



HAL
open science

Assemblage des couches externes des spores de *Bacillus cereus*: acteurs et mécanismes

Armand Lablaine

► **To cite this version:**

Armand Lablaine. Assemblage des couches externes des spores de *Bacillus cereus*: acteurs et mécanismes. Sciences agricoles. Université d'Avignon, 2021. Français. NNT: 2021AVIG0728. tel-03928276

HAL Id: tel-03928276

<https://theses.hal.science/tel-03928276>

Submitted on 7 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 D'AVIGNON UNIVERSITÉ

École Doctorale N° 536
« Sciences et Agrosciences »

Mention de doctorat : Biologie

Laboratoire : INRAE UMR 408 « Sécurité et Qualité
des Produits d'Origine Végétale »

Présentée par
Armand LABLAINE

Assemblage des couches externes des
spores de *Bacillus cereus* :
Acteurs et mécanismes

Soutenue publiquement le **5 juillet 2021** devant le jury composé de :

Mme Rut CARBADILLO-LOPEZ, Directrice de Recherche INRAE, **Rapporteuse**
M. Patrick EICHENBERGER, Associate Professor, New York University, **Rapporteur**
Mme Cécile MORLOT, Chargée de Recherche-HDR, IBS, **Examinatrice**
M. Adriano O. HENRIQUES, Associate Professor, ITQB, **Examinateur**
Mme Catherine DUPORT, Professeur, Avignon Université, **Examinatrice**
M. Frédéric CARLIN, Directeur de Recherche INRAE, **Co-directeur de thèse**
Mme Véronique BROUSSOLLE, Directrice de Recherche INRAE, **Directrice de thèse**

Remerciements

Pour commencer je souhaite remercier l'ensemble des membres de mon jury et particulièrement mes deux rapporteurs, Rut Carballido-López et Patrick Eichenberger qui ont accepté de lire ce manuscrit juste avant l'été. Cécile Morlot et Adriano O. Henriques, merci à vous également de m'avoir accompagné tout au long de ma thèse. Depuis mon 1^{er} comité de thèse jusqu'à la soutenance finale, vos conseils m'ont été précieux et m'ont aidé à me forger en tant que scientifique. Grâce à vous tous, je garderai un souvenir impérissable de cette discussion, débutée peu après le repas et qui s'est étirée jusqu'à la fin de l'après midi de ce lundi 5 juillet 2021.

Véronique Broussolle et Frédéric Carlin, mes deux directeurs de thèse, vous m'avez choisi, guidé et surtout fait confiance. En votre compagnie j'ai pu pleinement m'épanouir dans mon sujet et je suis fier de ce manuscrit et de notre publication commune. A jamais nos noms sont inscrits, côte à côte, dans le marbre de la science. Véro, une mention toute particulière pour toi qui a toujours été présente pour moi, jusqu'à la veille de la soutenance, lorsque ma maison baignait dans le Rhône. Je te dois énormément, Merci.

Stéphanie Chamot, tous les deux, nous avons partagé beaucoup de travail et de très beaux résultats. C'est une fierté également d'avoir nos noms réunis dans notre publication. Je n'oublie pas non plus nos nombreux moments de labo. Merci pour tout. Merci aussi à Isabelle Bornard pour ses incroyables clichés au microscope électronique. Merci à Adriano O. Henriques de m'avoir accueilli dans son équipe, à Mariana Pinho et Pedro Matos pour m'avoir laissé utiliser le microscope SIM et pour leur aide. Merci également aux membres de l'équipe d'Adriano ; Monica Serrano, Amaury Fasquelle, Aristides Mendes et les autres. Avec eux j'ai passé de super moments pendant mes expatriations depuis ma paillasse avec vue sur l'océan. J'aimerais aussi remercier Jean Armengaud pour son expertise sur les analyses protéomiques et Christelle Bressuire-Isoard pour avoir initié énormément de travaux sur CotE et les spores de *B. cereus*. J'aimerais aussi remercier mes anciens chefs François Cornet et Philippe Rousseau et les membres de leur équipe. Le succès de cette thèse tient aussi à mon passage dans cette équipe incroyable.

Les personnes du quotidien sont aussi essentielles pour l'équilibre de vie durant une thèse, alors une pensée à tous les collègues de l'UMR408 et de mon équipe SporAlim que j'aimais rencontrer au hasard le long des couloirs du bâtiment. Une mention à Alice avec qui on a imaginé des projets fous. Un remerciement spécial à ceux que je croisais le jour et qui partageaient aussi mes soirées, les copains du bureau ; Marina, Fella, Cécile, Imed, les copains thésards ; Charlène, Alexandra, Carla, Miarka, les copains grimpeurs ; Thibault, Romarin, Alex, Manon, Nathan.

Enfin, la famille, pour leur soutien indéfectible, merci à eux. Jacques et Isabelle, mes parents, m'ont (entre autre) hébergé (supporté) et soutenu durant la rédaction de ce manuscrit, ce qui n'est pas une mince affaire. Un remerciement spécial à mon papa pour les corrections qu'il a apportées à ce manuscrit.

Mes neveux ; Cléa, qui est née par un clair matin de dimanche alors que j'étais au Portugal, en route sur les pavés pour démarrer mes premières manip et Jules, qui a beaucoup grandi pendant cette thèse et qui continue de supporter son tonton un peu fou, toujours en train de parler de bactéries multicolores. Une pensée aussi pour ma sœur Amélie, mon beau Benoît, mes grands parents ; Astrid et Joseph, ma tante Charlotte et, Yvon qui nous a quitté durant ma thèse, les Cadic, Quentin et Pauline les futurs parents, la belle famille qui m'a souvent accueilli pendant mes différentes phases de rédaction; Dame Chrystelle, Yves, Léo, Romane et puis, Lucie. Lucie le premier de mes soutiens. Quelle aventure que de faire deux thèses en même temps, l'un à Avignon, l'autre à Londres. Tout cela maintenant terminé, à nous la belle vie !

