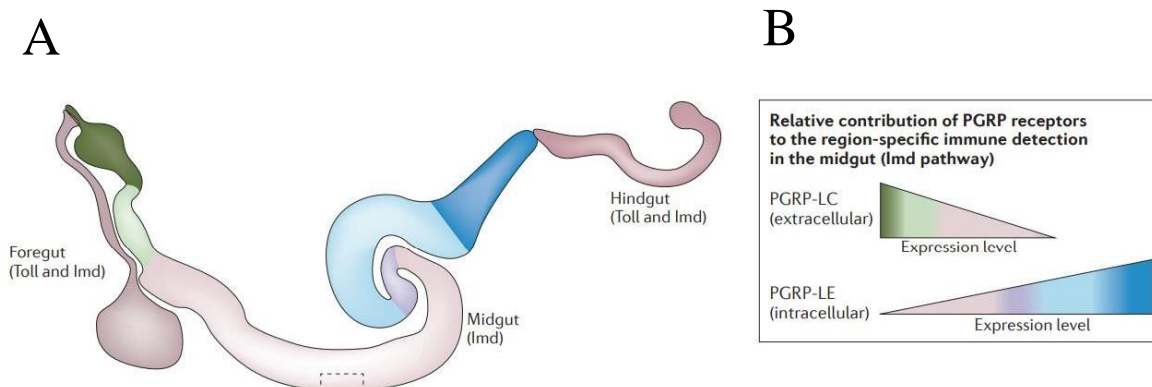
En réponse systémique et suite à une infection par des bactéries pathogènes à Gram positif (Lys-PGN), des chercheurs ont identifié un complexe protéique composé par PGRP-SA, PGRP-SD et de la protéine circulante GGBP1 (Gram-negative binding protein 1). Ce modèle représente un complexe moléculaire de reconnaissance en amont de la voie immunitaire Toll (Gobert et al., 2003; Wang et al., 2006). En revanche, les mutations au niveau des composants de ce système de reconnaissance n'affectaient pas l'activation de la voie « Immune deficiency » (Imd), l'analogue de la voie de signalisation TNF- $\alpha$  chez les mammifères (Michel et al., 2001). Néanmoins, cela a soulevé des questions non seulement sur la fonction des 11 PGRP restants, mais aussi sur la nature des PRR impliqués dans la reconnaissance et la distinction entre les différents microorganismes au niveau intestinal. Une partie de la réponse est venue après l'analyse d'un autre membre de la famille, PGRP-LC. Ce dernier possède trois isoformes, dont



deux : PGRP-LCx et PGRP-LCa, les mieux décrits, sont impliquées dans la reconnaissance du PGN. Les homodimères de PGRP-LCx reconnaissent le peptidoglycane sous forme polymérique, tandis que les hétérodimères PGRP-LCx/PGRP-LCa le reconnaissent sous sa forme monomérique (Kaneko and Silverman, 2005; Neyen et al., 2012). PGRP-LC est décrit comme un récepteur transmembranaire capable d'assurer une double fonction : (i) la reconnaissance des bactéries *via* son domaine PGRP extracellulaire, et (ii) l'activation de la signalisation Imd *via* son domaine intracytoplasmique (Royet et al., 2011; Royet, 2011).

En revanche, en 2004, Takehana et ses collaborateurs ont montré que la surexpression du récepteur PGRP-LE conduisait également à l'activation de la voie Imd (Takehana et al., 2004). Ils ont émis alors les hypothèses d'une contribution des deux PGRP (-LC et -LE) dans la reconnaissance bactérienne, et de l'activation de la voie Imd au niveau intestinal. Ces hypothèses ont été confirmées par la suite avec des expériences complémentaires de perte de fonction (Takehana et al., 2004; Neyen et al., 2012; Bosco-Drayon et al., 2012; Kaneko and Silverman, 2005). Il faut noter que PGRP-LE est une protéine ne possédant qu'un seul domaine fonctionnel capable de reconnaître et de se lier aux PGN. Cette caractéristique laisse suggérer que ce récepteur est de type intracellulaire, contrairement au PGRP-LC, qui lui est transmembranaire (Kaneko and Silverman, 2005).

Même si les voies immunitaires Toll et Imd co-existent ensemble en termes de réponse systémique, au niveau intestinal ce n'est pas toujours le cas. En effet, la voie Imd a été décrite jusqu'à aujourd'hui comme une voie immunitaire dominante au niveau de toutes les régions de l'intestin de la drosophile (foregut, midgut et hindgut) (Tzou et al., 2000; Buchon et al., 2013b). En revanche, quelques données suspectent une implication de la voie de signalisation Toll au niveau du foregut et hindgut de l'intestin de la drosophile (Basset et al., 2000) (Figure 12A). Aussi, l'activation de la voie Imd au niveau intestinal obéit à une régionalisation des récepteurs. En effet, cette activation est principalement sous le contrôle de PGRP-LC dans les parties ectodermiques de l'intestin (foregut et hindgut). Mais le contrôle de l'activation de la voie Imd se complique au niveau du midgut. Il a été montré que l'élimination de PGRP-LE ou de PGRP-LC était suffisante pour inhiber l'activation de la voie Imd au niveau de la R1 et R2 (Bosco-Drayon et al., 2012). Ceci implique que l'absence d'un récepteur ne peut être compensée par la présence de l'autre, et suggère que PGRP-LE et PGRP-LC peuvent former un hétérodimère (Kaneko and Silverman, 2005). En revanche, dans les régions R3, R4 et R5 du midgut, PGRP-LE est le principal récepteur présent (Bosco-Drayon et al., 2012; Neyen et al., 2012) (Figure 12).



**Figure 12 : Activation des voies immunitaires au niveau de l'intestin de la drosophile.**

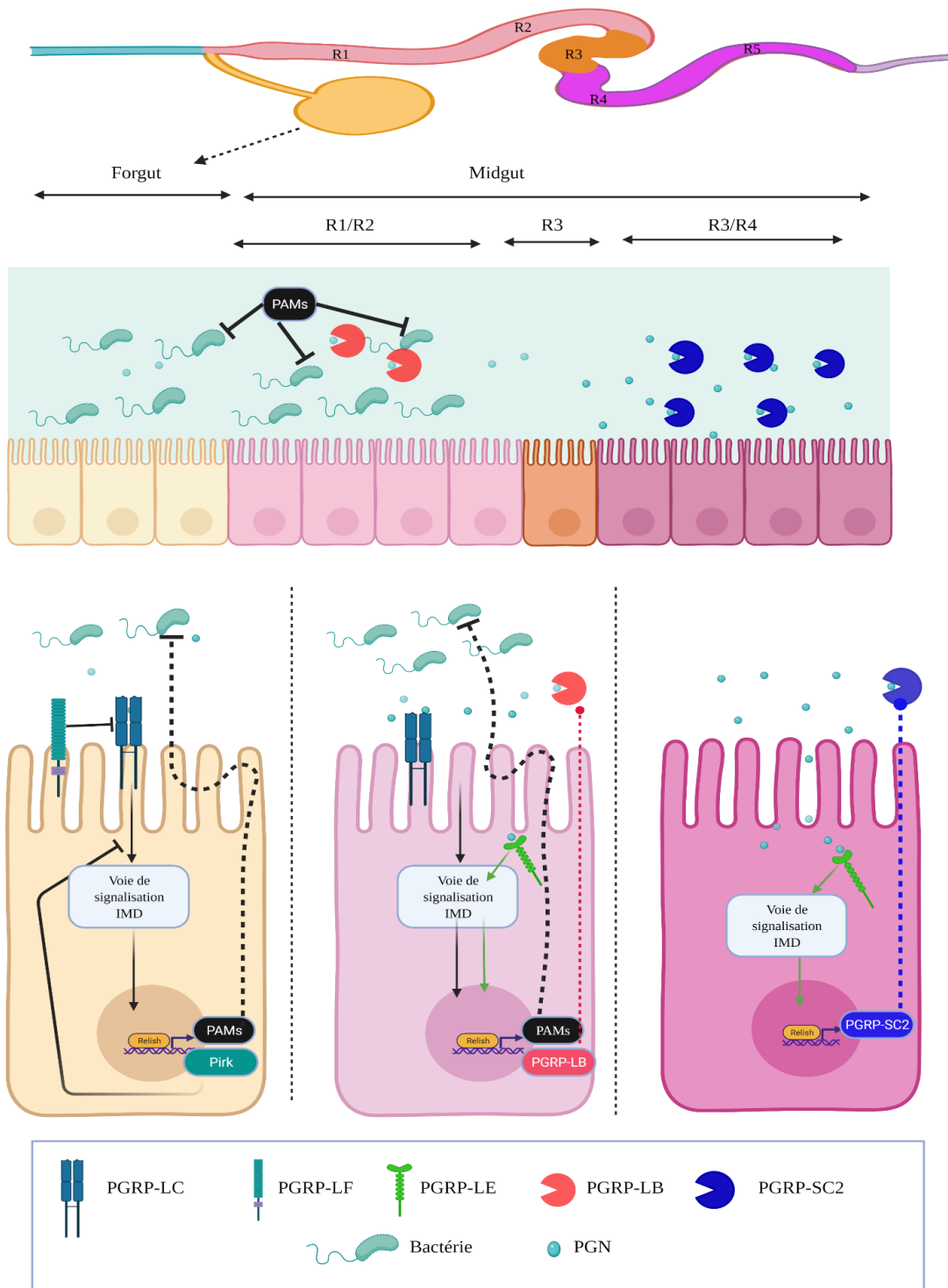
(A) Localisation des voies de signalisation immunitaires au long de l'intestin de la drosophile (B) Régionalisation de la localisation de PGRP-LE et -LC au niveau de l'intestin moyen (Buchon et al., 2014)

Le microbiote intestinal joue un rôle important dans cette régionalisation. En utilisant la bactérie *Erwinia carotovora carotovora* 15 (souche Ecc15), Paredes et al. ont montré que l'activation constitutive de PGRP-LC à la surface des EC pouvait devenir délétère pour l'épithélium intestinal (Paredes et al., 2011). Ces travaux laissent penser que la détection continue par PGRP-LC du PGN libéré en permanence par le microbiote serait néfaste pour l'hôte. On peut se poser alors la question suivante : Y-a-t-il un effet seuil du PGN bactérien pour déclencher les réponses immunitaires localisées dans les régions antérieures. À l'inverse, les parties postérieures (R4 et R5) sont principalement le siège de résidence du microbiote intestinale (Broderick et al., 2014). Or, la topographie cytoplasmique de PGRP-LE, rend invisible aux entérocytes les PGN issus du microbiote. En effet, la concentration en PGN provenant du microbiote dans la lumière intestinale est très faible, comparée à la quantité des PGN relargué après infections. En revanche, après infection, la quantité de PGN augmente considérablement permettant sa translocation dans les entérocytes et donc sa détection par PGRP-LE (Royet and Charroux, 2013) (Figure 13).

Cette régionalisation des récepteurs laisse aussi penser que les cibles du facteur de transcription NF- $\kappa$ b, Relish, en aval de la voie Imd sont également exprimées de façon localisée le long du midgut. Les PAMs sont principalement exprimés dans l'intestin moyen antérieur, tandis que les régulateurs négatifs tels que Pirk et les amidases PGRP-LB et -SC sont sécrétés majoritairement au niveau des parties postérieures. Concernant Pirk, il a été proposé qu'il intervenait dans la



sequestration de PGRP-LC au niveau du cytoplasme, empêchant ainsi l'initiation de la voie de signalisation Imd. Pirk est sous le contrôle de la voie Imd. Son rôle de régulateur négatif lui permet de réguler la cinétique d'activation de cette voie. Les amidases PGRP-LB et -SC ont pour fonction de décomposer les PGN bactériens afin de limiter aussi l'activation de la voie Imd et sont localisées dans les régions antérieures et postérieures de l'intestin moyen (Costechareyre et al., 2016). En effet, les auteurs ont montré que PGRP-LB était sécrété modérément au niveau de la R1 et R2, tandis que les PGRP-SC1/2 sont plutôt sécrétés au niveau des R4 et R5 de l'intestin moyen (Costechareyre et al., 2016) (Figure 13). Cette régionalisation spatiale des composants Imd suggère que les réponses immunitaires antimicrobiennes prédominent dans l'intestin moyen antérieur, tandis que les mécanismes de tolérance sont favorisés dans les régions postérieures. Les bactéries commensales, localisées dans les R4 et R5 n'évoquent pas une forte réponse antimicrobienne mais induisent plutôt l'expression de régulateurs négatifs de la voie Imd tels PGRP-SC1/2, de manière dépendante de PGRP-LE (Bosco-Drayon et al., 2012). Certaines études ont montré que l'expression de PGRP-SC2 était progressivement réprimée dans l'intestin des drosophiles âgées. Cette répression provoque une dérégulation de la réponse immunitaire, entraînant ainsi une dysbiose commensale, une hyperprolifération des cellules souches et une dysplasie épithéliale (Guo et al., 2014). D'autres composants régulent la voie Imd en réponse aux agents pathogènes et au microbiote. Parmi ces facteurs, PGRP-LF est localisé au niveau des régions ectodermique de l'intestin (foregut et hindgut) (Capo et al., 2016). PGRP-LF agit comme un inhibiteur compétitif de la dimérisation de PGRP-LC. L'association PGRP-LF avec PGRP-LC bloque la formation de l'homodimère PGRP-LC requis pour la signalisation Imd (Basbous et al., 2011; Maillet et al., 2008). On trouve également le répresseur transcriptionnel Caudal, présent surtout au niveau de l'intestin moyen postérieur. Caudal a pour rôle de réprimer l'expression des AMP dépendantes de Relish, en réponse aux microbes commensaux (Ryu et al., 2008). Collectivement, cela suggère que la voie Imd est régulée à plusieurs niveaux dans l'intestin moyen afin de permettre d'induire des réponses appropriées aux agents pathogènes tout en tolérant le microbiome, évitant ainsi tout dysfonctionnement intestinal.



**Figure 13 : Régionalisation de l'activation de la voie immunitaires Imd et de ces cibles au niveau de l'intestin de la drosophile**

## 5. Les effecteurs antimicrobiens conservés

Les épithéliums intestinaux possèdent une défense spécifique et efficace grâce à la production des peptides antimicrobiens (PAMs), afin de contrôler les bactéries résistantes aux ROS (Ryu et al., 2006). Les PAMs appartiennent à un système ancestral de défense, regroupant un ensemble de peptides sécrétés et décrits comme conservés chez tous les organismes (Toke, 2005).

En général, les PAMs sont des molécules amphipathiques, chargés positivement et capables de cibler spécifiquement des micro-organismes (de types bactéries et/ou champignon) en les neutralisant. On décrit deux modes d'action des PAMs. Dans le premier, les PAMs induisent une lyse de la membrane bactérienne, entraînant ainsi la mort des cellules. En revanche, dans le second mécanisme, les PAMs pénètrent dans les cellules bactériennes sans causer leurs ruptures membranaires, se lient aux acides nucléiques ou aux protéines intracellulaires bactériennes et inhibent ainsi les fonctions intracellulaires essentielles (Brogden, 2005).

Chez la drosophile, on compte 7 familles de PAMs identifiées: les **Attacines** (Att-A, -B, -C et -D), les **Cécropines** (Cec-A1, -A2, -B, -C et Andropine), la **Defensine (Def)**, les **Diptéricines** (Dpt-A et -B), la **Drosocine (Dro)**, les **Drosomycines** (Drosomycine (Drs), Drs-like (Drsl) - 1, -2, -3, -4, -5 et -6) et les **Metchnikowines** (Mtk) (Hanson and Lemaitre, 2020a). Ils possèdent tous un large spectre d'action, mais chacun d'entre eux présente une certaine spécificité antimicrobienne (Hanson and Lemaitre, 2020a). Ils ont été décrits comme initialement exprimés à la suite d'une réponse systémique via l'activation des voies immunitaires Toll ou Imd au niveau du corps gras (Lemaitre and Hoffmann, 2007) ([Tableau 2](#)).

**Tableau 2** : Caractéristiques des différents peptides antimicrobiens chez la drosophile  
(Hanson & Lemaitre, 2020)

	Famille	Gene	Voie immunitaire impliquée
Dpt	Diptéricine	Dpt A, DptB	Imd
Att	Attacine	Att A, Att B, Att C, Att D	Imd
Dro	Drosocine	Dro	Imd
Cec	Cecropine	Cec A1, Cec A2, Cec B, Cec C	Imd
Def	Defensine	Def	Imd
Drs	Drosomycin	Drs	Imd, Toll (réponse systémique)
		Drs-like1, Drs-like4, Drs-like5, Drs-like6	
		Drs-like2, Drs-like2	JAK-STAT
Mtk	Metchnikowin	Mtk	Imd, Toll (réponse systémique)

Mais au niveau intestinal, la régulation de la réponse immunitaire est assez fine afin de lui permettre de tolérer la présence du microbiote dans des conditions physiologiques normales tout en réagissant contre les pathogènes. En effet, la plupart des PAMs présentent une induction basale due à la présence du microbiote (Ferrandon, 2013). Par contre, suite l'ingestion d'*Ecc15*, Buchon et ses collaborateurs ont identifié à l'aide d'analyses transcriptomiques que les gènes des quatre Attacins (A, B, C et D), des deux Diptéricines (A et B), des deux Cecropin A1/A2 ainsi que la Defensin et de la Metchnikowin sont induits au niveau intestinal (Buchon et al.,

2009b). De plus, plusieurs autres études ont montré que l'absence de la production locale de ces PAMs rendait les mouches plus sensibles aux agressions par *Ecc15* (Basset et al., 2000; Buchon et al., 2009b), *Pseudomonas entomophila* (Liehl et al., 2006), *Pseudomonas aeruginosa* (Limmer et al., 2011) et *Serratia marcescens* (Nehme et al., 2007). Or, la surexpression d'un seul des PAMs chez un mutant déficient pour la voie Imd s'est révélé suffisante pour restaurer la résistance face aux agressions (Limmer et al., 2011; Nehme et al., 2007; Ryu et al., 2006). Je tiens à vous rappeler que même si toutes les régions de l'intestin moyen de la drosophile sont capables d'activer la voie Imd, seules ces régions antérieures montrent une forte production des PAMs suite à une infection bactérienne (Bosco-Drayon et al., 2012; Buchon et al., 2009).

En plus de ces PAMs régulés par la voie Imd au niveau intestinal, l'étude transcriptomique de Buchon et collaborateurs a montré l'induction d'autres PAMs indépendamment de la voie Imd au niveau des régions R1 et R2 du midgut. Ces PAMs indépendants de la voie Imd sont des Drosomycines-like (Drsl2, Drsl3 et Drsl4) produits sous le contrôle d'une autre voie de signalisation cellulaire la voie JAK-STAT (**Tableau 2**) (Buchon et al., 2009b). L'expression des PAMs de type Drosomycine-like a été par la suite décrite comme dépendantes des ligands Upd de la voie JAK-STAT libérés au niveau épithéliale suite à des agressions (Osman et al., 2012) (se référer à la partie régénération cellulaire). Ce résultat suggère que la production des Drosomycines-like au niveau intestinal est activée par un stress cellulaire plutôt qu'en réponse aux PGN comme c'est le cas avec les autres peptides antimicrobiens.

Ces mécanismes d'induction et de régulation ne pourraient pas pas être généralisées à d'autres espèces d'insectes. En effet, il a été montré chez le lépidoptère *Bombyx mori*, une coopération des voies Toll, Imd et JAK-STAT dans l'induction des PAMs dans l'intestin moyen (Wu et al., 2010). Une autre étude a montré une potentielle implication de la voie de signalisation Toll au niveau de l'intestin moyen des larves de *P. xylostella* par ingestion orale de microbes pathogènes (Li et al., 2020).

Chez les mammifères, au niveau intestinal, les EC mais surtout les cellules de Paneth sont les principales sources de sécrétion des PAMs (Michael Zasloff, 2002; Selsted and Ouellette, 2005). Meme si l'étude des PAMs chez les mammifère reste moins poussée comparée aux invertébrés, il faut savoir tout de même que des patients atteints par des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (exemple la maladie de Crohn), présentent une production de PAMs gastro-intestinale réduite, ce qui entraine potentiellement une dysbiose

(Yao and Rock, 2017). Un contrôle étroitement régulé de la sécrétion de PAMs semble donc être essentiel aussi chez les mammifères.

Plusieurs familles de PAMs ont été identifiées au niveau du tractus intestinal des mammifères, je cite à titre d'exemple : les Défensines ( $\alpha$ - and  $\beta$ -Défensines), les Cathélicidines, les Ribonucléases (RNases) et les protéines S100 (comme la Calprotectine) (Gallo and Hooper, 2012; Lai and Gallo, 2009). Tout comme la drosophile, les PAMs sont produits par les mammifères de façon homéostatique afin de contrôler du microbiote intestinal (Salzman et al., 2010). En revanche, la production des PAMs augmente considérablement lorsqu'il s'agit d'un agent pathogène comme *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *Listeria spp.*, *Citrobacter rodentium*, *Escherichia coli entéropathogène (EPEC)* et *E. coli entérohémorragique (EHEC)*. Parmi tous les PAMs (mammifères) cités auparavant, la production des  $\alpha$ -Défensines est la plus dominante au niveau de l'intestin grêle des mammifères. Ces  $\alpha$ -Défensines sont essentiellement produites au niveau des cellules de Paneth (Michael Zasloff, 2002; Selsted and Ouellette, 2005). Chez la souris, les  $\alpha$ -Défensines sont nommées des Cryptidines (Crp) (Sato et al., 2011). Ces Crp sont produites, au niveau des cellules de Paneth. Certaines études ont montré que les souris transgéniques exprimant un dominant négatif de MyD88 (dnMyD88) et les souris *MyD88*<sup>-/-</sup> présentaient une diminution des niveaux de production des Crp en réponse au microbiote ou suite à des infestation par des pathogènes (Vaishnava et al., 2008). Aussi, Kobayashi et ses collaborateurs ont montré que la production des Crp est aussi induit au niveau des cryptes suite à la reconnaissance du motif bactérien par son récepteur intracellulaire Nod2 (Kobayashi et al., 2005). Même si la contribution exacte au niveau intestinal de Nod2 dans la production des PAMs reste très mal documenté, on peut suggérer que le récepteur intracellulaire Nod2 joue un rôle similaire à celui du récepteur intracellulaire PGRP-LE chez la drosophile.

Pour revenir aux Crp, une étude très récente a montré une sécrétion topographique des Crp murins au niveau de l'intestin grêle (Nakamura et al., 2020). Les auteurs ont montré que le niveau d'expression des Crp dans l'iléon était très supérieur comparé au duodénum et au jéjunum. Ils ont corrélié ce résultat avec le fait qu'ils ont observé une augmentation progressive du nombre de cellules de Paneth de l'intestin grêle proximal vers le distal (Nakamura et al., 2020). Ce dernier résultat peut s'expliquer par le fait que l'iléon héberge un nombre plus important de bactéries commensales par rapport au duodénum ou jéjunum. Il faut savoir que la formation des lésions ulcéreuses de la muqueuse intestinale lors de la maladie de Crohn est prédominante dans l'iléon terminal. L'étude de l'implication des PAMs dans le contrôle du

microbiote est donc très importante afin de comprendre les enjeux de la pathogenèse de cette maladie (Shimizu et al., 2020).

Les barrières chimiques se manifestent en premier par est la sécrétion des enzymes digestives au niveau de la lumière intestinale. Il a été suggéré que ces enzymes sont des protéines antimicrobiennes qui interviennent dans l'inhibition de la croissance des pathogènes, par exemple en dégradant leurs surfaces ou leurs facteurs de croissance. Parmi ces enzymes digestives les plus décrites comme conservées, on retrouve les lysozymes. En effet, les gènes codants pour les lysozymes sont décrits comme omniprésents dans les génomes du règne animal. Tous les lysozymes partagent la capacité d'hydrolyser le PGN de la paroi cellulaire bactérienne (Callewaert and Michiels, 2010). Il clive les liaisons glycosidiques qui déstabilisent le peptidoglycane, entraînant ainsi une lyse bactérienne (Nash et al., 2006). Les bactéries Gram négatives quant à elles possèdent une membrane externe qui protège la paroi cellulaire sous-jacente du peptidoglycane et sont donc relativement résistantes au lysozyme.

La caractérisation et l'analyse du génome de la drosophile ont révélé que cet insecte possède au moins 17 gènes codants pour des lysozymes dont six gènes sont les plus exprimés au niveau intestinal (*lys-B*, *-E*, *-D*, *-P*, *-S* et *-X*) (Marra et al., 2021).

Mis à part la production des PAMs identifiés lors de l'étude transcriptionnelle citée précédemment, les auteurs ont décrit aussi l'expression d'un seul lysozyme « *lys-X* » suite à une infection orale par *Ecc15* (Buchon et al., 2009b). En revanche, il n'existe jusqu'à présent aucun outil génétique (exemple mutant de perte de fonction) permettant d'étudier l'implication de ce gène *lys-X* dans les infections microbiennes.

Aussi, très récemment, l'équipe de B. Lemaitre a généré grâce à la technique Crisper/Cas9 un mutant pour les 4 gènes des lysozymes (*lys-B*, *-E*, *-D* et *-P*) qu'ils ont appelé *LysB-P<sup>d</sup>* (Marra et al., 2021). En utilisant ce mutant *LysB-P<sup>d</sup>*, Marra et collaborateurs ont identifié une augmentation de la présence des espèces *Lactobacillus* (Gram positive) et des espèces *Acetobacter* (Gram négative).

Les lysozymes sont également présents chez les mammifères et ont pour fonction de limiter l'inflammation intestinale. L'étude de modèles murins développant des formes de la maladie de Crohn a récemment montré que l'inflammation intestinale est corrélée avec un défaut de sécrétions des lysozymes par les cellules de Paneth. Aussi une étude récente de Nakamura et

al. a révélé une régionalisation de la sécrétion des lysozymes qui se manifeste surtout au niveau de l'iléon (Nakamura et al., 2020)

## **6. Maintien de l'homéostasie cellulaire intestinale et régénération**

L'intestin est un organe connu pour sa forte capacité de régénération (Beumer and Clevers, 2016; Jiang et al., 2016; Weichselbaum and Klein, 2018). Tout au long de la vie d'un organisme, l'intestin est constamment renouvelé afin de maintenir son intégrité tissulaire et ses fonctions physiologiques. En effet cet organe est susceptible d'être la cible de plusieurs agressions causées soit directement par un agent infectieux, soit indirectement à la suite d'une défaillance de sa réponse immunitaire manifestée par une production continue de ROS et/ou de PAMs (Buchon et al., 2009a; Zhai et al., 2018). Pour faire face, l'épithélium intestinal doit être rapidement reconstitué via une accélération de son processus de renouvellement (Ferrandon, 2013). En effet, malgré la divergence évolutive, l'activité des CSI demeure dépendante de multiples voies de signalisation conservées telles que JAK-STAT, EGFR, Hippo et JNK (Jiang and Edgar, 2012; Karin and Clevers, 2016; Buchon et al., 2013a). Toutes ces voies de signalisation sont impliquées dans le maintien de l'homéostasie cellulaire intestinale afin de faire face aux agressions.

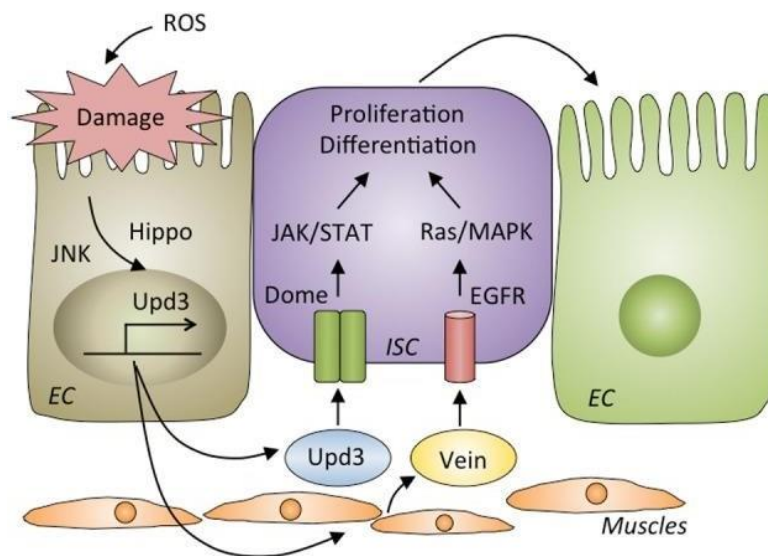
Chez la drosophile, le stress intestinal provoque le déclenchement d'un processus régénératif impliquant les voies de signalisation JNK et Hippo au niveau des entérocytes endommagés ou mourant (Shaw et al., 2010). La voie de signalisation JNK est la première voie induite. Elle est aussi activée dans les CSI afin de stimuler leur prolifération (Ren et al., 2010; Staley and Irvine, 2010). La voie de signalisation de Hippo est aussi une voie critique pour contrôler la prolifération cellulaire et l'apoptose en réponse au contact cellulaire. Elle joue ainsi un rôle très important dans la réparation intestinale et la tumorigénèse (Camargo et al., 2007; Karpowicz et al., 2010). Hippo a été identifiée à l'origine chez la drosophile comme un régulateur négatif de la taille des organes. Par la suite, elle a été décrite comme hautement conservée chez les mammifères. La voie Hippo possède la caractéristique d'inhiber le co-facteur de transcription Yorkie (Yki) responsable de la prolifération cellulaire (Creasy and Chernoff, 1995).

Certaines études ont suggéré l'existence d'un lien entre les voies JNK et Hippo. En effet la sur-activation de la voie JNK au niveau des entérocytes chez la drosophile suite à une infection orale par la bactérie *Pseudomonas entomophila* est corrélée à une augmentation de la mitose des CSI et une translocation nucléaire de la cible de la voie de signalisation Hippo (Yki) (Jiang



et al., 2009 ; Shaw et al. ; 2010). Ainsi, les lésions épithéliales chez la drosophile induisent l'activation de JNK et inhibent Hippo, entraînant la production de cytokines (Upd3) pour activer la voie JAK-STAT dans les CSI. Les ligands EGF (Vein) sont aussi impliqués dans la réponse aux stress intestinal en participant au contrôle de la prolifération des CSI et à la différenciation des EB en EC. Ainsi, suite à un stress, la forte activation des voies de signalisations JNK, JAK-STAT et EGFR dans les CSI stimule fortement leur prolifération afin de promouvoir un remplacement efficace des cellules mortes (Buchon et al., 2009 ; Shaw et al. ; 2010) (Figure 14).

De façon similaire à la drosophile, les agressions au niveau de l'épithélium intestinal de la souris activent aussi la voie JNK et inhibent la voie Hippo, entraînant une augmentation de la prolifération intestinale et de la réparation des plaies (Sancho et al., 2009; Cai et al., 2010).



**Figure 14 :** Les voies de signalisation cellulaires impliquées dans la régénération de l'épithélium intestinal chez la drosophile suite à une infection (Kuraishi et al., 2013)

## 7. La perméabilité intestinale

La perméabilité est une propriété de l'intestin lui permettant d'effectuer des échanges entre le lumen intestinal et la cavité intérieure. La perméabilité paracellulaire est définie comme étant le passage des molécules à travers les cellules (Bischoff et al., 2014). Ce passage est strictement régulé en conditions physiologiques. La perméabilité paracellulaire est essentiellement

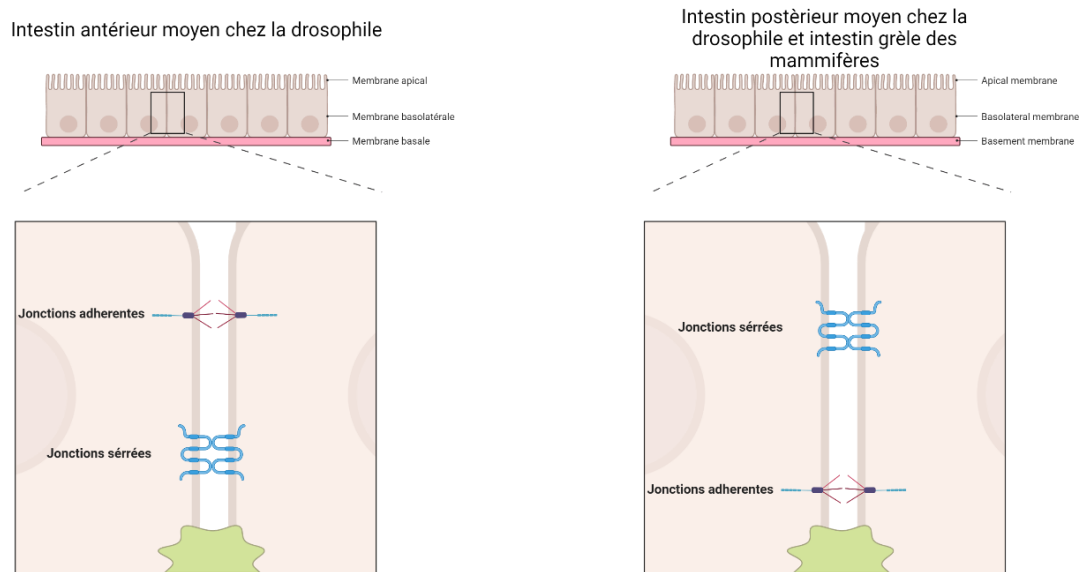
localisée au niveau de l'intestin moyen de la drosophile et l'intestin grêle des mammifères. Le contrôle de la perméabilité paracellulaire est indispensable afin d'assurer l'intégrité intestinale. Ce contrôle est assuré par la présence de différents types de jonctions cellulaires conservées. (Groschwitz & Hogan, 2009).

**Les jonctions serrées** dont l'acronyme est SJ (Septate junctions) chez la drosophile ou TJ (Tight junctions) chez les mammifères (Izumi and Furuse, 2014; Anderson and van Itallie, 2009). Chez les vertébrés comme les invertébrés, ces jonctions serrées contrôlent le flux paracellulaire de l'eau, des ions à travers l'épithélium (Turner et al., 2014). Cette étanchéité est nécessaire pour limiter l'intrusion directe dans l'organisme de molécules présentes dans la lumière intestinale.

**Les jonctions adhérentes (AJ)** représentent un complexe cadhérines- $\beta$  caténines qui assurent le maintien de la polarité cellulaire (Izumi and Furuse, 2014).

En revanche, il existe des différences au niveau de la composition protéique et la localisation de ces jonctions le long de l'intestin. En effet, chez la drosophile, les SJ dans la partie antérieure de l'intestin moyen, se trouvent du côté basal des jonctions adhérentes (AJ). Cependant, les SJ de l'intestin moyen postérieur tout comme les TJ des mammifères sont localisées du côté apical par rapport aux AJ (St Johnston and Ahringer, 2010) (Figure 15). De plus, les SJ sont formées principalement par des occludines alors que les TJ chez les mammifères sont formées par un complexe protéique (occludines, claudines, tricellulines et les junctional adhesion molecules (JAMs).

En utilisant le modèle drosophile, Izumi et collaborateurs ont montré que les altérations des SJ de l'épithélium de l'intestin moyen induisent un dysfonctionnement de la barrière intestinale et une dysplasie. Ce dérèglement homéostatique, qui se manifeste par une hypertrophie de l'épithélium intestinal et une sur-prolifération des CSI, a été corrélée une mortalité accrue (Izumi et al., 2019). Cette mortalité a été liée une infection systémique (Resnik-Docampo et al., 2018; Izumi et al., 2019).



**Figure 15: Disposition des différentes jonctions cellulaires au niveau intestinal chez la drosophile et les vertébrés**

Bonnay et ses collaborateurs ont aussi montré que la protéine Big Bang (Bbg) des jonctions serrées est nécessaire pour maintenir la fonction de barrière (Bonnay et al., 2013). Une autre étude a corrélé la perte de la protéine de SJ Snakeskin (Ssk) avec une dysbiose microbienne suivit par une perte assez rapide de la barrière intestinale et un ainsi un taux de mortalité assez important (Salazar-Jaramillo et al., 2014). Cette défaillance de la perméabilité intestinale paracellulaire a été identifiée comme aggravé par le vieillissement suite à l'augmentation du passage de macromolécules à travers l'épithélium intestinal (toxines, bactéries, fragments bactériens...) (Rera et al., 2012; Martins et al., 2018).

Des défauts de jonctions serrées chez les mammifères induit aussi une augmentation de la perméabilité intestinale et le développement de pathologies intestinales (ulcères gastro-duodénaux, diarrhées infectieuses, syndrome de l'intestin irritable, maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, maladie cœliaque, cancers digestifs) (Almoussa et al., 2018; Zeissig et al., 2007; Hering et al., 2012; Turner, 2009). À titre d'exemple, les patients atteints de la maladie de Crohn ou de la rectocolite hémorragique montrent une altération de la composition protéique des TJ (Heller et al., 2005). De plus, en utilisant le modèle murin, des études ont montré que les mutations au niveau du complexe protéique formant les TJ provoquent un

dysfonctionnement de la barrière intestinale et conduisent souvent à une défaillance intestinale (Cunningham and Turner, 2012; Su et al., 2013; Jin and Blikslager, 2016; Yoseph et al., 2016). En revanche, la surexpression de l'occludine seule prévient ces défauts de perméabilité intestinale et améliore la fonction intestinale (Marchiando et al., 2010). D'autres recherches ont aussi révélé que tout comme la drosophile, chez la souris le vieillissement favorise la rupture de la barrière intestinale, l'inflammation et ainsi la translocation des micro-organismes vers la circulation sanguine (Tran and Greenwood-Van Meerveld, 2013).

Ces résultats indiquent que les jonctions serrées sont essentielles pour l'amélioration de la physiologie intestinale et la prévention de l'inflammation et des infections systémiques permettant ainsi une extension de la durée de vie.

## **Chapitre VI : Réponse systémique face aux agressions par des pathogènes entériques**

Une fois que la barrière intestinale est franchie, les pathogènes ainsi que les espèces du microbiote peuvent se trouver libres dans le système circulant. Ce système circulant contrairement au tube digestif est stérile et détient une réponse immunitaire systémique. Afin de préserver l'intégrité et la survie de l'individu, les réponses systémique et locale coopèrent ensemble. Cette coopération se manifeste par le recrutement de cellules spécialisées circulantes (exemple les phagocytes) et le déclenchement de voies immunitaires humorales entraînant ainsi l'éradication du pathogène. L'orchestration des deux types d'immunité innée et la communication directe ou indirecte des différents types cellulaires contribuent à une meilleure protection de l'hôte contre les infections d'origine microbienne.

### **1. La réponse cellulaire**

Chez la drosophile comme les mammifères, les cellules du système immunitaire proviennent des cellules hématopoïétiques (Marmaras and Lampropoulou, 2009; Turvey and Broide, 2010). Les cellules hématopoïétiques sont des précurseurs pluripotents qui vont proliférer puis se différencier en cellules spécialisées. Alors que chez les vertébrés de nombreux types cellulaires sanguins coexistent, chez la drosophile, il existe seulement trois types de cellules sanguines matures qui sont apparentées aux cellules myéloïdes des mammifères.

Chez les mammifères, les cellules hématopoïétiques sont divisées en deux types de lignages : on trouve d'une part les granulocytes et monocytes qui sont générés à partir de progéniteurs myéloïdes et forment le lignage myéloïde alors que les lymphocytes T, B et NK (Natural Killer) sont générés à partir des progéniteurs lymphoïdes et forment le lignage lymphoïde (Smith et al., 2003; Beutler, 2004; Turvey and Broide, 2010).

Vu la complexité des modèles cellulaires chez les mammifères, je me focaliserai dans la suite de cette section uniquement sur les cellules monocytes/macrophages (dérivent de la différenciation des monocytes) et dont leur fonction est assurée par des cellules immunitaires analogues chez la drosophile (hémocytes/plasmocytes).

Depuis longtemps on a considéré les monocytes mammifères comme des cellules circulantes capables de migrer vers les différents organes où elles se différencient en macrophages. Des données récentes ont été associées à la subsistance d'incohérences dans ce modèle préexistant et ont poussé les chercheurs à émettre de nouvelles hypothèses quant à l'origine des macrophages. En effet, certaines études ont montré l'existence d'une autre lignée indépendante de cellules sanguines qui donne naissance à la majorité des macrophages résidant au niveau des différents organes. Cette lignée indépendante dérive des progéniteurs érythro-myéloïdes qui proviennent du sac vitellin embryonnaire et mûrissent dans le foie fœtal, puis colonisent les différents organes, donnant lieu à des populations locales de macrophages. Les macrophages (circulants et résidents) sont considérés comme les acteurs majeurs de l'immunité innée. Ils remplissent des fonctions fondamentales comme la défense de l'hôte, la réparation, l'homéostasie tissulaires. En effet, ces cellules sont caractérisées par leur capacité à phagocyter (les micro-organismes ou les cellules en apoptose) et à produire des cytokines (Beutler, 2004; Censoplano et al., 2014). Tout comme les cellules épithéliales, les macrophages possèdent aussi des PRR (dont les TLR et les NLR) (**se référer aux sections V/ 4.2 et 4.3**) capables de reconnaître les microbes et ainsi d'activer des réponses humorales par la production des cytokines ou de PAMs. De plus, chez les mammifères, les macrophages ont la particularité de jouer un rôle d'intermédiaire entre l'immunité innée et l'immunité adaptative (Owen and Mohamadzadeh, 2013).

Chez les insectes, notamment la drosophile, les cellules homologues des monocytes sont des hémocytes (Marmaras and Lampropoulou, 2009). Ils ont des activités diverses et leur fonction dépend du stade de développement de l'insecte (Feldhaar and Gross, 2008). Chez la drosophile, les hémocytes ne se développent qu'au stade embryonnaire et larvaire et persistent tout au long du cycle biologique (Sampson et al., 2013). Tout comme les mammifères, chez la drosophile, il existe deux lignées indépendantes d'hémocytes : celles décrites comme circulant et qui dérivent essentiellement des tissus hématopoïétiques dans lesquels ils se divisent et se différencient (Jung et al., 2005; Banerjee et al., 2019). Mais on trouve aussi d'autres hémocytes nommés résidents qui se trouve fixés à la surface de certains organes. Ils assurent aussi une fonction immunitaire de l'embryon à l'adulte, (Defaye et al., 2009; Zaidman-Rémy et al., 2012). Aussi, il a été montré qu'en cas d'infection intestinale, le nombre des hémocytes se retrouve enrichie au niveau de l'intestin moyen, afin d'apporter une réponse immunitaire complémentaire à la réponse locale et ainsi empêcher la propagation de l'infection (Ayyaz et

al., 2015; Charroux and Royet, 2009). Ces deux lignées d'hémocytes (circulant et résident) donnent naissance aux mêmes types de cellules circulantes et qui sont classées en trois catégories :

- Les plasmocytes : représentent plus de 90 % des cellules immunitaires. Ce sont des cellules très mobiles et ressemblant aux macrophages des vertébrés (Feldhaar and Gross, 2008). Elles se présentent comme les principales cellules phagocytaires chez la drosophile. Les plasmocytes participent aussi à la réponse humorale à différents niveaux. D'une part, ils sont eux-mêmes capables de sécréter des PAMs (Cecropine A1, Drosomycine et Dipterisine). D'autre part, ils sont impliqués dans la sécrétion de la cytokine Unpaired3 (Upd3) et du ligand Spätzle (Spz) qui vont activer respectivement les voies de signalisation Jak-stat et Toll au niveau du corps gras et ainsi favoriser la sécrétion de PAMs par ce dernier (Agaisse and Perrimon, 2004; Shia et al., 2009). Chez les invertébrés, les plasmocytes remplissent donc les mêmes fonctions immunitaires innées des macrophages vertébrés.
- Les cellules à cristaux : représentent presque 5% des cellules immunitaires. Elles interviennent dans la coagulation et la cicatrisation des plaies grâce à la mélanisation médiée par la prophénoloxydase (PPO) (Hillyer, 2016).
- Les lamellocytes sont impliquées dans l'encapsulation. Elles sont les analogues aux granulocytes chez les vertébrés (Banerjee et al., 2019).

## **2. La phagocytose**

La phagocytose est un processus évolutive essentiel dans la défense immunitaire (Beutler, 2004). C'est le processus par lequel les cellules phagocytaires internalisent diverses cibles. Elle implique en premier une reconnaissance des organismes étrangers ou des cellules apoptotiques par des récepteurs exprimés à la surface des cellules phagocytaires comme les macrophages (chez les vertébrés) et les plasmocytes (chez la drosophile) (Flannagan et al., 2012; Rosales and Uribe-Querol, 2017; Dunn et al., 2018). Cette reconnaissance permet à la cellule phagocytaire d'envelopper l'agent pathogène ou la cellule apoptotique par la formation d'une membrane plasmatique permettant la formation des lamellipodes. Cette structure représente le phagosome dans lequel est enfermée la proie (Feldhaar and Gross, 2008). Afin d'assurer la digestion de la proie internalisée, la phagocytose nécessite un processus de maturation du phagosome qui se produit suite à des échanges avec d'autres compartiments cellulaires (endosomes, lysosomes).

Ces échanges vont permettre notamment l'acidification et l'apport d'enzymes lytiques et la formation de phagolysosome qui assurera une destruction optimale des proies.

Deux études menées récemment sur des drosophiles déplétées en phagocytes ont montré que ceux-ci prévenaient le développement d'infections bactériennes lors de la métamorphose (Charroux and Royet, 2009) et jouaient un rôle prépondérant dans la survie aux infections par certaines bactéries, telles que *Staphylococcus aureus* (Defaye et al., 2009). Ils semblent également prendre part à la communication entre les organes impliqués dans la réponse immunitaire.

### **3. La réponse humorale**

Si le processus de phagocytose ne permet pas d'éliminer les microorganismes envahissants, comme mentionné auparavant, les cellules immunitaires (invertébrés et vertébrés) assurent aussi une réponse humorale par la production des PAMs ou de cytokines. Chez les insectes, cette réponse humorale est en majorité assurée par le corps gras (l'équivalent fonctionnel du foie des mammifères). En effet, chez la drosophile et suite à une infection, les transcrits des PAMs passent d'une concentration initiale à peine détectable dans les cellules du corps gras à des niveaux très élevés. En réponse systémique, les deux voies immunitaires Toll et Imd induisent préférentiellement des PAMs en fonction du type de microbes : ainsi, la voie Toll répond aux infections par des champignons et des bactéries Gram-positif, et induit en particulier la production de Drosomycines. Alors que la voie Imd répond particulièrement aux bactéries Gram-négatif (Lemaitre et al., 1996, 1995) (**Tableau 2**). Chez la drosophile, la production systémique des PAMs obéit aux mêmes mécanismes de reconnaissance du pathogène, activation des cascades de signalisation et sécrétion des PAMs détaillées précédemment (**se référer aux sections V/ 4.3 et V/ 5**).

Dans la suite de cette partie, je vous présenterai les différentes voies de signalisation conservées entre les vertébrés et la drosophile

#### **3.1. Les voies Toll et TLR**

La voie Toll a d'abord été décrite chez la drosophile comme une voie vitale dans le processus d'embryogenèse par son implication dans le développement de l'axe dorso-ventral. Ensuite, les travaux de Lemaitre ont permis de l'identifier comme une voie immunitaire essentielle chez la

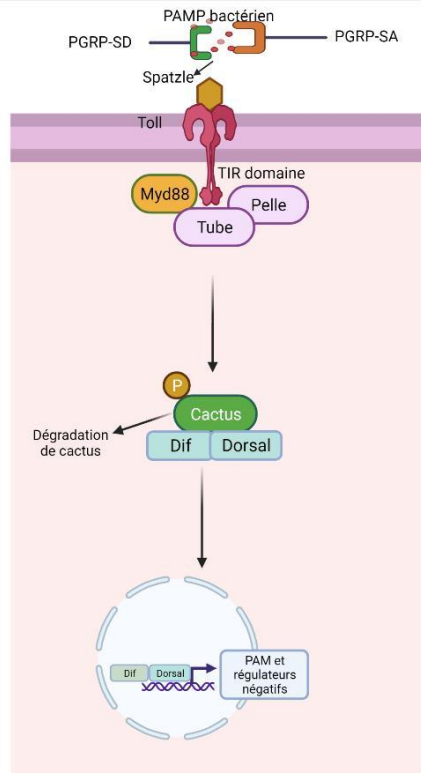
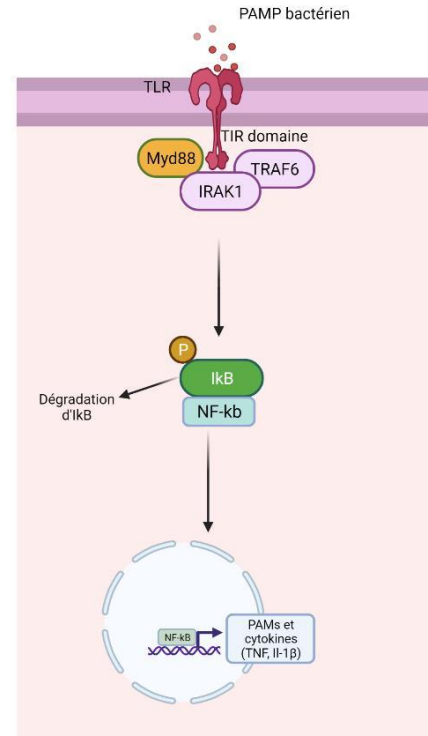


drosophile, lui permettent de produire des PAMs afin de combattre les infections fongiques et bactériennes à Gram-positif (Lemaitre et al., 1996). Ces travaux ont permis l'identification de son homologue fonctionnelle chez les mammifères, la voie TLR. En revanche, cette voie TLR n'est décrite impliquée que dans des processus immunitaires en produisant des PAMs ou des cytokines. Chez les mammifères, la production des cytokines entraîne l'activation des lymphocytes T, liant ainsi les réponses immunitaires innées aux réponses immunitaires adaptatives des mammifères (Akira et al., 2006).

Lors de l'activation des récepteurs Toll et TLR, une cascade de signalisation presque similaire est initiée chez la drosophile et les mammifères aboutissant à l'activation de facteurs de transcription homologues : la famille des NF- $\kappa$ B chez les mammifères et le dimère Dorsal/Dif chez les insectes. La différence majeure entre ces cascades se trouve au moment de l'initiation. En effet, l'activation de la voie TLR chez les mammifères se produit directement par la liaison d'un PAMP microbien à son récepteur TLR spécifique, alors que l'invasion microbienne, chez la drosophile, induit une activation indirecte du récepteur Toll. En effet, le PAMP est reconnu par le complexe extracellulaire PGRP-SA et -SD. Cette reconnaissance induit l'activation d'une protéine cystique appelée Spätzle qui peut se lier aux récepteurs Toll (Govind, 2008).

Lors de l'activation de Toll par Spätzle, la protéine de la réponse primaire de différenciation myéloïde de la protéine adaptatrice (MyD88) est recrutée par le domaine TIR intracellulaire du récepteur Toll. Un complexe hétéro-trimérique est formé avec MyD88, la kinase Pelle et la protéine Tube. À la suite de l'activation de Pelle, la protéine inhibitrice Cactus est phosphorylée et dégradée. Dans sa forme active, Cactus est lié aux facteurs de transcription Dif et Dorsal et les séquestre dans le cytoplasme. Par conséquent, lors de la dégradation de Cactus, Dorsal et Dif sont libres de se déplacer vers le noyau, entraînant la transcription des gènes codant pour les PAMs (Valanne et al., 2011a) (Figure 16A).

Un processus très similaire se produit dans la signalisation TLR chez les mammifères. La reconnaissance d'un PAMP par son récepteur spécifique TLR, induite le recrutement par le domaine TIR de MyD88 (homologue la MyD88 chez la drosophile). Cela initie le recrutement des kinases IRAK et TRAF qui sont les homologues de Pelle et Tube chez la drosophile. L'activation des kinases entraîne la phosphorylation et la dégradation de I- $\kappa$  $\beta$ , qui est homologue de Cactus chez la drosophile, initiant ainsi la translocation de NF- $\kappa$ B (homologue à Dif et Dorsal chez la drosophile) au noyau pour l'activation de la transcription de gènes codant cytokines et PAMs (Govind, 2008)(Figure 16B).

**A****B**

**Figure 16 : Conservation des voies immunitaires (A) Toll chez la drosophile (B) TLR chez les mammifères**

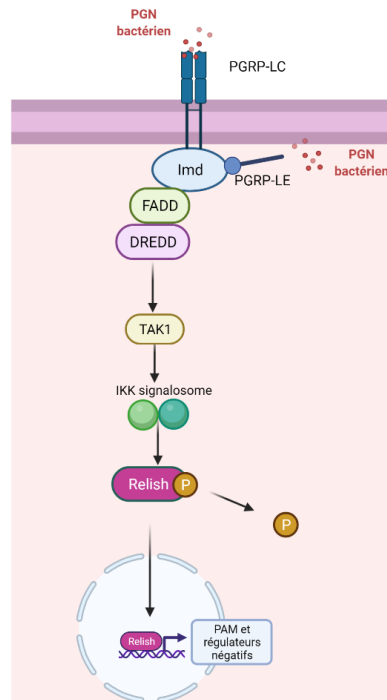
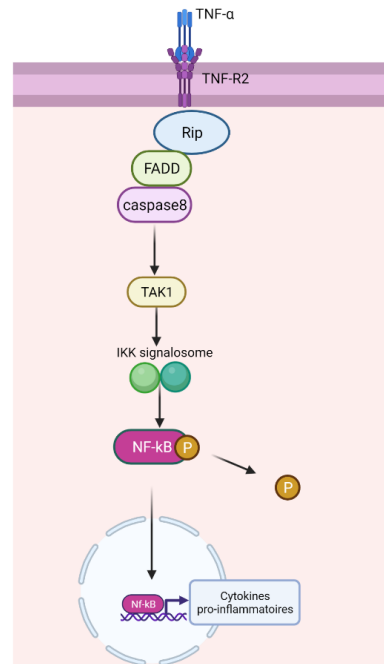
### 3.2. Les voies Imd et TNF

Chez la drosophile, la voie Imd est initiée par la liaison du PGN à ces récepteur PGRP-LC et/ou -LE tandis que chez les mammifères, la voie TNF- $\alpha$  est initiée par la liaison de la cytokine TNF- $\alpha$  à son récepteur TNFR1 (tumeur necrosis factor- $\alpha$  receptor).

La reconnaissance du PAMP chez la drosophile entraîne le recrutement d'Imd, de la protéine adaptatrice dFADD et de DREDD pour former un complexe (Leulier et al., 2002, 2000) qui participerait ensuite à l'activation de la kinase TAK1 (Transforming growth factor $\beta$ -Activated Kinase 1) (Zhou et al., 2008). Un complexe formé de TAK1 et de la protéine adaptatrice TAB2 (TAK1-Binding Protein 2) est ensuite requis pour l'activation du complexe IKK (IkappaB Kinase). Ce complexe est formé de deux sous-unités régulatrices IKKg et deux sous-unités

catalytiques IKK $\beta$  (Rutschmann et al., 2000). La cible de la voie Imd est le facteur de transcription Relish dont la structure est similaire aux protéines p100 et p105 des mammifères (précurseurs des sous-unités p52 et p50 du facteur de transcription NF- $\kappa$ B). En absence d'infection, Relish est retenu dans le cytoplasme par son propre domaine inhibiteur. La phosphorylation de Relish par le complexe IKK est requise préalablement à son clivage. Relish peut se déplacer dans le noyau afin d'activer les gènes des PAMs dirigés contre les bactéries Gram-négatifs (Stöven et al., 2000). (Figure 17A).

Nous pouvons noter ici que l'expression des peptides antimicrobiens au niveau locale et systémique ne contrôle pas les mêmes pathogènes. Au niveau local, l'activation de la voie Imd permet de cibler les bactérie Gram-positif et Gram-négatif alors qu'en systémique elle ne cible que les Gram-négatif. Ceci démontre l'existence de mécanismes de régulation différents pour l'induction des PAMs en fonction du tissu concerné (Tingvall et al., 2001; Tzou et al., 2000). La signalisation intracytoplasmique de la voie Imd présente de nombreuses similitudes avec la voie du récepteur du TNF des mammifères. Chez les mammifères, la voies TNF est impliquée dans la production de cytokines pro-inflammatoires ainsi que dans les voies de survie cellulaire et d'apoptose, reliant donc également les réponses immunitaires innées aux réponses adaptatives (Legarda et al., 2016). Chez les mammifères, l'activation du récepteur TNFR1 initie le recrutement de RIP, FADD et caspase 8 qui sont les homologues respectifs chez la drosophile d'Imd, dFADD et DREDD. La formation du complexe RIPP/FADD/caspase 8 active TAK1. TAK1 active le complexe IKK qui phosphoryle et dégrade la protéine inhibitrice I $\kappa$ B. Lors de la dégradation de I $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B est libéré pour la translocation vers le noyau (Myllymäki et al., 2014) (Figure 17B).

**A****B**

**Figure 17: Conservation des voies immunitaires (A) Imd chez la drosophile (B) TNF- $\alpha$  chez les mammifères**

### 3.3. Coopération entre les voie immunitaire Toll et Imd en réponse systémique chez la drosophile

En réponse systémique, les voies Imd et Toll peuvent coopérer pour induire l'expression de divers gènes cibles. Ce mode de régulation a en effet été mis en évidence par l'utilisation de mutants simples des gènes *relish*, *spätzle* et *toll* et des doubles mutants *relish*, *spätzle* et *relish*, *toll* chez la drosophile. Cette approche génétique a montré l'implication des deux voies Toll et Imd dans la résistance contre les bactéries Gram-négatif et confirmé le fait que la voie Toll est plus impliquée face aux bactéries Gram-positif. Cette étude a mis aussi en évidence que l'expression d'une majorité des PAMs à savoir Metchnikowine, Attacine et Drosomycine résultent de l'intervention des deux voies (de Gregorio et al., 2002).

Des expériences de co-immunoprécipitation ont par ailleurs montré que des dimères Relish/Dif et Relish/Dorsal se forment spontanément chez la drosophile. Ces dimères peuvent se fixer sur des sites NF- $\kappa$ B spécifiques, et induire l'expression de gènes immunitaires tels que celui codant pour la Drosomycine (Tanji et al., 2010).

# **Travaux de thèse**

## Objectifs de la thèse

L'application intensive à long terme des pesticides chimiques a entraîné une accumulation de leurs résidus dans les aliments et l'environnement. Ces produits synthétiques présentent des effets néfastes sur la santé humaine et l'écosystèmes. Par conséquent, l'application de biopesticides (substances ou organismes naturels) dans les secteurs agricoles a été fortement encouragée afin de diminuer le recours aux pesticides chimiques. C'est dans ce cadre que se situe le concept 'One Health' (une seule santé) créé au début des années 2000. Ce concept représente un mouvement qui reconnaît les liens entre l'homme, les animaux et l'environnement. Il favorise entre autres la coordination de ses trois composantes pour mieux comprendre et gérer les risques. En améliorant cette compréhension, il vise notamment à mieux affronter les maladies émergentes. Mon projet de thèse se situe dans ce contexte et est centré sur l'identification des risques liée à l'utilisation des bioinsecticides à base de spores de *Bacillus thuringiensis*, sur des organismes non-cibles.

*Bt* a été considéré pendant longtemps comme non pathogène pour les mammifères. Cette croyance repose sur les résultats de quelques études qui utilisaient des rongeurs ou simulaient les conditions intestinales (*in vitro*) afin d'investiguer si les spores de *Bt* sont liées ou non à des intoxications alimentaires. Ils ont conclu que la physiologie intestinale des mammifères ne permettait potentiellement pas la germination des spores de *Bt* ni la production de facteurs de virulence (notamment les entérotoxines Hbl, CytK et Nhe) (Ceuppens et al., 2012a, 2012b). Cependant, l'accroissement actuel de l'utilisation de *Bt* en agriculture biologique et conventionnelle augmente sa présence dans l'environnement et dans l'alimentation. Il est donc essentiel de se questionner sur l'innocuité de *Bt* pour les organismes non-cible. En effet, *Bt* est une bactérie Gram-positif appartenant au groupe *B. cereus*. Ce groupe est aussi représenté par l'espèce *Bc sensu stricto* (*Bc ss*), est décrit comme la troisième cause d'intoxication alimentaire collective (TIAC) en Europe et la deuxième en France. Très récemment, *Bt* a, à son tour, été décrit comme potentiellement impliqué dans des toxi-infections alimentaires collectives (Johler et al., 2018; Bonis et al., 2021). De plus, son implication dans des TIAC est sans doute sous-estimée car les tests microbiologiques permettant la discrimination de *Bt* et de *Bc ss* ne sont pas réalisés en routine.

*Bc ss* et *Bt* sont des bactéries opportunistes pouvant pénétrer dans le corps de l'individu soit par ingestion avec la nourriture, ou bien suite à une piqûre ou une blessure. La réponse immunitaire

innée, conservée dans le règne animal, représente la première barrière de défense contre les agresseurs. Lorsque ce système immunitaire innée est défaillant, la bactérie opportuniste devient alors pathogène et provoque ainsi des complications plus sévères conduisant parfois jusqu'à la mort de l'individu.

En utilisant le modèle *Drosophila melanogaster* (un organisme non-cible de *Bt*), nous avons démontré que les cellules végétatives de *Bt* étaient rapidement éliminées de l'intestin grâce à l'activation de mécanismes de défense localisée dans la région antérieure de l'intestin moyen. Cette réponse se résume principalement par une production rapide des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et l'apparition de spasmes viscéraux permettant d'expulser les germes (Benguettat et al., 2018). Cependant, des études disparates ont suggéré que *Bt*, sous sa forme résistante de spores, pouvaient persister dans les intestins des humains et des rongeurs (Oliviera-Filho et al., 2009, Wilcks et al., 2006; Jensen et al., 2002). **En utilisant deux modèles de laboratoire à savoir *Drosophila melanogaster* (un modèle invertébré utilisé pour mimer ce qui se passe au niveau environnemental mais aussi reconnue pour sa réponse immunitaire innée conservée au cours de l'évolution) et la souris (un modèle mammifère permettant de se rapprocher de la santé humaine), mon projet de thèse vise dans un premier temps à comprendre le devenir et le comportement des spores de *Bt/Bc ss* dans l'intestin. Dans un second, mon projet s'est attaché à décortiquer le rôle joué par la réponse immunitaire innée face à l'infection par des spores. Enfin, je me suis aussi impliquée dans un projet visant à caractériser la virulence d'un panel de souches de *Bt* et *Bc ss* issues de TIAC sur le modèle d'étude *Drosophila melanogaster*.**

# Résultats

## **Chapitre I. L'évasion des spores du groupe *B. cereus* aux réponses immunitaires innées locales permet leur persistance au niveau intestinal**

### **1. Résumé**

Depuis plusieurs années, le monde de l'agriculture a commencé à évoluer et tente de réduire l'utilisation massive des pesticides chimiques en faveur des biopesticides. La bactérie sporulante *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) est le biopesticide le plus commercialisé pour lutter contre les larves des lépidoptères, gros ravageurs des cultures. *Bt* est commercialisée sous sa forme spores plus cristaux de toxines Cry entomopathogènes. Lors de l'ingestion des spores de *Bt*, les insectes cibles meurent par septicémie en 2-3 jours. L'efficacité des produits *Bt* fait que leur utilisation agricole est croissante. Ceci engendre une augmentation de leur dispersion environnementale et soulève la question de leurs risques potentiels sur les organismes non-cibles. *Bt*, tout comme l'espèce *Bc sensu stricto* (*Bc ss*), appartient au groupe *B. cereus* décrit comme la troisième cause d'intoxication alimentaire collective (TIAC) en Europe et la deuxième en France

Afin d'identifier l'implication de *Bt* dans les épisodes d'intoxications alimentaires, il faut étudier en premier lieu le devenir des spores au niveau intestinal. Dans ce contexte, des études disparates avaient suggéré que *Bt*, sous sa forme résistante (spores), pouvait persister longtemps dans l'intestins des mammifères (Oliviera-Filho et al., 2009, Wilcks et al., 2008, Jensen et al., 2002). En revanche cette persistance n'a jamais été corrélé avec un potentiel de pathogénicité.

**Dans le cadre de mon projet de thèse, je me suis focalisée sur l'étude du comportement des spores de *Bt* et de *Bc ss* dans l'intestin des organismes non-cibles à savoir la drosophile et la souris.**

J'ai tout d'abord débuté l'étude avec le modèle *Drosophila melanogaster*. Cet organisme invertébré ne présente aucun enjeu éthique permettant ainsi d'étudier finement le comportement des spores chez un organisme modèle. Au cours de mes travaux, les drosophiles ont été



contaminées par voie orale selon deux modes : continue et aiguë afin de suivre la présence de *Bt/Bc ss* dans l'intestin moyen.

En utilisant le mode de contamination continue, qui consiste à déposer les spores sur le milieu nutritif et laisser les drosophiles en contact continu jusqu'au moment de la dissection, j'ai montré que les spores *Bt/Bc ss* persistaient au moins 30 jours dans l'intestin de la drosophile. Cependant, j'ai aussi observé que les spores germent sur le milieu nutritionnel à partir du 4<sup>ème</sup> jour, faussant ainsi l'interprétation. De plus, ce mode de contamination ne permettait pas d'affirmer de la persistance du germe car les drosophiles étaient en contact continu avec les spores et les bactéries végétatives. Pour contourner ces problèmes, j'ai utilisé le mode de contamination aiguë qui consiste à laisser les drosophiles en contact avec les spores pendant 30 minutes seulement (une seule prise alimentaire contaminée) puis de les transférer sur un milieu nutritif stérile jusqu'au moment de la dissection. Ainsi, j'ai pu montrer que *Bt* et *Bc ss* sont capables de persister au moins 10 jours dans l'intestin des drosophiles.

En se basant sur les données obtenues avec la drosophile et vu les enjeux éthiques qui entourent l'utilisation du modèle murin, j'ai choisi d'utiliser uniquement les spores de *Bt* pour l'étude chez la souris. Une ingestion unique par gavage avec la dose  $10^8$  spores/souris a été réalisée. J'ai ainsi montré une persistance de *Bt* au niveau de l'intestin grêle des souris et ce au moins 5 à 10 jours post gavage. Cette persistance a été aussi associée avec une forte diarrhée. La survenue de diarrhée (tant chez la drosophile que chez la souris) suggérait que les spores étaient capables de germer dans l'intestin des organismes non-cibles et d'y produire des entérotoxines responsables des désagréments intestinaux.

J'ai donc étudié l'éventuelle germination des spores dans l'intestin des organismes non-cibles. Pour cela, j'ai généré des spores fluorescentes rouges et qui une fois germées (bactéries végétatives) fluorescent en vert (elles expriment la GFP). En utilisant cet outil, j'ai montré que les spores de *Bt* et de *Bc ss* germent préférentiellement dans la région postérieure de l'intestin moyen/grêle (jéjunum et iléon) des deux modèles étudiés. J'ai ainsi confirmé que les spores de *Bt/Bc ss* présentent un comportement différent des bactéries végétatives au niveau intestinal, les bactéries végétatives étant rapidement éliminées grâce à l'activation des mécanismes de défenses locales. Je me suis penchée par la suite, sur du rôle joué par la réponse immunitaire innée suite à l'ingestion des spores de *Bt/Bc ss*.

Pour des raisons éthiques et vu que les mécanismes de défense innée sont en grande partie conservée chez les deux modèles (drosophile et souris), la suite de travaux de ma thèse sur

l'implication des défenses immunitaires innées a été principalement effectuée chez la drosophile.

J'ai montré en premier lieu, que les spores ne déclenchaient aucune réponse immunitaire (ni ROS, ni peptides antimicrobiens - PAMs) au niveau de l'intestin moyen antérieur, région décrite pour être le siège de la réponse immunitaire locale. En revanche, j'ai pu observer une induction significative des amidases. Ces amidases sont décrites comme des régulateurs négatifs de la voie immunitaire locale Imd et sont sécrétées principalement au niveau de l'intestin moyen postérieur. Mes données suggéraient qu'en absence de réponse immunitaire innée dans l'intestin moyen antérieur, les spores ne sont pas éliminées et peuvent atteindre la partie postérieure de l'intestin moyen où elles germent et induisent la production d'amidases par les cellules intestinales.

Pour comprendre l'implication des PAMs et des amidases dans la persistance des spores, j'ai utilisé des drosophiles mutantes pour ces deux effecteurs immunitaires. Les résultats obtenus avec deux mutants invalidés pour 10 et 14 PAMs ( $AMPs^{\Delta 10}$  et  $AMPs^{\Delta 14}$ ) montraient que leur absence favorise la persistance de *Bt* au niveau intestinal. A l'inverse, l'absence des régulateurs négatifs de la voies Imd, les amidases PGRP-SC1/2 ou PGRP-LB, a montré une diminution marquée de la charge en *Bt* au niveau de l'intestin moyen. En revanche, la surexpression spécifique de PGRP-SC2 au niveau intestinal augmentait la quantité de *Bt* dans l'intestin à un niveau équivalent de celui observé avec les mutants  $AMPs^{\Delta 10}$  et  $AMPs^{\Delta 14}$ . On a donc conclu que les spores qui germent dans les parties postérieures contournent la réponse immunitaire locale en favorisant la production des amidases. Ces régulateurs négatifs, en retour, restreignent l'activation de la voie Imd et empêchent ainsi la production des PAMs. Ceci promeut la persistance de *Bt/Bc ss* dans l'intestin.

L'outil spore que j'ai à disposition m'a permis de décortiquer pour la première fois les mécanismes des voies de signalisations immunitaires spécifiquement localisés dans la partie postérieure de l'intestin moyen de drosophile. J'ai commencé mon investigation par l'utilisation de différents mutants de la voie Imd décrite comme la principale voie immunitaire au niveau de l'intestin moyen. J'ai reconfirmé les résultats de Bosco-Drayon *et al.* qui montrent que le principal récepteur de la région postérieur est bien PGRP-LE. Son absence induit une diminution de la présence de *Bt* dans l'intestin. Aussi, j'ai montré que l'absence des cofacteurs Imd et Dredd induisait de façon similaire une diminution de la quantité de *Bt*. Mais à notre plus grande surprise, le facteur de transcription Relish, décrit jusqu'à présent comme le seul

impliqué au niveau intestinal en aval de la voie Imd, ne semble pas intervenir dans notre système : son absence n'affecte pas la présence de *Bt*. J'ai alors voulu investiguer d'autres facteurs de transcription impliquant l'autre voie immunitaire systémique, Toll. En utilisant un mutant perte de fonction pour le facteur de transcription Dif (en aval de la voie Toll), j'ai trouvé que la présence de *Bt* a tendance à diminuer comme avec les mutants *PGRP-LE*, *imd*, *Dredd*, *PGRP-SCI/2* et *PGRP-LB*. Ces résultats m'ont poussé à étudier d'autres composantes de la voie Toll à savoir le co-facteur Myd88 et Toll. À notre grande surprise le mutant perte de fonction de *Myd88* ou l'inhibition spécifique de *Toll* dans l'intestin provoque aussi une diminution de la présence de *Bt*.

Pour résumer, mes résultats montrent que contrairement aux bactéries végétatives, les spores du groupe *Bacillus cereus* sont capables de persister plusieurs jours dans l'intestin de leurs hôtes. Cette persistance est due au fait que les spores passent la région antérieure de l'intestin sans déclencher de mécanismes de défense (production de ROS et de PAMs, spasmes viscéraux). Une fois arrivées dans la région postérieure, elles germent en bactéries végétatives. Ces cellules végétatives contiennent du PGN à leur surface ce qui va déclencher une réponse immunitaire aboutissant à la production d'amidases, régulateurs négatifs de la voie Imd. La conséquence est que l'expression basale des PAMs (qui permet en outre l'équilibre de la flore commensale) est réduite, favorisant la persistance des formes végétatives de *Bc/Bt*. Mes travaux montrent aussi pour la première fois une éventuelle coopération entre les deux voies immunitaires Imd et Toll au niveau de l'intestin moyen postérieure chez la drosophile.

Enfin, en utilisant le modèle murin, j'ai pu identifier pour la première fois la conservation de l'expression localisée de l'amidase PGYPLP2 au niveau intestinal. En effet, suite à l'ingestion des spores de *Bt*, l'amidase murine semble être produite plutôt au niveau des parties postérieures de l'intestin grêle (le Jéjunum et l'Iléon).

## 2. Article : Hachfi et al., (under submission)

### ***Bacillus cereus* spores escape local immune defenses of the gut to favor their intestinal persistence**

Salma Hachfi<sup>1,2</sup>, Alexandra Brun-Barale<sup>1</sup>, Patrick Munro<sup>2</sup>, Marie-Paule Nawrot-Esposito<sup>1</sup>, Gregory Michel<sup>2</sup>, Arnaud Fichant<sup>1,3</sup>, Mathilde Bonis<sup>3</sup>, Laurent Boyer<sup>2,\*</sup> and Armel Gallet<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Université Côte d'Azur, CNRS, INRA, ISA, France

<sup>2</sup>Université Côte d'Azur, Inserm, C3M, Nice, France

<sup>3</sup>Anses (Laboratoire de Sécurité des Aliments), Université Paris-Est, France

\*Correspondence: **L. Boyer** ([Laurent.BOYER@univ-cotedazur.fr](mailto:Laurent.BOYER@univ-cotedazur.fr)), INSERM U1065, C3M, Bâtiment Universitaire ARCHIMED, 151 route Saint Antoine de Ginestière, BP 2 3194, 06204 NICE CEDEX 3 & **A. Gallet** ([Armel.GALLET@univ-cotedazur.fr](mailto:Armel.GALLET@univ-cotedazur.fr)), ISA, 400 route des Chappes, BP 167, 06903 Sophia Antipolis Cedex, France

#### **ABSTRACT**

Members of the *Bacillus cereus* group are spore-forming organisms commonly associated with food poisoning and intestinal infections. The capacity of these bacteria to form highly resistant dormant entities, called spores, enables them to survive extreme conditions. Here, we characterize a new mechanism by which spores persist in the gastrointestinal tract of both *Drosophila* and mouse. We have shown that bacteria of the *B. cereus* group are able to persist for at least 10 days in the intestines when ingested as spores. This persistence was correlated in the *Drosophila* midgut with the spore ability to escape the immune response in the anterior midgut and the acidic pH of the central the midgut. Once in the posterior midgut, spores are able to give birth to the vegetative cells. Similarly in mice, spores survive the acidic pH of the stomach and further reach the jejunum and the ileum where they germinate. Our findings further showed that both Imd and Toll immune pathways cooperate in the *Drosophila* posterior midgut by inducing the expression of amidases in response to spore infection. Amidases, which are negative regulators of the Imd and Toll immune pathways, dampen the immune response, promoting the bacterial persistence.

Keywords: Intestine; *Bacillus* spores; Innate immunity, *Drosophila*, Mice

## INTRODUCTION

Organisms are subjected to various environmental stresses including starvation, temperature variation, chemicals, and surrounding microbes. Healthy individuals can overcome these insults by engaging defense mechanisms to maintain their physiological equilibrium, named homeostasis. Among the different stressors, opportunistic enteric bacteria become pathogenic when host defenses are diminished to penetrate within the body upon food ingestion.

The evolutionarily conserved innate immune system is the first line of defense against bacteria and adult *Drosophila* has proven to be a powerful model for innate immunity studies (Capo et al., 2019). In the midgut, the local innate immune system is mainly mounted in the anterior parts (Capo et al., 2019; Royet and Charroux, 2013). First, anterior enterocytes can rapidly sense the presence of allochthonous (i.e., non-commensal) bacteria and secrete reactive oxygen species (ROS) in a DUOX-dependent manner to block bacterial proliferation (Benguettat et al., 2018; Kim and Lee, 2014). Concomitantly, luminal ROS are perceived by a subpopulation of anterior enteroendocrine cells that respond by releasing the DH31/CGRP neuropeptide, which promotes visceral muscles spasms to provoke the rapid expulsion of bacteria (Benguettat et al., 2018). During their passage in the anterior midgut, allochthonous bacteria release peptidoglycan (PGN), a bacterial cell wall component that binds to the immune receptors PGRP-LC and PGRP-LE (Bosco-Drayon et al., 2012). Consequently, the IMD/NF- $\kappa$ B pathway is activated, leading to the expression of anti-microbial peptides (AMPs) (Bonfini et al., 2016; Buchon et al., 2009b). Altogether, these combined means of defense allow the rapid elimination of the allochthonous bacteria and the survival of the individual (Benguettat et al., 2018; Bosco-Drayon et al., 2012; Loudhaief et al., 2017).

However, the detection of bacterial spores by the local innate immune system of the intestine and their elimination remains challenging. Indeed, spores can resist many biological, chemical, or physical treatments (Ehling-Schulz et al., 2019; Setlow, 2014). Among opportunistic bacteria, the widespread environmental spore-forming bacteria belonging to the *Bacillus cereus* (*Bc*) group are well-known worldwide food-poisoning pathogens causing diarrheal and/or emetic-type illnesses. *Bc* is the second most important cause of foodborne outbreaks (FBO) in France after *Staphylococcus aureus* (Bonis et al., 2021; Glasset et al., 2016) and the third in Europe (EFSA and ECDC, 2018). When nutrient-rich conditions are encountered, *Bc* spores can germinate, giving rise to vegetative cells which can even proliferate. Such favorable conditions are present in the small intestine of mammals where spores would germinate and probably proliferate to ultimately trigger diarrheas due to the production of enterotoxins (Berthold-Pluta et al., 2015; Ehling-Schulz et al., 2019). *In vitro* experiments have indicated that *Bc* vegetative cells could be destroyed by the acidic pH of the stomach and the biliary salt of the duodenum (Barbosa et al., 2005; Berthold-Pluta et al., 2015; Ceuppens et al., 2013; Ceuppens et al., 2012; Clavel et al., 2004). Furthermore, one has to consider the effectiveness of the gut innate immune system to fight *Bc* vegetative cells. In contrast, nothing is known concerning the behavior and the fate of *Bc* spores in the intestine *in vivo* and the related immune response mounted by the host.

Here we demonstrate that spores germinate only in the posterior parts of the *Drosophila* midgut and of the mouse small intestine. We show that *Bc* bacteria can persist for at least ten days in the posterior regions of the small intestine/midgut. Next, we demonstrate that the spores do not trigger any detectable immune responses in the anterior parts of the midgut of *Drosophila*. Once in the posterior midgut, germinated cells trigger the IMD immune pathway in a PGRP-LE dependent manner. Strikingly, we found the amidases PGRP-SC and PGRP-LB,

which are negative regulators of the IMD pathways, to be induced while the AMPs were repressed. The absence of the PGRP-LE receptor, the cytoplasmic components of the IMD pathway or the target amidases reduced the persistence of the bacteria in the posterior midgut. Strikingly, removing the downstream IMD pathway transcription factor Relish has no impact on the bacterial persistence. Hence, we further show that the Toll pathway participates to the fine tune of the immune response in the posterior midgut likely to cooperating with the IMD pathway to regulate amidase expression. Altogether, we provide here evidences that *Bc* persists in the intestine when ingested as spores and escape the anterior immune response. Spores reach the posterior regions of the midgut where they germinate, and vegetative bacteria induce expression of negative regulators of the IMD pathway dampening the production of AMPs, consequently fostering the persistence of the bacteria.

## RESULTS

### **Spores of the *Bc* group persist in the *Drosophila* intestine**

To cover different species of bacteria from the *Bc* group, we used the reference *Bc sensu stricto* (*Bc ss*) strain ATCC14579 as well as several *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) strains. Contrary to *Bc ss*, during sporulation, *Bt* produces Cry toxins embedded in a crystal, which displays specific entomopathogenic properties. Some *Bt* strains have been selected to be used as microbial insecticides. Upon ingestion of *Bt* insecticides (composed of spores and crystals) by target organisms, Cry toxins are released from the crystal in the intestine and destroy the larval gut epithelium. The spores germinate and vegetative bacteria invade the internal body cavity, inducing septicemia. The targeted pest dies in 2-3 days. The subspecies *Bt kurstaki* (*Btk*) is widely used to specifically fight lepidopteran larvae that are broad crop pests (Ehling-Schulz et al., 2019). As for other bacteria of the *Bc* group, *Bt* has been suspected to be responsible for FBO (Bonis et al., 2021; Johler et al., 2018). We, therefore, used different *Btk* strains to study the persistence of spores in the *Drosophila* midgut: the commercial *Btk SA-11* and *ABTS-351*

strains (noteworthy adult *Drosophila* is not susceptible to Cry toxins produced by these strains). Because we suspected the crystal of Cry toxins might influence the behavior of *Btk* in the midgut, we engineered a *Btk SA-11 $\Delta$ Cry* strain cured of its plasmids and therefore devoid of Cry toxins (see Experimental Procedures). We also selected a *Btk<sup>-</sup>Cry* obtained from the Bacillus Genetic Stock Center (#4D22, <https://bgsc.org/>) also devoid of Cry toxins. Finally, to avoid any deleterious impacts of the ingestion of huge doses of bacteria, we fed flies with a low amount of bacteria such as the allochthonous bacterial load in the intestine (Figure 1) never overwhelm the amount of indigenous bacteria (Blum et al., 2013; Buchon et al., 2009a; Fast et al., 2018).

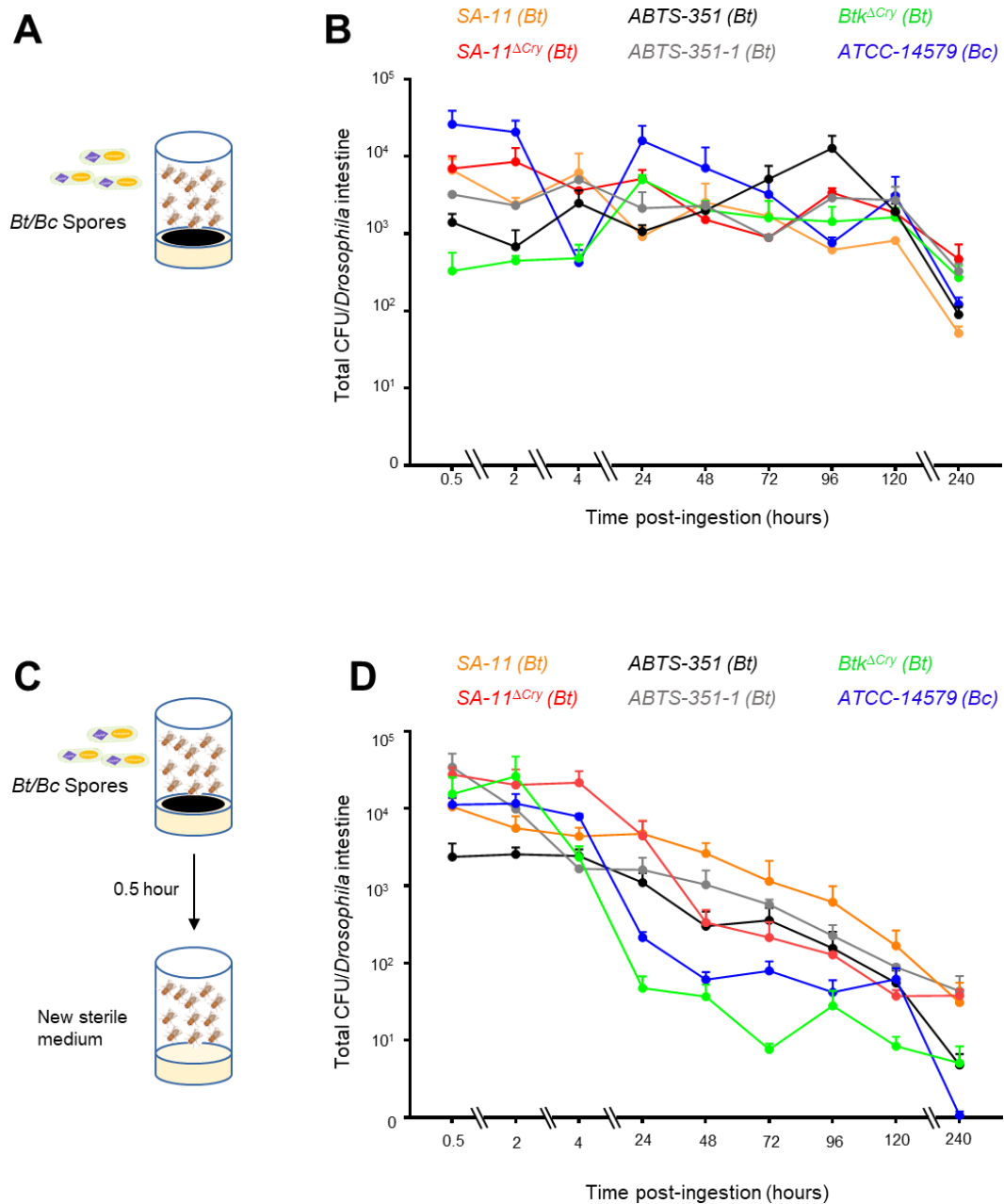
We have previously demonstrated that *Btk $\Delta$ Cry* bacteria are rapidly cleared from the *Drosophila* midgut upon ingestion of vegetative cells (Benguettat et al., 2018; Loudhaief et al., 2017). We confirmed here that *Bc ATCC14579*, as well as *Btk SA-11* vegetative cells, were also cleared from the intestine in less than 24 hours (Figure S1). To determine whether, upon ingestion, *Bc* or *Btk* spores behaved the same as vegetative cells in the *Drosophila* midgut, we first fed flies in continuous with contaminated food and assessed the amount of *Bc* or *Btk* bacteria in the midgut at a different time (Figure 1A). When flies were continuously fed with *Bc/Bt* spores, we observed that regardless of the strain used, *Bc/Bt* were still present in the *Drosophila* midgut at least 10 days after the initial contact with the contaminated food (Figure 1B). The commercial preparations made of spores of the strain *Btk* ABTS-351 are known to contain 46% of additives (Nawrot-Esposito et al., 2020). To assess the potential involvement of those additives in the intestinal spores' persistence, we extended our study to the ABTS-351 commercial preparation that we compared both to our own ABTS-351 spore preparation without any additives and to all the other strains. The commercial spores behave in the midgut as all the other "homemade" *Bc/Bt* spores (Figure 1B) suggesting that the additives present in the commercial preparation did not contribute to the persistence of ABTS-351 spores.

Because spores could germinate and proliferate on the fly medium, misleading our interpretation, we checked this possibility by counting the number of *SA-11<sup>GFP</sup>* bacteria on the fly



medium in absence of fly and over a week. We applied heat treatment to kill vegetative cells (see Experimental Procedures). We noticed that 2 days after spore deposit on the fly medium, some of them started their germination and even proliferated 4 days after deposit (Figure S2A). We confirmed this observation by confocal microscopy using our innovative tools corresponding to red fluorescent spores that fluoresce in green once germinated (*Btk SA-11<sup>RG</sup>*) (Figure S2B). We obtained similar results using the *Btk<sup>ΔCry</sup>* strains (data not shown).

Hence, to eliminate any caveats in our persistence assessment, we decided to use a 30 min acute oral ingestion (Figure 1C). We first controlled the *Drosophila* food intake by measuring the bacterial load in the midgut after 30 min and we found an average bacterial count of around 10 000 cells per midgut (Figure 1D). Interestingly, whatever the *Bt/Bc* strains we used, bacteria could persist up to 10 days in the *Drosophila* midgut (Figure 1D). Together, our data demonstrated that, unlike vegetative cells, *Bc/Bt* spores can persist in the *Drosophila* midgut for several days.



**Figure 1. Spores of the *Bacillus cereus* group persist in the *Drosophila* intestine.**

(A) Experimental setup to assess bacterial load after the continuous ingestion

(B) Bacterial loads of dissected guts after a continuous ingestion

(C) Experimental setup to assess bacteria load acute ingestion

(D) Bacterial loads of dissected guts after acute ingestion.

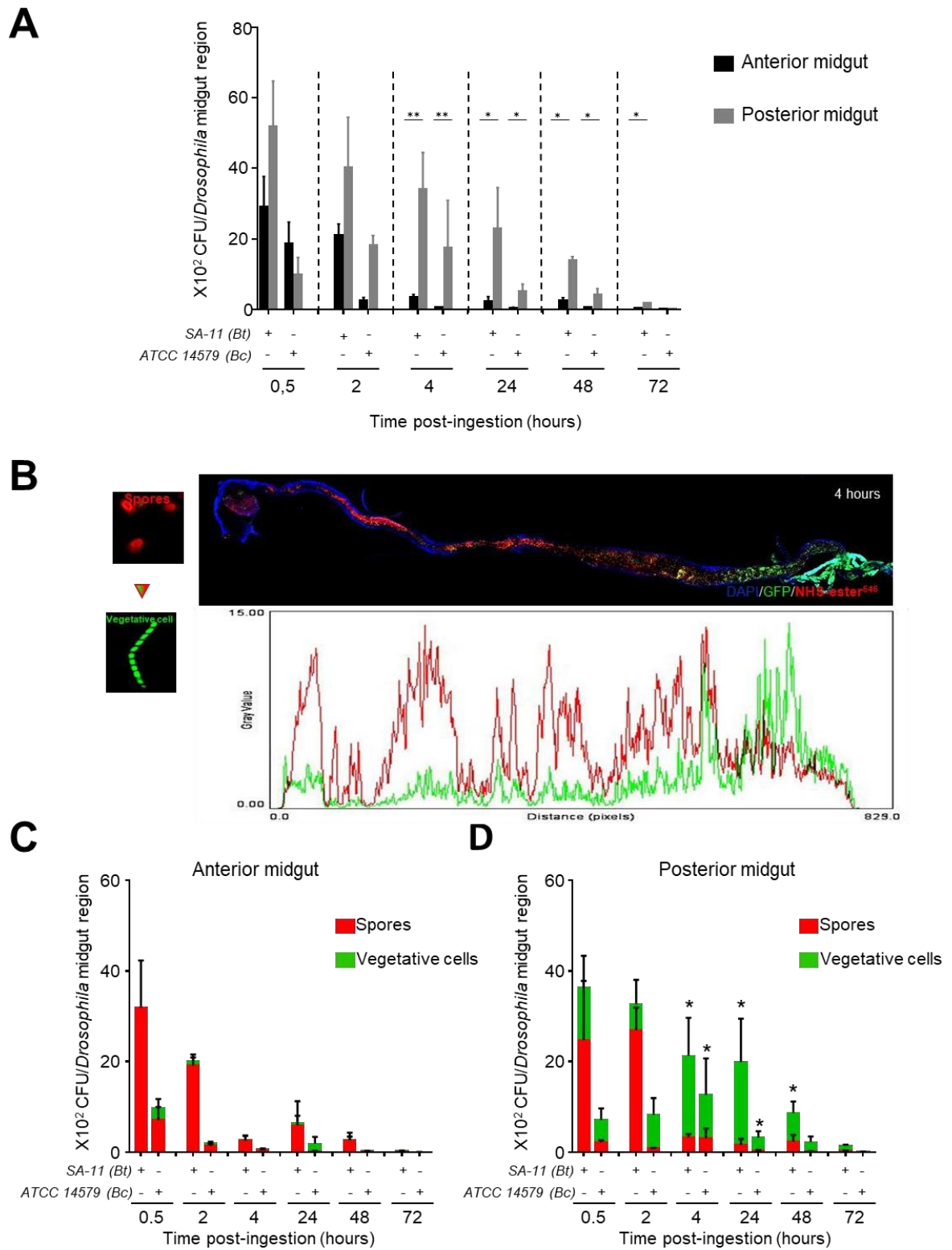
Error bars correspond to the SEM of at least three independent experiments

### **Spores of the *Bc* group germinate preferentially in the posterior midgut**

The *Drosophila* midgut is subdivided into five major anatomical regions (R1 to R5) (Buchon et al., 2013; Marianes and Spradling, 2013). The anterior midgut fraction is represented by the regions (R1 and R2), the acidic copper cells region is represented by the region R3, while the posterior midgut is represented by the fractions (R4 and R5) (Figure S3A). To analyze in detail, the localization of *Bc/Bt* along the midgut, we quantified the bacterial load in the anterior and posterior midgut. We did not focus on the acidic region due to its small size and the difficulty to dissect it accurately. During the first two hours after acute ingestion, we found that *Bc/Bt* bacteria were present in both parts of the midgut (anterior and posterior). However, from 4 hours onward, the posterior part harbored a significant highest load of *Bc/Bt* cells compared to the anterior midgut (Figure 2A). We conclude that *Bc/Bt* may accumulate preferentially in the posterior regions.

Because the intestine is a convenient environment for spore germination, we wondered whether *Bc/Bt* spores could germinate in *Drosophila* midgut. The utilization of the *Btk SA-11<sup>R/G</sup>* fluorescent strain first revealed that at 0.5- and 2-hours post-ingestion, *Bt* spores densely occupied the lumen of the whole midgut (Figure S4A and B). Intestinally, few vegetative cells were detectable in the posterior midgut 2 hours post-ingestion (inset in Figure S4B). Spores germination was manifest in the posterior midgut 4 hours after ingestion (Figure 2B). 24-hours post-ingestion, we mostly detected germinant cells but not proliferative cells in the posterior midgut (Figure S4C). These observations were consistent with the CFU measurements in the different regions of the midgut. Indeed we compared heat-treated intestinal samples (to kill vegetative cells) to not heat-treated samples (control). The difference between the control and the heat-treated sample corresponds to the number of vegetative cells. Interestingly, we did observe in the anterior midgut region only the presence of *Bc/Bt* spores, even 3 days after acute ingestion (Figure 2C). However, in the posterior midgut, from 4 hours post-ingestion, we did observe a significant

appearance of *Bc/Bt* vegetative cells (Figure 2D) confirming that the germination of the *Bc/Bt* spores occurred 4 hours after ingestion and mainly in the posterior midgut.



**Fig 2. SA-11 spores germinate preferentially in *Drosophila* posterior midgut.**

(A) Bacterial load in splitted *Drosophila* midgut after acute intoxication.

(B) Monitoring of SA-11<sup>RG</sup> germination in *Drosophila* midgut flies 4h post-ingestion.

(C) Plots of the average fluorescence intensity (represented as mean gray value) of SA-11<sup>RG</sup> germination measured along the *Drosophila* midgut. For every such plot of average fluorescence shown in this paper, the red line represents the average of spores state. The green line represents overall the average of vegetative cells. Bacterial load in Anterior *Drosophila* midgut. SA-11 spore counts after heat inactivation of one part of the sample are shown by red bars.

(D) Bacterial load in Anterior *Drosophila* midgut. SA-11 spore counts of one part of the sample are shown by red bars. SA-11 vegetative cells of one part of the sample are shown by green bars.

(E) Bacterial load in posterior *Drosophila* midgut. SA-11 spore counts of one part of the sample are shown by red bars. SA-11 vegetative cells of one part of the sample are shown by green bars.

Data represent mean  $\pm$  SEM of at least five independent experiments. Mann-whitney test, asterisks represent a statistically significant difference between conditions: \*\*0.001 < p < 0.01, \*p < 0.05.

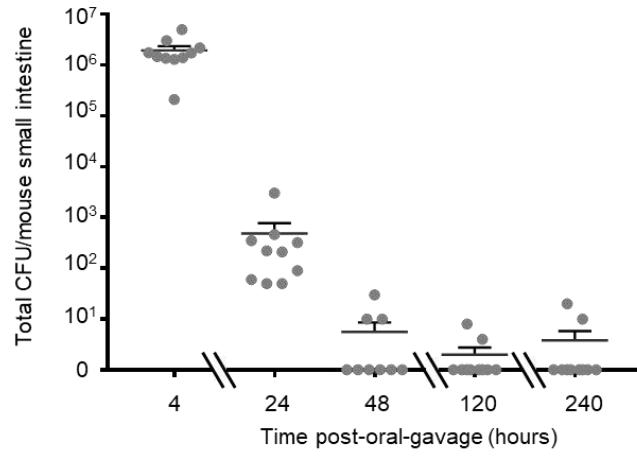
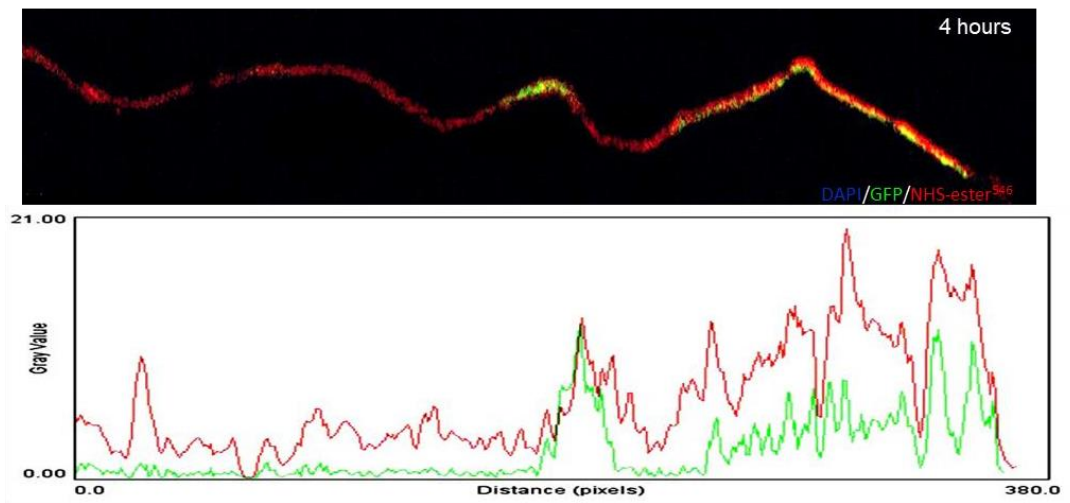
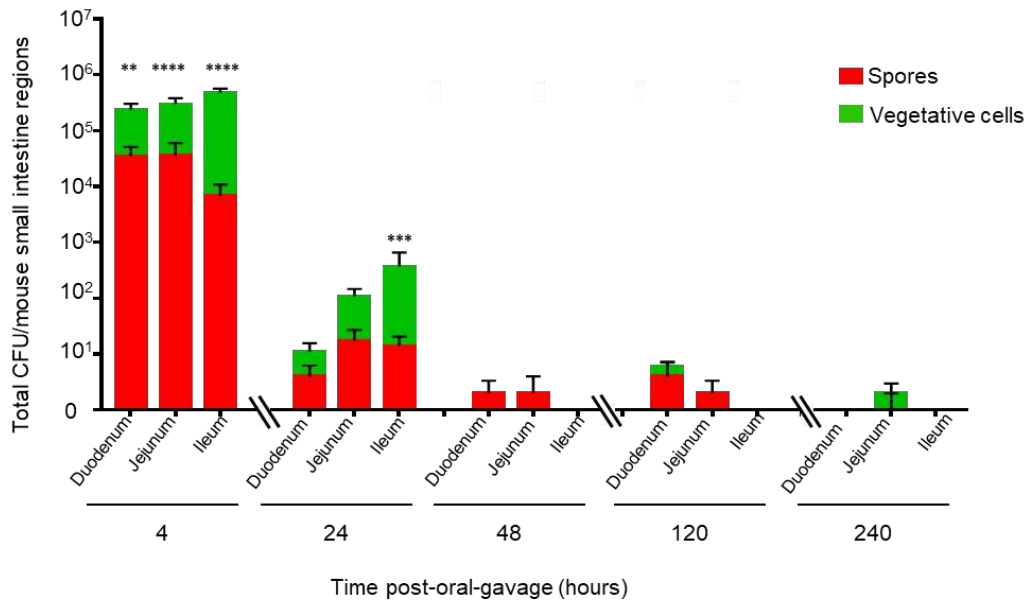
### **Bacillus spores persist in the mouse intestine**

*In vivo* mammalian models for *Bc* intestinal infection are lacking. In a recent study, using mice model, Rolny et al., have found that 4.5 hours post-inoculation of *Bc* vegetative cells, vegetative cells were localized in the whole small intestine, and 20 hours after inoculation vegetative cells were totally cleared from the small intestine (Rolny et al., 2014). Using the *Btk SA-11* strain, we confirmed these results (Figure S5) meaning that *Bc/Bt* vegetative cells are rapidly cleared from mice small intestines. Together these observations show that *Bc/Bt* vegetative cells behave the same in both *Drosophila* and mice intestines.