Sommaire

Table des matières

Abréviations.....	4
I-Introduction Bibliographique.....	5
Avant-propos.....	6
Chapitre 1 : Comment <i>B. subtilis</i> a pris la place de <i>B. cereus</i> dans les travaux des bactériologistes.....	9
1.1) L'essor des technologies au service de la Science.....	9
1.2) Un cycle pour les gouverner tous.....	11
1.3) Mutants et génétique; l'avènement d'un modèle.....	15
1.4) Cartographie du chromosome : de nouvelles avancées.....	16
1.5) La nomenclature et l'avènement de la génétique moderne.....	21
1.6) La microbiologie moléculaire: la consécration.....	23
Chapitre 2 : Le contrôle transcriptionnel de la sporulation.....	28
2.1) L'activation de SigF et SigE est couplée à la septation.....	28
2.1.2) Un subtil déséquilibre à l'origine de l'activation de SigF.....	29
2.1.3) La communication entre les compartiments et l'activation de SigE.....	31
2.2) Le mécanisme moléculaire de l'engulfment.....	32
2.2.1) Le complexe DMP : le moteur.....	34
2.2.2) Le complexe SpoIIQ*SpoIIIAA-AH et la fermeture éclair.....	35
2.2.3) La fission des membranes à la fin de l'engulfment.....	36
2.3) L'alternance des facteurs sigma à la fin de l'engulfment.....	39
2.3.1) L'activation de SigG est lié à la fin de l'engulfment.....	39
2.3.2) L'activation de SigK fait suite à l'activation de SigG.....	41
Chapitre 3 : Les différentes couches de la spore de <i>B. subtilis</i>.....	43
3.1) Les couches internes de la spore et les déterminants moléculaires de leur formation.....	43
3.2) Le manteau multi-couches de <i>B. subtilis</i>	44
Chapitre 4 : L'assemblage des coats de <i>B. subtilis</i>	47
4.1) La formation des coats repose sur une armature formée de protéines précoces.....	47
4.1.1) Des vagues de transcription génique contrôlent l'encapsulation de la préspore par les protéines des coats.....	47

4.1.2) SpoVM et SpoIVA, une dépendance mutuelle au cœur de la formation du plancher des coats.....	51
4.1.3) Les protéines associées au plancher des coats.....	52
4.2) L'encapsulation de la préspore par les protéines des coats.....	53
4.2.1) Rôle du complexe protéique SpoVM-IVA-VID.....	53
4.2.2) L'interaction de SpoVID avec SafA et CotE est au centre de l'encapsulation par les protéines des coats.....	54
4.2.3) Des inconnues dans la mise en place du plancher des coats.....	55
4.3) L'assemblage du crust.....	57
4.4) Les modifications post-traductionnelles des protéines de coats.....	58
4.4.1) Les pontages entre protéines des coats.....	58
4.4.2) Les protéines kinases et leurs rôles dans la formation des coats.....	62
4.4.3) Les glycosylations et la formation des coats.....	63
4.4.4) Une hypothèse pour expliquer le rôle de la glycosylation dans la formation du crust.....	66
4.5) Les connexions entre la mise en place de l'armature des coats et l'assemblage du cortex....	67
4.5.1) Le contrôle qualité de l'assemblage de SpoIVA et la synthèse du cortex.....	67
4.5.2) Les liens directs entre SpoVM et la machinerie de synthèse du cortex.....	68
Chapitre 5 : l'assemblage des couches protéiques externes des spores du groupe <i>B.</i>	
<i>cereus</i>.....	70
5.1) Structure et fonction des couches protéiques externes des spores du groupe <i>B. cereus</i>	70
5.1.1) Le coat, l'interspace et l'exosporium.....	70
5.1.2) Quelle fonction pour les couches protéiques externes des spores de <i>B. cereus</i> ?.....	73
5.2) Les déterminants protéiques de l'assemblage du coat dans le groupe <i>B. cereus</i>	75
5.2.1) Des homologues de protéines des coats de <i>B. subtilis</i> forment le feuillet basal de l'exosporium de <i>B. cereus</i>	79
5.2.2) Le duo CotY-ExsY au cœur de la formation du feuillet basal.....	80
5.2.3) CotE, CotO et YwdL sont associées au feuillet basal.....	81
5.3) Les protéines de l'exosporium spécifiques du groupe <i>B. cereus</i>	82
5.3.1) La bordure en brosse.....	82
5.3.2) Les enzymes associées à l'exosporium de <i>B. cereus</i>	85
5.3.3) Les protéines possiblement présentes dans le feuillet basal de l'exosporium.....	86
5.4) Le modèle d'assemblage de l'exosporium.....	86
Chapitre 6 : Questions ouvertes concernant l'assemblage des CPE des spores de <i>B. cereus</i>	
et objectif de la thèse.....	89
II-Résultats.....	91
1) La protéine morphogénétique CotE positionne les protéines CotY et ExsY pendant la sporulation de <i>Bacillus cereus</i>	91

2) Les évènements tardifs de l'assemblage des couches externes sont indépendants de la fin de l'engulfment dans les endospores de <i>Bacillus cereus</i>	93
3) Identification des protéines formant l'échafaudage morphogénétique des endospores de <i>B. cereus</i> par analyse protéomique.....	95
III-Discussion générale.....	97
Partie 1 : L'apport de l'approche SR-SIM pour l'étude du positionnement des protéines de la sporulation.....	97
1-1) Le SR-SIM permet de visualiser à la fois l'exosporium et le coat pendant leur formation.....	97
1-2) Les limites et avantages du SR-SIM pour l'analyse du positionnement des protéines de la sporulation.....	100
1-3) La structure de l'exosporium affecte l'émission de fluorescence.....	100
1.4) Le modèle cap/non-cap peut-il être lié à un biais d'émission des constructions fluorescentes ?	102
Partie 2 : Le « morphogenetic scaffold » de <i>B. cereus</i>.....	104
2-1) Assemblage bidirectionnel et maturation unidirectionnelle de l'exosporium.....	105
2-2) Modèle de l'asymétrie de maturation du MS	108
2-3) Quelle protéine du « Morphogenetic scaffold » serait la cible des maturations ?.....	111
2-4) Débarrasser le plancher (du coat).....	112
Partie 3 : un rôle particulier de SpoIIID dans l'assemblage des CPE des spores du groupe <i>B. cereus</i>.....	114
IV-References.....	116
RESUME	135
ABSTRACT.....	136

Abréviations

AA= Acide Aminé

ADN=Acide Désoxyribonucléique

ARN=Acide Ribonucléique

ARNP= ARN Polymérase

BEB= Bordure En Brosse

C-ter= Domaine C-terminal

CPE= Couche Protéique Externe (des spores)

DMP= Complexe multiprotéique formé par SpoIID, SpoIIM et SpoIIP

DPA= Acide Dipicolinique

FT= Feeding Tube

GCW= Germ Cell Wall

GFP= Green Fluorescent Protein

GPT= Glycine-Proline-Threonine

IC= Inner Coat

IFM= Inner Forespore Membrane (ancienne membrane de la présore)

IIQ*III^{IAA}-AH= Complexe multiprotéique formé par SpoIIQ, SpoIII^{IAA}-AH

IS= Interspace

Leg= Acide Legominamique

MC = Mother Cell

MCD= Mother Cell Distal (pole)

MCP= Mother Cell Proximal (pole)

MET= Microscopie Electronique à Transmission

MPT= Modification Post-Traductionnelle

MS= Morphogenetic Scaffold

MTG= Mitro Tracker Green

N-ter= Domaine N-terminal

OC= Outer Coat

OFM = Outer Forespore Membrane (ancienne membrane de la cellule-mère)

PBP= Penicillin Binding Protein

PC= Phase Contrast (microscopie)