We next wondered whether *Bt* spores also persisted in the mice small intestines. We designed intragastric experiments using the *Btk SA-11* strain (see Experimental Procedures). As shown in (Figure 3A), *Btk SA-11* bacteria were present 24 hours post gavage in the small intestine of all mice. Interestingly, two mice still harbored *Btk SA-11* bacteria 240 hours post oral gavage.

Then, to visualize the timing and domains of spore germination in the mice intestine, we forced fed our mice with the *Btk SA-11<sup>RG</sup>* strain. In mammals, the small intestine is divided into three functional sections: the duodenum, the jejunum, and the ileum. Because there is no obvious anatomical distinction between the three parts, we decided to split the small intestine into three equivalent parts (Figure S3B). However, we are well aware that the duodenum is probably smaller than the anterior third of the small intestine. Two hours post gavage, *Btk SA-11<sup>RG</sup>* spores were localized in the whole small intestine and few vegetative cells were detectable in the posterior ileum (Figure S6A). Four hours post gavage, *Btk SA-11<sup>RG</sup>* vegetative cells occupied the posterior part of the jejunum and all the ileum (Figure 3C). Twenty-four hours post gavage, we mostly detected vegetative cells in all the jejunum and the anterior part of the ileum (Figure S6B). Noteworthy, spores are evenly distributed along the small intestine at the different time points analyzed (Figure 3 and Figure S6). We confirmed these observations using CFU measurements in heat-treated vs non-heat-treated intestinal samples. We found that 4 hours post gavage, *Btk SA-11* spores were evenly distributed all along the small intestine and that vegetative cells

were more abundant in the ileum (Figure 3C). The vegetative cells we detected in the duodenum compared to the fluorescent observation (Figure 3B) could be explained by the 1/3 splitting method we used that encompassed the whole duodenum and likely part of the anterior jejunum (Figure S3B). We also observed, 24 hours post gavage, significant *Btk SA-11* germination localized specifically in the ileum (Figure 3C). Later on, *Btk SA-11* spores were still detectable in the duodenum and jejunum regions while vegetative cells were hardly detectable (Figure 3C). 10 days after gavage, only traces of vegetative cells were counted in the jejunum (Figure 3C). Collectively, our results demonstrate that like in the *Drosophila* midguts, *Bt* spores persist for a long time in the mice small intestines and could germinate preferentially in the jejunum and the ileum.

**A****B****C**



**Fig 3. SA-11 spores germinate in mice small intestines.**

(A) Bacterial load in splitted mice small intestines after gavage

(B) Monitoring on *SA-11<sup>R/G</sup>* germination in mice small intestines 4h post-ingestion. Plots of the average fluorescence intensity (represented as mean gray value) of *SA-11<sup>R/G</sup>* germination measured along mice small intestine.

(C) Bacterial load in different parts on mice small intestines. *SA-11* spore counts of one part of the sample are shown by red bars. *SA-11* vegetative cells of one part of the sample are shown by green bars.

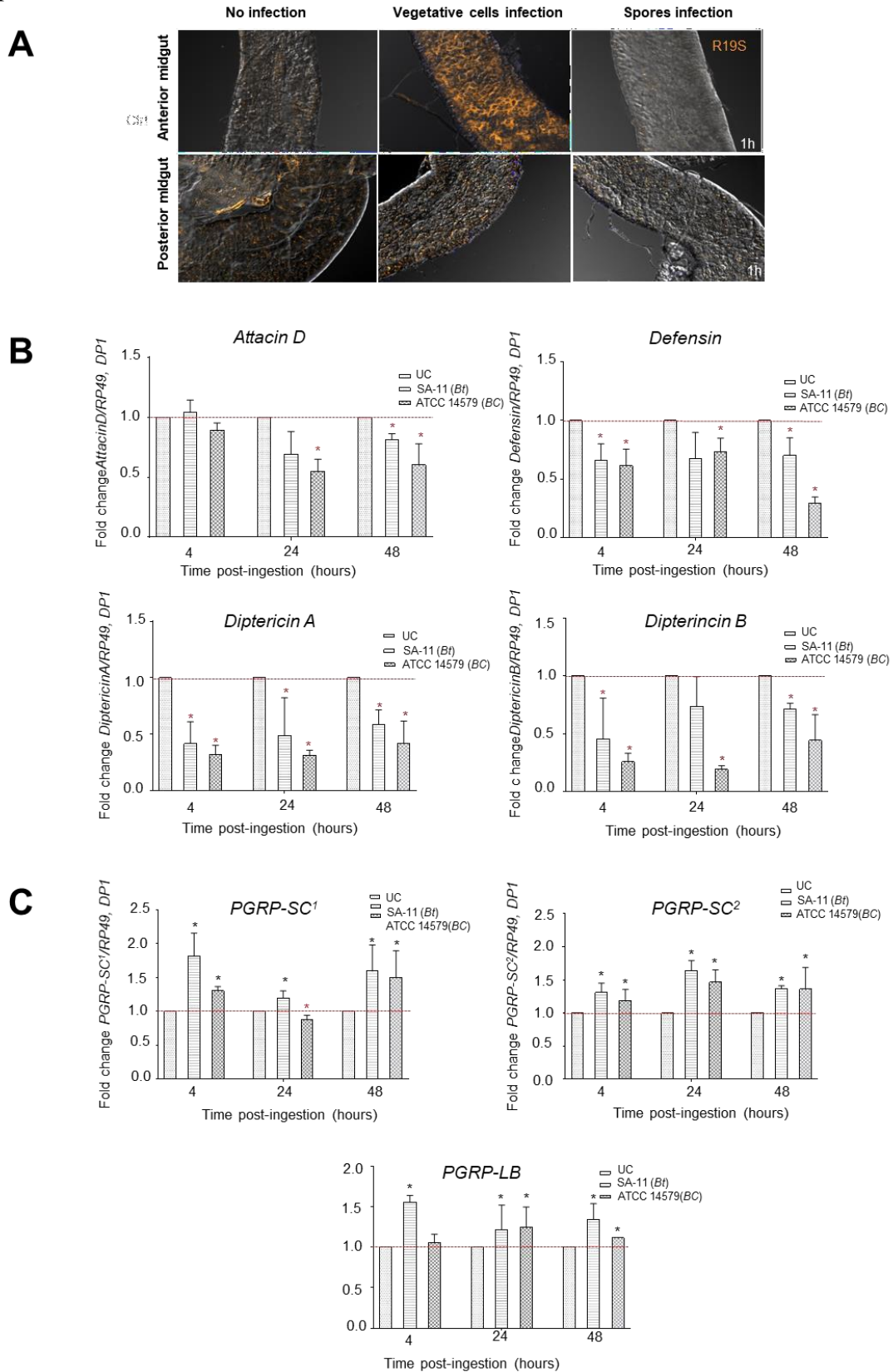
Data represent mean  $\pm$  SEM of at least ten independent experiments. Mann-Whitney test, asterisks represent a statistically significant difference between conditions: \*\*\*\* $p < 0.0001$ , \*\*\* $0.0001 < p < 0.001$ , \*\* $0.001 < p < 0.01$ , \* $p < 0.05$ , ns, not significant ( $p > 0.1$ ).

### **Spores do not trigger midgut innate immune response**

Both insects and mammals induce two major responses to fight bacterial ingestion: the production of ROS and AMPs. Because of ethical issues in mice experimentation and the fact that innate immune responses are well documented in the *Drosophila* midgut, we choose to focus the rest of our study on this model. It has been reported that ROS induction and AMPs productions localized specifically in the anterior midgut (R1 and R2 region) after bacterial ingestion (Bosco-Drayon et al., 2012; Hachfi et al., 2019; Lee et al., 2013; Royet and Charroux, 2013; Tzou et al., 2000). First, we confirmed that *Btk* vegetative cells induced ROS in the anterior region 1-hour post-ingestion (Figure 4A). Surprisingly, *Drosophila* fed with *Btk* spores showed ROS induction neither in the anterior nor in the posterior regions of the midgut (Figure 4A) though spores germinated in the posterior midgut (Figure 2 and Figure S4).

We next investigated the AMPs production in the *Drosophila* midguts following *Bc/Bt* ingestion (using the 30 min feeding protocol, Figure 1C). Upon vegetative cell feeding, transcriptional levels of AMP genes such as *Defensin*, *Diptericin A*, and *Diptericin B* were unchallenged while *AttacinD* was slightly induced 24 hours post-feeding (Figure S7A). These data are consistent with the fact that early ROS induction followed by the visceral spasms rapidly eliminate the vegetative bacteria (Benguettat et al., 2018), at least before the IMD pathway can be induced. Strikingly, upon acute *Bc/Bt* spore feeding, the AMP expressions were mostly repressed (Figure 4B). However, both *Bc/Bt* spores and vegetative cells induced the transcription of very potent negative regulators of the IMD pathway: the genes encoding the amidases PGRP-SC1 and PGRP-SC2 (Figure 4C and Figure S7B). *Bc/Bt* spores also induced another amidase encoding gene *PGRP-LB* that is also a negative regulator of the IMD pathway (Figure 4C). Altogether, our data strongly suggest that *Bc/Bt* spores are not detected by the anterior midgut immune response, reaching the posterior regions where they germinate and can activate the IMD

signaling target genes *PGRP-SC1*, *PGRP-SC2*, and *PGRP-LB* that promote negative feedback on *AMP* gene expressions.



**Figure 4: *Bacillus cereus* Spores do not trigger midgut innate immune response**

(A) ROS monitoring after acute feeding (spores *vs* vegetative cells). ROS production in the midgut is visualized by HOCl-specific R19S dye (orange)

(B) qRT-PCR analysis of *AMPs* expression upon *Bacillus cereus* spores acute feeding.

(C) qRT-PCR analysis of *Amidases* expression upon *Bacillus cereus* spores acute feeding.

UC corresponds to flies fed with water.

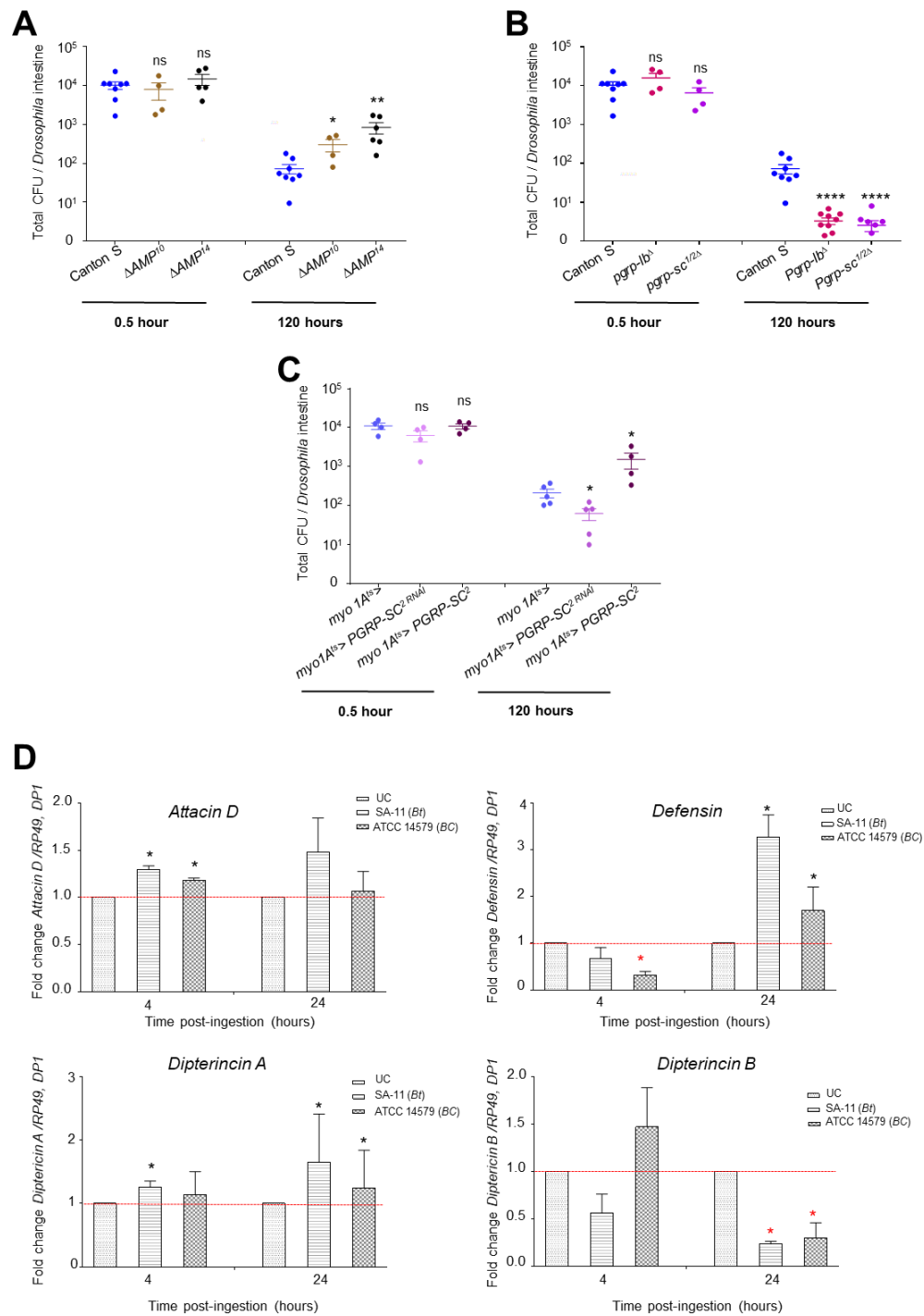
The results are shown as relative levels of expression. Data represent mean  $\pm$  SEM of at least three independent experiments, (\* $p < 0.05$ ) Mann-Whitney test.

### **Amidases and AMP participate in the intestinal persistence of spores**

To assess the implication of the AMPs in the spore persistence, we used two fly strains with deletions of 10 AMP genes ( $\Delta AMP^{10}$ ) or 14 AMP genes ( $\Delta AMP^{14}$ ) (Carboni et al., 2021; Hanson et al., 2019). We quantified *Btk SA-11* bacterial load in the midgut of wild type (Canton S),  $\Delta AMP^{10}$  and  $\Delta AMP^{14}$  flies. While all genotypes ingested a similar amount of spores during the 30 min of feeding, 120h post-feeding, in flies deleted for 10 or 14 AMP genes, we found a significant higher *Btk SA-11* load compared to wild-type flies (Figure 5A). Of note, the increase in bacterial load was higher in  $\Delta AMP^{14}$  flies that additionally have 4 Cecropin encoding genes deleted (Figure 5A). Our data suggest that though repressed upon spore ingestion (Figure 4), the weak production of AMPs is still necessary to limit the *Bc/Bt* bacterial load in the midgut.

Because amidases participate in the repression of the IMD pathway by scavenging the bacterial PGN, impeding PGRP-LC and -LE dependent IMD signaling activation (Costechareyre et al., 2016; Paredes et al., 2011), we assessed *Btk SA-11* load in homozygous viable mutant flies for *PGRP-LB* or *PGRP-SC1/2*. No difference in bacterial load in the midgut was observed for the different mutants after 30 min of spore feeding (Figure 5B). However, 120 hours post-feeding, the absence of *PGRP-LB* or *PGRP-SC1/2* provoked a significant decrease of *Btk SA-11* presence in the midgut compared to the wild-type flies (Figure 5B). Because *Bc/Bt* spores accumulated and germinated in the posterior midgut (Figure 2), we focused on the *PGRP-SC2* described to be the main amidase expressed in the enterocytes of the posterior regions (Costechareyre et al., 2016). Using targeted *RNAi* (see Experimental procedures), we specifically silenced *PGRP-SC2* in enterocytes and found a significant decrease in *Btk SA-11* midgut load (Figure 5C). Conversely, over-expressing *PGRP-SC2* in enterocytes increased the *Btk SA-11* load 120 hours post-ingestion (Figure 5C) in a similar magnitude to that observed with  $\Delta AMP^{14}$  mutant flies (Figure 5A and C). These data suggested that amidases were induced by the presence of *Bc/Bt* in the posterior midgut to negatively control the expression of AMPs, consequently favoring its persistence. We confirmed this hypothesis by showing that AMP expressions were no more repressed and even

somewhat induced, by *Btk SA-11* spore ingestion in a *PGRP-SC1/2* mutant background (Figure 5D). Together, our results show that *Bc/Bt* induction of Amidases restrains the production of AMPs, consequently favoring the persistence of *Bc/Bt* in the posterior *Drosophila* midgut.



**Figure 5: AMPs and Amidases are involved in *Bacillus cereus* persistence**

(A) Bacterial load in AMP mutants 0.5 or 120 hours after SA-11 (*Bt*) spores acute feeding

(B) Bacterial load in amidases mutants 0.5 or 120 hours after SA-11 (*Bt*) spores acute feeding

(C) Bacterial load in PGRP-SC2 mutant and PGRP-SC2 over-expressing animals in EC (using the *myo IA<sup>ts</sup>* driver)

(D) qRT-PCR analysis of *AMPs* expression in *PGRP-SC1/2<sup>Δ</sup>* mutants following *Bacillus cereus* spores acute feeding.

UC corresponds to flies fed with water.

Data represent mean  $\pm$  SEM of at least five independent experiments. Mann-whitney test, asterisks represent a statistically significant difference between conditions: \*\*\*\* $p < 0.0001$ , \*\* $0.001 < p < 0.01$ , \* $p < 0.05$ , ns, not significant ( $p > 0.1$ ).

### **IMD and Toll pathways participate in the intestinal persistence of spores**

To test to implication of the IMD pathway in *Bc/Bt* persistence, we started our investigation by using flies lacking to the main receptors PGRP-LC or -LE. The same amounts *Btk SA-11* were ingested by WT flies or *PGRP-LC<sup>d</sup>* and *PGRP-LE<sup>112</sup>* loss of function mutant flies after 30 minutes of feeding (Figure 6A). 120 hours after feeding, only *PGRP-LE<sup>112</sup>* mutant flies showed a significant decrease of *Btk SA-11* intestinal load (Figure 6A) in a similar magnitude to that observed for flies lacking the amidases (Figure 5B). These results suggest that PGRP-LE contributes to the sensing of germinated spores in the posterior midgut and confirm that PGRP-LE is the main receptor in the posterior midgut by controlling amidase expression (Bosco-Drayon et al., 2012).

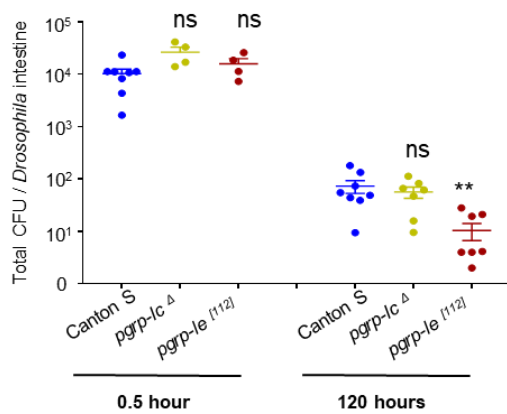
Next, we used mutants for several IMD pathway genes. First, loss-of-function mutants for the cytoplasmic components Imd (*imd<sup>Shaddock</sup>*) or Dredd (*Dredd<sup>F64</sup>*) showed also a *Btk SA-11* persistence decrease 120 hours post-ingestion (Figure 6B). Strikingly, the bacterial load in homozygous mutant flies for the downstream IMD pathway NF- $\kappa$ B like transcription factor Relish (*Rel<sup>E20</sup>*) was similar to the control flies (Figure 6B). Contrary to what it has been proposed in the *Drosophila* midgut (Bosco-Drayon et al., 2012; Buchon et al., 2009b; Vodovar et al., 2005), this result suggested that Relish could not be the unique transcription factor downstream of the IMD pathway at least in the posterior midgut.

In the systemic innate immune response, the transcription factors, Relish (downstream of the IMD pathway) and Dif (downstream of the Toll pathway), synergistically regulate the infection by inducing the production of various AMPs and amidases (Ganesan et al., 2011; Tanji et al., 2007). To understand whether Dif could also be involved in *Bc/Bt* persistence we used *Dif<sup>11</sup>* loss-of-function homozygous viable flies. While *Dif<sup>11</sup>* mutant flies and WT flies ingested a similar amount of spores during the 30 minutes of feeding, 120 hours later, we observed a significant decrease of *Btk SA-11* loads (Figure 6C). This result prompted us to investigate the implication of the Toll pathway in spore persistence. Using homozygous viable mutant flies for the loss-of-function allele *Myd88<sup>KG03447</sup>* (MyD88 is a cytoplasmic components of the Toll pathway) or specifically silencing the expression of the Toll

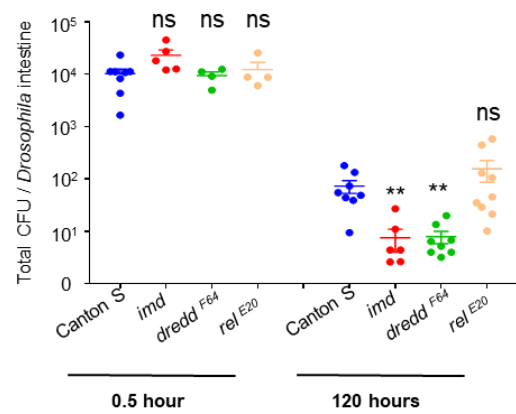


receptor in enterocytes, we found that *Btk SA-11* load significantly decreased 120 hours after spores acute ingestion (Figure 6C and D). Taken together, our data demonstrate that both IMD and Toll pathway act synergistically in the posterior midgut to control the expression of AMPs and Amidases, Relish being downstream of IMD pathway to control AMP expression and Dif being likely downstream of both Toll and IMD pathways to control amidases' expression.

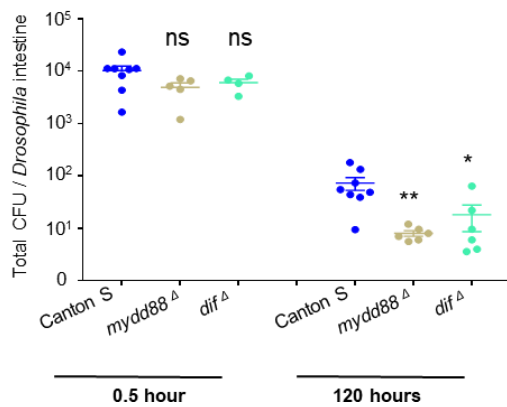
**A**



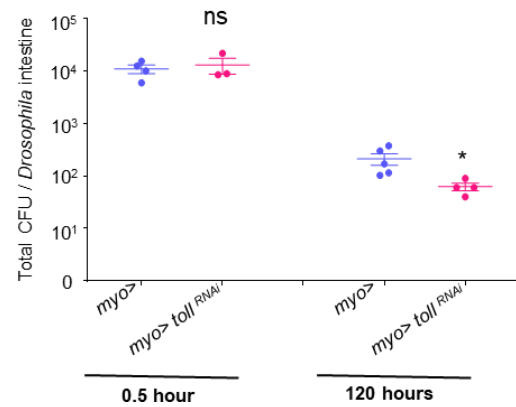
**B**



**C**



**D**



**Figure 6: Imd and Toll pathways are synergistically involved in *Bacillus cereus* persistence**

- (A) Bacterial load in Imd pathway receptors (*pgrp-le* and *-lc*) mutants 0.5 or 120 hours after SA-11 (*Bt*) spores acute feeding
- (B) Bacterial load in Imd cytoplasmic components (*imd*, *dredd*) and the transcription factor (*relish*) mutants 0.5 or 120 hours after SA-11 (*Bt*) spores acute feeding
- (C) Bacterial load in Toll pathway transcription factors (*dif*) and the cytoplasmic components (*myd88*) mutants 0.5 or 120 hours after SA-11 (*Bt*) spores acute feeding
- (D) Bacterial load in toll mutant animals in EC (using *myo IA<sup>ts</sup>*)

Data represent mean  $\pm$  SEM of at least four independent experiments. Mann-whitney test, asterisks represent a statistically significant difference between conditions: \*\*0.001 < p < 0.01, \*p < 0.05, ns, not significant (p > 0.1).

## CONCLUSION

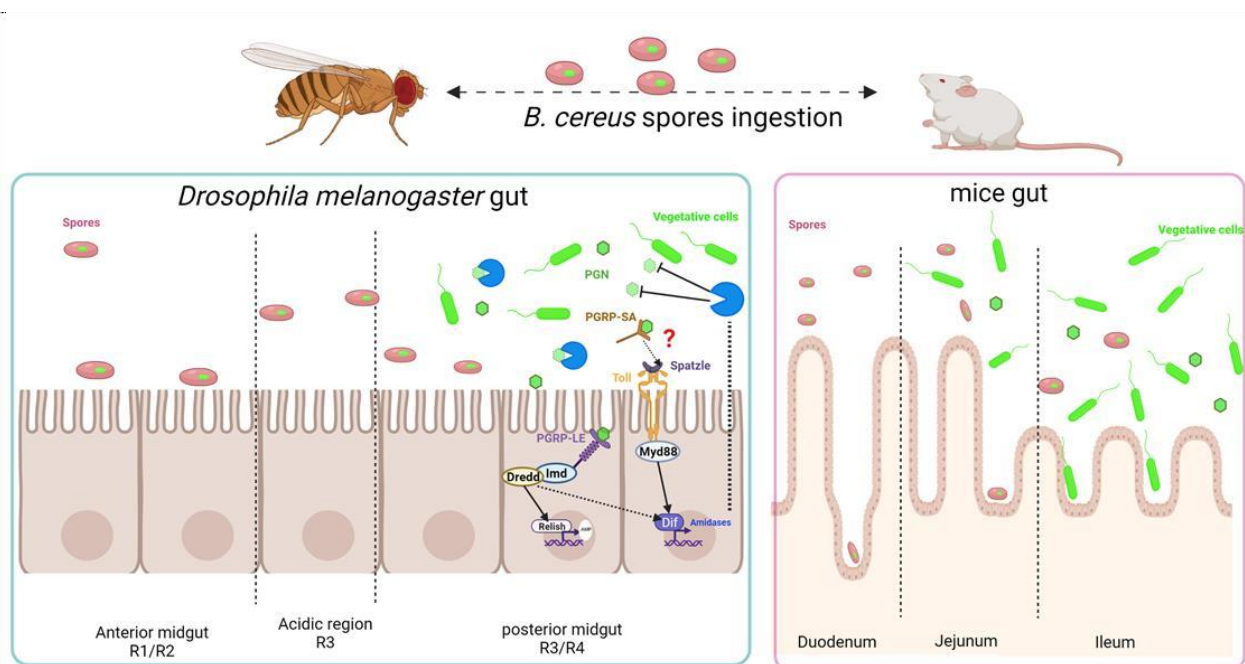
The *B. cereus* group consists of Gram-positive bacteria, commonly isolated from the environment. Members of this group are spore-forming bacteria commonly associated with food poisoning and intestinal infections and represent the third cause of food poisoning in Europe and the second in France. The most-studied members of this group are *B. anthracis*, *Bc ss* and *Bt* that are well known for their pathogenic activity.

Using *Drosophila melanogaster*, it has been previously shown that *Bt* vegetative cells are rapidly cleared from the intestine. This elimination is due to the activation of the local innate immune response. However, few studies suggest that *Bt* spores can persist in human and rodent intestines. To understand why and how *Bt/Bc* spores persist in the gut of non-target organisms and the implication of the innate immune response in fighting spores, we have used two powerful models: *Drosophila melanogaster* and mice. First, we have shown that *Bt/Bc* spores can persist, after acute ingestion, up to 10 days in the *Drosophila* midguts and in mice small intestines. Then, using an innovative tool consisting of red fluorescent spores that switch in green fluorescent once germinated (corresponding to vegetative bacteria), we have shown that spores accumulate mainly in the posterior midgut of *Drosophila* and the posterior small intestine of mice where they can further germinate. Then, we confirmed these data using quantitative monitoring of spores vs. vegetative bacteria accumulation *in vivo* in the intestines of *Drosophila* and mice. Altogether, our data suggest that, in the posterior regions of the *Drosophila* midgut (and the small intestine of mice), the innate immune response is inefficient to promptly eliminate spores and germinated bacteria.

In *Drosophila* midgut, the local innate immune response (i.e. the production of Reactive ROS and AMPs) is mainly mounted in the anterior regions. We have shown that, unlike vegetative cells, spores do not trigger ROS and AMP production. Strikingly, we have even observed that spores inhibit AMP production. Interestingly, we have found a transcriptional induction of negative regulators (e.g. PGRP-SC1, -SC2, and -LB) of the immune signaling pathways in the posterior region of the midgut in

response to spore ingestion. Then, using combinations of mutants of the two immune pathways, Imd and Toll, we have been the first to demonstrate that both immune pathways coexist in the *Drosophila* midgut (Figure 7).

Our work highlights the mechanisms used by *B. cereus* spores for long-lasting persistence in the intestine. Indeed, *B. cereus* spore ingestion only induce negative regulators of the immune pathway that dampen the expression of AMPs that in turn allows render the intestine tolerant to the germination of the spores. Consequently, the persistence of bacteria in the posterior midgut with a reduced innate immune defense may favor the opportunism of *Bt/Bc* opportunism. This emphasizes the need to better understand the potential pathogenicity of the *Btk* strains used commonly in organic agriculture and to evaluate the risks of their consumption.



**Figure 7:** Model of *Bc/Bt* persistence in *Drosophila* and mice models. *Bc/Bt* germinate preferentially in the posterior parts of the *Drosophila* midgut and mice small intestine. Germinated cells in *Drosophila* posterior midgut promote amidases production by synergically activating Imd and Toll pathway

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

### Bacterial strains

The two bioinsecticide strains (SA-11 and ABTS-351) were used as commercial formulations. In parallel, the strain ABTS-351 was also used after bacterial isolation and “home-made” spore production as described below. The *Btk*<sup>-Cry</sup> strain (#4D22) was collected from the Bacillus Genetics Stock Center ([www.bgsc.org](http://www.bgsc.org)) (González et al. 1982). The *Bc ss* (#ATCC14579) was provided by ANSES maison d’Alfort. *SA-11*<sup>ΔCry</sup> strain was generated in this work

### Construction of *SA-11*<sup>-Cry</sup>

The mutant *SA-11*<sup>ΔCry</sup> was obtained from the WT strain SA-11, by a procedure of plasmid curing, as follows. After isolation on TSA-YE agar (Biomérieux, 18h culture at 30°C), the strain SA-11 was subcultured successively 3 times in 10ml of brain-heart Infusion (BHI, Oxoid) broth at 42°C with agitation, for 64, 48 and 36h respectively. The first BHI culture was inoculated from an isolated colony, and the subsequent cultures were inoculated with 100 μl of the previous ones. Clones from the last culture were isolated on TSA-YE agar after serial dilution, then subcultured on the sporulating medium hydrolysate of casein tryptone (HCT) + 0.3% Glc, to verify the absence of crystal production. The absence of plasmids carrying the *cry* genes was checked by sequencing as follows. Briefly, the genomic DNA of *SA-11*<sup>ΔCry</sup> and *SA-11* WT were extracted using the KingFisher cell and Tissue DNA kit (ThermoFisher) and sequenced with Illumina technology at the Institut du Cerveau et de la Moelle Epinière (ICM) platform, as previously described (Bonis et al., 2021), (SAMN23436137 and SAMN23455549, respectively). The absence of *cry* genes in *SA-11*<sup>ΔCry</sup> has been confirmed from raw reads, using KMA (Clausen et al., 2018). Consistently, a plasmid reconstruction made with Mob-Suite (Robertson and Nash, 2018) suggested the loss of 4 plasmids in *SA-11*<sup>ΔCry</sup> compared to *SA-11* WT.

### **Btk<sup>ΔCry</sup>GFP and SA-11 GFP strains**

The GFP coding sequence was inserted into the *pHT315* plasmid (bearing the erythromycin-resistant gene) (Theoduloz et al., 2003) (gift from Didier Lereclus). The *pHT315-GFP* recombinant plasmid was transfected and amplified into competent *dam<sup>-</sup>/dcm<sup>-</sup> E. Coli* (NEB#C2529H) which allowed it to be demethylated. *pHT315-GFP* was then extracted and purified using either the Pureyield plasmid miniprep kit (Promega #A1223) or the QIAGEN® Plasmid Mini Kit (QIAGEN). For the extraction using the QIAGEN® Plasmid mini Kit, the DNA solution was concentrated by isopropanol precipitation following the manufacturer's recommendations and resuspended in PCR-grade water. The DNA concentrations were measured using the NanoDrop1000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific).

The strains *SA-11* was transfected with the *pHT315-GFP* plasmid as follows. Strains were plated on TSA-YE agar at room temperature for 48h, then subcultured in 10 ml of BHI for 18h at 30°C, after inoculation from isolated colonies. The cultures were diluted 1/100 in 100 ml BHI and incubated at 37°C under agitation until an OD<sub>600nm</sub> of about 0.3 was reached. Bacteria were washed in 10 ml of cold electroporation buffer (400 mM sucrose, 1mM MgCl<sub>2</sub>, phosphate-buffered saline 1X, pH 6.8) and then resuspended in 850μl of cold electroporation buffer. A hundred μl of each suspension was incubated with 250 ng of plasmid DNA in ice for 5 min, then submitted to electroporation using the MicroPulser Electroporator (Biorad, program Sta), and 2 mm electroporation cuvettes. After the addition of 0.9 ml of BHI, bacteria were incubated for 2h at 37°C and isolated on TSA-YE agar supplemented with 10 μg/ml of erythromycin. The selected clones were checked for the presence of the *GFP* gene after sequencing (SAMN23436138 and SAMN23436139, respectively), and for the expression of GFP using fluorescence microscopy.

### **Spore production**

Strains were plated on LB-agar plates and grown overnight at 30°C. Bacteria strains were grown at 30°C in HCT-agar medium (pH 7.2) containing per 1L: 5g tryptone (Oxoid), 2 g casein hydrolysate (Oxoid),

15 g agar, 3 g glucose, and salts as previously reported in a sporulation-specific medium (Lecadet et al., 1980). After 10 days of incubation, spores were washed with 0.15% NaCl and heat-treated for 20 min at 70°C. Then cells were centrifuged at 10000g, 8°C for 20min. Spores were washed with sterile deionized water and centrifuged at 10000g, 8°C for 20min. The supernatant was discarded, and the washing was repeated once. The last pellets were taken up in 10ml, lyophilized (freeze-drying equipment model: RP2V). The amounts of spore produced were determined by estimating the colony-forming units (CFU) on LB plates after serial dilution of lyophilized spores.

### **NHS-ester-547 spore labelling (spore<sup>R/G</sup>)**

*SA-11<sup>GFP</sup>* / *SA-11<sup>Δcry-GFP</sup>* spores at a concentration of 10<sup>6</sup> CFU/5 cm<sup>2</sup>/fly and 10<sup>8</sup> CFU/5 cm<sup>2</sup>/fly were diluted and incubated in 500 μL of sterile water containing 10μl of 0.01% NHS-ester-547 (Interchim #1H0880) for 1hour with shaking at 4°C. After centrifugation at 10000g, 4°C for 10min, the pellet of spores was suspended in 500μl of cold sterile water and re-centrifuged a second time. The supernatant was removed, and the pellet was suspended up in the desired volume of sterile water.

### **Drosophila rearing and stocks**

Flies were reared on our standard laboratory medium (Nawrot-Esposito et al., 2020) in 12h/12h light/dark cycle-controlled incubators. We used the following stocks: *WT canton S* (Bloomington #64349); *Rel<sup>E201</sup>* (Bloomington #55714); *w*; *PGRP-LC<sup>ΔE</sup>* (Bloomington #55713); *yw*; *PGRP-LE<sup>112</sup>* (Bloomington #33055); *w*; *PGRP-SC<sup>d</sup>* (Bloomington #55724); *w*; *PGRP-LB<sup>d</sup>* (Bloomington #55715; gift from B. Charroux); *Dredd<sup>F64</sup>* (Leulier et al., 2000); gift from B. Charroux); *imd<sup>Shaddock</sup>* (gift from B. Charroux ); *w*; *Dif<sup>d11</sup>* (Bloomington #36559); *ΔAMP10* (gift from B. Lemaitre); *ΔAMP14* (gift from B. Lemaitre); *UAS-PGRP-SC2<sup>RNAi</sup>* (Bloomington #56915); *UAS-TOLL<sup>RNAi</sup>* (Bloomington #31477); *UAS-PGRP-SC2* (Guo et al., 2014) was a kind gift from Heinrich Jasper; *w*; *myo1A-Gal4*; *tubGal80ts UAS-GFP/TM6b* (gift from Nicolas Tapon)

### **Drosophila oral intoxication**

5–6-day old virgin females *Drosophila* were reared at 25°C. For conditional expression of UAS-GAL80<sup>ts</sup>linked transgenes, Flies were developed at room temperature, then shifted to 29°C for 7 days to induce transgene expression.

Before intoxication, *Drosophila* females were put into a new vial without medium for starvation for 2 hours at 25°C or at 29°C for UAS-GAL80<sup>ts</sup> flies. This allows the synchronization of food intake once in contact with the contaminated medium. 10 females were transferred into a *Drosophila* narrow vial containing fly medium covered with a filter disk where the spore solution was deposited. The inoculum used for continuous and acute intoxication were respectively 10<sup>6</sup> CFU/5 cm<sup>2</sup>/fly and 10<sup>8</sup> CFU/5 cm<sup>2</sup>/fly respectively. For the acute intoxication, *Drosophila* was fed for 30 minutes with the spore inoculum, then transferred to a new sterile vial until dissection. For the continuous intoxication, *Drosophila* was let in contact with the spore inoculum until the dissection time. For control conditions, *Drosophila* females were fed with sterile deionized water in the same conditions.

### **Bacterial load quantification (CFU) in Drosophila midgut**

Flies were washed first in ethanol 70% and then in PBS1X before guts dissection in PBS1X. Whole midguts or split parts (anterior and posterior regions) were crushed in 200 µL of LB at various times post-ingestion using a micro pestle and the homogenate was serially diluted in LB and incubated overnight at 30°C on LB agar plates. Colony counting was performed the day after.

### **Bacterial load quantification (CFU) on the filter disk**

The filter disk was washed and vortexed in 1ml of sterile water. The homogenate was serially diluted in sterile water and incubated overnight at 30°C on LB agar plates. Colony counting was performed the day after.



### **Heat-treatment**

The intestinal samples or the filter disk samples were heated at 75°C for 25 min to kill the vegetative cells. Afterward, the spores were enumerated as described above.

### **In-vivo monitoring of spores germination**

Flies were fed with *Btk SA-11*<sup>R/G</sup>. Guts were dissected and fixed with 4% formaldehyde in PBS1X for 20min and immediately mounted in Fluoroshield-DAPI medium. Images acquisition was performed at the microscopy platform of the Institut Sophia Agrobiotech (INRAE 1355-UCA-CNRS 7254-Sophia Antipolis) with the microscope Zeiss AxioZoom V16 with an Apotome 2 and the Zeiss AxioPlan Z1 with an Apotome 2. Images were analyzed using ZEN and Photoshop software.

### **RNA extraction, RT-PCR, and Real-time PCR for *Drosophila* guts**

Four biological replicates were generated for each condition. Total RNA was extracted from 10 *Drosophila* midguts using Microelute Total RNA kit (Omega Bio Tek) and dissolved in 20µl of RNase-free water. The quantity and quality of RNA were assessed using a Thermo Scientific™ NanoDrop 2000. 550 ng of extracted RNA was reverse transcribed to cDNA using Qscript™. Real-time PCR was performed on AriaMX Real-Time (Agilent) in a final volume of 20 µl, using the EvaGreen kit. Each experiment was independently repeated three times. Relative expression data were normalized to *RP49* and *Dp1* genes

### **HOCl staining with R19S**

The protocol is described in ([Hachfi et al., 2019](#)).

### **The ethics statement for mouse model**

This study was carried out in strict accordance with the guidelines of the Council of the European Union (Directive 86/609/EEC) regarding the protection of animals used for experimental and other scientific

purposes. The protocol was approved by the Institutional Animal Care and Use Committee on the Ethics of Animal Experiments of Nice, France (APAFIS#18923-2019012512125055 v3).

### **Mice**

Female Balb/c mice (7 weeks of age) were used. The mice were matched by age with a control group. The mice were kept in animal house facilities with 12:12-h light/dark cycles in standard animal cages and fed with a standard pellet diet, as well as a plastic bottle. Mice were acclimatized to these conditions for 1 week before entering the study.

### **Mice oral administration**

Balb/c mice (7 weeks, female) were divided into two groups (n=5-10). There was no significant difference in body weight between the groups. Mice received 200µl of bacterial suspension or sterile PBS1X. The bacterial suspension was prepared by dissolving spores/bacterial at a concentration of  $10^8$  CFU/mouse. All mice were transferred to freshly sterilized cages every day.

### **Bacterial load quantification (CFU) in the mouse small intestine**

At the time of dissection, Mice received freshly prepared Ketamine-Xylazine (10mg/ml)-10mg/ml mixture doses. The anesthetic mixture was injected intraperitoneal IP. Blood was collected from a tail vein sampling. Then, mice were euthanized. Duodenum, jejunum, ileum were sampled, weighed, and crushed in 1ml of sterile PBS1x using the precellys lysing kits CK14 (Bertin Technologies) The homogenate was serially diluted in PBS1x and incubated overnight at 30°C on LB agar plates. Colony counting was performed the day after.

### **In-vivo monitoring of spores germination**

Mice fasted for 48h SA-11<sup>GFP</sup> spores suspension per gavage at a concentration of  $10^8$  CFU/mouse. Guts were dissected and immediately visualized with PhotonIMAGER Optima (Biospace Lab, Nesles-la-

Vallée, France). The data was analysed using M3 Vision software (Biospace Lab, Nesles-la-Vallée, France) version 1.1.2.26170 and Fuji software.

### **Statistical analyses**

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism v.7.00, using the nonparametric Mann–Whitney U-tests.

Reagent ou ressource	Source	Identifiant
<b>Bacterial and virus strains</b>		
<i>B. thuringiensis</i> : Dipel ABTS-351	bioinsecticide	
<i>B. thuringiensis</i> : Delfin SA-11	bioinsecticide	
<i>B. thuringiensis</i> : Dipel homemade	This paper	
<i>B. thuringiensis</i> : SA-11 $\Delta^{Cry}$	This paper	
<i>B. thuringiensis</i> : 4D22	bgsc	
<i>B. cereus</i> : ATCC14579	bgsc	
dam/dcm <sup>+</sup> E.coli		
<b>Chemicals, Peptides, and Recombinant Proteins</b>		
Agar	Euromedex	L3522
Lb	Sigma	1330
Erythromycin	Euromedex	UT8750
NHS-ester	Interchim	FP-1H0880
PBS 10x	Euromedex	ET330
Formaldehyde 16%	Thermo scientific	28908
Fluoroshield-DAPI	Sigma	F6057-20mL
Casein hydrolysate	US-Biological	C12080608

tryptone	Euromedex	UT8750
glucose	Euromedex	UG3050
Ethanol70%	VWR	UN1170
Qscript™	Quanta-bio	95048-25
Bromophenol Blue	Janssen chimique	62685-289

<b><i>Drosophila</i> strains</b>		
WT canton S	Bloomington	64349
<i>Rel<sup>E201</sup></i>	Bloomington	55714
<i>w; PGRP-LC<sup>AE</sup></i>	Bloomington	55713
<i>y w; PGRP-LE<sup>I12</sup></i>	Bloomington	33055
<i>w; PGRP-SC<sup>d</sup></i>	Bloomington	55724
<i>PGRP-LB<sup>d</sup></i>	Bloomington	55715
imd		
<i>Dredd<sup>F64</sup></i>	Leulier et al.,2000	Gift from B.Charroux
<i>myoIA-Gal4, UAS-GFP; tubulin-Gal80<sup>ts/+</sup></i>		
<i>UAS-PGRP-SC2<sup>RNAI</sup></i>	Bloomington	56915
<i>UAS-PGRP-SC2</i>	Guo et al., 2014	Gift from Jasper
<i>w; Dif<sup>I1</sup></i>	Bloomington	36559
<i>UAS-TOLL<sup>RNAI</sup></i>	Bloomington	31477
<i>ΔAMP10</i>	Hanson et al., 2019	Gift from Lemaitre and Hanson
<i>ΔAMP14</i>	Carboni et al., 2021	Gift from Lemaitre and Hanson
<b>Oligonucleotides</b>		
dp1 Forward ACG-GGC-AGA-ATT-GAG-AAG-TG	Eurogentec	N/A
dp1 Reverse GGT-ACG-ATG-GAG-GTC-GAA-AG	Eurogentec	N/A
RP49 Forward CGC-ACC-AAG-CAC-TTC-ATC	Eurogentec	N/A
RP49 Reverse CAC-TCT-GTT-GTC-GAT-ACC-CTT-G	Eurogentec	N/A
Defensine Forward GCT-TTT-GCT-CTG-CTT-GCT-TG	Eurogentec	N/A
Defensine Reverse CTT-TGA-ACC-CCT-TGG-CAA-T	Eurogentec	N/A
AttacineD Forward GTT-TGG-CGG-AGG-ACT-CAA	Eurogentec	N/A

AttacineD Reverse GTC-ATG-CCG-AAC-TGA-GGA- AC	Eurogentec	N/A
DiptericineA Forward CAT-TGC-CGT-CGC-CTT-ACT- TT	Eurogentec	N/A
DiptericineA Reverse GGT-GGT-GGA-GTG-GGC-TTC	Eurogentec	N/A
DiptericineB Forward	Eurogentec	N/A
DiptericineB Reverse	Eurogentec	N/A
PGRP-SCI Forward GGC-AAC-TAC-CTC-AGC-TAC- GC	Eurogentec	N/A
PGRP-SCI Reverse ACG-GGT-CTC-GCA-GTA-GGA-G	Eurogentec	N/A

## ACKNOWLEDGEMENT

We would like to thank Bernard Charroux, François Leulier, Julien Royet, Heinrich Jasper, Mark Hanson, Bruno Lemaitre and Jean Luc Imler for kindly providing fly stocks. We are grateful to Dorota Czerucka for her help in mice dissection. We also thank Olivier Pierre for his help for the microscopy. We thank the Space, Environment, Risk and Resilience Academy of the Université Côte d'Azur for their financial support.

## FUNDING

This work has been supported by the French government, through the UCAJEDI Investments in the Future project managed by the National Research Agency (ANR) with the reference number ANR-15-IDEX-01 and through the ANR-13-CESA-0003-01. AF was funded by a PhD grant from INRAE and Anses.