PS= Polysaccharide

I-Introduction Bibliographique

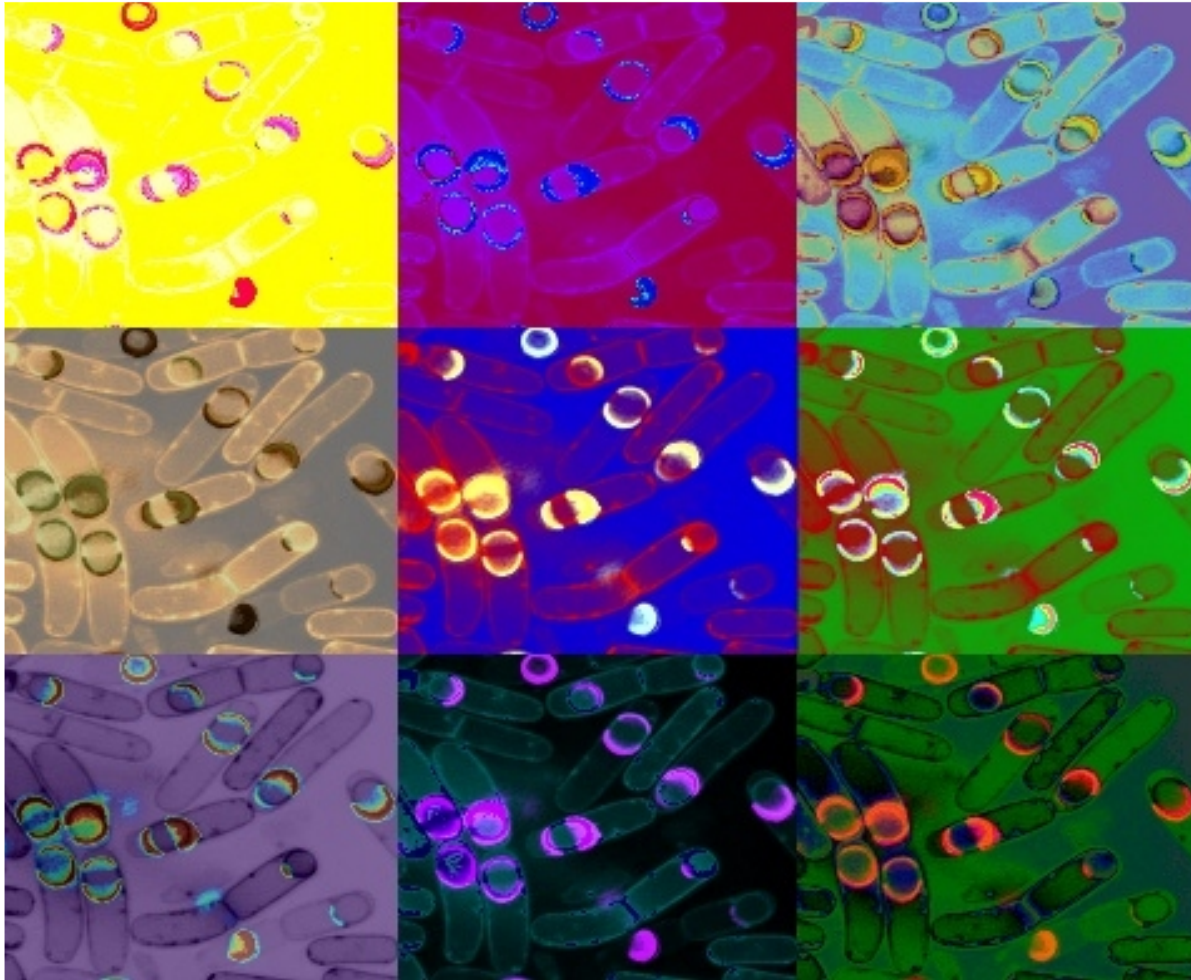


Image sélectionnée par le journal mSphere comme couverture de son recueil volume 6, numéro 2 d'Avril 2021 (<https://journals.asm.org/toc/msphere/6/2>). Les spores de *Bacillus cereus* sont entourées d'une couche externe, l'exosporium, formée de protéines glycosylées dont l'assemblage est guidé par des protéines dites morphogénétiques. L'image présentée montre des variations colorées de cellules sporulantes de *B. cereus* observées par Microscopie Super-Résolution Structure Illuminatuon (SR-SIM). Dans le panneau central, les signaux jaunes représentent la fluorescence de la protéine morphogénétique CotE fusionnée à une étiquette SNAP et montrent toutes les étapes du positionnement dynamique de la protéine à un pôle, puis deux pôles et enfin autour de la préspore. Ce résultat montre que la protéine morphogénétique CotE guide l'assemblage de CotY et ExsY dans un processus bidirectionnel et asymétrique. Voir l'article connexe : Lablaine et al., mSphere 6:e00007-21, 2021] Copyright © 2021 Lablaine et al. Ce contenu est distribué selon les termes de la licence Creative Commons Attribution 4.0 International.

Avant-propos.

Les bactéries sont certainement parmi les organismes vivants les mieux adaptés à notre planète qu'elles ont entièrement colonisée, jusque dans les environnements les plus extrêmes. Elles se sont même invitées sur la coque de la Station Spatiale Internationale en profitant d'un de nos voyages extra-terrestres (Alekhova *et al.*, 2015). Ces microbes sont également considérés comme les organismes originels à la base de tous les autres organismes, existants ou ayant existé (Battistuzzi *et al.*, 2004; Sleep and Bird, 2008). Ce sont des bâtisseurs de mondes. La faculté d'adaptation des bactéries réside dans leur apparente simplicité : une cellule dépourvue de noyau dans laquelle l'ADN flotte dans un cytoplasme dépourvu de toute organelle, un organisme primitif en contact direct avec son environnement qui constitue un support parfait pour la réalisation des mécanismes d'évolution darwinienne, clé de son succès. Ce support biologique quasi parfait, simple en apparence devient un océan de mystère pour qui veut tracer les chemins tortueux empruntés par l'évolution depuis la « soupe primordiale » de leur origine (Rinke *et al.*, 2013; Hug *et al.*, 2016). Son chromosome est une mosaïque, héritage de transferts de gènes horizontaux entre congénères (de la Cruz and Davies, 2000). L'histoire des bactéries est en perpétuelle évolution.

La microbiologie moléculaire est née des études pionnières réalisées au siècle dernier sur deux bactéries aujourd'hui considérées comme modèle ; *Escherichia coli* et *Bacillus subtilis* (Hirota *et al.*, 1968; Losick and Sonenshein, 1969). Grâce à ces organismes facilement cultivables en laboratoire et à l'utilisation de leurs parasites naturels (les bactériophages), il fut possible pour mieux comprendre leur fonctionnement de déconstruire certaines des machineries cellulaires essentielles. Parmi les découvertes fondamentales réalisées grâce à l'étude de ces deux bactéries, il y a l'ARN messager (Jacob and Monod, 1961), les facteurs sigma de la transcription (Burgess *et al.*, 1969; Travers and Burgess, 1969), la réplication de l'ADN (Meselson and Stahl, 1958) et le contrôle de la division cellulaire (Hirota *et al.*, 1968). Ces découvertes ont posé les jalons de notre science moderne. Aujourd'hui, les moyens techniques disponibles pour étudier les machineries cellulaires sont étonnants. En quelques décennies, nous sommes passés de l'étude indirecte des processus biologiques (dénombrement bactérien, immunoblot) à la visualisation directe des structures protéiques au sein des organismes (3D-SIM, cryo-FIB-ET) (Gustafsson, 2000, Khanna et al 2019). C'est grâce à ces nouveaux instruments que nous tentons de décrypter les machineries moléculaires d'autres bactéries qui restaient jusque-là difficiles à étudier. Désormais, elles nous

livrent peu à peu leur secret d'adaptation. C'est dans la compréhension des performances réalisées par les bactéries en terme d'adaptation que se trouvent les clés des technologies et de la science de demain.

La sporulation constitue l'un des mécanismes dont les bactéries ont le secret : une reprogrammation complète de l'expression génétique donnant naissance à une structure différenciée et très résistante, la spore. La spore pour le meilleur et pour le pire. Pour le meilleur, lorsqu'elle joue le rôle de véhicule capable de progresser dans des zones inaccessibles. Elle est aussi capable de résister aux sucs gastriques et d'installer une flore intestinale vitale dans des organismes multicellulaires (Browne *et al.*, 2016). Cette propriété de résistance est aussi envisagée comme un outil biotechnologique futuriste (Lin *et al.*, 2020). Grâce à des spores présentant des antigènes à leur surface, il est déjà possible d'immuniser des animaux contre les toxines les plus puissantes (Isticato *et al.*, 2001). Des spores capables de dépolluer des environnements souillés aux gaz moutarde ont également été développées (Wang *et al.*, 2019). La spore pour le pire quand elle met ses formidables propriétés d'adaptation au service d'agents pathogènes et en les rendant capable de résister aux traitements de décontamination, de se former au sein de biofilms, d'échapper aux macrophages, et de survivre aux antibiotiques quand ses congénères dépourvus de formes de résistance sont éliminés. C'est l'anthrax, le botulisme, les infections nosocomiales à *Clostridium difficile* ou les intoxications alimentaires ou systémiques causées par *Bacillus cereus* (Mallozzi *et al.*, 2010).

L'équipe SporAlim de INRAE dans laquelle j'ai réalisé mes travaux de thèse s'est d'abord intéressée aux spores de *Clostridium botulinum* présentes dans sol et les sédiments marins. La toxine produite par cette espèce est l'une des plus puissantes connues, provoque des paralysies sévères et est à l'origine de toxi-infections alimentaires (Peck *et al.*, 2011). Plus récemment, l'équipe SporAlim s'est concentrée sur un pathogène alimentaire plus fréquent, *Bacillus cereus*, dont les spores ont la capacité de résister aux traitements de décontamination de l'industrie agroalimentaire (Faille *et al.*, 2011). *Bacillus cereus sensu stricto*, *Bacillus anthracis*, l'agent étiologique de l'anthrax et *Bacillus thuringiensis* un pathogène d'insectes utilisé comme bio-insecticide forment, avec d'autres bacilles apparentés, le groupe *B. cereus sensu lato* (Guinebretière *et al.*, 2008). La singularité des spores formées par le groupe *B. cereus* réside dans l'exosporium qui les englobe. L'exosporium est une structure lâche, déconnectée en apparence des couches plus internes et qui confère aux spores des propriétés particulières. Ainsi, les bactéries enfermées dans un exosporium paraissent plus hydrophobes, et donc plus aptes à adhérer aux surfaces

biotiques ou abiotiques, tel l'acier inoxydable (Faille *et al.*, 2011; Lequette *et al.*, 2011b). L'exosporium est la structure en contact avec l'environnement de la spore. En accord avec cette position stratégique, sa fonction principale semble être liée au contrôle des molécules pouvant accéder aux structures plus internes de la spore. L'exosporium est également lié à la pathogénicité (Stewart, 2015). Une expérience a ainsi montré comment une enzyme associée à l'exosporium permet d'échapper aux macrophages (Ramarao and Lereclus, 2005) .

Malgré des fonctions cruciales dans le cycle de vie de la bactérie, une originalité d'aspect et de forts enjeux économiques et sanitaires qui sont liés aux bactéries possédant un exosporium, les bases moléculaires de son assemblage restent aujourd'hui incomplètes.

Chapitre 1 : Comment *B. subtilis* a pris la place de *B. cereus* dans les travaux des bactériologistes

1.1) L'essor des technologies au service de la Science

Au milieu des années 50, la Science connaît un essor sans précédent. La physique atomique en est l'étendard, forte de ses « succès » tel le plan Manhattan et du développement important qu'elle connut durant la Seconde Guerre mondiale. La biologie profite directement de cet apport de nouvelles connaissances des particules élémentaires avec l'émergence de la microscopie électronique. Grâce à l'utilisation d'un faisceau d'électrons concentré, le grossissement applicable aux objets biologiques passe de x2000, atteignable avec les microscopes optiques, à x5 000 000. C'est une véritable révolution!

S'engage alors une véritable course technologique. Les microscopes électroniques deviennent de plus en plus puissants. Ce développement se matérialise en 1958 à Toulouse, en un bâtiment futuriste (Dupouy *et al.*, 1960). Cet édifice abrite le premier microscope à très haute tension atteignant une « accélération » de 1 MeV. La démesure poussera à la fabrication à Toulouse également d'un microscope atteignant 3 MeV (Dupouy, 1973). Mais ce genre de microscope à très haute tension se relèvera toutefois peu utile pour la biologie en raison d'une perte importante de contraste lorsque les échantillons biologiques sont soumis à un rayonnement aussi puissant. De plus ils occasionnent de nombreux dommages sur les cellules vivantes. On lira par la suite;

« damage to living during irradiation in the electron microscope is so fatal that any process that is observed is more correctly described as 'dying' than 'living' » (Glauert, 1974).

Au sein des photothèques constituées lors de cette course technologique, on retrouve une image de spores de *Bacillus megaterium* réalisée à l'aide d'un microscope à une accélération de 800 kV (Fig. 1A et 1C) (Hama, 1973). Néanmoins, ces résultats s'avéreront peu exploitables du fait de la forte opacité aux électrons de ces objets. L'image d'une bactérie exposée au plus puissant faisceau retrouvée dans la littérature de la période 1945-1980 est un *Pseudomonas putida* isolé sur un patient de l'hôpital de Purpan et soumis à un faisceau accéléré à 3 MV dans les locaux du CNRS de Toulouse (Fig. 1B) (Dupouy, 1973). Ces images permettent de distinguer directement un motif géométrique périodique qui forme un feuillet enveloppant la bactérie.