## SUPPLEMENTAL DATA SET

**SupFigure 1:** *Bacillus cereus* vegetative cells are rapidly eliminated upon an acute ingestion

**SupFigure 2:** *Bacillus cereus* spores germinate on the *Drosophila* feeding disc

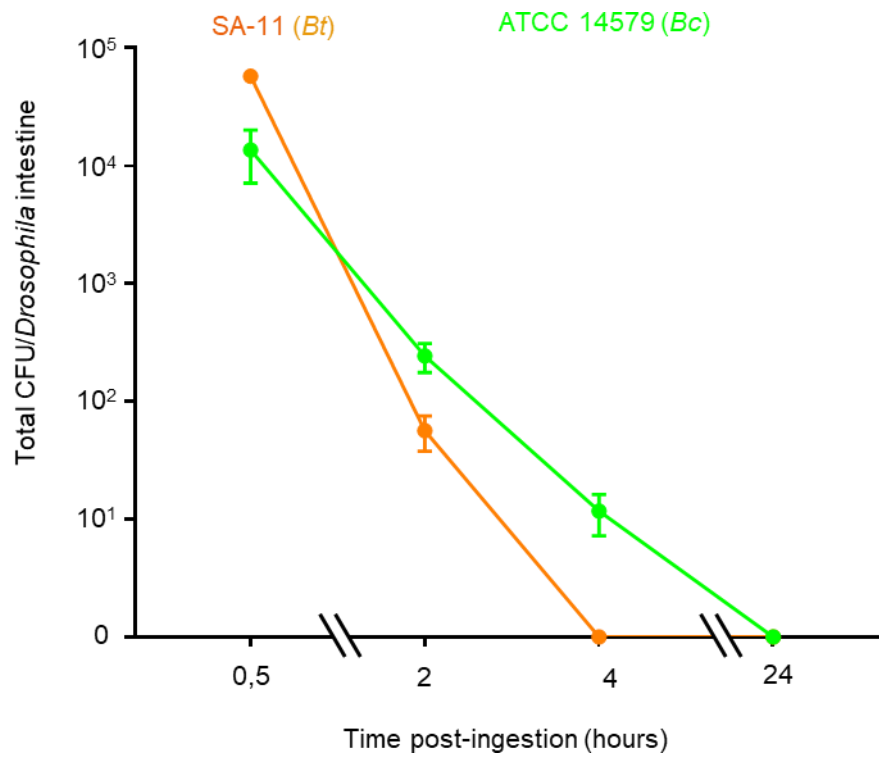
**SupFigure 3:** Representation of dissected gut portions used to define *Bacillus cereus* spores localization

**SupFigure 4:** Monitoring of *SA-11*<sup>RG</sup> germination in *Drosophila* midgut

**SupFigure 5:** *SA-11* vegetative cells are rapidly eliminated from mice small intestines

**SupFigure 6:** Monitoring of *SA-11*<sup>RG</sup> germination in mice small intestines

**SupFigure 7:** *Bacillus cereus* vegetative cells induce gut innate immune responses

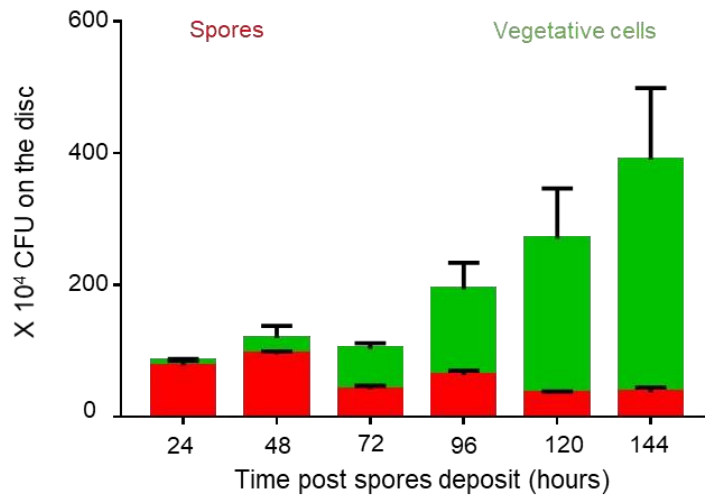


**SupFigure 1: *Bacillus cereus* vegetative cells are rapidly eliminated upon an acute ingestion**

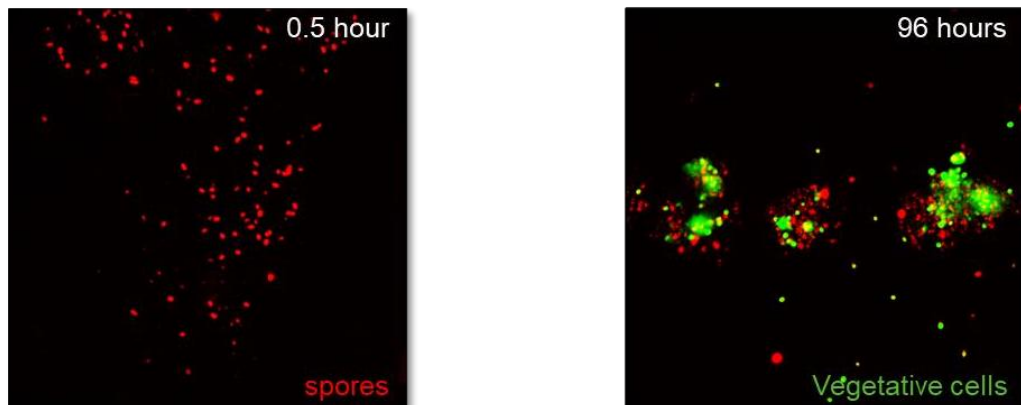
Bacterial loads of dissected guts after acute ingestion.

Error bars correspond to the SEM of at least three independent experiments

**A**



**B**



**SupFigure 2: *Bacillus cereus* spores germinate on the *Drosophila* feeding disc**

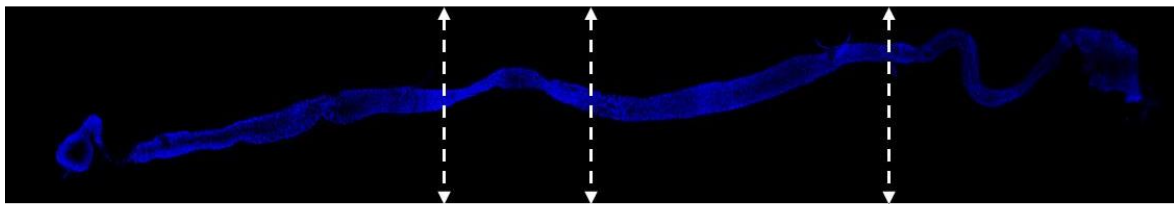
(A) Bacterial loads on the disc after a continuous exposure

(B-C) Monitoring on *SA-11<sup>R/G</sup>* germination on the disc (B) 0.5 hour and (C) 96 hours post-spores deposit.

Error bars correspond to the SEM of at least three independent experiments



**A**



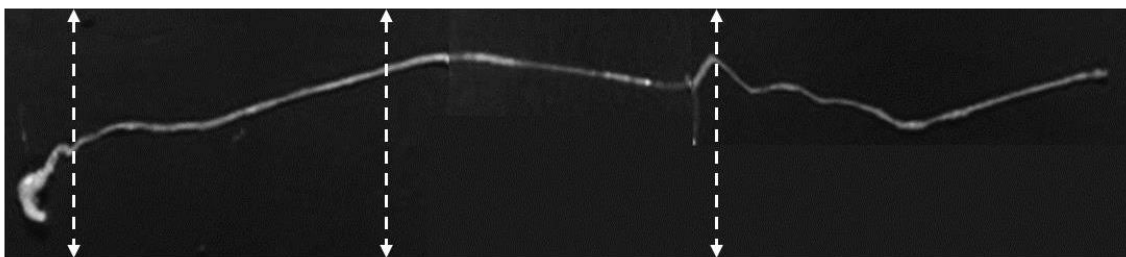
Anterior part

Copper  
cells

Posterior part

Hindgut

**B**



Duodenum

Jejunum

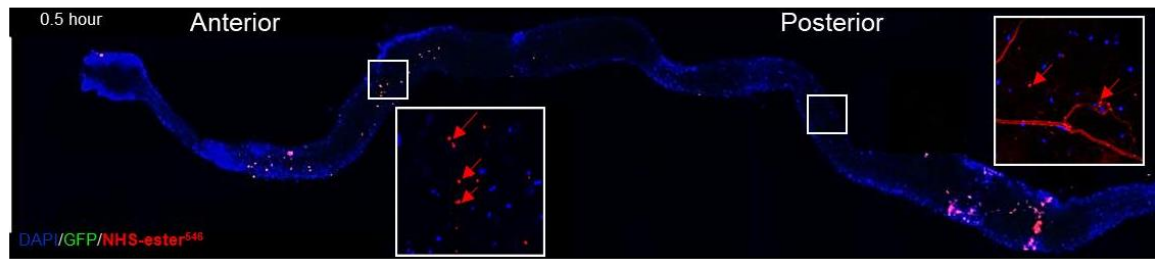
Ileum

**SupFigure 3: Representation of dissected gut portions used to define *Bacillus cereus* spores localization**

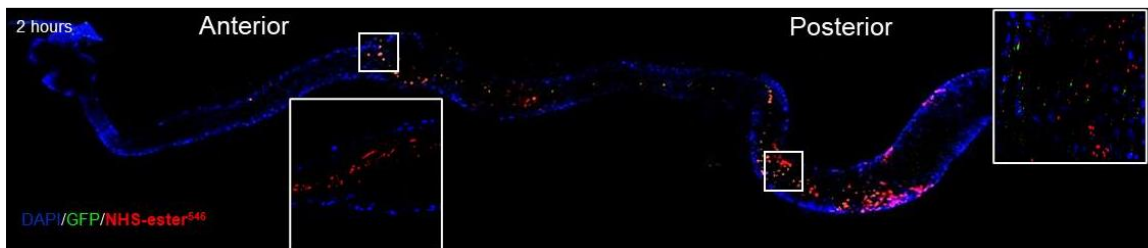
**(A)** Dissection scheme in *Drosophila* midguts for the experiment shown in Fig2. Dotted lines represent where guts have been sectioned to isolate the different portions.

**(B)** Dissection scheme in mice small intestines for the experiment shown in Fig 3. Dotted lines represent where guts have been sectioned to isolate the different portions.

**A**



**B**

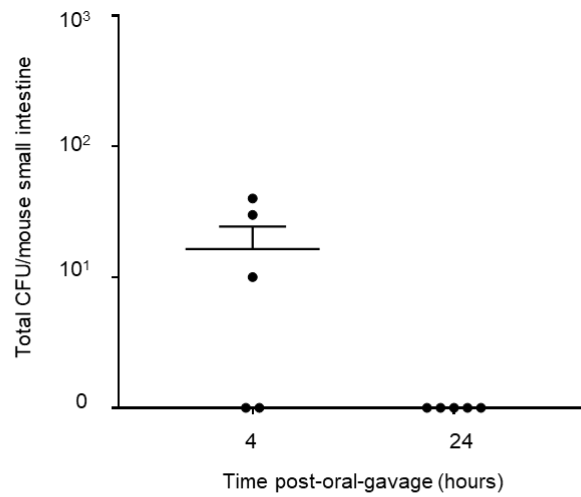
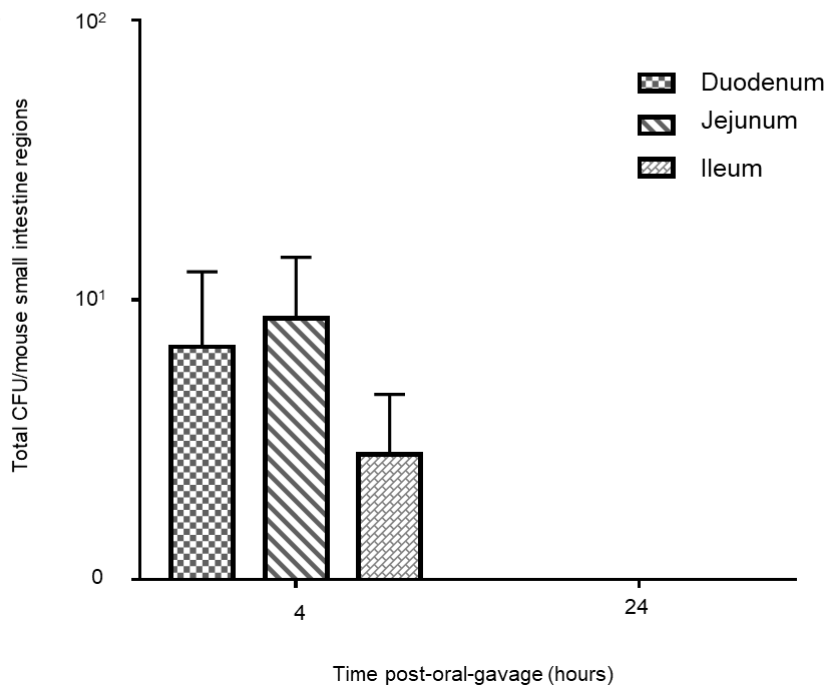


**C**



**SupFigure 4: Monitoring of SA-11<sup>RG</sup> germination in *Drosophila* midgut.**

- (A) 2 hours post-ingestion.
- (B) 4 hours post-ingestion.
- (C) 24 hours post-ingestion.

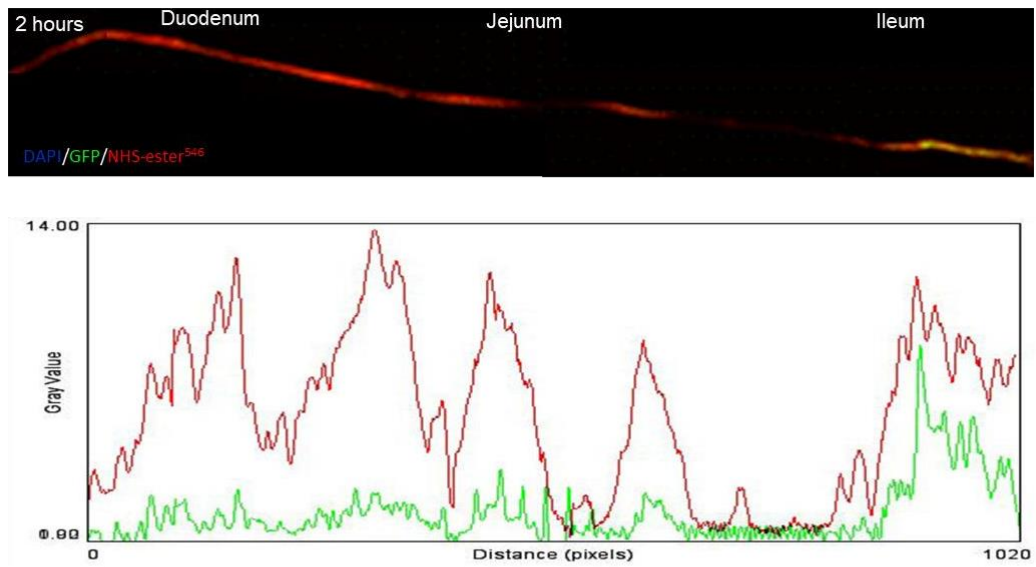
**A****B****SupFigure 5: SA-11 vegetative cells are rapidly eliminated from mice small intestines**

(A) Bacterial loads of dissected small intestine

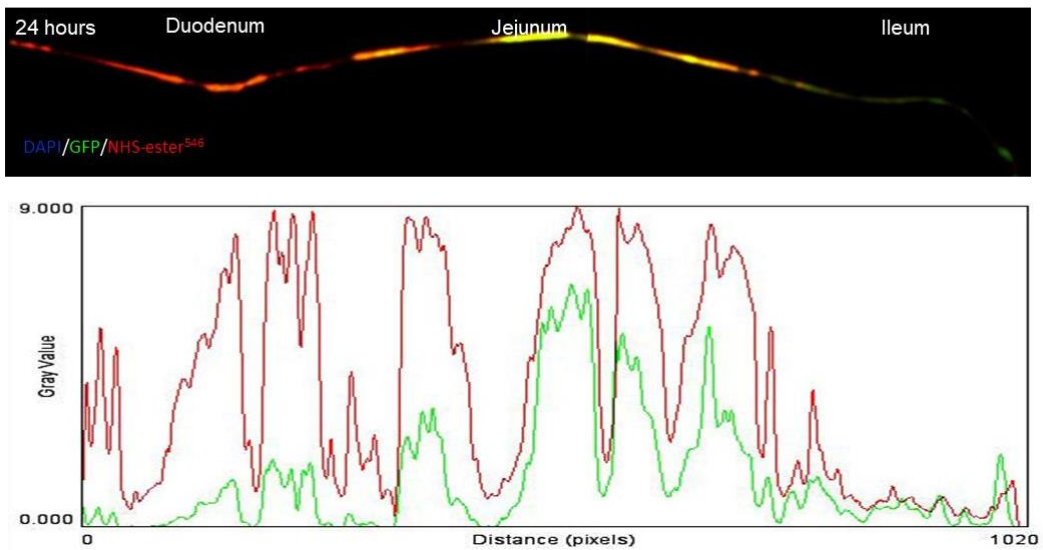
(B) Localization of SA-11 vegetative cells in mice small intestines.

Error bars correspond to the SEM of at least five independent experiments

A



B

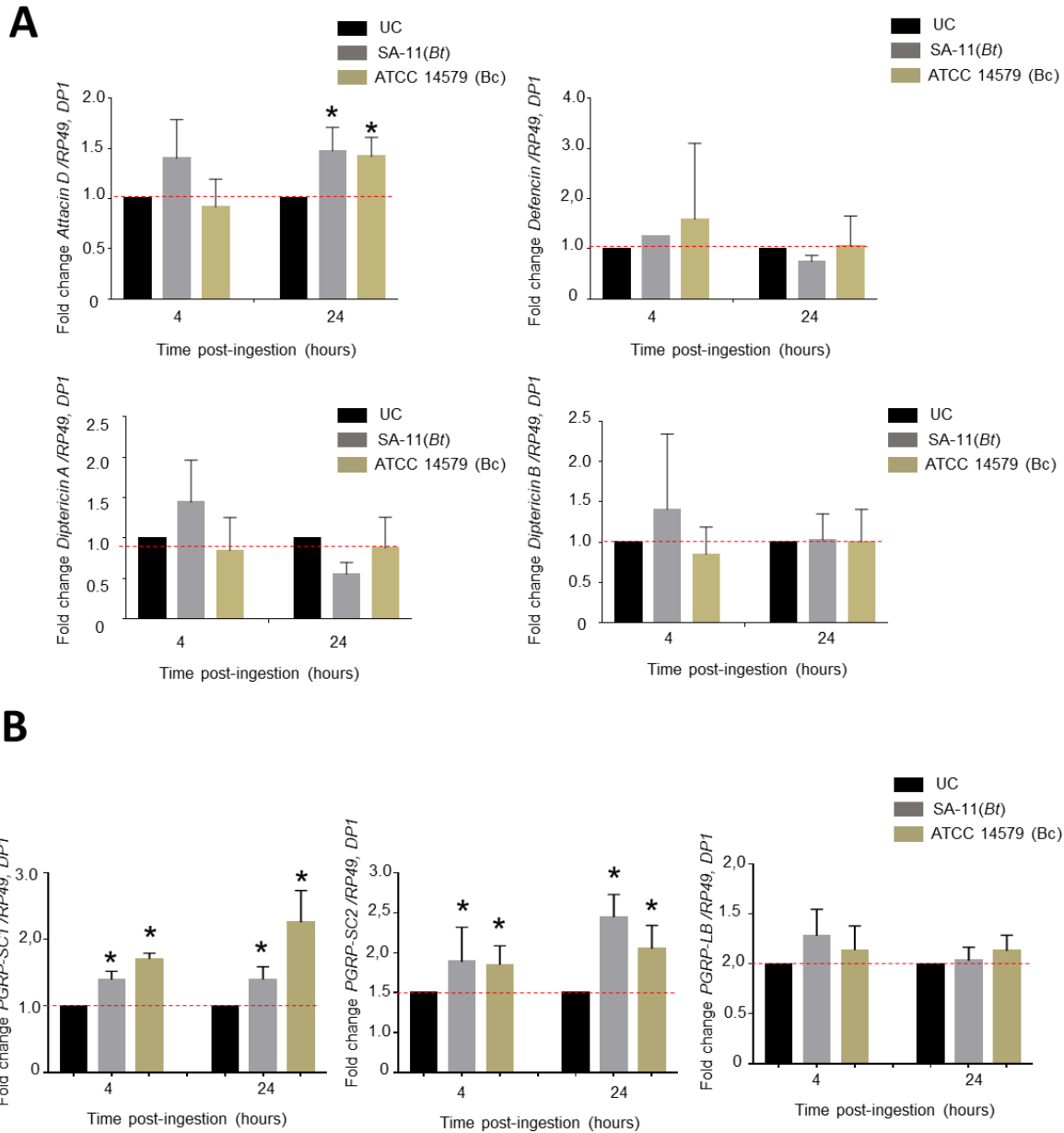


**SupFigure 6: Monitoring of *Btk SA-11<sup>RG</sup>* germination in mice small intestines**

(A) 2 hours post-ingestion.

(B) 24 hours post-ingestion.

Plots of the average fluorescence intensity (represented as mean gray value) of *Btk SA-11<sup>RG</sup>* germination measured along mice small intestine.



**SupFigure 7 : *Bacillus cereus* vegetative cells induce gut innate immune responses**

(A) qRT-PCR analysis of AMPs expression following *Bacillus cereus* vegetative cells acute feeding.

(B) qRT-PCR analysis of Amidases expression *Bacillus cereus* vegetative cells acute feeding.

UC corresponds to flies fed with water.

The results are shown as relative levels of expression. Data represent mean  $\pm$  SEM of at least three independent experiments, (\* $p < 0.05$ ) Mann-Whitney test.

## REFERENCES

- Barbosa, T. M., Serra, C. R., La Ragione, R. M., Woodward, M. J., and Henriques, A. O. (2005). Screening for bacillus isolates in the broiler gastrointestinal tract. *Appl Environ Microbiol* *71*, 968-978. doi: 10.1128/AEM.1171.1122.1968-1978.2005.
- Benguettat, O., Jneid, R., Soltys, J., Loudhaief, R., Brun-Barale, A., Osman, D., and Gallet, A. (2018). The DH31/CGRP enteroendocrine peptide triggers intestinal contractions favoring the elimination of opportunistic bacteria. *PLoS Pathog* *14*, e1007279. doi: 1007210.1001371/journal.ppat.1007279. eCollection 1002018 Sep.
- Berthold-Pluta, A., Pluta, A., and Garbowska, M. (2015). The effect of selected factors on the survival of *Bacillus cereus* in the human gastrointestinal tract. *Microb Pathog* *82:7-14.*, 10.1016/j.micpath.2015.1003.1015. Epub 2015 Mar 1017.
- Blum, J. E., Fischer, C. N., Miles, J., and Handelsman, J. (2013). Frequent replenishment sustains the beneficial microbiome of *Drosophila melanogaster*. *MBio* *4*, e00860-00813. doi: 10.1128/mBio.00860-00813.
- Bonfini, A., Liu, X., and Buchon, N. (2016). From pathogens to microbiota: How *Drosophila* intestinal stem cells react to gut microbes. S0145-0305X(0116)30032-30035. doi: 10.1016/j.jci.2016.30002.30008.
- Bonis, M., Felten, A., Pairaud, S., Dijoux, A., Maladen, V., Mallet, L., Radomski, N., Duboisset, A., Arar, C., Sarda, X., *et al.* (2021). Comparative phenotypic, genotypic and genomic analyses of *Bacillus thuringiensis* associated with foodborne outbreaks in France. *PLoS One* *16*, e0246885.
- Bosco-Drayon, V., Poidevin, M., Boneca, I. G., Narbonne-Reveau, K., Royet, J., and Charroux, B. (2012). Peptidoglycan sensing by the receptor PGRP-LE in the *Drosophila* gut induces immune responses to infectious bacteria and tolerance to microbiota. *Cell Host Microbe* *12*, 153-165.
- Buchon, N., Broderick, N. A., Chakrabarti, S., and Lemaitre, B. (2009a). Invasive and indigenous microbiota impact intestinal stem cell activity through multiple pathways in *Drosophila*. *Genes Dev* *23*, 2333-2344. doi: 10.1101/gad.1827009.
- Buchon, N., Broderick, N. A., Poidevin, M., Pradervand, S., and Lemaitre, B. (2009b). *Drosophila* intestinal response to bacterial infection: activation of host defense and stem cell proliferation. *Cell Host Microbe* *5*, 200-211. doi: 10.1016/j.chom.2009.1001.1003.
- Buchon, N., Osman, D., David, F. P., Fang, H. Y., Boquete, J. P., Deplancke, B., and Lemaitre, B. (2013). Morphological and molecular characterization of adult midgut compartmentalization in *Drosophila*. *Cell Rep* *3*, 1725-1738. doi: 10.1016/j.celrep.2013.1704.1001. Epub 2013 May 1722.
- Capo, F., Wilson, A., and Di Cara, F. (2019). The Intestine of *Drosophila melanogaster*: An Emerging Versatile Model System to Study Intestinal Epithelial Homeostasis and Host-Microbial Interactions in Humans. *Microorganisms* *7(9)*. microorganisms7090336. doi: 10.3390/microorganisms7090336.
- Carboni, A. L., Hanson, M. A., Lindsay, S. A., Wasserman, S. A., and Lemaitre, B. (2021). Cecropins contribute to *Drosophila* host defense against a subset of fungal and Gram-negative bacterial infection. *Genetics* *220*.
- Ceuppens, S., Boon, N., and Uyttendaele, M. (2013). Diversity of *Bacillus cereus* group strains is reflected in their broad range of pathogenicity and diverse ecological lifestyles. *FEMS Microbiol Ecol* *84*, 433-450. doi: 10.1111/1574-6941.12110. Epub 2013 Apr 12114.
- Ceuppens, S., Uyttendaele, M., Hamelink, S., Boon, N., and Van de Wiele, T. (2012). Inactivation of *Bacillus cereus* vegetative cells by gastric acid and bile during in vitro gastrointestinal transit. *Gut Pathog* *4*, 11. doi: 10.1186/1757-4749-1184-1111.
- Clausen, P., Aarestrup, F. M., and Lund, O. (2018). Rapid and precise alignment of raw reads against redundant databases with KMA. *BMC Bioinformatics* *19*, 307.

Clavel, T., Carlin, F., Lairon, D., Nguyen-The, C., and Schmitt, P. (2004). Survival of *Bacillus cereus* spores and vegetative cells in acid media simulating human stomach. *J Appl Microbiol* 97, 214-219. doi: 210.1111/j.1365-2672.2004.02292.x.

Costechareyre, D., Capo, F., Fabre, A., Chaduli, D., Kellenberger, C., Roussel, A., Charroux, B., and Royet, J. (2016). Tissue-Specific Regulation of *Drosophila* NF- $\kappa$ B Pathway Activation by Peptidoglycan Recognition Protein SC. *J Innate Immun* 8, 67-80. doi: 10.1159/000437368. Epub 000432015 Oct 000437330.

EFSA, and ECDC (2018). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017. *EFSA Journal* 16, e05500.

Ehling-Schulz, M., Lereclus, D., and Koehler, T. M. (2019). The *Bacillus cereus* Group: *Bacillus* Species with Pathogenic Potential. *Microbiol Spectr* 7(3). 10.1128/microbiolspec.GPP1123-0032-2018.

Fast, D., Duggal, A., and Foley, E. (2018). Monoassociation with *Lactobacillus plantarum* Disrupts Intestinal Homeostasis in Adult *Drosophila melanogaster*. *MBio* 9(4). mBio.01114-01118. doi: 01110.01128/mBio.01114-01118.

Ganesan, S., Aggarwal, K., Paquette, N., and Silverman, N. (2011). NF- $\kappa$ B/Rel proteins and the humoral immune responses of *Drosophila melanogaster*. *Curr Top Microbiol Immunol* 349, 25-60.

Glasset, B., Herbin, S., Guillier, L., Cadel-Six, S., Vignaud, M. L., Grout, J., Pairaud, S., Michel, V., Hennekinne, J. A., Ramarao, N., and Brisabois, A. (2016). *Bacillus cereus*-induced food-borne outbreaks in France, 2007 to 2014: epidemiology and genetic characterisation. *Euro Surveill* 21(48). 30413. doi: 30410.32807/31560-37917.ES.32016.30421.30448.30413.

Guo, L., Karpac, J., Tran, S. L., and Jasper, H. (2014). PGRP-SC2 promotes gut immune homeostasis to limit commensal dysbiosis and extend lifespan. *Cell* 156, 109-122. doi: 110.1016/j.cell.2013.1012.1018.

Hachfi, S., Benguettat, O., and Gallet, A. (2019). Hypochlorous Acid Staining with R19-S in the *Drosophila* Intestine upon Ingestion of Opportunistic Bacteria. *Bio-protocol* 9, e3246.

Hanson, M. A., Dostálová, A., Ceroni, C., Poidevin, M., Kondo, S., and Lemaitre, B. (2019). Synergy and remarkable specificity of antimicrobial peptides in vivo using a systematic knockout approach. *eLife* 8, e44341.

Johler, S., Kalbhenn, E. M., Heini, N., Brodmann, P., Gautsch, S., Bagcioglu, M., Contzen, M., Stephan, R., and Ehling-Schulz, M. (2018). Enterotoxin Production of *Bacillus thuringiensis* Isolates From Biopesticides, Foods, and Outbreaks. *Front Microbiol* 9:1915., 10.3389/fmicb.2018.01915. eCollection 02018.

Kim, S. H., and Lee, W. J. (2014). Role of DUOX in gut inflammation: lessons from *Drosophila* model of gut-microbiota interactions. *Front Infect Microbiol* 3, 116.

Lee, K. A., Kim, S. H., Kim, E. K., Ha, E. M., You, H., Kim, B., Kim, M. J., Kwon, Y., Ryu, J. H., and Lee, W. J. (2013). Bacterial-derived uracil as a modulator of mucosal immunity and gut-microbe homeostasis in *Drosophila*. *Cell* 153, 797-811. doi: 710.1016/j.cell.2013.1004.1009.

Leulier, F., Rodriguez, A., Khush, R. S., Abrams, J. M., and Lemaitre, B. (2000). The *Drosophila* caspase Dredd is required to resist gram-negative bacterial infection. *EMBO Rep* 1, 353-358.

Loudhaief, R., Brun-Barale, A., Benguettat, O., Nawrot-Esposito, M. P., Pauron, D., Amichot, M., and Gallet, A. (2017). Apoptosis restores cellular density by eliminating a physiologically or genetically induced excess of enterocytes in the *Drosophila* midgut. *Development* 144, 808-819. doi: 810.1242/dev.142539.

Marianes, A., and Spradling, A. C. (2013). Physiological and stem cell compartmentalization within the *Drosophila* midgut. *Elife* 2:e00886., 10.7554/eLife.00886.

Nawrot-Esposito, M. P., Babin, A., Pasco, M., Poirié, M., Gatti, J. L., and Gallet, A. (2020). *Bacillus thuringiensis* Bioinsecticides Induce Developmental Defects in Non-Target *Drosophila melanogaster* Larvae. *Insects* 11.

Paredes, J. C., Welchman, D. P., Poidevin, M., and Lemaitre, B. (2011). Negative regulation by amidase PGRPs shapes the *Drosophila* antibacterial response and protects the fly from innocuous infection. *Immunity* 35, 770-779. doi: 710.1016/j.immuni.2011.1009.1018.

Robertson, J., and Nash, J. H. E. (2018). MOB-suite: software tools for clustering, reconstruction and typing of plasmids from draft assemblies. *Microb Genom* 4.

Rolny, I. S., Minnaard, J., Racedo, S. M., and Pérez, P. F. (2014). Murine model of *Bacillus cereus* gastrointestinal infection. *J Med Microbiol* 63, 1741-1749.

Royet, J., and Charroux, B. (2013). Mechanisms and consequence of bacteria detection by the *Drosophila* gut epithelium. *Gut* 4, 259-263. doi: 210.4161/gmic.24386. Epub 22013 Apr 24312.

Setlow, P. (2014). Spore Resistance Properties. *Microbiol Spectr* 2(5). 10.1128/microbiolspec.TBS-0003-2012.

Tanji, T., Hu, X., Weber, A. N., and Ip, Y. T. (2007). Toll and IMD pathways synergistically activate an innate immune response in *Drosophila melanogaster*. *Mol Cell Biol* 27, 4578-4588.

Theoduloz, C., Vega, A., Salazar, M., González, E., and Meza-Basso, L. (2003). Expression of a *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin cry1Ab gene in *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* strains that naturally colonize the phylloplane of tomato plants (*Lycopersicon esculentum*, Mills). *J Appl Microbiol* 94, 375-381.

Tzou, P., Ohresser, S., Ferrandon, D., Capovilla, M., Reichhart, J. M., Lemaitre, B., Hoffmann, J. A., and Imler, J. L. (2000). Tissue-specific inducible expression of antimicrobial peptide genes in *Drosophila* surface epithelia. *Immunity* 13, 737-748.

Vodovar, N., Vinals, M., Liehl, P., Basset, A., Degrouard, J., Spellman, P., Boccard, F., and Lemaitre, B. (2005). *Drosophila* host defense after oral infection by an entomopathogenic *Pseudomonas* species. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 11414-11419. Epub 12005 Aug 11411.



## Complementary results

**1. Profile expression transcriptionnelle de l'amidase *Pglyrp-2* au niveau de l'intestin grêle chez le modèle murin.....**Erreur ! Signet non défini.

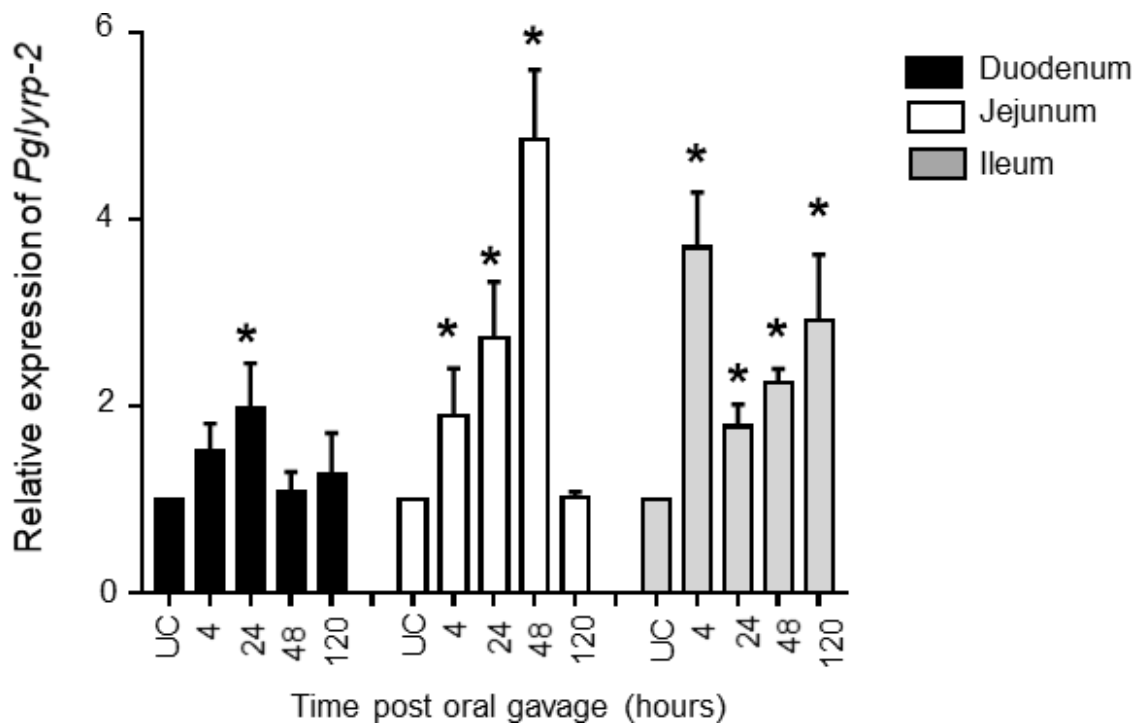
**2. Impact de l'acidité sur le processus de germination et prolifération des spores de *Bt***  
Erreur ! Signet non défini.

## 1. Profile expression transcriptionnelle de l'amidase *Pglyrp-2* au niveau de l'intestin grêle chez le modèle murin

### Result

*Drosophila* innate immune response is dependent on a family of peptidoglycan recognition proteins (PGRPs). PGRPs can be intracellular, transmembrane or secreted. Some PGRPs can directly bind to the bacterial cell wall component peptidoglycan (PGN) and initiate the signaling immune pathway leading to the activation of antibacterial host defense. However, certain PGRPs such as the amidases PGRP-LB or PGRP-SC are negative regulatory enzymes dampening the host defense by degrading the bacterial PGN. We have previously demonstrated using the *Drosophila* model, that upon *Bt* spore ingestion, germinant cells accumulate in the posterior midgut leading to the overexpression of intestinal amidases. Here, I have analyzed the kinetics expression of the *Pglyrp-2* gene, the ortholog of the *Drosophila* amidases, in the murine small intestine by quantitative RT-PCR upon gavage with *Btk SA-11* spores.

Taking PBS1X oral infected mice as a reference, we observed a moderate up-regulation of *Pglyrp-2* expression only 24 hours post-infection in the duodenum part. Whereas the most pronounced upregulation was observed mostly in the posterior small intestine regions (Jejunum and Ileum) corresponding to the timing of spore's germination. However, we observed no difference in the *Pglyrp-2* expression at 120 hours in the jejunum part



**Figure 18:** *Pglyrp2* expression profiling in different parts of mice small intestine after *Bt* spores oral gavage

Data represent mean  $\pm$  SEM of at least five independent experiments. Mann-whitney test, asterisks represent a statistically significant difference between conditions: \* $p < 0.05$ , ns, not significant ( $p > 0.1$ ).

### **Supplemental material**

#### **RNA extraction and RT-qPCR**

One-centimeter of intestinal tissue (duodenum, jejunum, or ileum) was homogenized in 2-mL tubes containing 300  $\mu$ l Trizol using the Precellys system. The duodenum part was taken directly after the stomach, the jejunum part was taken in the middle, and the ileum was the distal part near the cecum. After extraction with chloroform, precipitation with isopropanol and washings with 70% ethanol, and extracted RNA was resuspended in 50  $\mu$ L of sterile distilled water. cDNA synthesis was performed with Applied Biosystems™ Kit (Thermo Fisher

Scientific). Gene expression was analyzed by quantitative reverse transcription PCR (qRT-PCR) analysis on a QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific) and normalized to endogenous control gene mGUS. Gene expression is depicted as relative mRNA amounts (relative quantities (RQ) after normalization to the expression of endogenous control gene mGUS calculated using delta/delta Ct method using the software provided by QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System.

<b>Oligonucleotides</b>		
mGUS Forward GAT-TCA-GAT-ATC-CGA-GGG- AAA-GG	Invitrogen	N/A
mGUS Reverse CCA-ACG-GAG-CAG-GTT-GAA- AT	Invitrogen	N/A
Pglyrp-2 Forward ACC-ACA- AGA-ATG-AGC-TGG-GC	Invitrogen	N/A
Pglyrp-2 Reverse TCA-CCC-TTG- ATG-TTC-CAG-CC	Invitrogen	N/A

## 2. Impact de l'acidité sur le processus de germination et prolifération des spores de *Bt*

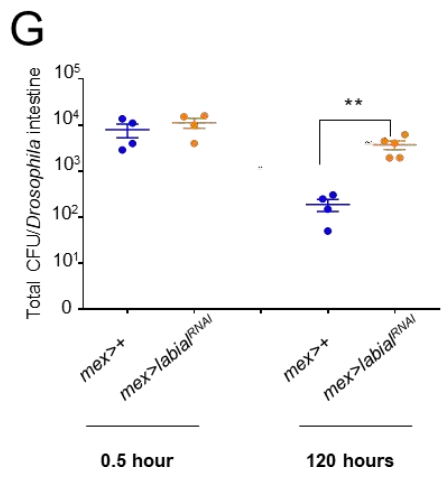
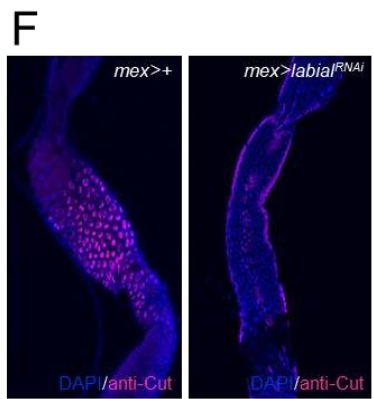
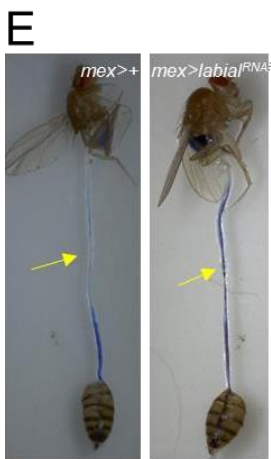
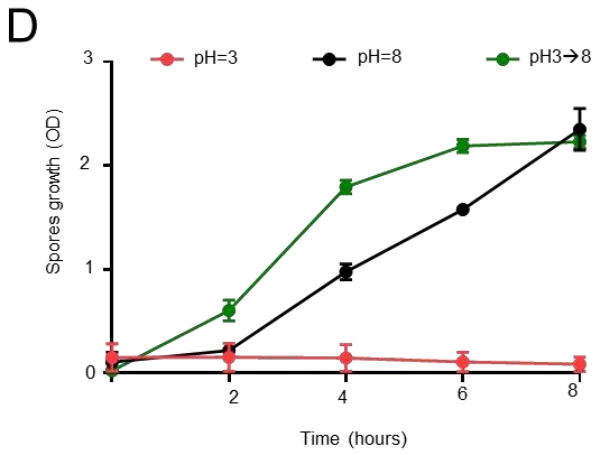
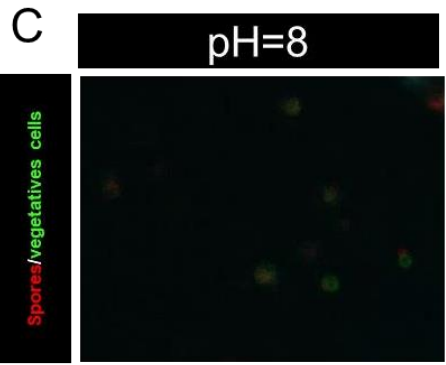
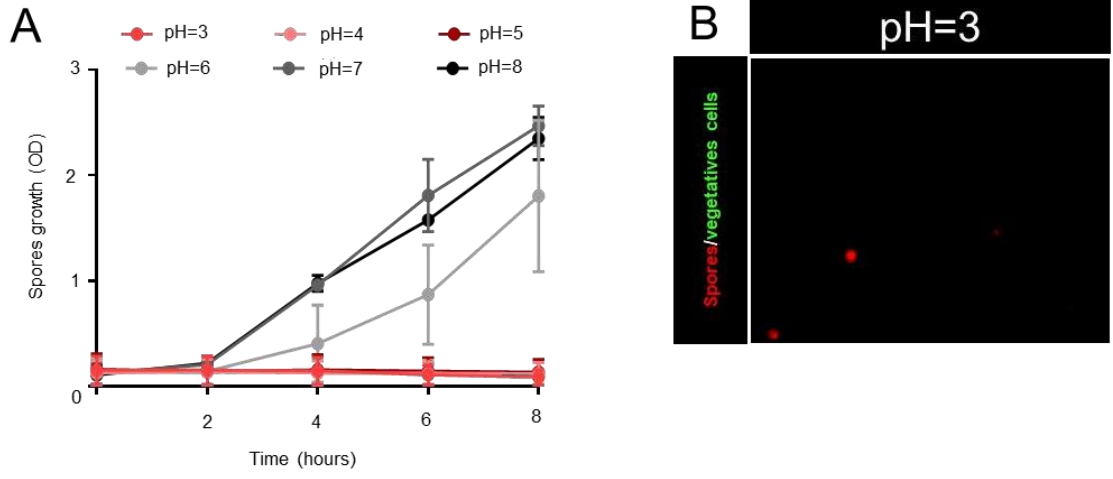
The results obtained in the paper described above showed that the *B. cereus* spores are able to persist and germinate in the posterior parts of the *Drosophila* midgut and mice small intestines. Moreover, the ability of spores to survive in the gastrointestinal tract condition suggests that they are also able to face an acidic environment such as the stomach in mice and the copper cells domain in flies. Therefore, the viability of spores at low pH conditions was studied *in vitro* both *in vitro* and *in vivo* in *Drosophila*.

First, we monitored *in vitro* the germination and growth of *Btk SA-11<sup>R</sup>* spores at different pH. Briefly, spores were grown in LB broth adjusted to pH 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0 or 8.0 and incubated at 30°C for 8h. The growth of the bacterial population was measured every 2 hours. I have observed that spores are not able to germinate at very low pH ( $3.0 < \text{pH} < 5.0$ ) corresponding to the acidic Stomachal conditions (Figure 19A). However, from pH 6.0 to 8.0, spores could start their germination process and further proliferated. Also, the neutral pH or low alkaline conditions appeared more adapted to spores growth (Figure 19A). I also carried out live imaging for 6 hours using the *Btk SA-11<sup>R/G</sup>* spores (red spores that give birth to GFP germinant cells) to track spore behavior in acidic and alkaline pH. I confirmed that spores did not germinate in acidic conditions (Figure 19B). Nevertheless, spores were able to germinate and proliferate in an alkaline environment (Figure 19C).

To mimic *in vitro* the passage through an acidic region (e.g. the stomach of mice or the copper cell region of *Drosophila* intestine), I exposed spores for a few minutes to acidic conditions (pH=3) and then I transferred them in alkaline conditions. Then, I monitored their growth for 8h at 30°C. Interestingly, this experiment showed that the transition from acidic to alkaline conditions accelerated the spore germination and proliferation process (Figure 19D).

Altogether, these results showed that spores are able to resist acidic conditions, germinate and proliferate in alkaline conditions which are close to the conditions encountered in the *Drosophila* posterior midgut or the mice small intestine. Nonetheless, in my previous paper, we had never observed any *Bt/Bc ss* vegetative cells proliferation in the posterior midgut. This suggests that, *in vivo*, some constrains must exist to preclude *Bt/Bc ss* vegetative cell proliferation. These constrains could arise from the host, the bacterium itself or both.

In order to investigate, *in vivo*, the impact of acidic conditions on the spore fate, I used the *Drosophila* model. While the pH in the anterior and posterior midgut are mostly alkaline, the R3 region (the copper cell domain) is marked by luminal acidic conditions (Figure 19E, left panel). The transcription factor Cut and Labial are necessary for the differentiation and function of the acid-secreting copper cells in the region R3 (Figure 19F, left panel) (Strand and Micchelli, 2011). It was previously reported that lowering the expression of the *labial* gene can alter the acidic region and induces a significant increase of commensal microbial charge in the posterior midgut (Storelli et al., 2018). Silencing the expression of *labial* in the adult midgut, by expressing *labial* RNAi specifically in the midgut (*mex-GAL4>UAS-labial<sup>RNAi</sup>*), buffered the acidic region (Figure 19E-F, right panels). The absence of acidic R3 domain did not alter food intake of the flies during the 30 minutes of spore feeding (Figure 19G). However, 120 hours after spore ingestion, I observed a significant increase of the *Btk* load in acid-less flies midgut (Figure 19G). Altogether, those results confirm that acidic intestinal conditions can impact *Bt* fate. More investigations are required in order to identify if this *Btk* load increase in acid-less flies is correlated with vegetative cell proliferation in the posterior midgut.



**Figure 19 : Role of the acidic conditions on spore fate**

**A-** Spore growth in LB broth adjusted to pH ranging from 3 to 8.

**B-** Live imaging of *Btk SA-11*<sup>R/G</sup> spore growth in LB broth adjusted to pH=3.

**C-** Live imaging of *Btk SA-11*<sup>R/G</sup> spore growth in LB broth adjusted to pH=3.

**D-** Spore growth in LB broth exposed to low and then alkaline conditions.

**E-** *Drosophila* fed with the bromophenol blue dye pH indicator. Note the absence of blue labeling in the middle midgut (R3 region) of WT flies (yellow arrow, left panel). When the acidic pH is buffered in *mex-Gal4>labial*<sup>RNAi</sup> midguts, the R3 region harbors a blue labeling (yellow arrow, right panel).

**F-** WT (left) or *mex-Gal4>labial*<sup>RNAi</sup> (right) midguts stained for Cut (purple) and DAPI (blue). Note the absence of Cut staining in *mex-Gal4>labial*<sup>RNAi</sup> midgut.

**G-** Bacterial load in acid-less flies 0.5 or 120 hours after *Btk SA-11* spore acute feeding,

Data represent mean ± SEM of at least four independent experiments. Mann-whitney test, asterisks represent a statistically significant difference between conditions; \*\*0.001 < p < 0.01



## **Chapitre II. Détournement des défenses immunitaires des macrophages par les spores de *Bacillus thuringiensis***

### **1. Résumé**

Le groupe *Bacillus cereus* est représenté par plusieurs espèces bactériennes Gram-positives capables de sporuler en conditions défavorables. Ce groupe est décrit comme la troisième cause d'intoxication alimentaire collective en Europe et la deuxième en France (<https://www.santepubliquefrance.fr/>). De plus, ces bactéries opportunistes ont été identifiées dans des infections nosocomiales chez des individus immunodéprimés (Cormontagne et al., 2021). Par ailleurs, la bactérie sporulante *B. thuringiensis* (*Bt*), qui appartient au groupe phylogénétique *B. cereus*, est le biopesticide le plus commercialisé dans le monde.