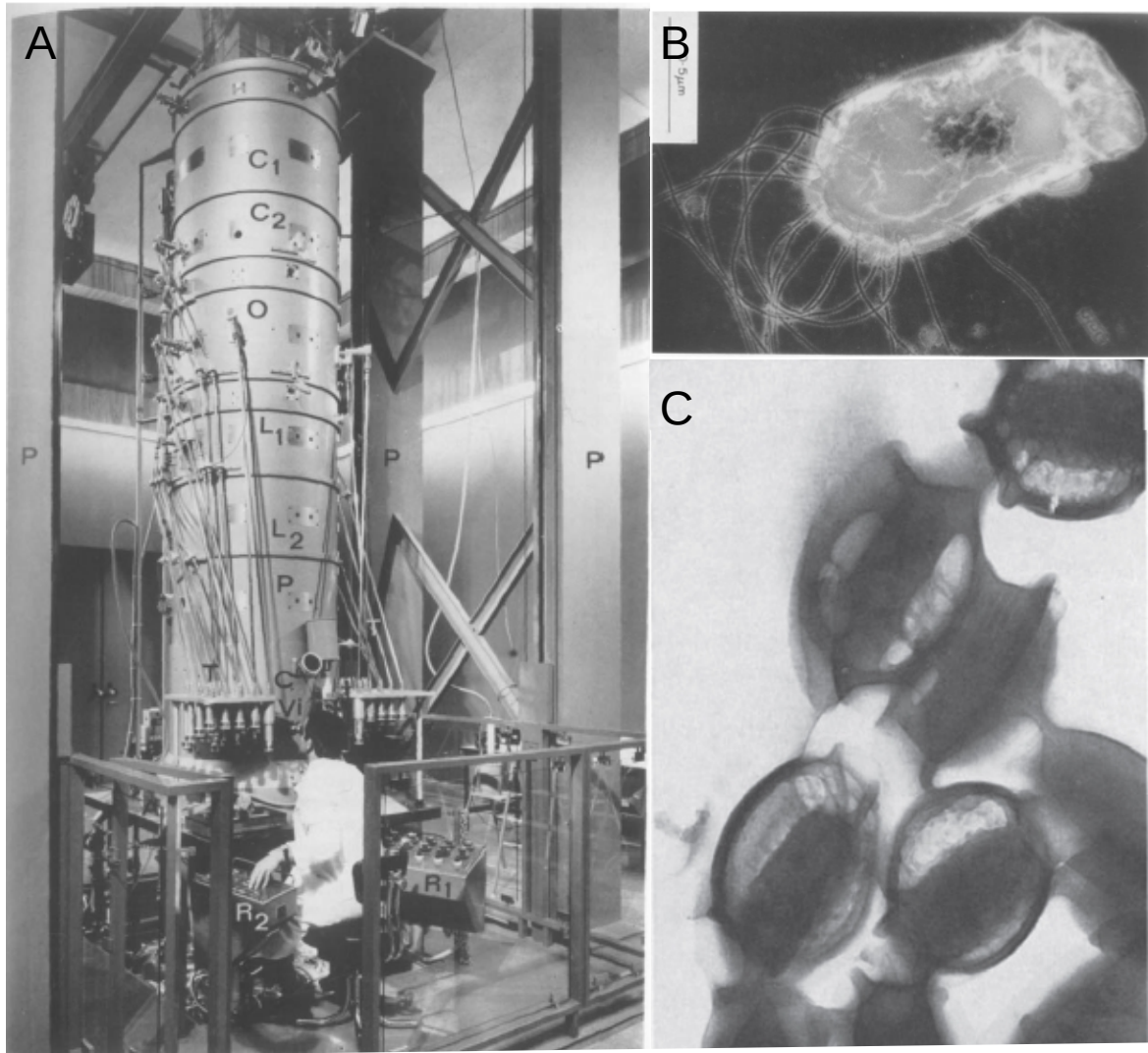


FIG 1. La démesure. (A) Le microscope électronique à très haut voltage de Toulouse ayant été le plus puissant du monde au moment de sa fabrication. (B) Image d'un *Pseudomonas putida* isolé d'un patient de l'hôpital de Purpan colorée légèrement à l'acide phototungstique exposée à un rayon d'électrons accéléré à 3MV en utilisant le microscope présenté en (A). (C) Observation de spores de *B. megaterium* non fixées et non colorées à une accélération de 800 KV par le microscope à très haut voltage de l'université d'Osaka. (D'après Dupouy, 1973 et Hama, 1970)

Les microscopistes préféreront toutefois se tourner vers l'observation de sections ultra fines nécessitant une accélération moindre, autour de 100 keV. Ce compromis nécessite des conditions matérielles bien inférieures comparées aux coûteux microscopes électroniques à très haut voltage. Cette approche permettra également de contourner le problème d'opacité des spores aux électrons.

De la seconde partie des années 50 à la fin des années 1980, les articles scientifiques proposant des coupes cytologiques de différentes bactéries sporulées appartenant au groupe des *Firmicutes* se multiplient. Ce phénomène peut trouver son explication dans la facilité de préparation des cultures bactériennes, par la synchronisation naturelle que permet la sporulation et par la richesse des structures observables dans les spores. La spore, constituant l'objet biologique le plus résistant connu, se prête particulièrement bien à ce genre d'observations destructives. Dans ce contexte d'après-guerre, de relance économique et de soif de connaissances, la biologie fondamentale va connaître ses heures de gloire.

1.2) Un cycle pour les gouverner tous

Dans le tumulte de la seconde moitié du 20^e siècle, les bactéries des genres *Bacillus* et *Clostridium* du groupe des *Firmicutes* sont particulièrement étudiées. Les cellules végétatives, en cours de sporulation, les spores et les spores en cours de germination sont passées sous le faisceau du microscope électronique (Walker, 1970). Parmi les bactéries les plus étudiées alors, *B. cereus* fait figure de proue et les bases du cycle de sporulation seront posées dans cet organisme (Young and Fitz-James, 1959a; Young and Fitz-James, 1959b; Young and Fitz-James, 1959c; Ohye and Murrell, 1973). Néanmoins, avec les balbutiements de la génétique naissante, Anne Ryter de l'Institut Pasteur choisi également d'étudier les événements du cycle de sporulation de *B. subtilis* : « pour les comparer avec ceux des autres bacilles et, d'autre part, pour les confronter dans l'avenir avec ceux des mutants de sporulation de cette souche [*B. subtilis* 168 Try- dite de Marburg] » (Ryter, 1965).

De ces observations en microscopie électronique à transmission (MET) il ressortira que, hormis l'absence évidente d'exosporium, la sporulation de *B. subtilis* est identique à celle décrite précédemment pour *B. cereus* (Young and Fitz-James, 1959a) ou *B. coagulans* (Ohye and Murrell, 1962). Ainsi, la première édition du schéma moderne de la sporulation de *B. subtilis* est historiquement issue des travaux d'Anne Ryter en 1965 sur *B. subtilis* 168 (Fig. 2).