Les bactéries du groupe *Bc* infectent leurs hôtes par ingestion de nourriture contaminée, à la suite d'une blessure. Lorsque le système immunitaire inné est défaillant, la bactérie opportuniste devient alors pathogène et est capable d'induire des complications plus sévères conduisant parfois jusqu'à la mort de l'hôte. Les macrophages représentent des cellules immunitaires qui peuplent tous les tissus de l'organisme. Ces cellules peuvent être recrutées pour accomplir des fonctions complexes reliées à l'inflammation et à la défense de l'hôte telles que la destruction des pathogènes ou des cellules apoptotiques (Beutler, 2004; Censoplano et al., 2014). Typiquement, ces cellules internalisent les microbes et initient une réponse immunitaire conduisant à la destruction du pathogène (Beutler, 2004). Les macrophages jouent un rôle prépondérant dans la mise en place d'une réponse immunitaire innée adaptative. Un complexe cytoplasmique, l'inflammasome NLRP3, a été identifié chez les macrophages comme un élément important dans la détection des microorganismes pathogènes (Dufies et al., 2021). L'activation de l'inflammasome NLRP3 se traduit par l'activation de la protéase Caspase-1 et conduit à la libération des cytokines pro-inflammatoires de type IL-1 $\beta$  et IL-18 (Lamkanfi and Dixit, 2017). Il a été récemment décrit que les bactéries végétatives du groupe *Bacillus cereus* sont reconnues par les macrophages promouvant ainsi leur internalisation et leur élimination rapide (Rolny et al., 2017). Dans le contexte de mon étude, j'ai cherché à déterminer si les cellules végétatives et les spores de *Bt* (issues de la souche commerciale *Btk SA-11*) sont aussi

reconnues par ces cellules phagocytaires et sont capables ou pas d'induire une réponse inflammatoire par l'activation de l'inflammasome NLRP3.

Dans cette étude, j'ai isolé et différencié des macrophages à partir de la moelle osseuse de souris (Bone Marrow derived Macrophages). Ces macrophages ont ensuite été stimulés soit par des cellules végétatives de *Bt* soit par des spores de *Btk SA-11*.

Dans un premier temps, en utilisant les formes végétatives, j'ai confirmé que les macrophages sont capables de les internaliser et de les dégrader. J'ai aussi pu montrer que la forme végétative de *Btk SA-11* est capable d'induire l'activation de l'inflammasome NLRP3. Ensuite, j'ai montré que les spores sont aussi phagocytées et directement adressées vers le phagolysosome où, de manière surprenante, elles y sont stockées sans y germer. Enfin, j'ai aussi mis évidence que les spores, contrairement aux cellules végétatives, n'induisent pas l'activation de l'inflammasome NLRP3.

L'ensemble de mes résultats indiquent que, contrairement aux bactéries végétatives, les spores de *Bt* persistent à l'intérieur des macrophages et n'induisent pas de réponse inflammatoire dépendante de NLRP3. Etant donné que ces cellules ont des propriétés migratoires, celles-ci pourraient participer à la désamination des spores chez l'hôte infecté.

## 2. Article : Hachfi et al., (in preparation)

### Interactions of *Bacillus thuringiensis* spores with the phagocytic macrophage host cells

Salma Hachfi<sup>1,2</sup>, Anne Doye<sup>2</sup>, Armel Gallet<sup>1,\*</sup> and Laurent Boyer<sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup>Université Côte d'Azur, CNRS, INRA, ISA, France

<sup>2</sup>Université Côte d'Azur, Inserm, C3M, Nice, France

\*Correspondence: **L. Boyer** ([Laurent.BOYER@univ-cotedazur.fr](mailto:Laurent.BOYER@univ-cotedazur.fr)), INSERM U1065, C3M, Bâtiment Universitaire ARCHIMED, 151 route Saint Antoine de Ginestière, BP 2 3194, 06204 NICE CEDEX 3 & **A. Gallet** ([Armel.GALLET@univ-cotedazur.fr](mailto:Armel.GALLET@univ-cotedazur.fr)), ISA, 400 route des Chappes, BP 167, 06903 Sophia Antipolis Cedex, France

#### **Abstract**

Macrophages are the first line of defense of the innate immune system. These phagocytic cells are able to respond efficiently to tissue damages and microbial infections. During infection, macrophages have diverse roles including microbe phagocytosis and coordination of the inflammatory response *via* the secretion of inflammatory cytokines. One of a master component of the innate immune system is the NLRP3 inflammasome. NLRP3 mediates caspase-1 activation and the secretion of proinflammatory cytokines (IL-1 $\beta$ ). The Gram-positive sporulating bacterium *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) is a worldwide used biopesticide to fight lepidopteran pests and is therefore present in the food. *Bt* belongs to the phylogenetic group of *B. cereus*, the third cause of food poisoning in Europe and the second in France. *B. cereus* infections were also reported to be involved in bacteremia despite the accumulation of phagocytic cells at the site of infection. Using *in vitro* culture of mouse Bone Marrow-Derived Macrophages, we showed that internalized *Bt* vegetative cells can activate the NLRP3 inflammasome pathway causing a high level of cells death. On the other side, spores, that are also phagocytosed, persist in the macrophage bodies without activation of the inflammasome pathway.

## **Introduction**

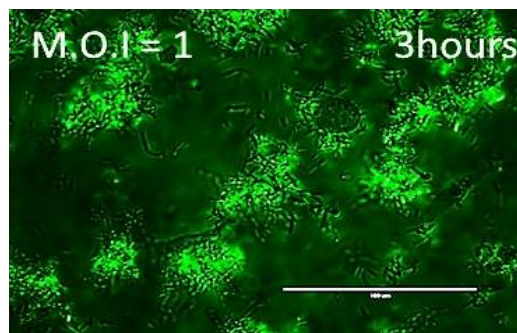
During our existence, we are continuously exposed to various microorganisms. To face this threat, the host's sophisticated immune system is required to prevent microbes' invasion. The immune system consists of innate and adaptive immune responses. Myeloid cells such as macrophages and dendritic cells play a key role in innate immunity. Their function is to recognize and internalize the infectious agents, then, destroy them (Underhill and Goodridge, 2012; Tran and Ramarao, 2013). The uptake of infectious agents by phagocytic cells involves the binding between bacterial surface antigens and cellular receptors. Phagocytic cells can recognize pathogens directly, through specific microbial motifs called pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) (Kumar et al., 2011). Following this recognition, macrophage membrane cell protrusions surround and absorb the microbe into the acidic phagolysosome (Ueno and Wilson, 2012). This acidic environment inhibits microbial growth, kills susceptible microorganisms, and degrade organic debris (Underhill and Goodridge, 2012). However, some pathogens developed avoidance strategies to ensure their survival in a highly hostile environment created by the immune response. This adaptation could involve the escape from the phagosome or survival into the phagolysosome milieu to survive and to disseminate within the host body (Underhill & Goodridge, 2012).

The *B. cereus* group is represented by Gram-positive spore-forming bacterium. It is widely distributed in the environment (Stenfors Arnesen et al., 2008). This group includes several *Bacillus* species with closely related phylogeny. The most well-studied members of the group are *B. cereus sensu stricto* (*Bc ss*) and *B. thuringiensis* (*Bt*). *Bc ss* is an emerging human pathogen initially characterized as a causal agent of gastroenteritis. It is the third most important cause of collective food poisoning in Europe and the second one in France. *Bt* is known for its potential entomopathogenic activities and *Bt* spores are widely used worldwide as biopesticides. The subspecies *kurstaki* (*Btk*) specifically targets lepidopteran larvae that threaten crops. Using, murine peritoneal macrophages infection by *Bacillus cereus sensu stricto* (*Bc ss*) vegetative cells showed a short bacteria internalization and elimination (Rolny et al., 2017). However, studies on the interaction between spores of the *B. cereus* group and phagocytic cells are rarely described. In the present work, we examine the interaction and the intracellular lifestyle of spores of the *Btk SA-11* biopesticide strain in mice Bone Marrow-Derived Macrophages (BMDM).

## **Results**

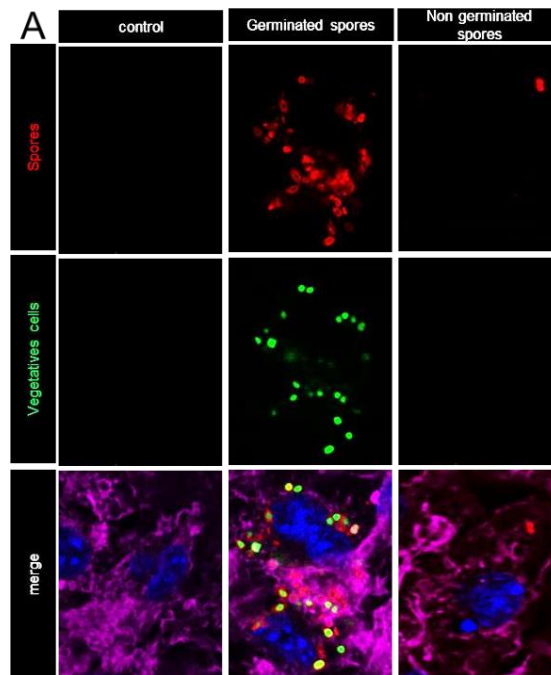
### ***1. Bt spores interaction with phagocytic cells***

Because we observed important *Btk* spore germination and proliferation in the cell culture medium (Figure 1), we chose to use a low multiplicity of infection (M.O.I.) model (M.O.I.=1) to obtain a reasonable balance between the number of bacteria/spores and the number of infected cells.



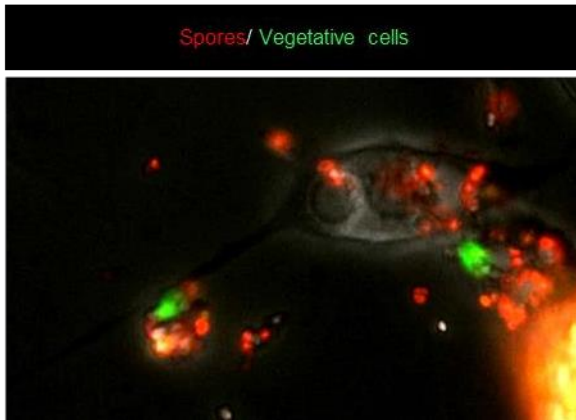
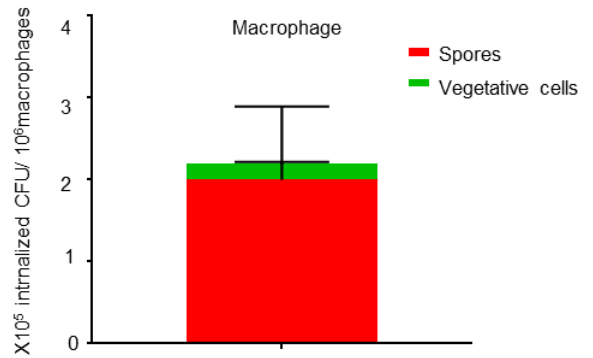
**Figure 1.** Spores germination and proliferation in BMDM medium. *Btk* vegetative cells are in green. Scale bar 25 $\mu$ m

First, we wondered whether BMDM cells could recognize phagocyte *Btk* spores. We infected macrophages with the fluorescent *Btk SA-11<sup>R/G</sup>* spores which consist of red fluorescent spores that upon germination fluorescence in green (by expressing the GFP) (Hachfi et al., submitted). 4 hours after BMDM infection, we performed confocal microscopy analysis. We observed GFP germinated cells and red spores both colocalizing with macrophage (Figure 2 Medium Panel). To delay the germination of spores in the cell culture medium, facilitating the monitoring of spore fate only, we inactivated spores by exposure to UV irradiation as described in REF for *B. subtilis* Using these inactivated spores, confocal we confirmed their colocalization with macrophage cells (Figure 2, right panel).



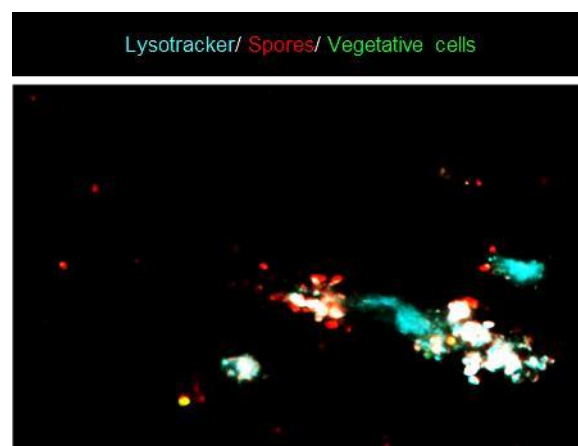
**Figure 2.** Characterization of spore phagocytosis by macrophages using confocal microscopy. Spores are in red, vegetative cells are in green. Actin in purple and nuclei in blue allow the detection of macrophages.

Next, we performed live-cell imaging of macrophage/*Btk SA-11<sup>RG</sup>* spore interaction for 6 hours. Movies revealed that macrophages could make contact with spores *via* long filopodia, engulfing them towards their cell body, then internalizing them (Figure 3A, Movie 1). The live-cell imaging revealed the germination of spores in the cell culture medium but we found that internalized spores persisted in the macrophage bodies without launching any germination process. These observations were consistent with the CFU measurements in the BMDM macrophages 4 hours after phagocytosis. Indeed, we compared heat-treated samples (to kill vegetative cells) to not heat-treated samples (control). The difference between the control and the heat-treated sample corresponds to the number of vegetative cells (Hachfi et al., submitted). Interestingly, we did observe that *Bt* spores internalized do not germinate in macrophage bodies (Figure 3B).

**A****B**

**Figure 3.** Spores are internalized by macrophages. (A) Live cell imaging. Spores are shown in red and vegetative cells are shown in GFP. (B) CFU assessment of heat-treated vs non-heat-treated macrophage bodies (4 hours after infection)

Acidic phagosome pH is a key obstruct to the growth of many microorganisms (Uribe-Quero and Rosales, 2017). To assess whether the persistence of spores inside the macrophage body was correlated with the acidic conditions, we stained cells with the LysoTracker labeling. LysoTracker is a fluorophore linked to a weak base that freely permeates through cell membranes. LysoTracker is not significantly protonated at neutral pH but is fully protonated in acidified organelles (pH<5.5–6) (Anes et al., 2003; Ibrahim-Granet et al., 2003). The results showed that spores within the infected macrophages colocalized with the LysoTracker-positive vesicles (Figure 4; Movie 2).



**Figure 4.** Acidity prevents spore germination inside the macrophages. Time-lapse images of live BMDM cells stained with LysoTracker (phagolysosome in blue) Spores are shown in red and vegetative cells in green.

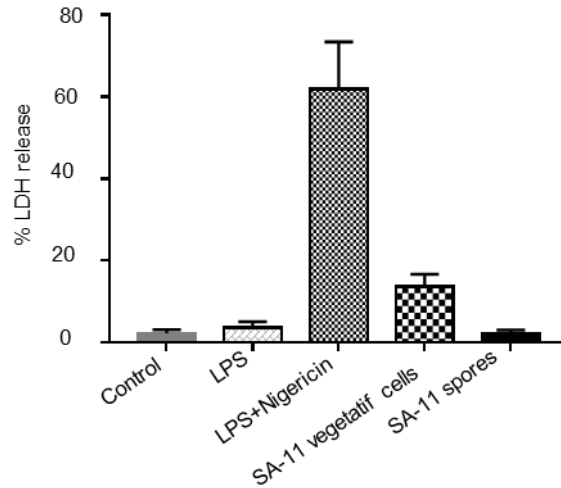
Taken together our results suggest that *Btk* spores are able to survive engulfment by macrophages and that the acidic intracellular environment of these phagocytic cells blocks spore germination.

## ***2. Bt spores do not induce any innate immune response in phagocytic cells***

Macrophages' interaction with bacterial pathogens and/or their toxins promotes innate immunity. Inflammasome activation is an integral part of the innate immune response in host defense and other inflammatory diseases (Dufies et al., 2021). The nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor family, pyrin domain-containing 3 (NLRP3) inflammasome is present in a variety of cells, including phagocytic cells (Pétrilli et al., 2007). The NLRP3 inflammasome is mainly composed of NLRP3, the apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase activating recruitment domain (ASC) and the procaspase-1. These three components are assembled to react to microbial infections or endogenous danger signals. The activation of the NLRP3 inflammasome promotes the activation of caspase-1 and the secretion of  $\text{IL-1}\beta$  cytokines and induces cell death by pyroptosis affecting the membrane integrity (Jin and Flavell, 2010; Sutterwala et al., 2014).

Pyroptotic cell death is distinct from the other forms of cell death such as apoptosis by its dependence on caspase-1 (Miao et al., 2011). The caspases-1 activation results in rapid formation of membrane pores, followed by membrane rupture, and release of intracellular content into the extracellular environment, including cytosolic proteins such as lactate dehydrogenase (LDH) (Bergsbaken et al., 2009). Therefore, to test membrane permeability in our experiments, LDH was measured in the culture supernatants. Following LPS (Lipopolysaccharide) treatment, the no-LDH increase was observed. However, adding nigericin (an activator of the NLRP3 inflammasome) to LPS treatment promoted an increase in LDH levels in the supernatants of cells, indicating that the cell membrane integrity had been compromised. Interestingly, at MOI=1, *Btk SA-11* vegetative cell infection provoked moderate cytotoxicity whereas spores did not (Figure 5). Together, these results demonstrate that spores do not affect cell membrane integrity.

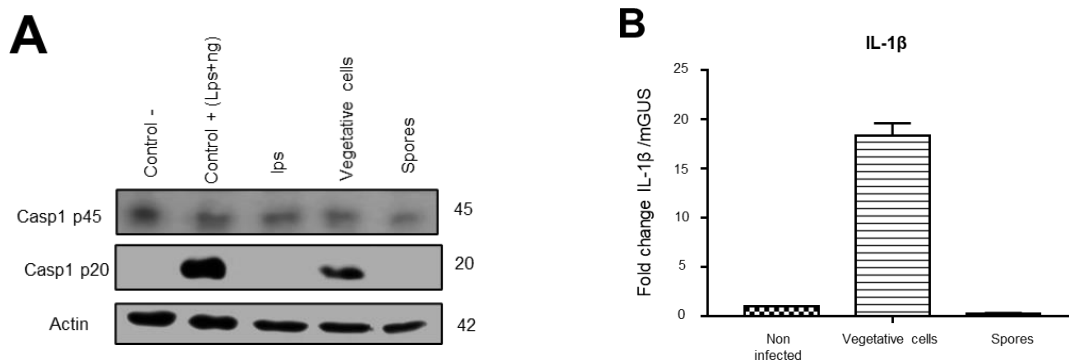




**Figure 5.** Spores do not generate BMDM cytotoxicity.

We then evaluated the specificity of caspase-1-induced pyroptotic cell death. Out of diverse conditions tested, only LPS-nigericin assay or vegetative cells infection were able to promote an NLRP3 inflammasome-dependent caspase-1 cleavage (Figure 6A).

A major function of the NLRP3 inflammasome is to regulate the secretion of a family of non-conventionally secreted cytokines, including IL-1 $\beta$ . To probe the implication of *Btk SA-11* vegetative cells/spores in cytokine productions, we performed RT-qPCR to quantify *Il-1  $\beta$*  expression. *Il-1  $\beta$*  transcription level was positively induced by *Btk SA-11* vegetative cells. By contrast, spores did not induce *Il-1  $\beta$*  transcription (Figure 6B).



**Figure 6.** Spores do not promote NLRP3 activation. (A) Immunoblot analysis of caspase-1 and actin in macrophage lysates. (B) Analysis of *Il-1 $\beta$*  expression by RT-qPCR

Taken together our results reveal that, unlike vegetative cells, internalized *Btk* spores do not trigger NLRP3 activation.

## **Conclusion**

Here we show that *Btk* spores can be phagocytosed by murine macrophages. Our data demonstrate that internalized spores can persist into the immune phagocytic cells without germination. We also observed that, unlike vegetative cells, spores are not able to trigger the activation of the NLRP3 inflammasome, an essential step in the innate immune response. Nevertheless, more investigations are necessary to study the involvement of other innate immune pathways such as the TLR pathway after spore infection. However, because macrophages are circulating cells and spores can persist inside their body, macrophages can serve as a spore vehicle to disseminate them into the host body.

## **Material and Methods**

### ***Inhibition of Bacillus Spores germination by Ultraviolet Light***

The lyophilized spores were suspended in sterile, deionized water to obtain a concentration of  $10^6$  spores per mL. Spores were then placed in a 6 well culture plate and irradiated for 90 min under UV light. for *B. thuringiensis* strains. The irradiated spores were recovered and centrifuged at 10000g, 20°C for 10min. The control of UV inactivation of the germination was performed as follows: Irradiated spores were serially diluted in sterile water and spread on LB agar plates. After overnight incubation at 30°C, the colonies were enumerated. Based on the number of colonies obtained at a given dilution of the irradiated spores, the surviving titer of each sample was calculated.

### ***BMDMs culture and inhibitors***

Bone marrow-derived macrophages (BMDMs) were extracted from femurs of 6 weeks-old BALB/c and were cultured in RPMI GlutaMax medium (Life Technologies) supplemented with 100 ng/mL M-CSF (Premium grade, Miltenyi Biotec), 10% heat-inactivated FBS (Biowest) and 50 µg/mL gentamycin (Life Technologies). Bone marrow cells were plated at a concentration of  $10^6$  cells per well in a 6-well plate. Cells were incubated at 37°C, 5% CO<sub>2</sub>.

### ***Intracellular staining***

On day 6, adherent cells on coverslips were infected with fluorescent spores<sup>R/G</sup> (article 1). Four hours after, cells were fixed with 4% paraformaldehyde in PBS for 15 min. Fixation and all subsequent steps in this procedure were carried out at room temperature; Following fixation, cells were washed twice, then blocked with 5% Triton X-100 for 5 min and blocked with 2% TBS-BSA (BSA, Sigma-Aldrich) in PBS for 30 min. Subsequently, cells were washed twice. Finally, all cells were stained with 250 ng/ml DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindole) (Life Technologies) in PBS for 5 min, washed 3 times with PBS, covered with fluorescent mounting medium (Sigma-Aldrich), and mounted on slides. Samples were imaged Cells were imaged using Nikon A1R confocal.

For intracellular CFU, at indicated time infected macrophages were removed and individually lysed in Triton 0.01%, and the lysate was heat-treated, serial diluted, and plated on LB agar to enumerate CFU as described in the 1<sup>st</sup> paper

### ***Time-lapse phagocytosis assays***

50 000 BMDMs were plated into 8 wells microplates LAB TEK II (#055079, DUTSCHER) and allowed to adhere as described above. Two hours before infection, cells were incubated in RPMI 2% medium with 10nM of LysoTracker<sup>TM</sup> Deep Red (#L12492, Invitrogen). BMDMs were then washed with sterile PBS. *Btk*<sup>R/G</sup> viable spores and *Btk*<sup>GFP</sup> bacteria were added at m.o.i 1 and the plates were transferred under a Leica AM-TIRF video microscope which was housed inside a cell incubator at 37°C/5% CO<sub>2</sub>, until the end of the assay. At the beginning, 10 images per well from two technical replicates were taken every 5 min for 2h using a 40x objective. Then 10 images per well were taken every 10 min for further 12 hours

### ***Cells infections and Inflammasome activation***

At day 7, macrophages were infected with *Bt/Bc* vegetative bacteria, spores or irradiated spores at a multiplicity of infection (MOI) of one in RPMI 1640 supplemented with 2% FBS for 4hours.

To activate the NLRP3 inflammasome, control macrophages were treated with 100 ng/ml LPS from *E. coli* (Invivogen) for 4 hours and then stimulated with 5 μM of Nigericin (Invivogen) for 30 min. LDH release was measured using the CytoTox96® non-radioactive cytotoxicity assay (Promega).

### ***Proteins precipitation and Immunoblotting analyses***

Following the treatments, cells were pelleted, and Supernatants were removed for proteins precipitation. Ice-cold, 80% Acetone (1.4ml) was added to 350 $\mu$ L of supernatants and samples were incubated overnight at  $-20^{\circ}\text{C}$ . Samples were then centrifuged at 10 000  $g$  for 10 min at  $8^{\circ}\text{C}$ . Supernatants were removed and 500  $\mu$ L ice-cold acetone was used to resuspend pellets. Following a 5 min incubation on ice, samples were centrifuged at 10000  $g$  for 10 min at  $8^{\circ}\text{C}$ . Residual acetone in samples was removed by air-drying for 30 min. The protein pellet was resuspended directly in 100 $\mu$ L LDS Sample buffer with DTT. Samples were briefly vortexed and heated at  $95^{\circ}\text{C}$  for 10 min.

Proteins were separated on 12% polyacrylamide gels (SDS PAGE). The proteins were transferred to nitrocellulose membranes (bio-Rad). After transfer, the membranes were incubated in blocking buffer containing 2.5% nonfat dried milk and incubated overnight with primary antibodies against caspase-1 (at 1:1000; AdipoGen), Actin (at 1:10000; Sigma). Nitrocellulose membranes were then incubated with secondary antibody for 2h and proteins were visualized using Fujifilm LAS-4000 Imager. Videos were analyzed using Fuji Software. Green channel acquisition time was 400 ms, whereas red channel acquisition time was 350 ms.

### ***RNA isolation and quantitative gene expression analysis***

Following the treatments, cells were pelleted, and the supernatant was removed. The cell pellet was re-suspended was extracted using the RNA Extraction Kit (ARN Qiagen) according to the manufacturer's instructions. All RNA samples were DNase treated (Thermo Fisher Scientific) and reverse transcribed with Applied Biosystems™ Kit (Thermo Fisher Scientific). Gene expression was analyzed by quantitative reverse transcription PCR (qRT-PCR) analysis on a QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific) and normalized to endogenous control gene mGUS. Gene expression is depicted as relative mRNA amounts (relative quantities (RQ) after normalization to the expression of endogenous control gene mGUS calculated using delta/delta Ct method using the software provided by QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System.

Oligonucleotides		
mGUS Forward GAT-TCA-GAT-ATC-CGA-GGG- AAA-GG	Invitrogen	N/A
mGUS Reverse CCA-ACG-GAG-CAG-GTT-GAA- AT	Invitrogen	N/A
TNF Forward CTA-TGT-CTC-AGC- CTC-TTC-TC	Invitrogen	N/A
TNF Reverse CAT-TTG-GGA-ACT- TCT-CAT-CC	Invitrogen	N/A
Il-1b Forward AGG-AGA-CGA- CTC-TAA-ATA-TCC	Invitrogen	N/A
Il-1b Reverse CAC-TAC-CTG-TGA- TGA-GTT-TTG	Invitrogen	N/A

## REFERENCES

- Anes, E., Kühnel, M. P., Bos, E., Moniz-Pereira, J., Habermann, A., & Griffiths, G. (2003). Selected lipids activate phagosome actin assembly and maturation resulting in killing of pathogenic mycobacteria. *Nature Cell Biology*, 5(9), 793–802. <https://doi.org/10.1038/ncb1036>
- Bergsbaken, T., Fink, S. L., & Cookson, B. T. (2009). Pyroptosis: host cell death. *Nat Rev Microbiol*, 7(2), 99–109. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2070>. Pyroptosis
- Beutler, B. (2004). Innate immunity: An overview. *Molecular Immunology*, 40(12), 845–859. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2003.10.005>
- Censoplano, N., Epting, C. L., & Coates, B. M. (2014). The role of the innate immune system in sepsis. *Clinical Pediatric Emergency Medicine*, 15(2), 169–176. <https://doi.org/10.1016/j.cpem.2014.04.007>
- Cormontagne, D., Rigourd, V., Vidic, J., Rizzotto, F., Bille, E., & Ramarao, N. (2021). *Bacillus cereus* Induces Severe Infections in Preterm Neonates: Implication at the Hospital and Human Milk Bank Level. *Toxins*, 13(2), 123. <https://doi.org/10.3390/toxins13020123>
- Dufies, O., Doye, A., Courjon, J., Torre, C., Michel, G., Loubatier, C., Jacquel, A., Chaintreuil, P., Majoor, A., Guinamard, R. R., Gallerand, A., Saavedra, P. H. V., Verhoeyen, E., Rey, A., Marchetti, S., Ruimy, R., Czerucka, D., Lamkanfi, M., Py, B. F., ... Boyer, L. (2021). *Escherichia coli* Rho GTPase-activating toxin CNF1 mediates NLRP3 inflammasome activation via p21-activated kinases-1/2 during bacteraemia in mice. *Nature Microbiology*, 6(3), 401–412. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-00832-5>
- Ibrahim-Granet, O., Philippe, B., Boleti, H., Boisvieux-Ulrich, E., Grenet, D., Stern, M., & Latgé, J. P. (2003). Phagocytosis and intracellular fate of *Aspergillus fumigatus* conidia in alveolar macrophages. *Infection and Immunity*, 71(2), 891–903. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.2.891-903.2003>

- Jin, C., & Flavell, R. A. (2010). Molecular mechanism of NLRP3 inflammasome activation. *Journal of Clinical Immunology*, 30(5), 628–631. <https://doi.org/10.1007/s10875-010-9440-3>
- Kumar, H., Kawai, T., & Akira, S. (2011). Pathogen recognition by the innate immune system. *International Reviews of Immunology*, 30(1), 16–34. <https://doi.org/10.3109/08830185.2010.529976>
- Lamkanfi, M., & Dixit, V. M. (2017). The inflammasome turns 15. *Nature*, 548(7669), 534–535. <https://doi.org/10.1038/548534a>
- Miao, E. A., Rajan, J. v., & Aderem, A. (2011). Caspase-1-induced pyroptotic cell death. *Immunological Reviews*, 243(1), 206–214. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2011.01044.x>
- Pétrilli, V., Papin, S., Dostert, C., Mayor, A., Martinon, F., & Tschopp, J. (2007). Activation of the NALP3 inflammasome is triggered by low intracellular potassium concentration. *Cell Death and Differentiation*, 14(9), 1583–1589. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4402195>
- Rolny, I. S., Racedo, S. M., & Pérez, P. F. (2017). Fate of *Bacillus cereus* within phagocytic cells. *International Microbiology*, 20(4), 170–177. <https://doi.org/10.2436/20.1501.01.300>
- Stenfors Arnesen, L. P., Fagerlund, A., & Granum, P. E. (2008). From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiology Reviews*, 32(4), 579–606. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00112.x>
- Sutterwala, F. S., Haasken, S., & Cassel, S. L. (2014). Mechanism of NLRP3 inflammasome activation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1319(1), 82–95. <https://doi.org/10.1111/nyas.12458>
- Tran, S. L., & Ramarao, N. (2013). *Bacillus cereus* immune escape: A journey within macrophages. *FEMS Microbiology Letters*, 347(1), 1–6. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12209>
- Ueno, N., & Wilson, M. E. (2012). Receptor-mediated phagocytosis of *Leishmania*: Implications for intracellular survival. *Trends in Parasitology*, 28(8), 335–344. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2012.05.002>
- Underhill, D. M., & Goodridge, H. S. (2012). Information processing during phagocytosis. *Nature Reviews Immunology*, 12(7), 492–502. <https://doi.org/10.1038/nri3244>
- Uribe-Quero, E., & Rosales, C. (2017). Control of phagocytosis by microbial pathogens. *Frontiers in Immunology*, 8(OCT), 1–23. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01368>

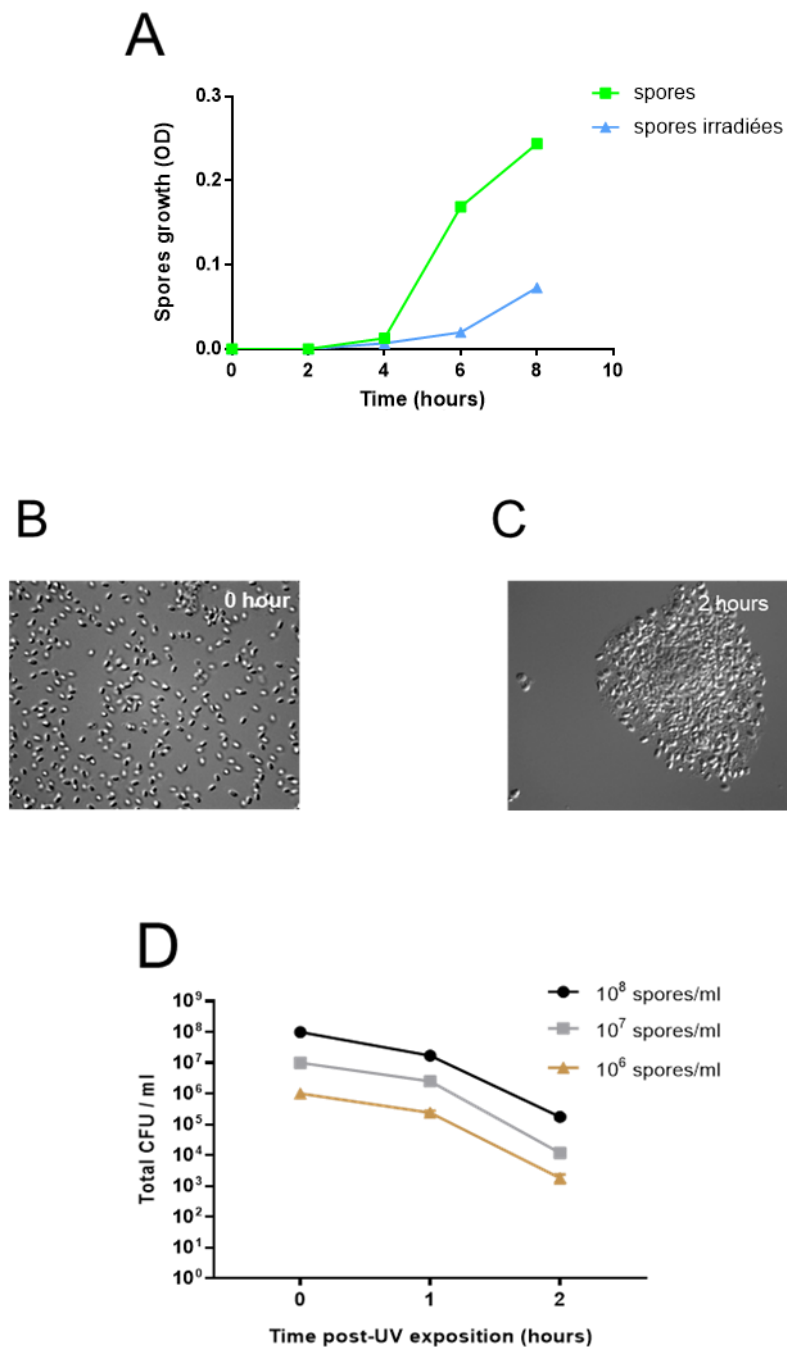
# **Discussion et perspectives**

## 1. Evaluation du potentiel de virulence des bioinsecticides à base de *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) chez des organismes non-cibles

Depuis plusieurs décennies, l'utilisation des pesticides chimiques font l'objet de nombreuses critiques quant à leurs effets sur l'environnement et la santé publique. Pour cette raison, les autorités encouragent de plus en plus l'utilisation des biopesticides. Je cite, à titre d'exemple, le plan Ecophoto établi en France et qui vise à réduire de 50% l'utilisation des pesticides chimiques en faveur des biopesticides d'ici 2025. Le succès commercial des biopesticides à base de la bactérie environnementale *Bt* est principalement dû à la présence de toxines entomopathogènes appelées toxines Cry, produites lors de la phase de sporulation (Fiuza et al., 2017). *Bt* est une bactérie qui appartient au groupe *B. cereus*. Ce groupe est représenté par huit espèces bactériennes dont la plus décrite est l'espèce *Bc ss* identifiée comme l'agent causal de plusieurs types d'intoxications alimentaires (se référer à la section II/1). Cependant, les deux espèces *Bt* et *Bc ss* sont très proches phylogénétiquement et plusieurs études ont reporté qu'il est impossible de les différencier sur le plan chromosomique car elles présentent les mêmes gènes de virulence tels que ceux codant les entérotoxines (se référer à la section III/1). En revanche, la taxonomie actuelle permettant de distinguer ces deux espèces s'appuie principalement sur des caractéristiques phénotypiques à savoir la présence de cristaux de toxines Cry dont les gènes sont portés par des plasmides présents uniquement chez l'espèce *Bt*. Certaines toxines Cry présentent une forte activité insecticide décrites comme limitée aux stades larvaires de certaines espèces (Palma et al., 2014). Cependant, ces toxines entomopathogènes se sont révélées instables dans l'environnement. Elles semblent être très sensibles aux conditions environnementales et leur dégradation est liée entre autres aux rayons UV (Hung et al., 2016b, 2016a). En revanche, les spores de *Bt* sont plus résistantes aux UV et peuvent persister dans le sol quatre ans après épandage (van Cuyk et al., 2011). Dans ce contexte, j'ai étudié le comportement des spores de *Bt* (souche issue du produit commercial SA-11) exposées aux irradiations UV. Mes travaux montrent qu'une exposition prolongée des spores aux UV retarde le processus de germination de quelques heures (**Figure 20A**). J'ai aussi observé qu'une fois exposées aux UV, ces spores se mettent en amas (**Figure 20B-C**). Ceci pourrait être un processus de protection où celles qui se trouvent aux extrémités se sacrifieraient au profit de celles protégées à l'intérieur. Ces dernières seront capables de germer pour donner lieu à des



cellules végétatives capables de proliférer une fois que les conditions redeviennent favorables (Setlow., 2001) (Figure 20D).



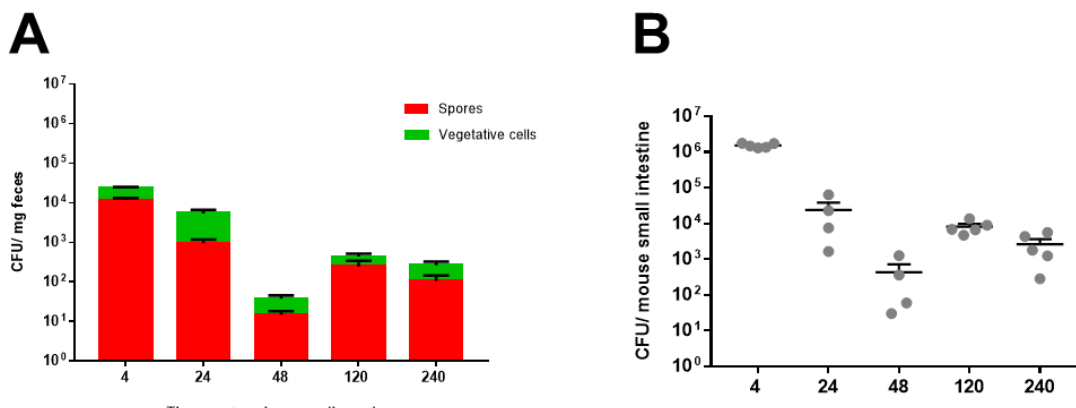
**Figure 20 : Exposition des spores de *Bt* à des irradiations UV pendant 2 heures. (A)** Suivi de la croissance bactérienne des spores sans ou après irradiation. **(B)** Spores avant traitements au UV. **(C)** Formation d'amas de spores 2 heures après irradiation UV. **(D)** Comparaison du titre bactérien après irradiation.

Pour compenser l'instabilité des toxines Cry, l'Union Européenne autorise les agriculteurs à réaliser jusqu'à 8 traitements espacés d'une semaine. Les formulations commerciales à base de *Bt* sont composées essentiellement de spores et de toxines Cry (Fiuza et al., 2017) avec pour conséquence l'accumulation des spores de *Bt* dans l'environnement et mais aussi sur les aliments traités. Même si les spores sont décrites inertes et que leur potentiel de danger réside dans leur capacité à germer en cellules végétatives, cet état nécessite de porter plus d'intérêt aux effets non intentionnels des spores de *Bt* sur des organismes considérés comme non-cibles. Malheureusement, la majorité des travaux publiés à ce sujet se sont intéressés à l'étude du devenir des cellules végétatives au niveau intestinal et non pas des spores. En effet, à l'état végétatif, les deux espèces *Bt* et *Bc ss* se présentent comme une seule et même espèce. Ainsi, cet état végétatif est jugé comme l'entité la plus infectieuse du groupe *B. cereus* par sa capacité à libérer des entérotoxines (Johler et al., 2018; Ehling-Schulz et al., 2019). En utilisant la forme végétative *Bt/Bc ss*, les résultats publiés par mon équipe (modèle drosophile) et ceux de Ronly et collaborateurs (modèle murin) montrent que les bactéries végétatives de ces deux espèces sont rapidement éliminées (au bout de 24 heures) de l'intestin moyen de drosophile ou grêle de souris (Benguettat et al., 2018; Loudhaief et al., 2017; Rolny et al., 2014). J'ai aussi confirmé ces résultats au cours de ma thèse.

Il semble donc plus judicieux de s'intéresser au comportement des spores au niveau de l'intestin qui représente un milieu propice à leur germination. Dans le cadre de ma thèse, j'ai essayé de répondre à cette problématique en utilisant deux modèles de laboratoire à savoir la drosophile et la souris. Ces deux organismes sont décrits comme des non-cibles aux formulations agricoles à base de la souche *Btk* (*Bt* ssp. *kurstaki*) connue pour avoir des activités toxiques spécifiquement contre les larves de lépidoptère.

Mes résultats montrent que les spores de *Btk* persistent longtemps au niveau intestinal des organismes non-cibles (drosophile et souris). Ceci vient appuyer d'autres études très disparates qui ont montré que les spores de *Bt* persistent plusieurs jours voire des semaines au niveau intestinal de plusieurs mammifères entre autres de l'homme, où il persiste jusqu'à six jours (Jensen et al., 2002), du rat où il persiste jusqu'à deux semaines (Wilcks et al., 2006) et de la souris où il persiste jusqu'à 30 jours (Oliviera-Filho et al., 2009). En revanche, ces études ont été élaborées dans un contexte où les individus entraient en contact continu ou chronique avec les spores de *Bt* ne permettant pas d'étudier une réelle persistance. En effet, mes résultats avec le modèle drosophile montrent que l'ingestion continue n'est pas bien adaptée à l'étude de la

persistance. J'ai corrélé ce résultat avec l'observation d'une éventuelle germination des spores sur le milieu nutritionnel des drosophiles. De plus, dans l'étude d'Oliveira-Filho et collaborateurs menée chez le modèle murin, les auteurs ont mentionné dans leur protocole que l'administration de la suspension de spores a été réalisée par un seul et unique gavage. Suite auquel ils observent une persistance de *Bt* au niveau de l'intestin grêle des souris 30 jours après. Or, il n'est indiqué nulle part dans leur méthodologie qu'ils ont effectué des changements de cages ponctuels (Oliviera-Filho et al., 2009). En effet, en essayant d'établir un protocole d'infection chez le modèle murin, je me suis rendue compte que *Btk* est éliminé au niveau des fèces des souris sous forme de spores (Figure 21A). La souris est animal coprophage, capable donc de se réinfecter avec les spores à travers les fèces. Ce résultat peut expliquer alors la persistance observée jusqu'à 30 jours (Oliviera-Filho et al., 2009) et au-delà de 10 jours dans le contexte de mes résultats. (Figure 21B). Pour minimiser au maximum cet impact, dans les expérimentations présentées dans (Figure 3, Hachfi et al., submitted), j'ai procédé à des changements de cages régulières (4 heures puis 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, et 9 jours)

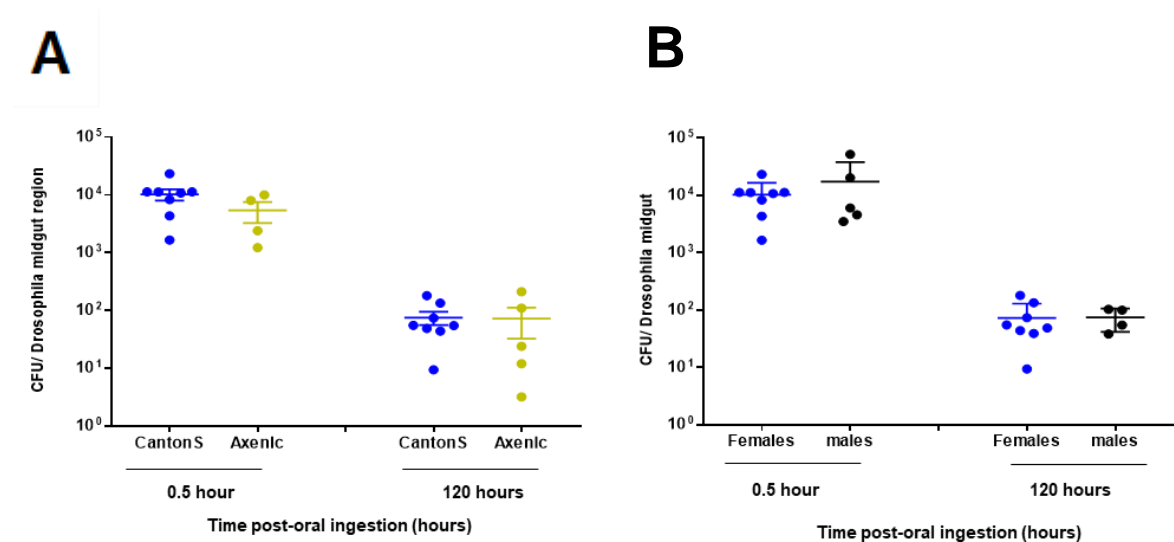


**Figure 21 : Recontamination par les spores de *Bt* chez le modèle murin. (A)** Test de chauffage des fèces de souris montrant que *Bt* est éliminé sous forme spores. **(B)** La recontamination des souris induit une persistance assez stable de *Bt* au niveau intestinal.

En utilisant un protocole d'ingestion ponctuelle, mes travaux montrent pour la première fois que les spores de *Btk* utilisées comme biopesticides se comportent différemment des cellules végétatives en persistant plusieurs jours dans l'intestin des organismes non-cibles, à savoir la drosophile et la souris.

De plus, j'ai aussi étudié l'impact du microbiote sur cette persistance. En effet, une récente étude de mon équipe menée chez des larves de drosophiles montre que l'ingestion des mélanges

commerciaux de *Btk* (spores + toxines) induisent un retard de développement identique en présence ou en absence de la flore commensale (Nawrot-Esposito et al., 2020). En axéniques, j'ai pu montrer que le microbiote intestinal n'intervient pas dans la persistance des spores (**Figure 22A**). Aussi, j'ai pu montrer en utilisant le modèle drosophile que cette persistance est indépendante du sexe de l'individu (**Figure 22B**).



**Figure 22 : Quantification de la charge bactérienne 30 minutes et 5 jours après l'ingestion ponctuelle de spores de *Bt* chez la drosophile adulte. (A) Comparaison entre drosophiles sauvages aux axéniques. (B) Comparaison entre drosophiles femelles et males**

La question soulevée par la suite était d'identifier si ces spores qui persistent sont capables de germer au niveau intestinal. Les quelques études menées à ce jour pour répondre à cette question ont été réalisées *in vitro*. En mimant l'environnement intestinal humain, des études suggèrent une éventuelle germination des spores de l'espèce *Bc ss* (Ceuppens et al., 2012a). En revanche, dans le cadre de mon étude, cette question a été abordée *in vivo* en utilisant les modèles drosophile et souris. Pour étudier le devenir des spores au niveau intestinal, nous avons développé au laboratoire une nouvelle souche de *Bt* issue de la souche commerciale *Btk* SA-11 et nommée *SA-11<sup>R/G</sup>*. Cette souche se présente sous forme de spores fluorescentes rouges. Une fois ces spores germées en cellules végétatives, ces dernières expriment la GFP et fluorescent ainsi en vert. Munie de cet outil fluorescent, j'ai pu montrer pour la première fois que les spores de *Btk* s'accumulent et germent préférentiellement dans les régions postérieures de l'intestin moyen de drosophile et grêle de souris correspondant au jéjunum et l'iléon. Ces données ont

été aussi confirmées en utilisant des tests de chauffage portant sur les différentes parties de l'intestin moyen/grêle. Comme les spores sont des entités résistantes aux hautes températures, le chauffage permet de tuer les cellules végétatives en préservant ainsi les spores. En tenant compte de toutes ces données, j'ai montré pour la première fois que les spores de *Btk* sont capables de germer dans l'intestin des organismes non-cibles. En revanche, au cours de mon étude je n'ai jamais pu détecter une quelconque prolifération des cellules germées au niveau intestinal chez nos deux modèles (vertébré ou invertébré). Ce même constat a été aussi observé par les travaux *in vitro* (Ceuppens et al., 2012a, 2012b)

J'ai aussi suspecté que l'acidité de l'estomac chez la souris ou de la région acide (R3) de l'intestin chez la drosophile pouvait être responsable de la régulation de la prolifération bactérienne au niveau intestinal. Cette hypothèse est basée sur les travaux de Storelli *et al.* qui, en inhibant spécifiquement la production d'acidité au niveau de la région R3 (pH=3) de l'intestin moyen, ont constaté une augmentation significative du nombre des bactéries commensales localisées spécifiquement dans les régions postérieures de l'intestin moyen (Storelli et al., 2018). En utilisant leur protocole, j'ai pu constater aussi une augmentation significative de la présence de *Btk* au niveau intestinal (**Figure 19C**). Cependant, l'augmentation de la charge bactérienne ne peut pas trancher en faveur de la prolifération de *Btk* au niveau intestinal. En effet, j'ai parfois observé la germination de quelques spores au niveau de la partie postérieure de l'intestin antérieur moyen (intersection R2-R3). On peut donc supposer que les spores qui ont entamé déjà leur transition germinative sont tuées par l'acidité de la région R3 avant d'arriver à la région R4. Dans ce cas de figure, l'inhibition de l'acidité permettrait donc un maintien en vie de ces bactéries germées et non pas une prolifération.

Plus d'investigations semblent donc être nécessaires pour comprendre l'implication ou non de l'acidité dans la régulation de la prolifération de *Btk* au niveau intestinal. Pour ce faire, nous pourrions procéder à des RT-qPCR afin de quantifier au niveau intestinal l'expression de gènes spécifiques à *Bt* (exemple le gène flagellaire *motB* identifié spécifiquement chez les espèces *B. cereus*) chez des drosophiles contrôles ou dépourvues d'acidité. Une forte induction de ces gènes peut être corrélée avec une prolifération bactérienne. Pour confirmer ces résultats nous pourrions utiliser l'outil fluorescent *SA-11<sup>RG</sup>* et identifier *in vivo* l'existence ou non d'une prolifération chez les drosophiles dépourvues des cellules sécrétrices d'acidité. Toutes ses suppositions sont en cours d'investigations

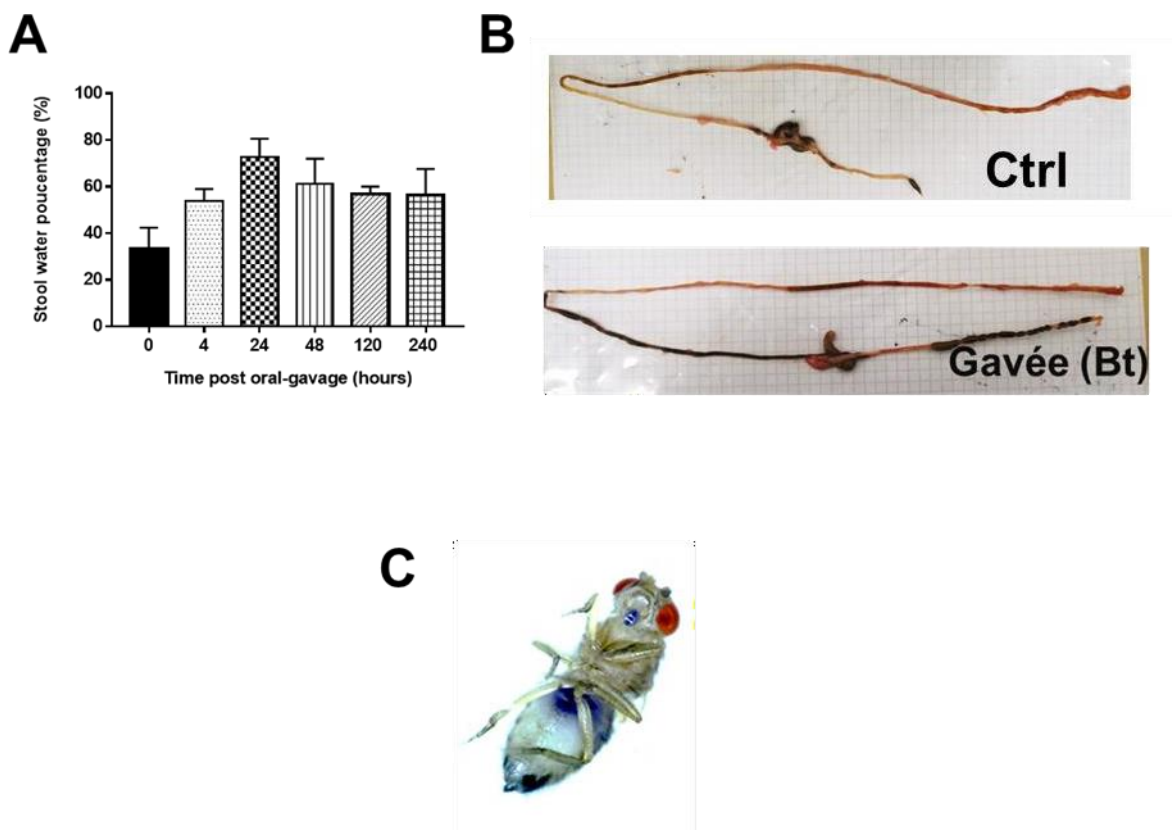
Mes résultats ont apporté des nouvelles connaissances essentielles quant au devenir des spores dans l'intestin qui demeurait jusqu'à présent très peu documenté. Pourtant, depuis 2013, des inquiétudes ont été soulevées concernant la sécurité de certains produits bioinsecticides agricoles à base de *Bt* et des alertes ont été émises par les agences de sécurité des aliments française (l'Anses) et Européenne (l'EFSA) (EFSA Panel on Biological Hazards 2016 ; Anses Saisine n° 2013-SA-0039 ; Johler et al., 2018). Ces alertes ont mis en garde contre l'utilisation de *Bt* en évoquant son potentiel pouvoir de virulence. Depuis, l'utilisation de *Bt* est devenue un sujet très polémique qui divise l'opinion scientifique. Le rapport de l'EFSA mentionne qu'il n'existe pas de réelles différences entre *Bt* et *Bc ss*. Selon eux, ces deux espèces partagent la même capacité à provoquer des diarrhées chez l'homme via la sécrétion des entérotoxines (Hbl, Nhe et CytK) (EFSA Panel on Biological Hazards 2016). Cependant, certains scientifiques, poussés par leur conviction de défendre l'utilisation de *Bt*, ont rédigé une lettre assez rude pour répondre à l'alerte de l'EFSA. Dans cette réponse, ils affirment que l'espèce *Bt* est écologiquement spécialisée pour agir contre les insectes cibles, ne pouvant donc pas infecter d'autres organismes non-cibles (Raymond et al., 2010; Raymond and Federici, 2017). Ces scientifiques "pro-*Bt*" ont même suggéré que les applications agricoles intensives de *Bt* n'imposent aucun risque à la santé publique (Manktelow et al., 2021). Leur principal argument réside dans le mécanisme d'action des toxines Cry chez les organismes cibles (larves de lépidoptères). En effet, selon eux, pour pouvoir perforer l'épithélium intestinal, ces toxines Cry doivent entrer en contact avec des récepteurs spécifiques de l'hôte comme les cadhérines. Ils affirment que ces récepteurs localisés au niveau de l'épithélium intestinal n'existent que chez les organismes cibles (Raymond and Federici, 2017). En revanche, une récente étude au laboratoire contredit cette affirmation et montre que les toxines Cry interagissent avec les cadhérines intestinales de la drosophile promouvant ainsi une différenciation cellulaire atypique (Jneid, Phd., 2021). Dans ce même contexte, une autre étude de Lemos et collaborateurs a montré que l'administration par gavage des toxines Cry (de *Bt aizawai*) à des rates gestantes modifie les paramètres de la fonction hépatique et induit ainsi des lésions hépatiques (Lemos et al., 2013). De plus ces scientifiques "pro-*Bt*" affirment que la persistance des spores ne constitue pas automatiquement un signe d'infection. L'infection pour eux est définie comme une perturbation de l'hôte causée par la multiplication de l'inoculum dans les tissus, la production de toxines ou bien les deux. Lorsque le germe persistant finit par disparaître sans induire de symptômes délétères pour l'hôte alors pour eux on parle de persistance et non pas d'infection

(Siegel, 2012, 2001). Ces auteurs s'appuient sur une étude qui date de 1973 et qui affirme que des rats nourris avec une dose égale à  $10^9$  spores de *Bt*/jour pendant 730 jours n'ont subi aucun effet néfaste (Raymond and Federici, 2017; Siegel, 2001). Malheureusement, je n'ai pas pu remonter jusqu'à la source de ces études inaccessibles pour pouvoir les vérifier. En revanche, l'expérience que j'ai acquise au cours de ma thèse sur la manipulation de rongeurs me permet d'émettre un doute sur ces expérimentations. En effet, si on suppose que l'administration de *Bt* s'est déroulée par des gavages quotidiens, ces manipulations ont donc été contraignantes pour les manipulateurs (présents 7 jours sur 7 pendant 2 ans) et non respectueuses au bien-être animal. Un gavage quotidien des animaux pendant 730 jours engendre assurément des stress physiologiques et des dommages délétères au niveau de l'œsophage et de l'estomac, ce qui peut conduire à la mort de l'animal par cessation de s'alimenter. Par contre, si on suppose que l'administration de *Bt* s'est faite en mélangeant les spores avec la nourriture ou l'eau de boisson, alors les doses ingérées sont sûrement bien plus faibles que celles mises à disposition ( $10^9$  spores de *Bt*/jour). En effet, j'ai moi-même constaté, chez la drosophile, qu'en mettant  $10^8$  spores à disposition par drosophile dans la nourriture, seulement  $10^4$  spores étaient retrouvées dans l'intestin après 30 minutes.

En plus, dans leur réponse à l'EFSA, ces auteurs avancent que les TIAC dues à l'ingestion de *Bt* décrites dans le rapport de l'EFSA ne peuvent pas être reliées qu'à *Bt* suite à l'identification d'autres germes sur l'aliment suspecté (Siegel, 2001; Raymond and Federici, 2017). Cependant, très récemment, deux études ont montré sans ambiguïté que du *Bt* d'origine agricole est l'agent causal de plusieurs épisodes de TIAC (Johler et al., 2018; Bonis et al., 2021). Mes résultats viennent appuyer ces deux publications ainsi que les alertes de l'EFSA et de l'Anses. En effet, j'ai pu montrer que les spores de *Btk* persistent longtemps dans les intestins des organismes non-cibles. De plus, j'ai pu aussi comparer ces résultats avec les spores qui dérivent de la souche *Bc ss* (ATCC14579). J'ai ainsi confirmé de façon indépendante que les spores de *Bt* et de *Bc ss* se comportent de façon très similaire au niveau intestinal.

Mes travaux suggèrent que les spores qui germent dans les parties postérieures de l'intestin pourraient être capables de sécréter des entérotoxines et d'induire ainsi des épisodes diarrhéiques. En effet, en réalisant un seul gavage à des doses de  $10^8$  spores/souris, j'ai observé chez le modèle murin une survenue prononcée de diarrhées qui perdure dans le temps (**Figure 23A-B**). Pour ces expérimentations, nous avons bien conscience que les doses utilisées sont assez élevées si on tient en compte du poids de l'animal. Initialement, nous avons réalisé des

doses-réponses suite à des gavages par *Btk* et nous avons identifié que la dose  $10^8$  spores/souris permettaient une réponse reproductible entre souris avec une manifestation des diarrhées. Au-delà de cette dose, les souris succombaient à l'infection. De plus, nous avons aussi observé chez le modèle drosophile des vomissements qui se manifestaient suite à l'ingestion des spores de *Btk* (**Figure 23C**). En revanche, il faudra tout de même arriver à corréliser avec certitude ses symptômes avec la sécrétion des entérotoxines. Pour cela, nous pourrions générer des souches de *Bt/Bc ss* dépourvus soit des trois entérotoxines en même temps soit d'une seule entérotoxine et tester leur profil de virulence sur les modèles murins et drosophiles.

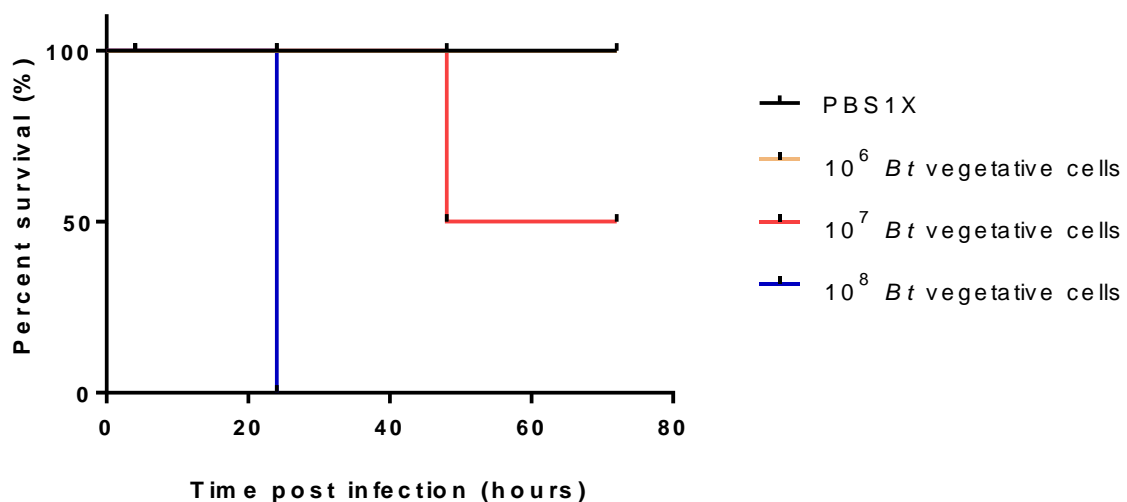


**Figure 23:** L'ingestion des spores de *Btk SA-11* provoquent des désagréments intestinaux représentée par des diarrhées et des vomissements. (A) Quantification du pourcentage d'eau au niveau des fèces de souris. (B) Photos représentant l'état du transit intestinal chez une souris ctrl (gavée par du PBS 1x) et une souris gavée avec des spores de *Bt* (C) Photo représentant le vomissement chez le modèle drosophile.

Dans cette optique, en collaboration avec l'Anses de maison d'Alfort, nous avons déjà pu dresser des profils de virulence de spores issues d'un panel de 21 souches du groupe *B. cereus*



chez des drosophiles. Nous plaçons les drosophiles à la température de 29°C afin de sensibiliser les mouches (29°C stresse les drosophiles) et en contact continu à des spores (pour augmenter la pénétrance des phénotypes observés). Nous avons ainsi pu identifier qu'une majorité des souches bioinsecticides à base de *Bt* présentent un profil de virulence important causant une forte mortalité des individus qui survient généralement suite à une perméabilité intestinale accrue (**Annexe1**). Ceci peut être dû au fait que la capacité de régénération cellulaire n'est pas assez compétente pour faire face à la germination des spores au niveau intestinal. Les bactéries peuvent ainsi traverser la barrière intestinale et envahir le milieu intérieur. La drosophile meurt par bactériémie. En effet, la présence de *Bt/Bc ss* passent de 10<sup>4</sup>CFU/drosophile au niveau intestinal à 10<sup>8</sup> CFU/drosophile observées dans la cavité interne après perméabilisation intestinale. Dans ce contexte, j'ai réalisé des injections intraveineuses chez le modèle murin avec des cellules végétatives de *Bt* afin de mimer leur éventuel passage suite à une perméabilisation intestinale. Le résultat obtenu montre que le passage de doses élevées de cellules végétatives peut contribuer à des bactériémies non curables (**Figure 24**).



**Figure 24:** Evaluation de la survie suite à l'injection de différentes de cellules végétatives de *Btk SA-11* chez le modèle murin

Tous ces résultats nous poussent à rester objectifs vis-à-vis de l'utilisation de *Bt* en agriculture biologique. Il faut savoir qu'en France, le seuil d'alerte pour les espèces du groupe *B. cereus* est fixé à 10<sup>5</sup> CFU/g d'aliments et tolère même des traitements la veille de la récolte. Si on tient compte de ce seuil, une consommation d'un plat de salade d'un poids de 200g induira une

consommation  $2.10^7$  CFU de *Bt*/plat. Or, l'étude de Bonis et collaborateurs a montré que les souches de *Bt* identifiées dans plus de 90% de TIAC étaient en fait présentes avec une dose égale  $10^3$  CFU/g d'aliments (Bonis et al., 2021). Ce qui est largement inférieur au seuil d'alerte fixés par le gouvernement. Il faut savoir que la notion dose est importante dans ce cas de figure. En effet, les TIAC prennent en compte plusieurs patients indépendamment de leur sexe, leur statut immunitaire et de leur prédisposition. De ce fait la quantité du pathogène ingéré est mise en cause en cas d'intoxication alimentaire. Il faut savoir que le seuil d'alerte est un seuil conseillé. Afin de remédier à ce problème, mes résultats viennent renforcer ceux de Bonis et collaborateurs afin d'encourager à revoir les seuils d'alertes en les rendant obligatoires et en les abaissant à au moins  $10^3$  CFU/g d'aliments. Afin de baisser les quantités de *Bt* présentement initialement sur l'aliment, il faut procéder en premier à former les agriculteurs (labélisés bio ou pas) à l'épandage de *Bt*. On peut les vulgariser à espacer les traitements avant récolte et définir un nombre de traitements obligatoire à respecter. Il faut aussi surveiller les chaînes de transformation alimentaire en instaurant des obligations de lavages intensives des aliments crus. De ce fait, même en abaissant les seuils d'alertes, il est aussi important de prendre en compte le fait que chaque hôte répond différemment aux infections. Par exemple, chez certaines personnes prédisposées, *Bt* est sans doute capable d'engendrer des symptômes diarrhéiques même à des doses encore plus faibles. La variabilité du potentiel de virulence de *Bt* et l'état physiologique de l'hôte au moment de l'ingestion de l'aliment contaminé rendra difficile l'établissement d'un seuil d'alerte efficace permettant d'éviter des événements d'intoxication individuelle sporadique.

## **2. Implication de la réponse immunitaire innée dans le processus de persistance des spores au niveau intestinal**

La question suivante était de comprendre l'implication de la réponse immunitaire innée face à cette persistance. En effet, il est reporté que les mécanismes de la réponse immunitaire innée représentent la première ligne de défense contre les infections. Ces mécanismes de défenses innées sont décrits comme conservés au cours de l'évolution. Pour des raisons éthiques et vu que la réponse immunitaire locale est bien décrite chez le modèle drosophile, j'ai choisi de continuer avec ce modèle et de transposer les résultats, quand cela est possible, avec le modèle murin.

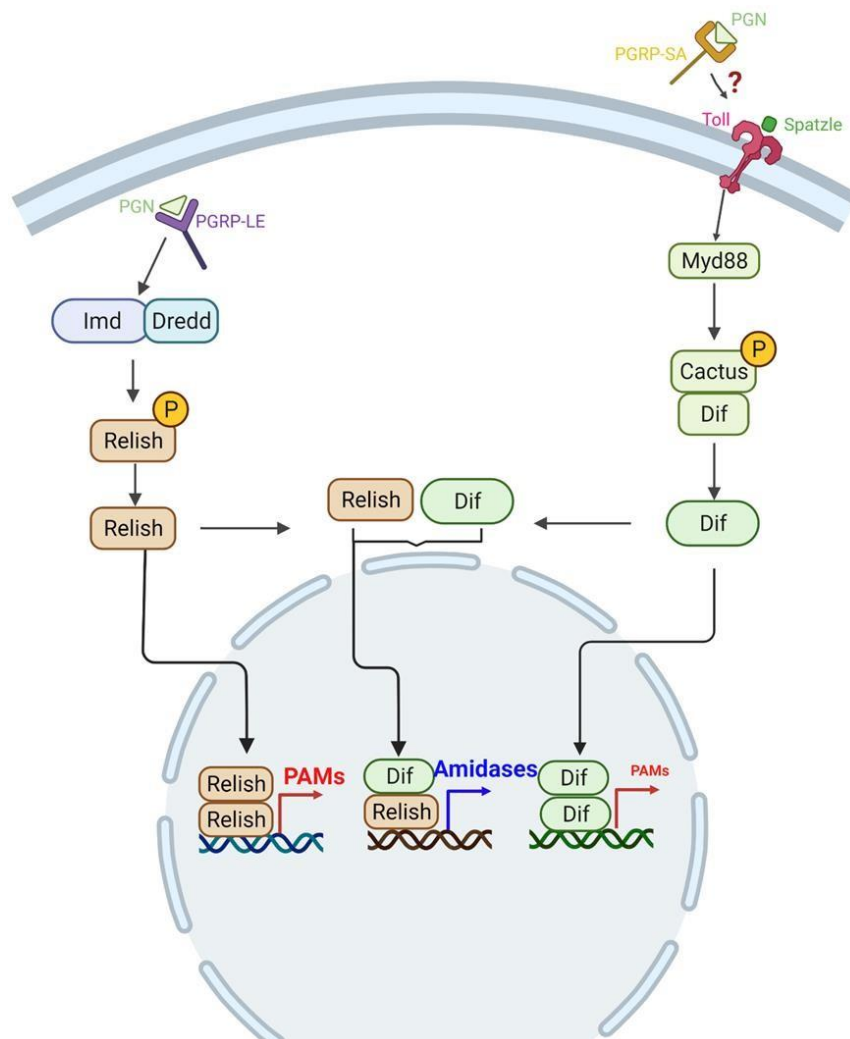
Jusqu'à présent, tous les travaux menés pour comprendre les mécanismes de la réponse immunitaire innée locale ont été réalisés avec des bactéries végétatives. Aucune étude ne s'est intéressée au modèle d'infection par des spores. Ces études, avec les bactéries végétatives, ont révélé que la réponse immunitaire au niveau intestinal est localisée spécifiquement dans les régions antérieures de l'intestin moyen (R1 et R2) de la drosophile adulte. La détection du facteur de croissance bactérien, l'uracile, par des récepteurs membranaires des cellules épithéliales induit la sécrétion de ROS immunitaires (HOCl) très rapidement (entre 30 minutes et 1h30 après l'ingestion de bactéries végétatives) (Benguettat et al., 2018; Lee and Hase, 2014; Du et al., 2016a). L'action des ROS est suivie par la production des PAMs. La production de ces derniers est sous le contrôle spécifique de la voie immunitaire Imd au niveau des régions antérieures (Tzou et al., 2000; Bosco-Drayon et al., 2012; Royet and Charroux, 2013). En utilisant les formes végétatives de bactéries allochtones (*Bt* et *Ecc*), mon équipe a pu montrer, toujours chez la drosophile, que l'élimination rapide des bactéries végétatives est due à une forte induction de HOCl qui, dans un premier temps, a un effet bactériostatique et dans un second temps, déclenche des spasmes viscéraux accélérant l'expulsion des bactéries (Benguettat et al., 2018). En complément, mon travail a permis de montrer que l'ingestion de faibles doses de bactéries végétatives de *Bt* induit aussi légèrement l'expression des PAMs. Ce résultat montre bien que le système immunitaire (HOCl et spasmes viscéraux) est efficace face aux infections à faibles doses sans pour autant avoir recours à la production de PAMs. En revanche, j'ai aussi montré que les spores n'induisent ni la production de HOCl, ni de spasmes viscéraux. Aussi, j'ai observé que l'ingestion des spores est corrélée avec une tendance à réprimer l'expression des PAMs au niveau intestinal. Mes résultats montrent que les spores en tant qu'entités inertes ne sont pas détectées dans l'intestin moyen antérieur de drosophile et échappent ainsi aux mécanismes de défenses intestinales et s'accumulent préférentiellement dans les parties plus postérieures de l'intestin moyen (R4 et R5) où elles germent. L'outil spores représente donc une nouveauté pour comprendre les mécanismes de défenses localisés dans ces parties postérieures. Ce qui est décrit jusqu'à présent est que les débris des bactéries tuées par les mécanismes de défenses antérieures (ROS et PAMs) atteignent les parties postérieures R4 et R5. Ces débris contiennent des PGN bactériens qui sont reconnus par le récepteur intracellulaire PGRP-LE (Du et al., 2016a; Tzou et al., 2002; Bosco-Drayon et al., 2012). Mes résultats confirment bien l'implication du récepteur PGRP-LE dans la reconnaissance des formes germées au niveau des parties postérieures. Cette reconnaissance des PGN par PGRP-LE induit

la cascade de signalisation immunitaire Imd. En effet, au niveau intestinal, seule cette voie est décrite comme impliquée dans les réponses antibactériennes. Son activation au niveau des parties R4 et R5 induit majoritairement la sécrétion d'enzymes de types amidases (PGRP-SC et PGRP-LB). Afin d'empêcher une activation continue de la réponse immunitaire qui induirait une perturbation de l'homéostasie intestinale, le système immunitaire a développé ces enzymes de rétrocontrôle négatif pour la voie Imd au niveau des régions postérieures (Costechareyre et al., 2016). Pour confirmer la localisation spécifique de ces amidases, j'ai procédé en premier lieu à un découpage des différentes parties intestinales. Malheureusement, je ne suis jamais arrivée à amplifier par RT-qPCR un quelconque signal des effecteurs immunitaires. Cet échec peut être expliqué par notre mode d'intoxication utilisant une faible quantité de *Bt* et pendant seulement 30 minutes. La quantité de *Bt* ingérée ne pourrait ne pas être suffisante pour induire une réponse techniquement détectable au niveau des différentes parties intestinales comparées aux autres études où une forte charge bactérienne est utilisée. Malgré cela, mes résultats montrent que potentiellement au niveau postérieur, les spores germées induisent l'expression spécifique des amidases tout en réprimant la production des PAMs. Ces amidases semblent donc réguler négativement l'expression des PAMs afin de tolérer la persistance de *Bt* au niveau des régions postérieures tout comme la présence du microbiote intestinal (Bosco-Drayon et al., 2012). Les spores sont donc des entités microbiennes capables de contourner les mécanismes de réponses immunitaires afin de préserver leur présence au niveau intestinal. Ensuite, en utilisant des drosophiles mutantes pour les composants cytoplasmiques de la voie Imd (Imd et Dredd), j'ai pu montrer que ces derniers sont aussi impliqués en aval de PGRP-LE pour permettre la production des amidases au niveau des parties postérieures de l'intestin moyen. A notre plus grande surprise, j'ai trouvé que le facteur de transcription Relish n'intervient pas dans le contrôle de la persistance de *Bt* dans les régions R4 et R5. De ce fait dans le cas des spores *Bt/Bc*, Relish semble ne pas être le principal facteur de transcription intestinale chez la drosophile contrôlant la réponse antimicrobienne contrairement à ce qui est décrit jusqu'à aujourd'hui (Buchon et al., 2009b; Costechareyre et al., 2016). Cependant, en utilisant le même mutant *Rel<sup>E20</sup>* perte-de-fonction, Brodriek et ses collaborateurs ont observé une augmentation globale significative de la charge bactérienne du microbiote intestinal qu'ils ont corrélé avec une absence de production de PAMs chez un mutant *Relish* (Broderick et al., 2014). Ils ont aussi observé que cette augmentation de la charge du microbiote est surtout visible dans l'intestin moyen antérieur, aucune modification de la charge du microbiote n'a été observée dans

l'intestin moyen postérieure (Broderick et al., 2014). Ceci rejoint mes observations et la possibilité de l'intervention d'un autre facteur de transcription en aval de la voies Imd dans les parties postérieures de l'intestin moyen.

Ce résultat nous a poussé à élargir notre étude aux facteurs de transcription de l'autre voie immunitaire, Toll, décrite n'intervenir qu'au niveau systémique. La voie Toll est caractérisée par l'existence de deux facteurs de transcription qui se dimérisent, à savoir Dorsal et Dif. L'activation de ce dimère permet la production d'effecteurs immunitaires (PAMs ou amidases) (Valanne et al., 2011b). J'ai commencé mon investigation avec *dorsal* qui est un gène impliqué dans l'embryogenèse. Malheureusement les outils ARNi que j'ai eu à ma disposition ne m'ont pas permis d'inhiber spécifiquement l'expression de *dorsal* au niveau intestinal. Je me suis alors focalisée sur Dif. A notre plus grande surprise, le mutant perte de fonction pour *Dif* répond de la même manière que les mutants perte de fonction des gènes codant les amidases et les composants cytoplasmiques de la voie Imd. Deux hypothèses sont possibles pour expliquer l'implication de Dif: (1) Il existe un branchement de la voie immunitaire Imd au niveau des facteurs de transcription Dif et Relish. L'un contrôle les amidases (Dif) et l'autre contrôle les PAMs (Relish). Pour vérifier cela, je suis en train de générer un double mutant *Rel<sup>-/-</sup>; Dif<sup>-/-</sup>* pour suivre la persistance de *Bt* au niveau intestinal. Si notre hypothèse est vraie, nous nous attendons à ce que dans un double mutant *Rel<sup>-/-</sup>; Dif<sup>-/-</sup>* il y ait à la fois absence d'expression des amidases et des PAMs et donc une persistance inchangées de *Bt* au niveau intestinale voire une tendance à diminuer. (2) La seconde hypothèse réside dans l'implication de la voie Toll au niveau des régions postérieures de l'intestin moyen. Afin de vérifier cette hypothèse, j'ai utilisé des mutants des composants de la cascade de signalisation Toll, à savoir Myd88 et Toll. En utilisant un mutant perte-de-fonction *Myd88* et une inhibition ciblée de l'expression de *Toll* au niveau intestinal, j'ai pu montrer une diminution de la présence de *Bt* au niveau intestinal. Ces résultats sont identiques à ceux obtenus pour les mutants de *PGRP-LE*, *Imd*, *Dredd*, *Dif* ou des *amidases*. Ce qui favorise l'hypothèse d'une implication de la voie Toll dans les régions postérieures de l'intestin. Il se peut aussi que le facteur de transcription Dif soit sous le contrôle des deux voies immunitaires Imd et Toll (**Figure 25**). Ce dernier point reste tout de même à confirmer par la quantification de l'expression des amidases et PAMs dans les mutants *Rel* et *Dif*. De plus, nous pourrons aussi tester d'autres composants de la voie Toll comme le ligand Spätzle (activateur de la voie Toll) et le récepteur aux PGN PGRP-SA. De plus, l'infection par *Ecc* au niveau intestinal, a révélé une induction transcriptionnelle de l'expression de Spätzle et de PGRP-SA

indépendamment du facteur de transcription Relish (Buchon et al., 2009b). Ceci peut laisser penser qu'ils interviennent aussi dans la réponse intestinale.

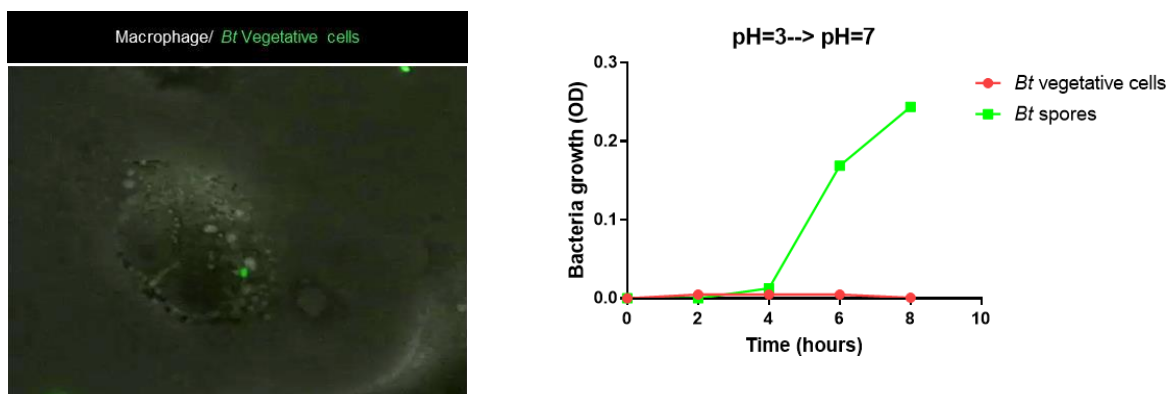


**Figure 25:** Hypothèse sur l'éventuelle coopération des voies Toll et Imd au niveau des postérieures de l'intestin moyen chez le modèle drosophile

Vu que les amidases sont induites par les spores germées au niveau des régions postérieures de l'intestin moyen de la drosophile, j'ai voulu identifier chez le modèle murin, une éventuelle implication de PGLYRP-2, l'homologue des amidases de drosophile (Saha et al., 2010). De même, j'ai identifié que l'expression de *PGLYRP-2* est localisée majoritairement au niveau des régions postérieures de l'intestin grêle où s'accumulent et germent les spores de *Bt*. Ce résultat montre pour la première fois une conservation de la localisation de l'expression de ces

amidases. Cependant afin de continuer l'étude sur le modèle murin et pour faire face aux contraintes éthiques, j'ai eu recours à l'utilisation du modèle macrophage. J'ai ainsi identifié que les macrophages sont aussi capables de produire cet amidase en réponses aux bactéries végétatives de *Bt*. En utilisant des transfections de macrophages par des siRNA dirigées contre l'amidase PGLYRP-2, j'ai réussi à réprimer son expression. Ceci me permettra d'identifier le rôle joué par les l'amidase PGLYRP-2 chez ce modèle cellulaire dans la persistance des spores et ainsi pouvoir transposer ces résultats *in vivo* sur le modèle murin.

Dans un second temps, je me suis aussi intéressée à l'étude de la réponse immunitaire face aux spores chez les mammifères. Pour ce faire, j'ai eu recours à l'utilisation des macrophages comme modèle immunitaire cellulaire. Le choix de ce modèle est basé sur le fait que les macrophages représentent les premières cellules effectrices du système immunitaire inné chez les mammifères. Ils sont capables de reconnaître et phagocyter les bactéries, et sécréter en réponse des médiateurs pro-inflammatoires et antimicrobiens (Hirayama et al., 2018). Récemment, une étude s'est intéressée aux devenir des bactéries végétatives de l'espèce *Bc ss* au niveau des macrophages. Cette étude a montré que les bactéries sont internalisées et envoyées peu de temps après vers le phagolysosome acide (pH=5 à 5.5). Ils ont aussi constaté que 2 heures après infection, toutes les bactéries internalisées étaient éliminées (Rolny et al., 2017). J'ai moi-même étudié l'internalisation des bactéries végétatives de *Bt* par les macrophages. En utilisant la souche *Btk SA-11<sup>GFP</sup>*, j'ai confirmé la phagocytose et l'élimination des cellules végétatives par les cellules végétatives (en suivant en temps réel la phagocytose) **(Figure 26A)**. Comme mes données *in vitro* montrent que les bactéries ne résistent pas aux pH acides **(Figure 26B)**, j'ai corrélé cette élimination rapide avec l'acidité des compartiments de phagocytose.



**Figure 26: Réponse des macrophages aux infections par des cellules végétatives de *Bt***  
 (A) Movie 5 : Suivi de l'internalisation des cellules végétatives par les macrophages au cours du temps (B) Le passage *In vitro* par un pH acide tue les bactéries végétatives

Il restait à savoir si ces formes végétatives sont reconnues et induisent une réponse immunitaire. Mes résultats montrent une corrélation entre l'infection et la reconnaissance de *Bt* sous sa forme végétative (Hachfi et al., in preparation). Ceci se manifeste par l'induction d'un fort profil pro-inflammatoire par les macrophages. En effet, l'infection induit une sur-activation de l'inflammasome NLRP3 et la libération de la cytokine IL-1 $\beta$ . Ceci montre que les macrophages reconnaissent et répondent aux infections par la forme végétative de *Bt*. Ce travail est en cours de finalisation afin de confirmer ces profils inflammatoires induits avec les bactéries végétatives. Nous avons à notre disposition des souris KO pour l'inflammasome NLRP3. Ces souris homozygotes viables peuvent être utilisées afin d'identifier *in vivo* l'implication de l'inflammasome NLRP3 dans la réponse aux bactéries végétatives de *Bt*.

En revanche, peu de données scientifiques suggèrent une capacité des spores à échapper aux réponses des macrophages (Basu et al., 2007; Tran and Ramarao, 2013; Ramarao and Lereclus, 2005). Dans le cadre de mon étude, l'utilisation de spores irradiées de *Bt* dont le processus de germination est retardé me permettait d'étudier les voies immunitaires induites par la spore proprement dite indépendamment des cellules germées (Figure 20). En utilisant, cet outil, j'ai suivi le comportement de la spore de *Bt* une fois phagocytée. Mes résultats montrent que les spores irradiées sont aussi internalisées et envoyées vers le phagolysosome. En revanche, ces spores persistent au niveau des phagolysosomes à pH acide sans pour autant déclencher un



processus germinatif. Cette persistance dans les macrophages circulant peut laisser supposer une dissémination des spores dans tout le corps de l'hôte, pouvant ainsi contaminer d'autres organes. De plus, aucune réponse inflammatoire de type NLRP3 n'a été détectée au niveau des macrophages (**Figure 6A, Hachfi et al., in preparation**). J'ai ainsi montré que les spores de *Bt* échappent aussi aux mécanismes de reconnaissance immunitaire par les macrophages. Ce mécanisme d'échappement peut être corrélé avec la structure de la spore des espèces du groupe *B. cereus*. Ces spores sont formées par plusieurs couches rendant leur reconnaissance inaccessible par les récepteurs immunitaires (**se référer à la section II/2.2**).

Indépendamment des ces résultats, j'ai réalisé une observation qui se manifeste chez le modèle murin par une expansion de tissu adipeux blanc localisé au niveau du péritoine après gavage (**Figure 27**). J'ai réalisé par la suite des tests de CFU afin de vérifier un éventuel passage de *Bt* de l'intestin vers ce tissu métabolique. Mes résultats montre une absence de *Bt* au niveau de ce tissu adipeux.

Ce résultat m'a permis de supposer une éventuelle coopération entre la réponse immunitaire locale suite à un gavage et une activation d'un profil d'inflammation au niveau du tissu adipeux permettant son expansion.



**Figure 27: Expansion du tissu adipeux abdominal suite au gavage par des spores de *Bt***  
Souris Ctrl : gavée avec du PBS1X , souris traitée : gavée avec des spores de *Bt*.  
Les photos sont prises 24heures après gavage

Il faut savoir que le tissu adipeux blanc (WAT : acronyme en anglais) est le principal site de stockage d'énergie chez les vertébrés et contrôle étroitement l'homéostasie du glucose chez les mammifères (Gesta et al., 2007). L'expansion du WAT peut être une des caractéristiques de l'obésité induisant le développement de troubles métaboliques (Hajer et al., 2008).

Certaines études suggèrent que le microbiote intestinal est un facteur environnemental clé qui peut contribuer à un dysfonctionnement des tissus gras chez les mammifères (Cani, 2012; Gesta et al., 2007; Kredel and Siegmund, 2014). En revanche, le mécanisme avec lequel le microbiote intestinal régule les fonctions et l'état inflammatoire de ces organes métaboliques au cours de ces processus pathologiques reste très mal documentée. Dans le cadre de notre observation, nous pourrions réaliser des RT-qPCR ou des marquages spécifiques permettant de cibler les différentes cytokines pro-inflammatoires au niveau du WAT. Comme cette observation n'a été détectée que suite à des gavages par les spores, je suppose que l'inflammation au niveau du WAT est due aux désagrément intestinaux (en l'occurrence diarrhée) occasionnées par la germination des spores et la libération des entérotoxines.

Mon étude apporte de nouvelles connaissances mécanistiques et physiologiques le modèle d'infection des spores bactériens. Elle remet en question plusieurs dogmes se rapportant en premier lieu au comportement des spores de *Bt* au niveau intestinal des organismes non cibles, et en second lieu, sur l'implication de certaines voies immunitaires non identifiées jusqu'à présent comme impliquée au niveau intestinale chez le modèle drosophile. Ce projet de thèse montre que les spores du groupe *B. cereus* considérées comme des opportunistes, n'induisent aucune réponse pro-inflammatoire. Au contraire elles ont tendance à induire plus d'enzyme anti-inflammatoire afin d'assurer leur persistance. De fait, les interactions causatives des spores de *B.cereus* avec des personnes immunocompétantes ou immunodéprimées pourraient induire les memes symptômes diarrhéiques indépendamment du profil immunitaire de chaque individu. Si on prend le cas de la TIAC causée par la souche *Bt* 16SBCL1310 reportée dans l'étude de Bonis et collaborateurs , cette souche a causé des intoxications alimentaires chez au moins 50 personnes (Bonis et al., 2021). Il est impossible que toutes ces personnes soient porteuses simultanément dans un même lieu (restauration collective) d'une maladie inflammatoire ou d'une immunodépression les rendant plus vulnérables aux intoxications. Dans ce contexte, les spores définissent ainsi un mécanisme d'opportunisme bactérien inédit indépendamment du profil immunitaire de l'hôte. Ce mécanisme permet à la spore d'échapper au système immunitaire et de maintenir une bonne capacité de persistance au niveau intestinal. Par contre, ce mécanisme dépend de la dose ingérée afin de promouvoir une éventuelle production d'entérotoxines capables d'engendrer des cas d'intoxications alimentaires. Ces données ouvrent la voie à de nouvelles perspectives pour réétudier les interactions hôte-pathogène

# Conclusion générale

Mon projet de thèse avait pour but de comprendre le comportement des spores du groupe *B. cereus* dans le tractus gastro-intestinal des mammifères et des invertébrés. L'étude de ce type d'interaction hôte-pathogène semble être essentielle pour acquérir plus de connaissance sur un pathogène d'intérêt. En effet, du point de vue santé publique, *B. cereus* représente la deuxième cause d'intoxication alimentaire collective (TIAC) en France et la troisième en Europe. De plus, l'espèce *B. thuringiensis*, appartenant au groupe *B. cereus*, est fortement utilisée en tant que biopesticide. Ceci entraîne son accumulation dans l'environnement et sur les aliments. De plus, par sa capacité à sporuler et à former des biofilms, *B. cereus* a été identifié dans le milieu hospitalier et a été reporté dans plusieurs cas d'infections systémiques conduisant parfois à des bactériémies chez des patients immunodéprimés. Par ailleurs, dans le cadre de l'incitations à la consommation des produits issus d'agriculture biologique, plusieurs démarches ont été lancées pour l'introduction de fruits et légumes "bio" dans le milieu hospitalier avec potentiellement pour conséquence l'introduction involontaire d'un nouvel opportuniste.

Mon projet de thèse montre que *B. thuringiensis* peut contribuer à la manifestation de désagréments intestinaux remettant en cause son absence de virulence vis-à-vis des organismes non-cibles comme la drosophile (modèle invertébré) et la souris (modèle vertébrés). Ce travail s'inscrit ainsi dans le concept 'One Health' ou 'Une santé pour tous' qui résume une idée déjà décrite depuis plus d'un siècle selon laquelle la santé des animaux, la santé des humains et la santé des écosystèmes sont interconnectées et interdépendantes. Ainsi, la santé des uns affecte la santé des autres.

## **Références bibliographiques**

- Abee, T., Kovács, Á.T., Kuipers, O.P., and van der Veen, S.** (2011). Biofilm formation and dispersal in Gram-positive bacteria. *Current Opinion in Biotechnology* **22**: 172–179.
- Abot, A., Lucas, A., Bautzova, T., Bessac, A., Fournel, A., Le-Gonidec, S., Valet, P., Moro, C., Cani, P.D., and Knauf, C.** (2018). Galanin enhances systemic glucose metabolism through enteric Nitric Oxide Synthase-expressed neurons. *Molecular Metabolism* **10**: 100–108.
- Adang, M.J., Crickmore, N., and Jurat-Fuentes, J.L.** (2014). *Diversity of Bacillus thuringiensis Crystal Toxins and Mechanism of Action* 1st ed. (Elsevier Ltd.).
- Agaisse, H. and Perrimon, N.** (2004). The roles of JAK/STAT signaling in Drosophila immune responses. *Immunological Reviews* **198**: 72–82.
- Agata, N., Mori, M., Ohta, M., Suwan, S., Ohtani, I., and Isobe, M.** (1994). A novel dodecadepsipeptide, cereulide, isolated from *Bacillus cereus* causes vacuole formation in HEp-2 cells. *FEMS Microbiology Letters* **121**: 31–34.
- Akira, S., Uematsu, S., and Takeuchi, O.** (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* **124**: 783–801.
- Almoussa, A.A., Meurens, F., Krol, E.S., and Alcorn, J.** (2018). Linoorbitides and enterolactone mitigate inflammation-induced oxidative stress and loss of intestinal epithelial barrier integrity. *International Immunopharmacology* **64**: 42–51.
- Anderson, J.M. and van Itallie, C.M.** (2009). Physiology and function of the tight junction. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **1**.
- Anes, E., Kühnel, M.P., Bos, E., Moniz-Pereira, J., Habermann, A., and Griffiths, G.** (2003). Selected lipids activate phagosome actin assembly and maturation resulting in killing of pathogenic mycobacteria. *Nature Cell Biology* **5**: 793–802.
- Apidianakis, Y. and Rahme, L.G.** (2011). *Drosophila melanogaster* as a model for human intestinal infection and pathology. *DMM Disease Models and Mechanisms* **4**: 21–30.
- Armstrong, D.** (1993). History of Opportunistic Infection in the Immunocompromised Host. *Clinical Infectious Diseases* **17**: S318–S321.
- Atrih, A. and Foster, S.J.** (2001). Analysis of the role of bacterial endospore cortex structure in resistance properties and demonstration of its conservation amongst species. *Journal of Applied Microbiology* **91**: 364–372.
- Authority, E.F.S. and European Centre for Disease Prevention and Control** (2021). The European Union One Health 2020 Zoonoses Report. *EFSA Journal* **19**: e06971.
- van der Auwera, G.A., Timmerly, S., Hoton, F., and Mahillon, J.** (2007). Plasmid exchanges among members of the *Bacillus cereus* group in foodstuffs. *International Journal of Food Microbiology* **113**: 164–172.

- Ayyaz, A., Li, H., and Jasper, H.** (2015). Haemocytes control stem cell activity in the *Drosophila* intestine. *Nature Cell Biology* **17**: 736–748.
- Babu, S.D., Jayanthi, V., Devaraj, N., Reis, C.A., and Devaraj, H.** (2006). Expression profile of mucins (MUC2, MUC5AC and MUC6) in *Helicobacter pylori* infected pre-neoplastic and neoplastic human gastric epithelium. *Molecular Cancer* **5**: 1–7.
- Banerjee, U., Girard, J.R., Goins, L.M., and Spratford, C.M.** (2019). *Drosophila* as a genetic model for hematopoiesis. *Genetics* **211**: 367–417.
- Bardin, A.J., Perdigoto, C.N., Southall, T.D., Brand, A.H., and Schweisguth, F.** (2010). Transcriptional control of stem cell maintenance in the *Drosophila* intestine. *Development* **137**: 705–714.
- Barker, N., van Es, J.H., Kuipers, J., Kujala, P., van den Born, M., Cozijnsen, M., Haegerbarth, A., Korving, J., Begthel, H., Peters, P.J., and Clevers, H.** (2007). Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene *Lgr5*. *Nature* **449**: 1003–1007.
- Basbous, N., Coste, F., Leone, P., Vincentelli, R., Royet, J., Kellenberger, C., and Roussel, A.** (2011). The *Drosophila* peptidoglycan-recognition protein LF interacts with peptidoglycan-recognition protein LC to downregulate the Imd pathway. *EMBO Reports* **12**: 327–333.
- Basset, A., Khush, R.S., Braun, A., Gardan, L., Boccard, F., Hoffmann, J.A., and Lemaitre, B.** (2000). The phytopathogenic bacteria *Erwinia carotovora* infects *Drosophila* and activates an immune response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**: 3376–3381.
- Basu, S., Pathak, S.K., Banerjee, A., Pathak, S., Bhattacharyya, A., Yang, Z., Talarico, S., Kundu, M., and Basu, J.** (2007). Execution of macrophage apoptosis by PE\_PGRS33 of *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by toll-like receptor 2-dependent release of tumor necrosis factor- $\alpha$ . *Journal of Biological Chemistry* **282**: 1039–1050.
- Bazinet, A.L.** (2017). Pan-genome and phylogeny of *Bacillus cereus sensu lato*. *BMC evolutionary biology* **17**: 176.
- Beaman, T.C., Greenamyre, J.T., Corner, T.R., Pankratz, H.S., and Gerhardt, P.** (1982). Bacterial spore heat resistance correlated with water content, wet density, and protoplast/sporoplast volume ratio. *Journal of Bacteriology* **150**: 870–877.
- Beaman, T.C., Pankratz, H.S., and Gerhardt, P.** (1972). Ultrastructure of the exosporium and underlying inclusions in spores of *Bacillus megaterium* strains. *Journal of Bacteriology* **109**: 1198–1209.
- Benguettat, O., Jneid, R., Soltys, J., Loudhaief, R., Brun-Barale, A., Osman, D., and Gallet, A.** (2018). The DH31/CGRP enteroendocrine peptide triggers intestinal contractions favoring the elimination of opportunistic bacteria. *PLoS Pathogens* **14**: 1–26.
- Bergsbaken, T., Fink, S.L., and Cookson, B.T.** (2009). Pyroptosis: host cell death. *Nat Rev Microbiol* **7**: 99–109.