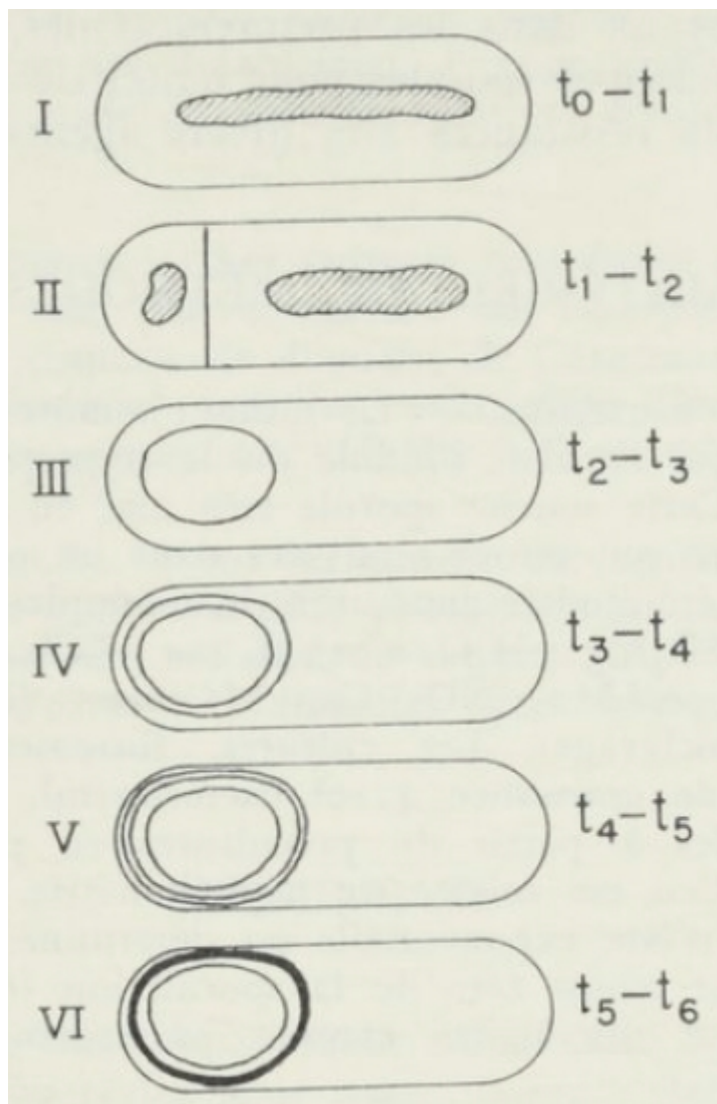


FIG 2. Le premier schéma de la sporulation de *B. subtilis*. En 1965, A. Ryter propose cette représentation schématique du cycle de sporulation de *B. subtilis* après ses travaux par TEM. Dans l'étape I un filament axial d'ADN se forme. En II, une partie du filament est compacté dans la chambre présporale matérialisée par le septum en position asymétrique. En III la cellule mère phagocyte la préspore jusqu'à former un protoplaste. En IV le cortex et en V le coat se développent. En VI la spore est maturée avant d'être libérée dans l'étape VII (non représentée). (d'après Ryter, 1965)

Il faut noter que ce cycle de la sporulation de *B. subtilis* constitue une version simplifiée de celui proposé par Young et Fitz-James à la suite de leurs travaux précurseurs sur *B. cereus* (Young and Fitz-James, 1959a). Ces travaux sont repris par Murrell dans une revue d'importance synthétisant l'état des connaissances de l'époque concernant la biochimie de la formation de la spore (Murrell, 1967).

Ce cycle est subdivisé en 6 étapes, la 7^e étant la libération d'une spore libre. La description de ce cycle est issue d'un ensemble de caractères directement observables par différentes techniques de microscopie qui se résument ainsi :

-Les premiers changements perceptibles indiquant l'entrée en sporulation apparaissent dans le cytoplasme de la cellule au travers d'un ensemble dénommé « corps chromatiniens » ou plus simplement chromatine. Ces « noyaux » vont se regrouper pour former un filament dans l'axe longitudinal de la cellule. La formation de ce filament axial constitue la première étape du cycle de sporulation. La formation du filament axial est directement observable en microscopie électronique. Elle peut être observée également au microscope photonique après coloration par la méthode de Feugen et par hydrolyse des cellules dans HCl laissant apparaître de petits corps fortement contrastés (Young and Fitz-James, 1959a; Walker, 1970).

-Une partie de ce filament axial est ensuite compacté à un pôle de la cellule dans une chambre qui se matérialise par la formation d'un septum issue de l'invagination de la membrane cytoplasmique. La cellule est alors scindée en deux compartiments inégaux. Le plus petit constitue la préspore et le plus volumineux forme la cellule-mère. Ce cloisonnement (ou septation) asymétrique de la cellule diffère de la septation symétrique observée dans le cycle cellulaire de division binaire constitue la 2^e étape du cycle de sporulation.

-Avec la formation du septum démarre un mécanisme dans lequel la cellule-mère va phagocytter la préspore qui, une fois le processus accompli, formera un protoplaste cerné de deux membranes au sein de la cellule-mère. Ce mécanisme largement connu sous le nom d' « engulfment » constitue la 3^e étape du cycle de sporulation. L'ensemble composé de la cellule-mère et de la préspore définit le sporange.

-La 4^e étape de développement de la spore est marquée par l'apparition du cortex, un feuillet de peptidoglycane (PG) modifié s'accumulant progressivement entre les deux membranes du protoplaste. D'une densité aux électrons proche de celle de la paroi cellulaire d'une cellule végétative, le cortex devient par la suite transparent aux électrons. Le développement du cortex

s'accompagne d'une apparente rigidification des membranes qui paraissaient jusqu'alors lâches (Walker, 1970).

-Dans la 5e étape, les tuniques protéiques (ou coats), très denses aux électrons, se déposent.

-L'étape 6 se caractérise par le développement des propriétés de résistance et la maturation de la préspore.