- Beumer, J. and Clevers, H.** (2016). Regulation and plasticity of intestinal stem cells during homeostasis and regeneration. *Development (Cambridge)* **143**: 3639–3649.
- Beutler, B.** (2004). Innate immunity: An overview. *Molecular Immunology* **40**: 845–859.
- Bischoff, S.C., Barbara, G., Buurman, W., Ockhuizen, T., Schulzke, J.D., Serino, M., Tilg, H., Watson, A., and Wells, J.M.** (2014). Intestinal permeability - a new target for disease prevention and therapy. *BMC Gastroenterology* **14**: 1–25.
- Biswas, A., Petnicki-Ocwieja, T., and Kobayashi, K.S.** (2012). Nod2: A key regulator linking microbiota to intestinal mucosal immunity. *Journal of Molecular Medicine* **90**: 15–24.
- Black, S.H. and Gerhardt, P.** (1961). Bacterial spores 1.
- Blum, J.E., Fischer, C.N., Miles, J., and Handelsman, J.** (2013). Frequent replenishment sustains the beneficial microbiome of *Drosophila melanogaster*. *mBio* **4**.
- Bonfini, A., Liu, X., and Buchon, N.** (2016). From pathogens to microbiota: How *Drosophila* intestinal stem cells react to gut microbes. *Developmental and Comparative Immunology* **64**: 22–38.
- Bonis, M., Felten, A., Pairaud, S., Dijoux, A., Maladen, V., Mallet, L., Radomski, N., Duboisset, A., Arar, C., Sarda, X., Vial, G., Mistou, M.-Y., Firmesse, O., Hennekinne, J.-A., & Herbin, S.** (2021). Comparative phenotypic, genotypic and genomic analyses of *Bacillus thuringiensis* associated with foodborne outbreaks in France. *PLOS ONE*, *16*(2), e0246885.
- Bonnay, F., Cohen-Berros, E., Hoffmann, M., Kim, S.Y., Boulianne, G.L., Hoffmann, J.A., Matt, N., and Reichhart, J.M.** (2013). Big bang gene modulates gut immune tolerance in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**: 2957–2962.
- Bosco-Drayon, V., Poidevin, M., Boneca, I.G., Narbonne-Reveau, K., Royet, J., and Charroux, B.** (2012). Peptidoglycan sensing by the receptor PGRP-LE in the *Drosophila* gut induces immune responses to infectious bacteria and tolerance to microbiota. *Cell Host and Microbe* **12**: 153–165.
- Bottone, E.J.** (2010). *Bacillus cereus*, a volatile human pathogen. *Clinical Microbiology Reviews* **23**: 382–398.
- Bravo, A., Gill, S.S., and Soberón, M.** (2007). Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon* **49**: 423–435.
- Bretschneider, A., Heckel, D.G., and Pauchet, Y.** (2016). Three toxins, two receptors, one mechanism: Mode of action of Cry1A toxins from *Bacillus thuringiensis* in *Heliothis virescens*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **76**: 109–117.
- Brillard, J. and Lereclus, D.** (2004). Comparison of cytotoxin cytK promoters from *Bacillus cereus* strain ATCC 14579 and from a *B. cereus* food-poisoning strain. *Microbiology* **150**: 2699–2705.

- Broderick, N.A., Buchon, N., and Lemaitre, B.** (2014). Microbiota-induced changes in *Drosophila melanogaster* host gene expression and gut morphology. *mBio* **5**.
- Brogden, K.A.** (2005). Antimicrobial peptides: Pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature Reviews Microbiology* **3**: 238–250.
- Buchon, N., Broderick, N.A., Chakrabarti, S., and Lemaitre, B.** (2009a). Invasive and indigenous microbiota impact intestinal stem cell activity through multiple pathways in *Drosophila*. *Genes and Development* **23**: 2333–2344.
- Buchon, N., Broderick, N.A., and Lemaitre, B.** (2013a). Gut homeostasis in a microbial world: Insights from *Drosophila melanogaster*. *Nature Reviews Microbiology* **11**: 615–626.
- Buchon, N., Broderick, N.A., Poidevin, M., Pradervand, S., and Lemaitre, B.** (2009b). *Drosophila* Intestinal Response to Bacterial Infection: Activation of Host Defense and Stem Cell Proliferation. *Cell Host and Microbe* **5**: 200–211.
- Buchon, N., Osman, D., David, F.P.A., Yu Fang, H., Boquete, J.P., Deplancke, B., and Lemaitre, B.** (2013b). Morphological and Molecular Characterization of Adult Midgut Compartmentalization in *Drosophila*. *Cell Reports* **3**: 1725–1738.
- Buchon, N., Silverman, N., and Cherry, S.** (2014). Immunity in *Drosophila melanogaster*-from microbial recognition to whole-organism physiology. *Nature Reviews Immunology* **14**: 796–810.
- Byri, S., Misra, T., Syed, Z.A., Bätz, T., Shah, J., Boril, L., Glashauser, J., Aegerter-Wilmsen, T., Matzat, T., Moussian, B., Uv, A., and Luschnig, S.** (2015). The Triple-Repeat Protein Anakonda Controls Epithelial Tricellular Junction Formation in *Drosophila*. *Developmental Cell* **33**: 535–548.
- Cai, J., Zhang, N., Zheng, Y., de Wilde, R.F., Maitra, A., and Pan, D.** (2010). The Hippo signaling pathway restricts the oncogenic potential of an intestinal regeneration program. *Genes and Development* **24**: 2383–2388.
- Callewaert, L. and Michiels, C.W.** (2010). Lysozymes in the animal kingdom. *Journal of Biosciences* **35**: 127–160.
- Camargo, F.D., Gokhale, S., Johnnidis, J.B., Fu, D., Bell, G.W., Jaenisch, R., and Brummelkamp, T.R.** (2007). YAP1 Increases Organ Size and Expands Undifferentiated Progenitor Cells. *Current Biology* **17**: 2054–2060.
- Cani, P.D.** (2012). Crosstalk between the gut microbiota and the endocannabinoid system: Impact on the gut barrier function and the adipose tissue. *Clinical Microbiology and Infection* **18**: 50–53.
- Capo, F., Charroux, B., and Royet, J.** (2016). Bacteria sensing mechanisms in *Drosophila* gut: Local and systemic consequences. *Developmental and Comparative Immunology* **64**: 11–21.
- Cario, E.** (2005). Bacterial interactions with cells of the intestinal mucosa: Toll-like receptors and NOD2. *Gut* **54**: 1182–1193.



- Casali, A. and Batlle, E.** (2009). Intestinal Stem Cells in Mammals and Drosophila. *Cell Stem Cell* **4**: 124–127.
- Censoplano, N., Epting, C.L., and Coates, B.M.** (2014). The role of the innate immune system in sepsis. *Clinical Pediatric Emergency Medicine* **15**: 169–176.
- Ceuppens, S., Rajkovic, A., Hamelink, S., van de Wiele, T., Boon, N., and Uyttendaele, M.** (2012a). Enterotoxin production by bacillus cereus under gastrointestinal conditions and their immunological detection by commercially available kits. *Foodborne Pathogens and Disease* **9**: 1130–1136.
- Ceuppens, S., Rajkovic, A., Heyndrickx, M., Tsilia, V., van de Wiele, T., Boon, N., and Uyttendaele, M.** (2011). Regulation of toxin production by *Bacillus cereus* and its food safety implications. *Critical Reviews in Microbiology* **37**: 188–213.
- Ceuppens, S., Uyttendaele, M., Drieskens, K., Heyndrickx, M., Rajkovic, A., Boon, N., and van de Wiele, T.** (2012b). Survival and germination of bacillus cereus spores without outgrowth or enterotoxin production during in vitro simulation of gastrointestinal transit. *Applied and Environmental Microbiology* **78**: 7698–7705.
- CEUPPENS, S., UYTTENDAELE, M., DRIESKENS, K., RAJKOVIC, A., BOON, N., and van de WIELE, T.** (2012). Survival of *Bacillus cereus* Vegetative Cells and Spores during In Vitro Simulation of Gastric Passage. *Journal of Food Protection* **75**: 690–694.
- Chamaillard, M., Girardin, S.E., Viala, J., and Philpott, D.J.** (2003). Nods, nalps and naip: Intracellular regulators of bacterial-induced inflammation. *Cellular Microbiology* **5**: 581–592.
- Charroux, B. and Royet, J.** (2009). Elimination of plasmacytes by targeted apoptosis reveals their role in multiple aspects of the Drosophila immune response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**: 9797–9802.
- Chassaing, B., Ley, R.E., and Gewirtz, A.T.** (2014). Intestinal epithelial cell toll-like receptor 5 regulates the intestinal microbiota to prevent low-grade inflammation and metabolic syndrome in mice. *Gastroenterology* **147**: 1363-1377.e17.
- Choma, C., Guinebretiere, M.H., Carlin, F., Schmitt, P., Velge, P., Granum, P.E., and Nguyen-The, C.** (2000). Prevalence, characterization and growth of *Bacillus cereus* in commercial cooked chilled foods containing vegetables. *Journal of Applied Microbiology* **88**: 617–625.
- Coleman, J.J., Muhammed, M., Kasperkovitz, P. v., Vyas, J.M., and Mylonakis, E.** (2011). *Fusarium* pathogenesis investigated using *Galleria mellonella* as a heterologous host. *Fungal Biology* **115**: 1279–1289.
- Cormontagne, D., Rigour, V., Vidic, J., Rizzotto, F., Bille, E., and Ramarao, N.** (2021). *Bacillus cereus* Induces Severe Infections in Preterm Neonates: Implication at the Hospital and Human Milk Bank Level. *Toxins* **13**: 123.
- Corr, S.C. and O’Neill, L.A.J.** (2009). *Listeria monocytogenes* infection in the face of innate immunity. *Cellular Microbiology* **11**: 703–709.

- Cortezzo, D.E., Koziol-Dube, K., Setlow, B., and Setlow, P.** (2004). Treatment with oxidizing agents damages the inner membrane of spores of *Bacillus subtilis* and sensitizes spores to subsequent stress. *Journal of Applied Microbiology* **97**: 838–852.
- Costechareyre, D., Capo, F., Fabre, A., Chaduli, D., Kellenberger, C., Roussel, A., Charroux, B., and Royet, J.** (2016). Tissue-Specific Regulation of *Drosophila* NF- $\kappa$ B Pathway Activation by Peptidoglycan Recognition Protein SC. *Journal of Innate Immunity* **8**: 67–80.
- Cowan, A.E., Olivastro, E.M., Koppel, D.E., Loshon, C.A., Setlow, B., and Setlow, P.** (2004). Lipids in the inner membrane of dormant spores of *Bacillus* species are largely immobile. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 7733–7738.
- Crosnier, C., Stamataki, D., and Lewis, J.** (2006). Organizing cell renewal in the intestine: Stem cells, signals and combinatorial control. *Nature Reviews Genetics* **7**: 349–359.
- Cucchi, T., Vigne, J.D., Auffray, J.C., Croft, P., and Peltenburg, E.** (2002). Introduction involontaire de la souris domestique (*Mus musculus domesticus*) à Chypre dès le Néolithique précéramique ancien (fin IXe et VIIIe millénaires av. J.-C.). *Comptes Rendus - Palevol* **1**: 235–241.
- Cunningham, K.E. and Turner, J.R.** (2012). Myosin light chain kinase: Pulling the strings of epithelial tight junction function. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1258**: 34–42.
- van Cuyk, S., Deshpande, A., Hollander, A., Duval, N., Ticknor, L., Layshock, J., Gallegos-Graves, L.V., and Omberg, K.M.** (2011). Persistence of *Bacillus thuringiensis* subsp. *Kurstaki* in Urban environments following spraying. *Applied and Environmental Microbiology* **77**: 7954–7961.
- Defaye, A., Evans, I., Crozatier, M., Wood, W., Lemaitre, B., and Leulier, F.** (2009). Genetic ablation of *Drosophila* phagocytes reveals their contribution to both development and resistance to bacterial infection. *Journal of Innate Immunity* **1**: 322–334.
- Dheer, R., Santaolalla, R., Davies, J.M., Lang, J.K., Phillips, M.C., Pastorini, C., Vazquez-pertejo, M.T., and Abreu, M.T.** (2016). Function and Colonic Microbiota and Promotes a Risk for. *Infection and Immunity* **84**: 798–810.
- Dierick, K., van Coillie, E., Swiecicka, I., Meyfroidt, G., Devlieger, H., Meulemans, A., Hoedemaekers, G., Fourie, L., Heyndrickx, M., and Mahillon, J.** (2005). Fatal family outbreak of *Bacillus cereus*-associated food poisoning. *Journal of Clinical Microbiology* **43**: 4277–4279.
- Dodds, P.N. and Rathjen, J.P.** (2010). Plant immunity: towards an integrated view of plant–pathogen interactions. *Nature Reviews Genetics* **11**: 539–548.
- Donaldson, G.P., Lee, S.M., and Mazmanian, S.K.** (2015). Gut biogeography of the bacterial microbiota. *Nature Reviews Microbiology* **14**: 20–32.

- Du, E.J. et al.** (2016a). TrpA1 Regulates Defecation of Food-Borne Pathogens under the Control of the Duox Pathway. *PLoS Genetics* **12**: 1–21.
- Du, E.J., Ahn, T.J., Wen, X., Seo, D.W., Na, D.L., Kwon, J.Y., Choi, M., Kim, H.W., Cho, H., and Kang, K.J.** (2016b). Nucleophile sensitivity of *Drosophila* TRPA1 underlies light-induced feeding deterrence. *eLife* **5**: 1–26.
- Dubreuil, R.R.** (2004). Copper cells and stomach acid secretion in the *Drosophila* midgut. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* **36**: 742–752.
- Dubreuil, R.R., Grushko, T., and Baumann, O.** (2001). Differential effects of a labial mutation on the development, structure, and function of stomach acid-secreting cells in *Drosophila melanogaster* larvae and adults. *Cell and Tissue Research* **306**: 167–178.
- Dufies, O. et al.** (2021). *Escherichia coli* Rho GTPase-activating toxin CNF1 mediates NLRP3 inflammasome activation via p21-activated kinases-1/2 during bacteraemia in mice. *Nature Microbiology* **6**: 401–412.
- Dunn, J.D., Bosmani, C., Barisch, C., Raykov, L., Lefrançois, L.H., Cardenal-Muñoz, E., López-Jiménez, A.T., and Soldati, T.** (2018). Eat prey, live: *Dictyostelium discoideum* as a model for cell-autonomous defenses. *Frontiers in Immunology* **8**.
- Dziarski, R. and Gupta, D.** (2006). Mammalian PGRPs: Novel antibacterial proteins. *Cellular Microbiology* **8**: 1059–1069.
- Eberl, G.** (2018). The microbiota, a necessary element of immunity. *Comptes Rendus - Biologies* **341**: 281–283.
- Eckmann, L. and Karin, M.** (2005). NOD2 and Crohn's disease: Loss or gain of function? *Immunity* **22**: 661–667.
- Ehling-Schulz, M. et al.** (2005). Emetic toxin formation of *Bacillus cereus* is restricted to a single evolutionary lineage of closely related strains. *Microbiology* **151**: 183–197.
- Ehling-Schulz, M., Fricker, M., and Scherer, S.** (2004). Identification of emetic toxin producing *Bacillus cereus* strains by a novel molecular assay. *FEMS Microbiology Letters* **232**: 189–195.
- Ehling-Schulz, M., Lereclus, D., and Koehler, T.M.** (2019). The *Bacillus cereus* Group: *Bacillus* Species with Pathogenic Potential .
- Ehrhardt, C.J., Chu, V., Brown, T., Simmons, T.L., Swan, B.K., Bannan, J., and Robertson, J.M.** (2010). Use of Fatty Acid Methyl Ester Profiles for Discrimination of *Bacillus cereus* T-Strain Spores Grown on Different Media. *Applied and Environmental Microbiology* **76**: 1902–1912.
- English, L. and Slatin, S.L.** (1992). Mode of action of delta-endotoxins from *Bacillus thuringiensis*: A comparison with other bacterial toxins. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **22**: 1–7.

- Fagerlund, A., Lindbäck, T., Storset, A.K., Granum, P.E., and Hardy, S.P.** (2008). Bacillus cereus Nhe is a pore-forming toxin with structural and functional properties similar to the ClyA (HlyE, SheA) family of haemolysins, able to induce osmotic lysis in epithelia. *Microbiology* **154**: 693–704.
- Fagerlund, A., Ween, O., Lund, T., Hardy, S.P., and Granum, P.E.** (2004). Genetic and functional analysis of the cytK family of genes in Bacillus cereus. *Microbiology* **150**: 2689–2697.
- Feldhaar, H. and Gross, R.** (2008). Immune reactions of insects on bacterial pathogens and mutualists. *Microbes and Infection* **10**: 1082–1088.
- Ferrand, A., al Nabhani, Z., Tapias, N.S., Mas, E., Hugot, J.P., and Barreau, F.** (2019). NOD2 Expression in Intestinal Epithelial Cells Protects Toward the Development of Inflammation and Associated Carcinogenesis. *Cmgh* **7**: 357–369.
- Ferrandon, D.** (2013). The complementary facets of epithelial host defenses in the genetic model organism *Drosophila melanogaster*: From resistance to resilience. *Current Opinion in Immunology* **25**: 59–70.
- Fiuza, L.M., Polanczyk, R.A., and Crickmore, N.** (2017). Bacillus thuringiensis and Lysinibacillus sphaericus: Characterization and use in the field of biocontrol. *Bacillus Thuringiensis and Lysinibacillus Sphaericus: Characterization and use in the Field of Biocontrol*: 1–288.
- Flannagan, R.S., Jaumouillé, V., and Grinstein, S.** (2012). The cell biology of phagocytosis. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* **7**: 61–98.
- Frankenhuyzen, K. van** (2009). Insecticidal activity of Bacillus thuringiensis crystal proteins. *Journal of Invertebrate Pathology* **101**: 1–16.
- Fukata, M. et al.** (2011). Constitutive activation of epithelial TLR4 augments inflammatory responses to mucosal injury and drives colitis-associated tumorigenesis. *Inflammatory Bowel Diseases* **17**: 1464–1473.
- Gallo, R.L. and Hooper, L. v.** (2012). Epithelial antimicrobial defence of the skin and intestine. *Nature Reviews Immunology* **12**: 503–516.
- Gaur, A.H., Patrick, C.C., McCullers, J.A., Flynn, P.M., Pearson, T.A., Razzouk, B.I., Thompson, S.J., and Shenep, J.L.** (2001). Bacillus cereus bacteremia and meningitis in immunocompromised children. *Clinical Infectious Diseases* **32**: 1456–1462.
- Gendrin, M., Zaidman-Rémy, A., Broderick, N.A., Paredes, J., Poidevin, M., Roussel, A., and Lemaitre, B.** (2013). Functional Analysis of PGRP-LA in *Drosophila* Immunity. *PLoS ONE* **8**: e69742.
- GERHARDT, P. and BLACK, S.H.** (1961). Permeability of bacterial spores. II. Molecular variables affecting solute permeation. *Journal of bacteriology* **82**: 750–760.
- Gesta, S., Tseng, Y.H., and Kahn, C.R.** (2007). Developmental Origin of Fat: Tracking Obesity to Its Source. *Cell* **131**: 242–256.

- Glasheen, B.M., Robbins, R.M., Piette, C., Beitel, G.J., and Page-McCaw, A.** (2010). A matrix metalloproteinase mediates airway remodeling in *Drosophila*. *Developmental Biology* **344**: 772–783.
- Gobert, V., Gottar, M., Matskevich, A.A., Rutschmann, S., Royet, J., Belvin, M., Hoffmann, J.A., and Ferrandon, D.** (2003). Dual Activation of the *Drosophila* Toll Pathway by Two Pattern Recognition Receptors. *Science* **302**: 2126–2130.
- Govind, S.** (2008). Innate immunity in *Drosophila*: Pathogens and pathways. *Insect Science* **15**: 29–43.
- Granum, P.** (1999). The sequence of the non-haemolytic enterotoxin operon from *Bacillus cereus*. *FEMS Microbiology Letters* **177**: 225–229.
- Granum, P.E.** (1994). *Bacillus cereus* and its toxins. *Journal of Applied Bacteriology* **76**: 61S-66S.
- de Gregorio, E., Spellman, P.T., Tzou, P., Rubin, G.M., and Lemaitre, B.** (2002). The Toll and Imd pathways are the major regulators of the immune response in *Drosophila*. *EMBO Journal* **21**: 2568–2579.
- Griffiths, K.K. and Setlow, P.** (2009). Effects of modification of membrane lipid composition on *Bacillus subtilis* sporulation and spore properties. *Journal of Applied Microbiology* **106**: 2064–2078.
- Groschwitz, K.R. and Hogan, S.P.** (2009). Intestinal barrier function: Molecular regulation and disease pathogenesis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **124**: 3–20.
- Gros Lambert, M., Nlrp, B.P., Gros Lambert, M., and Py, B.F.** (2018). To cite this version : HAL Id : hal-01904137 un inflammasome sous contrôle. **34**: 47–53.
- Guillemet, E., Cadot, C., Tran, S.L., Guinebretière, M.H., Lereclus, D., and Ramarao, N.** (2010). The InhA metalloproteases of *Bacillus cereus* contribute concomitantly to virulence. *Journal of Bacteriology* **192**: 286–294.
- Guinebretière, M.H. et al.** (2013a). *Bacillus cytotoxicus* sp. nov. is a novel thermotolerant species of the *Bacillus cereus* group occasionally associated with food poisoning. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **63**: 31–40.
- Guinebretière, M.H. et al.** (2013b). *Bacillus cytotoxicus* sp. nov. is a novel thermotolerant species of the *Bacillus cereus* group occasionally associated with food poisoning. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **63**: 31–40.
- Guinebretière, M.H., Thompson, F.L., Sorokin, A., Normand, P., Dawyndt, P., Ehling-Schulz, M., Svensson, B., Sanchis, V., Nguyen-The, C., Heyndrickx, M., and de Vos, P.** (2008). Ecological diversification in the *Bacillus cereus* Group. *Environmental Microbiology* **10**: 851–865.
- Guinebretière, M.H., Velge, P., Couvert, O., Carlin, F., Debuyser, M.L., and Nguyen-The, C.** (2010). Ability of *Bacillus cereus* group strains to cause food poisoning varies according to

- phylogenetic affiliation (groups I to VII) rather than species affiliation. *Journal of Clinical Microbiology* **48**: 3388–3391.
- Guo, L., Karpac, J., Tran, S.L., and Jasper, H.** (2014). PGRP-SC2 promotes gut immune homeostasis to limit commensal dysbiosis and extend lifespan. *Cell* **156**: 109–122.
- Ha, E.M., Oh, C.T., Bae, Y.S., and Lee, W.J.** (2005). A direct role for dual oxidase in *Drosophila* gut immunity. *Science* **310**: 847–850.
- Hajer, G.R., van Haeften, T.W., and Visseren, F.L.J.** (2008). Adipose tissue dysfunction in obesity, diabetes, and vascular diseases. *European Heart Journal* **29**: 2959–2971.
- Hanson, M.A. and Lemaitre, B.** (2020a). New insights on *Drosophila* antimicrobial peptide function in host defense and beyond. *Current Opinion in Immunology* **62**: 22–30.
- Hanson, M.A. and Lemaitre, B.** (2020b). New insights on *Drosophila* antimicrobial peptide function in host defense and beyond. *Current Opinion in Immunology* **62**: 22–30.
- Hasnain, S.Z., Tauro, S., Das, I., Tong, H., Chen, A.H., Jeffery, P.L., McDonald, V., Florin, T.H., and McGuckin, M.A.** (2013). IL-10 promotes production of intestinal mucus by suppressing protein misfolding and endoplasmic reticulum stress in goblet cells. *Gastroenterology* **144**: 357-368.e9.
- el Hassani, R.A. et al.** (2005). Dual oxidase2 is expressed all along the digestive tract. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* **288**: 933–942.
- Haug, T.M., Sand, S.L., Sand, O., Phung, D., Granum, P.E., and Hardy, S.P.** (2010). Formation of very large conductance channels by *Bacillus cereus* Nhe in *in vitro* and GH4 cells identifies NheA + B as the inherent pore-forming structure. *Journal of Membrane Biology* **237**: 1–11.
- HAUGE, S.** (1955). FOOD POISONING CAUSED BY AEROBIC SPORE-FORMING BACILLI. *Journal of Applied Bacteriology* **18**: 591–595.
- He, L., Si, G., Huang, J., Samuel, A.D.T., and Perrimon, N.** (2018). Mechanical regulation of stem-cell differentiation by the stretch-activated Piezo channel. *Nature* **555**: 103–106.
- Heim, V.J., Stafford, C.A., and Nachbur, U.** (2019). NOD Signaling and Cell Death. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* **7**: 1–15.
- Helgason, E., Økstad, O.L.E.A., Caugant, D.A., Mock, L.E., Hegna, I.D. a, Johansen, H.A., Fouet, A., Mock, M., Hegna, I., and Kolstø, A.B.** (2000). One Species on the Basis of Genetic Evidence. *Applied and environmental microbiology* **66**: 2627–2630.
- Heller, F. et al.** (2005). Interleukin-13 Is the Key Effector Th2 Cytokine in Ulcerative Colitis That Affects Epithelial Tight Junctions, Apoptosis, and Cell Restitution. *Gastroenterology* **129**: 550–564.
- Hering, N.A., Fromm, M., and Schulzke, J.D.** (2012). Determinants of colonic barrier function in inflammatory bowel disease and potential therapeutics. *Journal of Physiology* **590**: 1035–1044.

- Hillyer, J.F.** (2016). Insect immunology and hematopoiesis. *Developmental and Comparative Immunology* **58**: 102–118.
- Hirayama, D., Iida, T., and Nakase, H.** (2018). The phagocytic function of macrophage-enforcing innate immunity and tissue homeostasis. *International Journal of Molecular Sciences* **19**.
- Hirota, Y. and Nakajima, K.** (2017). Control of neuronal migration and aggregation by Reelin signaling in the developing cerebral cortex. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* **5**.
- Hisamatsu, T., Suzuki, M., Reinecker, H.C., Nadeau, W.J., McCormick, B.A., and Podolsky, D.K.** (2003). CARD15/NOD2 functions as an antibacterial factor in human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* **124**: 993–1000.
- Hooper, L. v. and MacPherson, A.J.** (2010). Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota. *Nature Reviews Immunology* **10**: 159–169.
- Hoton, F.M., Andrup, L., Swiecicka, I., and Mahillon, J.** (2005). The cereulide genetic determinants of emetic *Bacillus cereus* are plasmid-borne. *Microbiology* **151**: 2121–2124.
- Hung, T.P., Truong, L. v., Binh, N.D., Frutos, R., Quiquampoix, H., and Staunton, S.** (2016a). Persistence of detectable insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis* (Cry) and toxicity after adsorption on contrasting soils. *Environmental Pollution* **208**: 318–325.
- Hung, T.P., Truong, L. v., Binh, N.D., Frutos, R., Quiquampoix, H., and Staunton, S.** (2016b). Persistence of detectable insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis* (Cry) and toxicity after adsorption on contrasting soils. *Environmental Pollution* **208**: 318–325.
- Hung, T.P., Truong, L. van, Binh, N.D., Frutos, R., Quiquampoix, H., and Staunton, S.** (2016c). Fate of insecticidal *Bacillus thuringiensis* Cry protein in soil: differences between purified toxin and biopesticide formulation. *Pest Management Science* **72**: 2247–2253.
- Ibrahim-Granet, O., Philippe, B., Boleti, H., Boisvieux-Ulrich, E., Grenet, D., Stern, M., and Latgé, J.P.** (2003). Phagocytosis and intracellular fate of *Aspergillus fumigatus* conidia in alveolar macrophages. *Infection and Immunity* **71**: 891–903.
- Izumi, Y., Furuse, K., and Furuse, M.** (2019). Septate junctions regulate gut homeostasis through regulation of stem cell proliferation and enterocyte behavior in *Drosophila*. *Journal of cell science* **132**.
- Izumi, Y. and Furuse, M.** (2014). Molecular organization and function of invertebrate occluding junctions. *Seminars in Cell and Developmental Biology* **36**: 186–193.
- Jackson, M.A. and Nakamura, L.K.** (2020). *Bacillus mycoides*. In *Definitions (Qeios)*, pp. 4–7.
- Jensen, G.B., Larsen, P., Jacobsen, B.L., Madsen, B., Smidt, L., and Andrup, L.** (2002). *Bacillus thuringiensis* in fecal samples from greenhouse workers after exposure to *B. thuringiensis*-based pesticides. *Applied and Environmental Microbiology* **68**: 4900–4905.

- Jiang, C., Li, G., Huang, P., Liu, Z., and Zhao, B.** (2017). The Gut Microbiota and Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease* **58**: 1–15.
- Jiang, H. and Edgar, B.A.** (2012). Intestinal stem cell function in *Drosophila* and mice. *Current Opinion in Genetics and Development* **22**: 354–360.
- Jiang, H., Tian, A., and Jiang, J.** (2016). Intestinal stem cell response to injury: lessons from *Drosophila*. *Cellular and Molecular Life Sciences* **73**: 3337–3349.
- Jiménez, G., Urdiain, M., Cifuentes, A., López-López, A., Blanch, A.R., Tamames, J., Kämpfer, P., Kolstø, A.B., Ramón, D., Martínez, J.F., Codoñer, F.M., and Rosselló-Móra, R.** (2013). Description of *Bacillus toyonensis* sp. nov., a novel species of the *Bacillus cereus* group, and pairwise genome comparisons of the species of the group by means of ANI calculations. *Systematic and Applied Microbiology* **36**: 383–391.
- Jin, C. and Flavell, R.A.** (2010). Molecular mechanism of NLRP3 inflammasome activation. *Journal of Clinical Immunology* **30**: 628–631.
- Jin, Y. and Blikslager, A.T.** (2016). Myosin light chain kinase mediates intestinal barrier dysfunction via occludin endocytosis during anoxia/reoxygenation injury. *American Journal of Physiology - Cell Physiology* **311**: C996–C1004.
- Johansson, M.E.V., Sjövall, H., and Hansson, G.C.** (2013). The gastrointestinal mucus system in health and disease. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology* **10**: 352–361.
- Johler, S., Kalbhenn, E.M., Heini, N., Brodmann, P., Gautsch, S., Bagcioglu, M., Contzen, M., Stephan, R., and Ehling-Schulz, M.** (2018). Enterotoxin production of *Bacillus thuringiensis* isolates from biopesticides, foods, and outbreaks. *Frontiers in Microbiology* **9**: 1–11.
- Jones, R.M. et al.** (2013). Symbiotic lactobacilli stimulate gut epithelial proliferation via Nox-mediated generation of reactive oxygen species. *EMBO Journal* **32**: 3017–3028.
- Jung, S.H., Evans, C.J., Uemura, C., and Banerjee, U.** (2005). The *Drosophila* lymph gland as a developmental model of hematopoiesis. *Development* **132**: 2521–2533.
- Kabouridis, P.S. and Pachnis, V.** (2015). Emerging roles of gut microbiota and the immune system in the development of the enteric nervous system. *Journal of Clinical Investigation* **125**: 956–964.
- Kaneko, T. and Silverman, N.** (2005). Bacterial recognition and signalling by the *Drosophila* IMD pathway. *Cellular Microbiology* **7**: 461–469.
- Kanneganti, T.D., Lamkanfi, M., and Núñez, G.** (2007). Intracellular NOD-like Receptors in Host Defense and Disease. *Immunity* **27**: 549–559.
- Kapuria, S., Karpac, J., Biteau, B., Hwangbo, D.S., and Jasper, H.** (2012). Notch-Mediated Suppression of TSC2 Expression Regulates Cell Differentiation in the *Drosophila* Intestinal Stem Cell Lineage. *PLoS Genetics* **8**: 1–14.



- Karin, M. and Clevers, H.** (2016). Reparative inflammation takes charge of tissue regeneration. *Nature* **529**: 307–315.
- Karpowicz, P., Perez, J., and Perrimon, N.** (2010). The Hippo tumor suppressor pathway regulates intestinal stem cell regeneration. *Development* **137**: 4135–4145.
- Kedinger, M., Haffen, K., and Simon-Assmann, P.** (1987). Intestinal tissue and cell cultures. *Differentiation* **36**: 71–85.
- Kelley, N., Jeltema, D., Duan, Y., and He, Y.** (2019). The NLRP3 Inflammasome: An Overview of Mechanisms of Activation and Regulation. *International journal of molecular sciences* **20**: 3328.
- Kennedy, E.A., King, K.Y., and Baldrige, M.T.** (2018). Mouse microbiota models: Comparing germ-free mice and antibiotics treatment as tools for modifying gut bacteria. *Frontiers in Physiology* **9**: 1–16.
- Khansari, N., Shakiba, Y., and Mahmoudi, M.** (2009). Chronic Inflammation and Oxidative Stress as a Major Cause of Age- Related Diseases and Cancer. *Recent Patents on Inflammation & Allergy Drug Discovery* **3**: 73–80.
- Kim, J.G., Lee, S.J., and Kagnoff, M.F.** (2004). Nod1 Is An Essential Signal Transducer in Intestinal Epithelial Cells Infected with Bacteria That Avoid Recognition by Toll-Like Receptors. *Infection and Immunity* **72**: 1487–1495.
- Kim, M.S., Byun, M., and Oh, B.H.** (2003). Crystal structure of peptidoglycan recognition protein LB from *Drosophila melanogaster*. *Nature Immunology* **4**: 787–793.
- Kim, S.H. and Lee, W.J.** (2014). Role of DUOX in gut inflammation: Lessons from *Drosophila* model of gut-microbiota interactions. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* **3**: 1–12.
- Kobayashi, K.S., Chamillard, M., Ogura, Y., Henegariu, O., Inohara, N., Nuñez, G., and Flavell, R.A.** (2005). Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract. *Science* **307**: 731–734.
- Kolstø, A.B., Tourasse, N.J., and Økstad, O.A.** (2009). What sets *Bacillus anthracis* apart from other *Bacillus* species? *Annual Review of Microbiology* **63**: 451–476.
- Konecka, E., Baranek, J., and Kaznowski, A.** (2014). Crystalline protein profiling and cry gene detection in *Bacillus thuringiensis* strains isolated during epizootics in *Cydia pomonella* L. *Biological Letters* **51**: 83–92.
- Konstantinidis, K.T. and Tiedje, J.M.** (2005). Genomic insights that advance the species definition for prokaryotes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**: 2567–2572.
- Kotchoni, S.O. and Gachomo, E.W.** (2006). The reactive oxygen species network pathways: An essential prerequisite for perception of pathogen attack and the acquired disease resistance in plants. *Journal of Biosciences* **31**: 389–404.

- Kredel, L.I. and Siegmund, B.** (2014). Adipose-tissue and intestinal inflammation - visceral obesity and creeping fat. *Frontiers in Immunology* **5**: 1–12.
- Kumar, H., Kawai, T., and Akira, S.** (2011). Pathogen recognition by the innate immune system. *International Reviews of Immunology* **30**: 16–34.
- Kuraishi, T., Binggeli, O., Opota, O., Buchon, N., and Lemaitre, B.** (2011). Genetic evidence for a protective role of the peritrophic matrix against intestinal bacterial infection in *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**: 15966–15971.
- Kuraishi, T., Hori, A., and Kurata, S.** (2013). Host-microbe interactions in the gut of *Drosophila melanogaster*. *Frontiers in Physiology* **4 DEC**: 1–8.
- Kutima, P.M. and Foegeding, P.M.** (1987). Involvement of the spore coat in germination of *Bacillus cereus* T spores. *Applied and Environmental Microbiology* **53**: 47–52.
- Lacey, L.A., Grzywacz, D., Shapiro-Ilan, D.I., Frutos, R., Brownbridge, M., and Goettel, M.S.** (2015). Insect pathogens as biological control agents: Back to the future. *Journal of Invertebrate Pathology* **132**: 1–41.
- Lai, Y. and Gallo, R.L.** (2009). AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. *Trends in Immunology* **30**: 131–141.
- Lambeth, J.D.** (2004). NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nature Reviews Immunology* **4**: 181–189.
- Lamkanfi, M. and Dixit, V.M.** (2017). The inflammasome turns 15. *Nature* **548**: 534–535.
- Lechner, S., Mayr, R., Francis, K.P., Prüss, B.M., Kaplan, T., Wiessner-Gunkel, E., Stewart, G.S., and Scherer, S.** (1998). *Bacillus weihenstephanensis* sp. nov. is a new psychrotolerant species of the *Bacillus cereus* group. *International journal of systematic bacteriology* **48 Pt 4**: 1373–82.
- Lee, K.A., Kim, B., Bhin, J., Kim, D.H., You, H., Kim, E.K., Kim, S.H., Ryu, J.H., Hwang, D., and Lee, W.J.** (2015). Bacterial uracil modulates *drosophila* DUOX-dependent Gut immunity via hedgehog-induced signaling endosomes. *Cell Host and Microbe* **17**: 191–204.
- Lee, K.A., Kim, S.H., Kim, E.K., Ha, E.M., You, H., Kim, B., Kim, M.J., Kwon, Y., Ryu, J.H., and Lee, W.J.** (2013). Bacterial-derived uracil as a modulator of mucosal immunity and gut-microbe homeostasis in *drosophila*. *Cell* **153**: 797–811.
- Lee, W.J. and Hase, K.** (2014). Gut microbiota-generated metabolites in animal health and disease. *Nature Chemical Biology* **10**: 416–424.
- Legarda, D., Justus, S.J., Ang, R.L., Rikhi, N., Li, W., Moran, T.M., Zhang, J., Mizoguchi, E., Zelic, M., Kelliher, M.A., Blander, J.M., and Ting, A.T.** (2016). CYLD Proteolysis Protects Macrophages from TNF-Mediated Auto-necroptosis Induced by LPS and Licensed by Type I IFN. *Cell Reports* **15**: 2449–2461.

- Lemaitre, B. and Hoffmann, J.** (2007). The host defense of *Drosophila melanogaster*. *Annual Review of Immunology* **25**: 697–743.
- Lemaitre, B., Kromer-Metzger, E., Michaut, L., Nicolas, E., Meister, M., Georgel, P., Reichhart, J.M., and Hoffmann, J.A.** (1995). A recessive mutation, immune deficiency (*imd*), defines two distinct control pathways in the *Drosophila* host defense. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**: 9465–9469.
- Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J.M., and Hoffmann, J.A.** (1996). The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/Cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* **86**: 973–983.
- Lemos, A.J.J.M., Siqueira, H.A.A., Wanderley-Teixeira, V., Maia, F.C.L., Teixeira, Á.A.C., Silva, E.J., and Oliveira, J. v.** (2013). Effect of sub-lethal doses of *Bacillus thuringiensis* subsp. *Aizawai* and deltamethrin with regard to fertility and organ toxicity in pregnant albino rats. *Experimental and Toxicologic Pathology* **65**: 489–495.
- Leulier, F., Parquet, C., Pili-Floury, S., Ryu, J.H., Caroff, M., Lee, W.J., Mengin-Lecreulx, D., and Lemaitre, B.** (2003). The *Drosophila* immune system detects bacteria through specific peptidoglycan recognition. *Nature Immunology* **4**: 478–484.
- Leulier, F., Rodriguez, A., Khush, R.S., Abrams, J.M., and Lemaitre, B.** (2000). The *Drosophila* caspase *Dredd* is required to resist Gram-negative bacterial infection. *EMBO Reports* **1**: 353–358.
- Leulier, F., Vidal, S., Saigo, K., Ueda, R., and Lemaitre, B.** (2002). Inducible expression of double-stranded RNA reveals a role for *dFADD* in the regulation of the antibacterial response in *Drosophila* adults. *Current Biology* **12**: 996–1000.
- Li, H., Qi, Y., and Jasper, H.** (2016). *Ubx* dynamically regulates *Dpp* signaling by repressing *Dad* expression during copper cell regeneration in the adult *Drosophila* midgut. *Developmental Biology* **419**: 373–381.
- Li, S., de Mandal, S., Xu, X., and Jin, F.** (2020). The tripartite interaction of host immunity-*Bacillus thuringiensis* infection-gut microbiota. *Toxins* **12**.
- Liehl, P., Blight, M., Vodovar, N., Boccard, F., and Lemaitre, B.** (2006). Prevalence of local immune response against oral infection in a *Drosophila/Pseudomonas* infection model. *PLoS Pathogens* **2**: 0551–0561.
- Limmer, S., Haller, S., Drenkard, E., Lee, J., Yu, S., Kocks, C., Ausubel, F.M., and Ferrandon, D.** (2011). *Pseudomonas aeruginosa* *RhlR* is required to neutralize the cellular immune response in a *Drosophila melanogaster* oral infection model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**: 17378–17383.
- Lindbäck, T., Fagerlund, A., Rødland, M.S., and Granum, P.E.** (2004). Characterization of the *Bacillus cereus* *Nhe* enterotoxin. *Microbiology* **150**: 3959–3967.

- Liu, C., Xu, Z., Gupta, D., and Dziarski, R.** (2001). Peptidoglycan recognition proteins: A novel family of four human innate immunity pattern recognition molecules. *Journal of Biological Chemistry* **276**: 34686–34694.
- Liwinski, T., Zheng, D., and Elinav, E.** (2020). The microbiome and cytosolic innate immune receptors. *Immunological Reviews* **297**: 207–224.
- Lotte, R., Hérisse, A., Berrouane, Y., Lotte, L., Casagrande, F., Landraud, L., Herbin, S., Ramarao, N., Boyer, L., and Ruimy, R.** (2017). Virulence Analysis of Emerging Infectious Diseases **23**: 845–848.
- Loudhaief, R., Brun-Barale, A., Benguettat, O., Nawrot-Esposito, M.P., Pauron, D., Amichot, M., and Gallet, A.** (2017). Apoptosis restores cellular density by eliminating a physiologically or genetically induced excess of enterocytes in the *Drosophila* midgut. *Development (Cambridge)* **144**: 808–819.
- Lozupone, C.A., Stombaugh, J.I., Gordon, J.I., Jansson, J.K., and Knight, R.** (2012). Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature* **489**: 220–230.
- Lund, T., de Buyser, M.L., and Granum, P.E.** (2000). A new cytotoxin from *Bacillus cereus* that may cause necrotic enteritis. *Molecular Microbiology* **38**: 254–261.
- Mahler, H., Pasi, A., Kramer, J.M., Schulte, P., Scoging, A.C., Bär, W., and Krähenbühl, S.** (1997). Fulminant Liver Failure in Association with the Emetic Toxin of *Bacillus cereus*. *New England Journal of Medicine* **336**: 1142–1148.
- Maillet, F., Bischoff, V., Vignal, C., Hoffmann, J., and Royet, J.** (2008). The *Drosophila* Peptidoglycan Recognition Protein PGRP-LF Blocks PGRP-LC and IMD/JNK Pathway Activation. *Cell Host and Microbe* **3**: 293–303.
- Manktelow, C.J., White, H., Crickmore, N., and Raymond, B.** (2021). Divergence in environmental adaptation between terrestrial clades of the *Bacillus cereus* group. *FEMS Microbiology Ecology* **97**: 1–12.
- Marchiando, A.M., Shen, L., Vallen Graham, W., Weber, C.R., Schwarz, B.T., Austin, J.R., Raleigh, D.R., Guan, Y., Watson, A.J.M., Montrose, M.H., and Turner, J.R.** (2010). Caveolin-1-dependent occludin endocytosis is required for TNF-induced tight junction regulation in vivo. *Journal of Cell Biology* **189**: 111–126.
- Margulis, L., Jorgensen, J.Z., Dolan, S., Kolchinsky, R., Rainey, F.A., and Lo, S.C.** (1998). The Arthromitus stage of *Bacillus cereus*: Intestinal symbionts of animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**: 1236–1241.
- Marianes, A. and Spradling, A.C.** (2013). Physiological and stem cell compartmentalization within the *Drosophila* midgut. *eLife* **2**: e00886.
- Marmaras, V.J. and Lampropoulou, M.** (2009). Regulators and signalling in insect haemocyte immunity. *Cellular Signalling* **21**: 186–195.

- Marra, A., Hanson, M.A., Kondo, S., Erkosar, B., and Lemaitre, B.** (2021). Drosophila Antimicrobial Peptides and Lysozymes Regulate Gut Microbiota Composition and Abundance. *mBio* **12**: e0082421.
- Martinon, F., Burns, K., and Tschopp, J.** (2002). The Inflammasome: A molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL- $\beta$ . *Molecular Cell* **10**: 417–426.
- Martins, R., McCracken, A., Simons, M., Henriques, C., and Rera, M.** (2018). How to Catch a Smurf? – Ageing and Beyond... In vivo Assessment of Intestinal Permeability in Multiple Model Organisms. *Bio-Protocol* **8**: 1–13.
- Matziouridou, C., Rocha, S.D.C., Haabeth, O.A., Rudi, K., Carlsen, H., and Kielland, A.** (2018). INOS- and NOX1-dependent ROS production maintains bacterial homeostasis in the ileum of mice. *Mucosal Immunology* **11**: 774–784.
- Mengin-Lecreulx, D. and Lemaitre, B.** (2005). Structure and metabolism of peptidoglycan and molecular requirements allowing its detection by the Drosophila innate immune system. *Journal of Endotoxin Research* **11**: 105–111.
- Meyer-Hoffert, U., Hornef, M.W., Henriques-Normark, B., Axelsson, L.G., Midtvedt, T., Pütsep, K., and Andersson, M.** (2008). Secreted enteric antimicrobial activity localises to the mucus surface layer. *Gut* **57**: 764–771.
- Miao, E.A., Rajan, J. v., and Aderem, A.** (2011). Caspase-1-induced pyroptotic cell death. *Immunological Reviews* **243**: 206–214.
- Micchelli, C.A. and Perrimon, N.** (2006). Evidence that stem cells reside in the adult Drosophila midgut epithelium. *Nature* **439**: 475–479.
- Michael Zasloff** (2002). Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* **415**: 389–395.
- Michel, T., Relchhart, J.M., Hoffmann, J.A., and Royet, J.** (2001). Drosophila Toll is activated by Gram-positive bacteria through a circulating peptidoglycan recognition protein. *Nature* **414**: 756–759.
- Millet, A.C.M. and Ewbank, J.J.** (2004). Immunity in *Caenorhabditis elegans*. *Current Opinion in Immunology* **16**: 4–9.
- MORAVEK, M., WEGSCHEIDER, M., SCHULZ, A., DIETRICH, R., BURK, C., and MARTLBAUER, E.** (2004). Colony immunoblot assay for the detection of hemolysin BL enterotoxin producing. *FEMS Microbiology Letters* **238**: 107–113.
- Myllymäki, H., Valanne, S., and Rämet, M.** (2014). The Drosophila Imd Signaling Pathway . *The Journal of Immunology* **192**: 3455–3462.
- Nakamura, K., Yokoi, Y., Fukaya, R., Ohira, S., Shinozaki, R., Nishida, T., Kikuchi, M., and Ayabe, T.** (2020). Expression and Localization of Paneth Cells and Their  $\alpha$ -Defensins in the Small Intestine of Adult Mouse. *Frontiers in Immunology* **11**: 1–10.

- Nakamura, L.K.** (1998). Determine the Phylogenetic Relationship of the Group 2. *International Journal of Systematic Bacteriology*: 1031–1035.
- Naranjo, M., Denayer, S., Botteldoorn, N., Delbrassinne, L., Veys, J., Waegenare, J., Sirtaine, N., Driesen, R.B., Sipido, K.R., Mahillon, J., and Dierick, K.** (2011). Sudden death of a young adult associated with *Bacillus cereus* food poisoning. *Journal of Clinical Microbiology* **49**: 4379–4381.
- Nash, J.A., Ballard, T.N.S., Weaver, T.E., and Akinbi, H.T.** (2006). The Peptidoglycan-Degrading Property of Lysozyme Is Not Required for Bactericidal Activity In Vivo. *The Journal of Immunology* **177**: 519–526.
- Nawrot-Esposito, M.P., Babin, A., Pasco, M., Poirié, M., Gatti, J.L., and Gallet, A.** (2020). *Bacillus thuringiensis* bioinsecticides induce developmental defects in non-target drosophila melanogaster larvae. *Insects* **11**: 1–25.
- Naylor, G. and Axon, A.** (2003). Role of bacterial overgrowth in the stomach as an additional risk factor for gastritis. *Canadian journal of gastroenterology = Journal canadien de gastroenterologie* **17 Suppl B**: 13–18.
- Nehme, N.T., Liégeois, S., Kele, B., Giammarinaro, P., Pradel, E., Hoffmann, J.A., Ewbank, J.J., and Ferrandon, D.** (2007). A model of bacterial intestinal infections in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Pathogens* **3**: 1694–1709.
- Neyen, C., Poidevin, M., Roussel, A., and Lemaitre, B.** (2012). Tissue- and Ligand-Specific Sensing of Gram-Negative Infection in *Drosophila* by PGRP-LC Isoforms and PGRP-LE. *The Journal of Immunology* **189**: 1886–1897.
- Oda, M. et al.** (2012). Role of sphingomyelinase in infectious diseases caused by *Bacillus cereus*. *PLoS ONE* **7**: 1–11.
- Ohlstein, B. and Spradling, A.** (2006). The adult *Drosophila* posterior midgut is maintained by pluripotent stem cells. *Nature* **439**: 470–474.
- Oliviera-Filho, E.C., Oliveira, R.S., Lopes, M.C., Ramos, F.R., Grisolia, C.K., Alves, R.T., and Monnerat, R.G.** (2009). Toxicity Assessment and Clearance of Brazilian Microbial Pest Control Agents in Mice. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **83**: 570–574.
- Osman, D., Buchon, N., Chakrabarti, S., Huang, Y.T., Su, W.C., Poidevin, M., Tsai, Y.C., and Lemaitre, B.** (2012). Autocrine and paracrine unpaired signaling regulate intestinal stem cell maintenance and division. *Journal of Cell Science* **125**: 5944–5949.
- Owen, J.L. and Mohamadzadeh, M.** (2013). Macrophages and chemokines as mediators of angiogenesis. *Frontiers in Physiology* **4 JUL**: 1–8.
- Palma, L., Muñoz, D., Berry, C., Murillo, J., Caballero, P., and Caballero, P.** (2014). *Bacillus thuringiensis* toxins: An overview of their biocidal activity. *Toxins* **6**: 3296–3325.

- Paredes, J.C., Welchman, D.P., Poidevin, M., and Lemaitre, B.** (2011). Negative regulation by Amidase PGRPs shapes the drosophila antibacterial response and protects the Fly from innocuous infection. *Immunity* **35**: 770–779.
- Perdigoto, C.N., Schweisguth, F., and Bardin, A.J.** (2011). Distinct levels of Notch activity for commitment and terminal differentiation of stem cells in the adult fly intestine. *Development* **138**: 4585–4595.
- Peterson, L.W. and Artis, D.** (2014). Intestinal epithelial cells: Regulators of barrier function and immune homeostasis. *Nature Reviews Immunology* **14**: 141–153.
- Pétrilli, V., Papin, S., Dostert, C., Mayor, A., Martinon, F., and Tschopp, J.** (2007). Activation of the NALP3 inflammasome is triggered by low intracellular potassium concentration. *Cell Death and Differentiation* **14**: 1583–1589.
- Piggot, P.J.** (1985). Microbial development. *Trends in Genetics* **1**: 265.
- Pirhonen, T.I., Andersson, M.A., Jääskeläinen, E.L., Salkinoja-Salonen, M.S., Honkanen-Buzalski, T., and Johansson, T.M.L.** (2005). Biochemical and toxic diversity of *Bacillus cereus* in a pasta and meat dish associated with a food-poisoning case. *Food Microbiology* **22**: 87–91.
- Poindexter, H.A. and Washington, T.D.** (1974). Microbial opportunism in clinical medicine. *Journal of the National Medical Association* **66**: 284–291.
- Price, A.E., Shamardani, K., Lugo, K.A., Deguine, J., Roberts, A.W., Lee, B.L., and Barton, G.M.** (2018). A Map of Toll-like Receptor Expression in the Intestinal Epithelium Reveals Distinct Spatial, Cell Type-Specific, and Temporal Patterns. *Immunity* **49**: 560-575.e6.
- van Putten, J.P.M. and Strijbis, K.** (2017). Transmembrane Mucins: Signaling Receptors at the Intersection of Inflammation and Cancer. *Journal of Innate Immunity* **9**: 281–299.
- Rahme, L.G., Stevens, E.J., Wolfort, S.F., Shao, J., Tompkins, R.G., and Ausubel, F.M.** (1995). Common virulence factors for bacterial pathogenicity in plants and animals. *Science (New York, N.Y.)* **268**: 1899–902.
- Ramarao, N. and Lereclus, D.** (2005). The InhA 1 metalloprotease allows spores of the *B. cereus* group to escape macrophages. *Cellular Microbiology* **7**: 1357–1364.
- Rasko, D.A., Altherr, M.R., Han, C.S., and Ravel, J.** (2005). Genomics of the *Bacillus cereus* group of organisms. *FEMS Microbiology Reviews* **29**: 303–329.
- Raymond, B. and Federici, B.A.** (2017). In defense of *Bacillus thuringiensis*, the safest and most successful microbial insecticide available to humanity - a response to EFSA. *FEMS microbiology ecology* **93**: 1–8.
- Raymond, B., Johnston, P.R., Nielsen-LeRoux, C., Lereclus, D., and Crickmore, N.** (2010). *Bacillus thuringiensis*: An impotent pathogen? *Trends in Microbiology* **18**: 189–194.

- Rehman, A., Sina, C., Gavrilova, O., Häslér, R., Ott, S., Baines, J.F., Schreiber, S., and Rosenstiel, P.** (2011). Nod2 is essential for temporal development of intestinal microbial communities. *Gut* **60**: 1354–1362.
- Ren, F., Wang, B., Yue, T., Yun, E.Y., Ip, Y.T., and Jiang, J.** (2010). Hippo signaling regulates *Drosophila* intestine stem cell proliferation through multiple pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**: 21064–21069.
- Rera, M., Clark, R.I., and Walker, D.W.** (2012). Intestinal barrier dysfunction links metabolic and inflammatory markers of aging to death in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**: 21528–21533.
- Resnik-Docampo, M., Sauer, V., Schinaman, J.M., Clark, R.I., Walker, D.W., and Jones, D.L.** (2018). Keeping it tight: The relationship between bacterial dysbiosis, septate junctions, and the intestinal barrier in *Drosophila*. *Fly* **12**: 34–40.
- Rolny, I.S., Minnaard, J., Racedo, S.M., and Pérez, P.F.** (2014). Murine model of *Bacillus cereus* gastrointestinal infection. *Journal of Medical Microbiology* **63**: 1741–1749.
- Rolny, I.S., Racedo, S.M., and Pérez, P.F.** (2017). Fate of *Bacillus cereus* within phagocytic cells. *International Microbiology* **20**: 170–177.
- Rosales, C. and Uribe-Querol, E.** (2017). Phagocytosis: A Fundamental Process in Immunity. *BioMed Research International* **2017**.
- Rosenquist, H., Smidt, L., Andersen, S.R., Jensen, G.B., and Wilcks, A.** (2005a). Occurrence and significance of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* in ready-to-eat food. *FEMS Microbiology Letters* **250**: 129–136.
- Rosenquist, H., Smidt, L., Andersen, S.R., Jensen, G.B., and Wilcks, A.** (2005b). Occurrence and significance of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* in ready-to-eat food. *FEMS Microbiology Letters* **250**: 129–136.
- Royet, J.** (2011). Epithelial homeostasis and the underlying molecular mechanisms in the gut of the insect model *Drosophila melanogaster*. *Cellular and Molecular Life Sciences* **68**: 3651–3660.
- Royet, J. and Charroux, B.** (2013). Mechanisms and consequence of bacteria detection by the *Drosophila* gut epithelium. *Gut Microbes* **4**: 259–263.
- Royet, J. and Dziarski, R.** (2007). Peptidoglycan recognition proteins: Pleiotropic sensors and effectors of antimicrobial defences. *Nature Reviews Microbiology* **5**: 264–277.
- Royet, J., Gupta, D., and Dziarski, R.** (2011). Peptidoglycan recognition proteins: Modulators of the microbiome and inflammation. *Nature Reviews Immunology* **11**: 837–851.
- Russell, A.D.** (2003). Lethal effects of heat on bacterial physiology and structure. *Science progress* **86**: 115–137.



- Rutschmann, S., Jung, A.C., Zhou, R., Silverman, N., Hoffmann, J.A., and Ferrandon, D.** (2000). Role of *Drosophila* IKK $\gamma$  in a Toll-independent antibacterial immune response. *Nature Immunology* **1**: 342–347.
- Ryu, J.H., Ha, E.M., Oh, C.T., Seol, J.H., Brey, P.T., Jin, I., Lee, D.G., Kim, J., Lee, D., and Lee, W.J.** (2006). An essential complementary role of NF- $\kappa$ B pathway to microbicidal oxidants in *Drosophila* gut immunity. *EMBO Journal* **25**: 3693–3701.
- Ryu, J.H., Kim, S.H., Lee, H.Y., Jin, Y.B., Nam, Y. do, Bae, J.W., Dong, G.L., Seung, C.S., Ha, E.M., and Lee, W.J.** (2008). Innate immune homeostasis by the homeobox gene *Caudal* and commensal-gut mutualism in *Drosophila*. *Science* **319**: 777–782.
- Sacchi, C.T., Whitney, A.M., Mayer, L.W., Morey, R., Steigerwalt, A., Boras, A., Weyant, R.S., and Popovic, T.** (2002). Sequencing of 16S rRNA gene: A rapid tool for identification of *Bacillus anthracis*. *Emerging Infectious Diseases* **8**: 1117–1123.
- Sacristán, S. and García-Arenal, F.** (2008). The evolution of virulence and pathogenicity in plant pathogen populations. *Molecular plant pathology* **9**: 369–84.
- Saha, S., Jing, X., Park, S.Y., Wang, S., Li, X., Gupta, D., and Dziarski, R.** (2010). Peptidoglycan recognition proteins protect mice from experimental colitis by promoting normal gut flora and preventing induction of interferon- $\gamma$ . *Cell Host and Microbe* **8**: 147–162.
- Salazar-Jaramillo, L., Paspatis, A., van de Zande, L., Vermeulen, C.J., Schwander, T., and Wertheim, B.** (2014). Evolution of a cellular immune response in *Drosophila*: A phenotypic and genomic comparative analysis. *Genome Biology and Evolution* **6**: 273–289.
- Salzman, N.H. et al.** (2010). Enteric defensins are essential regulators of intestinal microbial ecology. *Nature Immunology* **11**: 76–83.
- Samapundo, S., Heyndrickx, M., Xhaferi, R., and Devlieghere, F.** (2011). Incidence, diversity and toxin gene characteristics of *Bacillus cereus* group strains isolated from food products marketed in Belgium. *International Journal of Food Microbiology* **150**: 34–41.
- Sampson, C.J., Amin, U., and Couso, J.P.** (2013). Activation of *Drosophila* hemocyte motility by the ecdysone hormone. *Biology Open* **2**: 1412–1420.
- Sancho, R., Nateri, A.S., de Vinuesa, A.G., Aguilera, C., Nye, E., Spencer-Dene, B., and Behrens, A.** (2009). JNK signalling modulates intestinal homeostasis and tumourigenesis in mice. *EMBO Journal* **28**: 1843–1854.
- Sangiorgi, E. and Capecchi, M.R.** (2008). *Bmi1* is expressed in vivo in intestinal stem cells. *Nature Genetics* **40**: 915–920.
- Sato, T., van Es, J.H., Snippert, H.J., Stange, D.E., Vries, R.G., van den Born, M., Barker, N., Shroyer, N.F., van de Wetering, M., and Clevers, H.** (2011). Paneth cells constitute the niche for *Lgr5* stem cells in intestinal crypts. *Nature* **469**: 415–418.

- Saulnier, D.M., Spinler, J.K., Gibson, G.R., and Versalovic, J.** (2009). Mechanisms of probiosis and prebiosis: considerations for enhanced functional foods. *Current Opinion in Biotechnology* **20**: 135–141.
- Schoeni, J.L. and Lee Wong, A.C.** (2005). *Bacillus cereus* food poisoning and its toxins. *Journal of Food Protection* **68**: 636–648.
- Scoville, D.H., Sato, T., He, X.C., and Li, L.** (2008). Current View: Intestinal Stem Cells and Signaling. *Gastroenterology* **134**: 849–864.
- Sekirov, I., Russell, S.L., Caetano M Antunes, L., and Finlay, B.B.** (2010). Gut microbiota in health and disease. *Physiological Reviews* **90**: 859–904.
- Selsted, M.E. and Ouellette, A.J.** (2005). Mammalian defensins in the antimicrobial immune response. *Nature Immunology* **6**: 551–557.
- Senesi, S. and Ghelardi, E.** (2010). Production, Secretion and Biological Activity of *Bacillus cereus* Enterotoxins. *Toxins* **2**: 1690–1703.
- Setlow, P.** (2006). Spores of *Bacillus subtilis*: Their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals. *Journal of Applied Microbiology* **101**: 514–525.
- Shaw, R.L., Kohlmaier, A., Polesello, C., Veelken, C., Edgar, B.A., and Tapon, N.** (2010). The Hippo pathway regulates intestinal stem cell proliferation during *Drosophila* adult midgut regeneration. *Development* **137**: 4147–4158.
- Shekels, L.L., Anway, R.E., Lin, J., Kennedy, M.W., Garside, P., Lawrence, C.E., and Ho, S.B.** (2001). Coordinated Muc2 and Muc3 mucin gene expression in *Trichinella spiralis* infection in wild-type and cytokine-deficient mice. *Digestive Diseases and Sciences* **46**: 1757–1764.
- Shi, J., Gao, W., and Shao, F.** (2017). Pyroptosis: Gasdermin-Mediated Programmed Necrotic Cell Death. *Trends in Biochemical Sciences* **42**: 245–254.
- Shia, A.K.H., Glittenberg, M., Thompson, G., Weber, A.N., Reichhart, J.M., and Ligoxygakis, P.** (2009). Toll-dependent antimicrobial responses in *Drosophila* larval fat body require Spätzle secreted by haemocytes. *Journal of Cell Science* **122**: 4505–4515.
- Shimizu, Y., Nakamura, K., Yoshii, A., Yokoi, Y., Kikuchi, M., Shinozaki, R., Nakamura, S., Ohira, S., Sugimoto, R., and Ayabe, T.** (2020). Paneth cell  $\alpha$ -defensin misfolding correlates with dysbiosis and ileitis in Crohn's disease model mice. *Life Science Alliance* **3**: 1–15.
- Siegel, J.P.** (2012). Testing the pathogenicity and infectivity of entomopathogens to mammals. *Manual of Techniques in Invertebrate Pathology*: 441–450.
- Siegel, J.P.** (2001). The mammalian safety of *Bacillus thuringiensis*-based insecticides. *Journal of Invertebrate Pathology* **77**: 13–21.

- Smith, D., Wang, T., Sulé-Suso, J., Španěl, P., and el Haj, A.** (2003). Quantification of acetaldehyde released by lung cancer cells in vitro using selected ion flow tube mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **17**: 845–850.
- Soberón, M., Gill, S.S., and Bravo, A.** (2009). Signaling versus punching hole: How do *Bacillus thuringiensis* toxins kill insect midgut cells? *Cellular and Molecular Life Sciences* **66**: 1337–1349.
- Sommer, F., Ståhlman, M., Ilkayeva, O., Arnemo, J.M., Kindberg, J., Josefsson, J., Newgard, C.B., Fröbert, O., and Bäckhed, F.** (2016). The Gut Microbiota Modulates Energy Metabolism in the Hibernating Brown Bear *Ursus arctos*. *Cell Reports* **14**: 1655–1661.
- St Johnston, D. and Ahringer, J.** (2010). Cell polarity in eggs and epithelia: Parallels and diversity. *Cell* **141**: 757–774.
- Staley, B.K. and Irvine, K.D.** (2010). Warts and yorkie mediate intestinal regeneration by influencing stem cell proliferation. *Current Biology* **20**: 1580–1587.
- Strand, M., & Michelli, C. A.** (2011). Quiescent gastric stem cells maintain the adult *Drosophila* stomach. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(43), 17696–17701. <https://doi.org/10.1073/pnas.1109794108>
- Staubach, F., Baines, J.F., Künzel, S., Bik, E.M., and Petrov, D.A.** (2013). Host Species and Environmental Effects on Bacterial Communities Associated with *Drosophila* in the Laboratory and in the Natural Environment. *PLoS ONE* **8**.
- Stenfors Arnesen, L.P., Fagerlund, A., and Granum, P.E.** (2008). From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiology Reviews* **32**: 579–606.
- Stenfors, L.P., Mayr, R., Scherer, S., and Granum, P.E.** (2002). Pathogenic potential of fifty *Bacillus weihenstephanensis* strains. *FEMS Microbiology Letters* **215**: 47–51.
- Storelli, G., Strigini, M., Grenier, T., Bozonnet, L., Schwarzer, M., Daniel, C., Matos, R., and Leulier, F.** (2018). *Drosophila* Perpetuates Nutritional Mutualism by Promoting the Fitness of Its Intestinal Symbiont *Lactobacillus plantarum*. *Cell Metabolism* **27**: 362-377.e8.
- Stöven, S., Ando, I., Kadalayil, L., Engström, Y., and Hultmark, D.** (2000). Activation of the *Drosophila* NF- $\kappa$ B factor Relish by rapid endoproteolytic cleavage. *EMBO Reports* **1**: 347–352.
- Su, L., Nalle, S.C., Shen, L., Turner, E.S., Singh, G., Breskin, L.A., Khramtsova, E.A., Khramtsova, G., Tsai, P.Y., Fu, Y.X., Abraham, C., and Turner, J.R.** (2013). TNFR2 activates mlck-dependent tight junction dysregulation to cause apoptosis-mediated barrier loss and experimental colitis. *Gastroenterology* **145**: 407–415.
- Sumimoto, H.** (2008). Structure, regulation and evolution of Nox-family NADPH oxidases that produce reactive oxygen species. *FEBS Journal* **275**: 3249–3277.
- Sutterwala, F.S., Haasken, S., and Cassel, S.L.** (2014). Mechanism of NLRP3 inflammasome activation. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1319**: 82–95.

- Swick, M.C., Koehler, T.M., and Driks, A.** (2016). Surviving between hosts: Sporulation and transmission. *Virulence Mechanisms of Bacterial Pathogens* **4**: 567–591.
- Takashima, S., Mkrtychyan, M., Younossi-Hartenstein, A., Merriam, J.R., and Hartenstein, V.** (2008). The behaviour of *Drosophila* adult hindgut stem cells is controlled by Wnt and Hh signalling. *Nature* **454**: 651–655.
- Takeda, K. and Akira, S.** (2003). Toll receptors and pathogen resistance. *Cellular Microbiology* **5**: 143–153.
- Takehana, A., Yano, T., Mita, S., Kotani, A., Oshima, Y., and Kurata, S.** (2004). Peptidoglycan recognition protein (PGRP)-LE and PGRP-LC act synergistically in *Drosophila* immunity. *EMBO Journal* **23**: 4690–4700.
- Takeuchi, O. and Akira, S.** (2010). Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell* **140**: 805–820.
- Tam, N.K.M., Uyen, N.Q., Hong, H.A., Duc, L.H., Hoa, T.T., Serra, C.R., Henriques, A.O., and Cutting, S.M.** (2006). The intestinal life cycle of *Bacillus subtilis* and close relatives. *Journal of Bacteriology* **188**: 2692–2700.
- Tanji, T., Yun, E.Y., and Ip, Y.T.** (2010). Heterodimers of NF- $\kappa$ B transcription factors DIF and Relish regulate antimicrobial peptide genes in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**: 14715–14720.
- Tepass, U. and Hartenstein, V.** (1994). The development of cellular junctions in the *Drosophila* embryo. *Developmental Biology* **161**: 563–596.
- Teplova, V. v., Mikkola, R., Tonshin, A.A., Saris, N.E.L., and Salkinoja-Salonen, M.S.** (2006). The higher toxicity of cereulide relative to valinomycin is due to its higher affinity for potassium at physiological plasma concentration. *Toxicology and Applied Pharmacology* **210**: 39–46.
- Thorsen, T. and Holt, T.** (2009). The potential for power production from salinity gradients by pressure retarded osmosis. *Journal of Membrane Science* **335**: 103–110.
- Tingvall, T.Ö., Roos, E., and Engström, Y.** (2001). expression in *Drosophila* barrier epithelia. *EMBO Reports* **2**: 239–243.
- Toke, O.** (2005). Antimicrobial peptides: New candidates in the fight against bacterial infections. *Biopolymers - Peptide Science Section* **80**: 717–735.
- Tran, L. and Greenwood-Van Meerveld, B.** (2013). Age-associated remodeling of the intestinal epithelial barrier. *Journals of Gerontology - Series A Biological Sciences and Medical Sciences* **68**: 1045–1056.
- Tran, S.L. and Ramarao, N.** (2013). *Bacillus cereus* immune escape: A journey within macrophages. *FEMS Microbiology Letters* **347**: 1–6.

- Trede, N.S., Langenau, D.M., Traver, D., Look, A.T., and Zon, L.I.** (2004). The use of zebrafish to understand immunity. *Immunity* **20**: 367–379.
- Turner, J.R.** (2009). Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nature Reviews Immunology* **9**: 799–809.
- Turner, J.R., Buschmann, M.M., Romero-Calvo, I., Sailer, A., and Shen, L.** (2014). The role of molecular remodeling in differential regulation of tight junction permeability. *Seminars in Cell and Developmental Biology* **36**: 204–212.
- Turvey, S.E. and Broide, D.H.** (2010). Innate immunity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **125**: S24–S32.
- Tzou, P., de Gregorio, E., and Lemaitre, B.** (2002). How *Drosophila* combats microbial infection: A model to study innate immunity and host-pathogen interactions. *Current Opinion in Microbiology* **5**: 102–110.
- Tzou, P., Ohresser, S., Ferrandon, D., Capovilla, M., Reichhart, J.M., Lemaitre, B., Hoffmann, J.A., and Imler, J.L.** (2000). Tissue-specific inducible expression of antimicrobial peptide genes in *Drosophila* surface epithelia. *Immunity* **13**: 737–748.
- Ueno, N. and Wilson, M.E.** (2012). Receptor-mediated phagocytosis of *Leishmania*: Implications for intracellular survival. *Trends in Parasitology* **28**: 335–344.
- Underhill, D.M. and Goodridge, H.S.** (2012). Information processing during phagocytosis. *Nature Reviews Immunology* **12**: 492–502.
- Uribe-Quero, E. and Rosales, C.** (2017). Control of phagocytosis by microbial pathogens. *Frontiers in Immunology* **8**: 1–23.
- Vachon, V., Laprade, R., and Schwartz, J.L.** (2012). Current models of the mode of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins: A critical review. *Journal of Invertebrate Pathology* **111**: 1–12.
- Vaishnava, S., Behrendt, C.L., Ismail, A.S., Eckmann, L., and Hooper, L. v.** (2008). Paneth cells directly sense gut commensals and maintain homeostasis at the intestinal host-microbial interface. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**: 20858–20863.
- Valanne, S., Wang, J.-H., and Rämetsä, M.** (2011a). The *Drosophila* Toll Signaling Pathway . *The Journal of Immunology* **186**: 649–656.
- Valanne, S., Wang, J.-H., and Rämetsä, M.** (2011b). The *Drosophila* Toll Signaling Pathway . *The Journal of Immunology* **186**: 649–656.
- Vilain, S., Luo, Y., Hildreth, M.B., and Brözel, V.S.** (2006). Analysis of the life cycle of the soil Saprophyte *Bacillus cereus* in liquid soil extract and in soil. *Applied and Environmental Microbiology* **72**: 4970–4977.

- Vollmer, W.** (2008). Structural variation in the glycan strands of bacterial peptidoglycan. *FEMS Microbiology Reviews* **32**: 287–306.
- Wang, L., Weber, A.N.R., Atilano, M.L., Filipe, S.R., Gay, N.J., and Ligoxygakis, P.** (2006). Sensing of Gram-positive bacteria in *Drosophila*: GNBPI is needed to process and present peptidoglycan to PGRP-SA. *EMBO Journal* **25**: 5005–5014.
- Weichselbaum, L. and Klein, O.D.** (2018). The intestinal epithelial response to damage. *Science China Life Sciences* **61**: 1205–1211.
- Werner, T., Liu, G., Kang, D., Ekengren, S., Steiner, H., and Hultmark, D.** (2000). A family of peptidoglycan recognition proteins in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**: 13772–13777.
- Wheeler, R., Chevalier, G., Eberl, G., and Gomperts Boneca, I.** (2014). The biology of bacterial peptidoglycans and their impact on host immunity and physiology. *Cellular Microbiology* **16**: 1014–1023.
- Wilcks, A., Hansen, B.M., Hendriksen, N.B., and Licht, T.R.** (2006). Persistence of *Bacillus thuringiensis* bioinsecticides in the gut of human-flora-associated rats. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* **48**: 410–418.
- Wong, C.N.A., Ng, P., and Douglas, A.E.** (2011). Low-diversity bacterial community in the gut of the fruitfly *Drosophila melanogaster*. *Environmental Microbiology* **13**: 1889–1900.
- Wood, J., Scott, K.P., Avguštin, G., Newbold, C.J., and Flint, H.J.** (1998). Estimation of the relative abundance of different *Bacteroides* and *Prevotella* ribotypes in gut samples by restriction enzyme profiling of PCR-amplified 16S rRNA gene sequences. *Applied and Environmental Microbiology* **64**: 3683–3689.
- Wu, S., Zhang, X., He, Y., Shuai, J., Chen, X., and Ling, E.** (2010). Expression of antimicrobial peptide genes in *Bombyx mori* gut modulated by oral bacterial infection and development. *Developmental and Comparative Immunology* **34**: 1191–1198.
- Yanagihashi, Y., Usui, T., Izumi, Y., Yonemura, S., Sumida, M., Tsukita, S., Uemura, T., and Furuse, M.** (2012). Snakeskin, a membrane protein associated with smooth septate junctions, is required for intestinal barrier function in *Drosophila*. *Journal of Cell Science* **125**: 1980–1990.
- Yao, J. and Rock, C.O.** (2017). Bacterial fatty acid metabolism in modern antibiotic discovery. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids* **1862**: 1300–1309.
- Yoseph, B.P., Klingensmith, N.J., Liang, Z., Breed, E.R., Burd, E.M., Mittal, R., Dominguez, J.A., Petrie, B., Ford, M.L., and Coopersmith, C.M.** (2016). Mechanisms of Intestinal Barrier Dysfunction in Sepsis. *Shock* **46**: 52–59.
- Yuan, Y., Zheng, D., Hu, X., Cai, Q., and Yuan, Z.** (2010). Conjugative Transfer of Insecticidal Plasmid pHT73 from *Bacillus thuringiensis* to *B. anthracis* and Compatibility of This Plasmid with pXO1 and pXO2. *Applied and Environmental Microbiology* **76**: 468–473.

- Zaidman-Rémy, A., Regan, J.C., Brandão, A.S., and Jacinto, A.** (2012). The *Drosophila* larva as a tool to study gut-associated macrophages: PI3K regulates a discrete hemocyte population at the proventriculus. *Developmental and Comparative Immunology* **36**: 638–647.
- Zeissig, S., Bürgel, N., Günzel, D., Richter, J., Mankertz, J., Wahnschaffe, U., Kroesen, A.J., Zeitz, M., Fromm, M., and Schulzke, J.D.** (2007). Changes in expression and distribution of claudin 2, 5 and 8 lead to discontinuous tight junctions and barrier dysfunction in active Crohn's disease. *Gut* **56**: 61–72.
- Zeng, X., Han, L., Singh, S.R., Liu, H., Neumüller, R.A., Yan, D., Hu, Y., Liu, Y., Liu, W., Lin, X., and Hou, S.X.** (2015). Genome-wide RNAi Screen Identifies Networks Involved in Intestinal Stem Cell Regulation in *Drosophila*. *Cell Reports* **10**: 1226–1238.
- Zhai, Z., Huang, X., and Yin, Y.** (2018). Beyond immunity: The Imd pathway as a coordinator of host defense, organismal physiology and behavior. *Developmental and Comparative Immunology* **83**: 51–59.
- Zhou, Z., Song, X., Berezov, A., Zhang, G., Li, Y., Zhang, H., Murali, R., Li, B., and Greene, M.I.** (2008). Human glucocorticoid-induced TNF receptor ligand regulates its signaling activity through multiple oligomerization states. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**: 5465–5470.
- Zinsser, B.Y.H. and Dwyer, J.G.** PROTEOTOXINS ( ANAPHYLATOXINS ) AND VIRULENCE  
. \*: 582–594.
- Zwick, R.K., Ohlstein, B., and Klein, O.D.** (2019). The engineered gut: Use of stem cells and tissue engineering to study physiological mechanisms and disease processes: Intestinal renewal across the animal kingdom: Comparing stem cell activity in mouse and *drosophila*. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* **316**: G313–G322.

## **Annexes**





## Hypochlorous Acid Staining with R19-S in the *Drosophila* Intestine upon Ingestion of Opportunistic Bacteria

Salma Hachfi<sup>1,2</sup>, Olivia Benguettat<sup>1,2</sup> and Armel Gallet<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>Université Côte d'Azur, CNRS, INRA, ISA, France; <sup>2</sup>Institut Sophia Agrobiotech, UMR CNRS 7254/INRA 1355/UNS, 400 route des Chappes, BP 167, 06903 Sophia Antipolis Cedex, France

\*For correspondence: [gallet@unice.fr](mailto:gallet@unice.fr)

**[Abstract]** The intestine is endowed with an innate immune system that is required to fight any exogenous bacteria that are swallowed along with the food. The first line of defense that is mounted by the gut epithelium is the release of immune Reactive Oxygen Species (ROS), such as hypochlorous acid (HOCl), into the lumen. HOCl is produced within 1.5 h of bacterial ingestion and is very labile once released. Therefore, to monitor HOCl production upon ingestion of allochthonous bacteria, one needs a detection system that can quickly and efficiently detect HOCl production in the intestine. While most of the ROS-sensitive probes available in the market detect all kinds of ROS without any distinction, the R19-S fluorescent probe has been developed to specifically detect HOCl. Here, we describe a protocol to monitor HOCl production using this probe in the gut lumen of adult *Drosophila* upon ingestion of the opportunistic bacteria *Bacillus thuringiensis*.

**Keywords:** Intestine, Innate immune system, Reactive Oxygen Species, HOCl, Opportunistic bacteria, *Drosophila melanogaster*

**[Background]** The evolutionarily conserved innate immune system is the first line of defense against pathogenic bacteria. In the gut, the local innate immune system first produces Reactive Oxygen Species (ROS) to damage bacterial wall and slow down the proliferation of ingested bacteria (Kim and Lee, 2014). Then, the visceral mesoderm triggers spasmodic contractions to favor bacterial eviction (Benguettat *et al.*, 2018). The third line of defense is the production of antimicrobial peptides that kill the bacteria (Xia *et al.*, 2017). Finally, the gut is able to regenerate damaged epithelial cells to maintain gut integrity, avoiding bacterial entry into the internal milieu (Bonfini *et al.*, 2016). In *Drosophila*, the immune ROS are produced by the enterocytes of the anterior midgut in a DUOX-dependent manner between 0.5 and 1.5 h after bacterial ingestion. The main immune ROS to be released in the gut lumen is hypochlorous acid (HOCl) (Lee *et al.*, 2013; Benguettat *et al.*, 2018). Therefore, HOCl monitoring is a good proxy for the gut innate immune response to a microbe. However, HOCl is a very labile compound that quickly disappears once it is released into the lumen. Here, we describe a protocol that we designed to efficiently detect HOCl production in the gut lumen of adult *Drosophila* upon ingestion of low doses of the Gram-positive *Bacillus thuringiensis kurstaki* (*Btk*) opportunistic bacteria. This protocol can equally be used to detect HOCl upon ingestion of any other pathogens and it also can be used to measure HOCl production in the gut of *Drosophila* larvae.

## **Materials and Reagents**

### A. *Drosophila* rearing

1. 6 oz *Drosophila* stock bottles (Genesee Scientific, catalog number: 32-130)
2. Cotton balls for stock bottles (Genesee Scientific, catalog number: 51-102B)
3. CantonS flies (Bloomington *Drosophila* Stock Center, catalog number: 64349) ([flystocks.bio.indiana.edu](http://flystocks.bio.indiana.edu))
4. Agar (VWR, BDH®, catalog number: 20768-361)
5. Sugar (Carrefour or any other supermarket)
6. Cornflour (AB, Celnat-NaturDis)
7. Yeast (Biospringer, catalog number: BA10/0-PW)
8. Tegosept (Apex, Fly Food preservative, Genesee Scientific, catalog number: 20-258)
9. Standard nutrient medium for *Drosophila* (see Recipes)

### B. Bacterial culture

1. Petri dishes (Thermo Scientific-Nunc™, catalog number: 263991)
2. Sterile tips (Sigma Aldrich, catalog number: CLS4138)
3. 15 ml tubes (Corning, Falcon®, catalog number: 352096)
4. Graduated cylinder (Azlon, catalog number: 11940985)
5. *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (*Btk*) strain identified under the code 4D22 at the Bacillus Genetic Stock Center (<http://www.bgsc.org/>) and described by Gonzalez *et al.*, 1982
6. Luria broth powder (Conda, catalog number: 1551)
7. Agar bacteriological (Euromedex, catalog number: 1330)
8. LB medium (see Recipes)
9. LB-agar medium (see Recipes)

### C. Inoculation

1. Cotton balls for 25 mm narrow vials (Genesee Scientific, catalog number: 51-101)
2. Spectrophotometry cuvettes (Ratiolab, catalog number: 2712120)
3. 2 ml microtubes (Paul Boettger, catalog number: 02-043)
4. 20 mm filter disks (3 MM Chr chromatography paper; GE Healthcare, catalog number: 3030-917)
5. 50 ml tubes (Fisher Scientific, catalog number: 10788561)
6. 25 mm narrow *Drosophila* vials (Genesee Scientific, catalog number: 32-109RL)
7. Sucrose (Euromedex, catalog number: 200-301-B)
8. 5% sucrose (see Recipes)
9. 1 mM R19-S (Futurechem, FC-8001, Seoul, South Korea) (see Recipes)

#### D. Dissection

1. 10x PBS (Euromedex, catalog number: ET330)
2. 1x phosphate-buffered saline (PBS) (see Recipes)

#### E. Assay

1. 1.5 ml microtubes (Paul Bottger, catalog number: 02-063)
2. 12-well black microplates (VWR international, catalog number: 734-2324)
3. Aluminum foil (available at any supermarket)
4. Formaldehyde 16% (Thermo Scientific, catalog number: 28908)
5. Vectashield/DAPI (Sigma, catalog number: F6057)
6. 4% Formaldehyde (see Recipes)

### **Equipment**

#### A. *Drosophila* rearing

Refrigerated oven at a constant temperature of 25 °C and with a 12 h/12 h light/dark cycle (Fisher Scientific, catalog number: 11857552). Humidity must be maintained between 40% and 70%.

#### B. Bacterial culture

1. 500 ml sterile flask
2. 30 °C shaking incubator (Infors, model: AK 82)

#### C. Inoculation

1. Spectrophotometer (Aqualabo, Secomam, model: Prim Light & Advanced)
2. CO<sub>2</sub>-anesthesia system (INJECT+MATIC sleeper)

#### D. Dissection

1. Dumont forceps #5 (Fine Science Tools, catalog numbers: 11251-20 and 11252-20)
2. Watch glass (Steriplan Petri dishes, DWK Life Sciences, catalog number: 237554008)
3. Stereomicroscope (Leica Microsystems, model: Leica M60)

#### E. Assay

Florescent microscope (Zeiss Axio Imager Z1 Apotome) equipped with a camera (AxioCam MRm) and a Rhodamine 43 fluorescent filter

### **Software**

1. ZEN 2012 (Zeiss)
2. ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>)

3. Kypplot (<http://kyenslab.com/en/index.html>)
4. Excel (Microsoft)

## Procedure

### A. *Drosophila* rearing

1. Canton S flies (Bloomington) are reared on standard medium for *Drosophila melanogaster* (see Recipes) at 25 °C.
2. To obtain synchronized mated females, remove adult flies from rearing bottles and wait for the emergence of new flies for one day. Then, transfer the newly emerged flies (males and females) to new bottles for five more days at 25 °C before inoculation. In our experiments, five to six-day-old mated females were used.

*Note: If you want to work only on virgin females, once new flies have hatched, remove the males immediately and place the virgin females in a separated vial until they reach the correct age.*

### B. Bacterial culture

In the experiments presented below, flies were inoculated with the *Btk* bacterial strain (see Materials and Reagents). A solution of 5% sucrose serves as the negative control (Ctrl).

1. Spread bacteria from the stock onto LB agar Petri dishes and grow overnight at 30 °C.
2. Pick a single colony using a sterile tip and inoculate 250 ml of LB in a 500 ml sterile flask, and incubate overnight at 30 °C with shaking at 180 rpm.

*Note: The growth of *Btk* is very efficient. There is no need for a starter culture.*

### C. Inoculation

1. On the day of infection, separate 5 to 6-day-old females from males and put into a vial without medium for a 2 h starvation period at 25 °C. This ensures the synchronization of food intake when they are introduced to Medium with bacteria.
2. During this time, measure the optic density (OD) of the overnight bacterial culture. If necessary, dilute the overnight culture to get an OD between 0.2 and 0.8.
3. Preparation of the bacterial solution: the required OD to inoculate flies with 10<sup>8</sup> Colony Forming Unit (CFU) of *Btk* per *Drosophila* is presented in Table 1.

**Table 1. Bacterial solution**

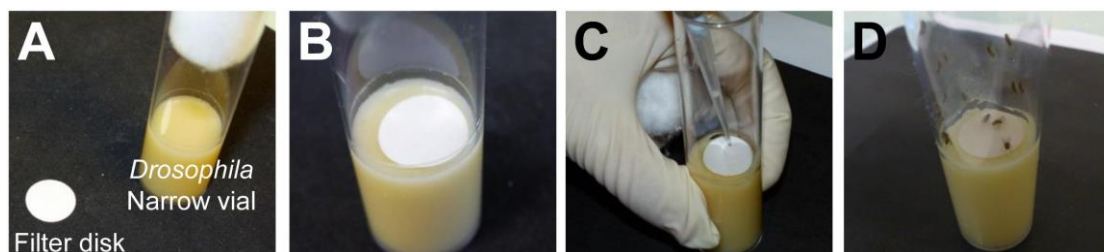
Bacterium	Volume to place on the media	Required OD	CFU/vial (for 10 flies/vial)	CFU/fly
<i>Btk</i>	25 µl	400	1 x 10 <sup>9</sup>	1 x 10 <sup>8</sup>

*Notes:*

- a. The OD of the overnight culture will be obviously too low and you must concentrate it. Pellet the bacterial culture by spinning at 2,500 x g for 15 min at room temperature. Resuspend the pellet with the required volume of 5% sucrose to get the correct CFU according to the formula  $fOD \times fV = iOD \times iV$  ( $fOD$  = final OD;  $iOD$  = initial OD,  $fV$  = final Volume;  $iV$  = initial Volume). For example, to obtain an OD 400 ( $fOD$ ) of *Btk* bacteria from an overnight culture at OD 2 ( $iOD$ ), spin 25 ml of the bacterial culture ( $iV$ ) and resuspend the pellet in a volume of 5% sucrose that is 200x less than the initial volume of LB, and thus  $fV = 125 \mu\text{l}$ .
  - b. One can inoculate flies with any other bacteria. However, depending on the type of bacteria, the OD that is required to yield the desired CFU will be probably different.
4. Dilute the 1 mM stock solution of R19-S (see Recipes) to 100  $\mu\text{M}$  in sucrose 5%. Keep the dilution in the dark.
  5. Dilute the bacterial solution (Table 1) at a 1:1 ratio with the 100  $\mu\text{M}$  R19-S probe solution. This mixture will constitute the inoculation solution.
    - a. The **negative control batch** is prepared by combining 25  $\mu\text{l}$  of the 100  $\mu\text{M}$  R19-S solution and 25  $\mu\text{l}$  of 5% sucrose.
    - b. The ***Btk* batch** is prepared by combining 25  $\mu\text{l}$  of 100  $\mu\text{M}$  R19-S and 25  $\mu\text{l}$  of the *Btk* solution (OD<sub>400</sub>). The concentration of bacteria used is  $1 \times 10^8$  CFU/5  $\text{cm}^2$ /fly.

*Note: Preparation of the R19-S mixture must be done under dark conditions.*
  6. Place a 20 mm filter disk on the top of the medium inside the *Drosophila* narrow vials (Figures 1A and 1B).
  7. Deposit the inoculation solution on the filter disk (Figure 1C).
  8. Transfer 10 starved flies into one *Drosophila* narrow vial and allow the *Drosophila* to feed for 30 min on the inoculation solution (Figure 1D).
 

*Note: For the 30 min time point, skip Step C9 below and dissect flies as described in Procedure D below.*
  9. Remove flies from vials and put them into fresh vials with filter disks only soaked with 25  $\mu\text{l}$  of 100  $\mu\text{M}$  R19-S solution + 25  $\mu\text{l}$  of 5% sucrose. Let the flies feed until the time of dissection (1 h and 1.5 h).



**Figure 1. Inoculation procedure.** A. Cut filter disks with a diameter of 20 mm. B. Place on the top of the medium within the vial. C. Deposit the inoculation solution on the filter disk. D. Introduce the flies.

#### D. Dissection (Video 1)

At the desired time points: 0.5 h, 1 h and 1.5 h start dissection.

1. Before starting, the forceps and dissecting watch glasses have to be rinsed with a 70% ethanol solution.
2. Ten females per condition are anesthetized with CO<sub>2</sub> using the *Drosophila*-Sleeper.
3. Place one fly in a watch glass pre-filled with 1 ml 1x PBS (see Recipes).
4. Using forceps, pull the head away. Hold the fly gently and make an incision in the abdomen at the thorax/abdomen boundary. Gently separate the abdomen from the thorax. You should see the intestine still attached to both the thorax and the abdomen.
5. Then, the intestine is carefully stretched.
6. Cut the gut at the boundaries between foregut and hindgut. Remove the Malpighian tubules and/or the ovaries if still attached to the midgut at the midgut/hindgut boundary.

*Note: If possible, dissection must be carried out in less than 30 s/intestine to avoid fading of the R19-S fluorescence.*



**Video 1. Dissection procedure**

#### E. Sample preparation and image capture

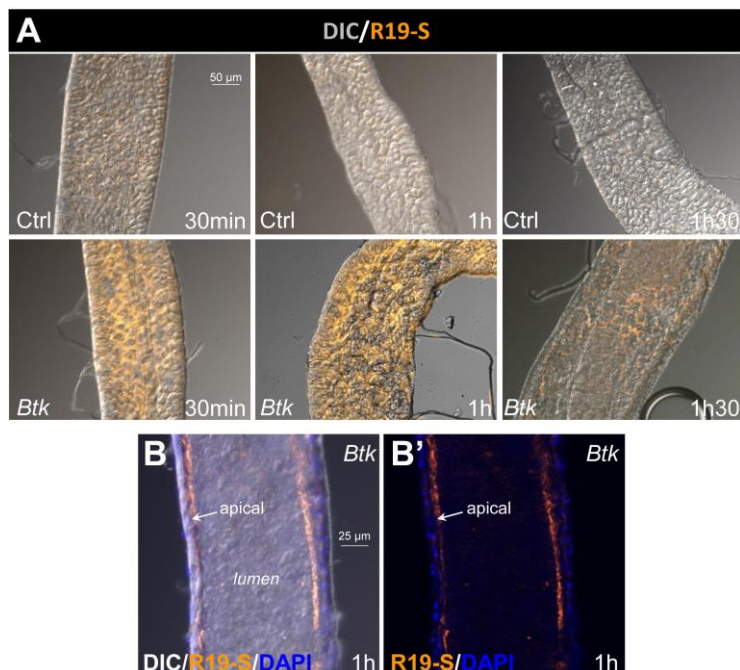
1. Fix *Drosophila* guts in 500 µl of 4% formaldehyde in PBS (see Recipes) in 12-well plates at room temperature without agitation for 50 min in darkness.

*Note: Cover the plate with aluminum foil to keep intestine samples in the dark.*

2. Rinse twice with PBS (2 x 5 min).
3. For each experiment, mount guts in Vectashield/DAPI and immediately observe the samples using a fluorescence microscope (Zeiss Axioplan Z1 with Apotome 2 microscope). R19-S fluorescence is visible within the "Rhodamine" emission range (excitation at 515 nm). A differential interference contrast (DIC) image is also taken to merge with the fluorescence image.



4. Take the pictures in the anterior part of midguts because HOCl is produced there. Below, in Figure 2, we present results for two conditions (H<sub>2</sub>O and *Btk*). For each condition, we performed 3 (at 30 min and 1 h) or 4 (at 1.5 h) independent experiments.



**Figure 2. Image capture.** A. Apotome image capture with the Rhodamine filter (orange) to visualize R19-S fluorescence and with the differential interference contrast (DIC) channel to outline intestine contours. Images were captured in the anterior part of the midgut. Ctrl: 5% sucrose negative control batch. *Btk*: *Btk* batch. B-B'. Cross section of anterior midgut at the level of the lumen. R19-S fluorescence (orange) is localized at the apical surface of the epithelium facing the lumen. Blue (DAPI) marks the epithelial nuclei. B incorporates the DIC image for orientation, whereas B' does not.

### Data analysis

1. For each condition, analyze at least 3 independent experiments that have been performed on different days.
2. At least 20 intestines per condition have to be analyzable when you combine the three independent experiments. If this is not the case, you must carry out a supplementary experiment to reach the threshold of 20 intestines.
3. The percentage of R19-S-positive intestines is calculated for each experiment independently. An intestine is considered positive for R19-S labeling when at least 10% of the anterior midgut displays a fluorescent labeling outlining the enterocyte membranes. Scattered cells are not taken into account.

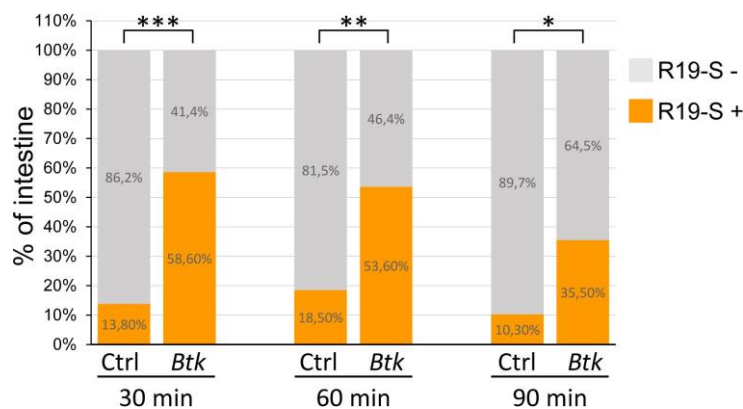


Note: For each experiment, the number of R19-S-positive intestines under control conditions (fed with 5% sucrose) must not exceed 25% of the intestines. This would indicate that the flies underwent an unexpected stress before or during the experiments. Therefore, if more than 25% of the intestines are R19-S positive in the control experiment, discard all the experiments (control and bacteria-infected batch).

4. Pool the 3 (or more) independent experiments for each condition and compare as presented in the Excel figure below (Figure 3).
5. Statistical analysis

If  $n < 30$  intestines, perform a non-parametric Kruskal and Wallis test using Kplot software.

If  $n \geq 30$  intestines, perform a parametric *t*-test using Excel or Kplot software.



**Figure 3. Percentage of R19-S positive midgut.** R19-S-positive midguts are represented in orange and R19-S-negative midgut in grey. Data were acquired 30, 60 and 90 min post-inoculation. Ctrl: Negative control batch. Btk: Btk batch. Since  $27 < n < 31$ , we used a non-parametric Kruskal and Wallis test.

## Recipes

1. Standard nutrient medium for *Drosophila melanogaster*  
Note: All the reagents are prepared with distilled water.  
8 g/L agar  
25 g/L sugar  
80 g/L cornflour  
20 g/L yeast  
6 g/L tegosept (stock solution at 100 g/L in 95% ethanol. Store at 4 °C)
2. LB medium
  - a. Weigh out 25 g of Luria broth medium powder
  - b. Adjust to 1 L with distilled water in a graduated cylinder
  - c. Adjust the pH to 7.2 if necessary
  - d. Autoclave

3. LB-agar medium
  - a. Weigh out 25 g of Luria broth medium powder
  - b. Adjust to 1 L with distilled water in a graduated cylinder
  - c. Adjust the pH to 7.2 if necessary
  - d. Add 15 g agar powder
  - e. Autoclave
4. 5% sucrose
  - a. Weigh out 2.5 g of sucrose in a 50 ml tube
  - b. Add 50 ml sterile distilled water and vortex

*Note: Make the solution just before use.*
5. 1x phosphate-buffered saline (PBS)
  - a. Add 100 ml of 10x PBS solution to 900 ml of distilled water in a graduated cylinder
  - b. Autoclave
6. 4% formaldehyde  
 Add 750  $\mu$ l of 1x PBS solution to 250  $\mu$ l of 16% formaldehyde
7. 1 mM R19-S
  - a. Prepare the stock solution at 1mM from the commercial powder in 100% acetonitrile
  - b. Store at 4 °C in the dark. Make aliquots if necessary

### **Acknowledgments**

SH has been supported by the French government, through the UCA<sup>JEDI</sup> Investments in the Future project managed by the National Research Agency (ANR; reference number ANR-15-IDEX-01). OB was supported by INRA and AG by the CNRS. The procedure presented here was adapted from that of Lee and colleagues from the Won-Jae Lee Lab.

### **Competing interests**

The authors have no conflicts of interest or competing interests.

### **References**

1. Benguettat, O., Jneid, R., Soltys, J., Loudhaief, R., Brun-Barale, A., Osman, D. and Gallet, A. (2018). [The DH31/CGRP enteroendocrine peptide triggers intestinal contractions favoring the elimination of opportunistic bacteria](#). *PLoS Pathog* 14(9): e1007279.
2. Bonfini, A., Liu, X. and Buchon, N. (2016). [From pathogens to microbiota: How \*Drosophila\* intestinal stem cells react to gut microbes](#). S0145-0305X(0116)30032-30035.

3. Gonzalez, J. M., Jr., Brown, B. J. and Carlton, B. C. (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.
4. Kim, S. H. and Lee, W. J. (2014). [Role of DUOX in gut inflammation: lessons from \*Drosophila\* model of gut-microbiota interactions](#). *Front Infect Microbiol* 3: 116.
5. Lee, K. A., Kim, S. H., Kim, E. K., Ha, E. M., You, H., Kim, B., Kim, M. J., Kwon, Y., Ryu, J. H. and Lee, W. J. (2013). [Bacterial-derived uracil as a modulator of mucosal immunity and gut-microbe homeostasis in \*Drosophila\*](#). *Cell* 153(4): 797-811.
6. Xia, X., Cheng, L., Zhang, S., Wang, L. and Hu, J. (2017). [The role of natural antimicrobial peptides during infection and chronic inflammation](#). *Antonie Van Leeuwenhoek* 30(10): 017-0929.