-L'étape 7 par la lyse de la cellule mère permettant de libérer la spore du sporange pour laisser apparaître une « spore libre ».

Ce plan en sept étapes de la sporulation permet de grouper les grands changements morphologiques observés au sein des Clostridies et *Bacillus* étudiées alors et sera d'une aide précieuse pour la caractérisation des mutants à venir. Néanmoins, les limites d'une telle représentation sont notées;

« *The seven stages in sporulation, as frequently described (Murrell, 1967), associate cortex formation with stage IV and coat formation with stage V and suggest that cortex and coat formation occur at different times. It is obvious that in this organism (*B. cereus*^T) cortex, coat, and exosporium formation occur together* » (Ohye and Murrell, 1973).

L'étude de l'assemblage de l'exosporium de *B. cereus* révèle une autre étrangeté. Ohye et Murrell (1973) font observer que:

« *the exosporium of this organism [*B. cereus*^T] always commenced at the end of the spore, away from the polar end of the mother cell* » (Ohye and Murrell, 1973).

De façon surprenante, ce premier fragment d'exosporium, dont il est question dans l'extrait ci-dessus, est détecté avant les premiers éléments du coat. Aussi la formation de l'exosporium, la structure la plus externe de la spore, est préalable à celle du coat, dont la localisation au sein de la spore est plus interne (Ohye and Murrell, 1973). Comment le passage des protéines formant les coats à travers l'exosporium est-il rendu possible? Aujourd'hui encore, 50 ans après ces premières observations, nous en ignorons le principe. Du fait des avancées majeures réalisées avec *B. subtilis*, devenue modèle de l'étude de la sporulation, *B. cereus* tombera dans l'oubli pour près d'un demi-siècle. Les bases moléculaires à l'origine des singularités de l'assemblage des feuillettes qui entourent les spores de *B. cereus* restent ainsi largement inexplicées.

1.3) Mutants et génétique; l'avènement d'un modèle

Parallèlement aux études de MET permettant de décrire l'organisation et le cycle de développement de la spore au sein des *Firmicutes*, démarrent dans les années 60 les premiers isollements de mutants entraînant des phénotypes non sporulés. L'étude de mutants constitue le passage obligé de toute étude génétique. Des mutants de sporulation furent obtenus dans diverses espèces incluant *B. cereus*, *C. hystolyticum* et bien sûr *B. subtilis* (Schaeffer and Ionesco, 1960; Levisohn and Aronson, 1967; H *et al.*, 1967; Jf *et al.*, 1968; Aronson *et al.*, 1971). Parmi ceux-ci certains mutants de *Clostridium* surprennent par leur morphologie ;
«*In addition, genetic blocks leading to monstrous forms, never observed in the sporulating wild type cultures, were also noted.* » (Schaeffer, 1967).

Mais c'est par un heureux hasard que l'étude de la sporulation s'est ainsi dirigée vers *B. subtilis* au détriment de *B. cereus* qui lui était alors préféré pour les études cytologiques. La souche *B. subtilis* 168, dite de Marburg, fut d'abord choisie pour sa capacité à être transformable par de l'ADN ; il est en effet possible d'y introduire un morceau d'ADN étranger (Spizizen, 1958). Son succès proviendra cependant de sa propriété à produire des spores pigmentées par la mélanine. Les auteurs concéderont à ce propos:

« *The choice of the Marburg strain turned out to be particularly felicitous, since the spores formed by this organism are pigmented with melanins. As a result, the sporulation mutants form colonies which remain white on the nutrient agar plates, whereas the wild type colonies turn brown; the isolation of the mutants was thus greatly facilitated* » (Schaeffer, 1967).

Aussi, il s'avère aisé de détecter des mutants ne parvenant pas à sporuler (ou mutants asporogènes, ou bien encore mutants sp- comme noté dans ces premiers travaux). Les mutants produisent des colonies blanches sur boîte de Petri alors que les types sauvages (WT) forment des colonies brunes (Schaeffer and Ionesco, 1960). Cette propriété est combinée à la possibilité de transformer génétiquement *B. subtilis* 168. Ainsi il est possible de déterminer simplement la diversité génétique des mutants isolés alors en transformant un mutant A avec l'ADN d'un autre mutant B: si la colonie du mutant A reste blanche, alors ces deux mutations affectent le même marqueur. Dans le cas inverse, si le mutant A transformé par l'ADN du mutant B produit des colonies pigmentées, alors ces deux mutations portent sur des marqueurs différents (Schaeffer

and Ionesco, 1960). Les premières caractérisations de mutations débutèrent. Les chercheurs de cette époque disposent pourtant de très peu d'informations concernant la régulation génétique ou l'organisation du chromosome. La structure en double hélice de l'ADN a été résolue moins de 10 ans auparavant par Watson et Crick (Watson and Crick, 1953). La première description de la régulation génique au sein d'un opéron venait d'être démontrée par leurs collègues Jacob et Monod de l'Institut Pasteur (Jacob and Monod, 1961). Un minutieux travail permettant d'obtenir la plus exhaustive des collections de mutants de la souche *B. subtilis* 168 s'engage afin de déterminer l'ensemble des marqueurs génétiques contrôlant la sporulation.

Grâce à l'établissement par MET du déroulement précis de la sporulation de la souche parentale 168 (Ryter, 1965), l'analyse des mutants par cette même technique permet d'identifier les stades auxquels la sporulation des mutants est interrompue. Ainsi sont amorcés les prémices de la caractérisation des gènes de la sporulation. Néanmoins, il s'avère que les premiers mutants reconnus par une déficience de pigmentation de leurs colonies étaient interrompus aux étapes initiales de la sporulation (stage 0) (Michel and Cami *et al.*, 1968). En comparaison, chez *C. histolyticum* les mutants n'étaient pas identifiés par déficience de la pigmentation et sont bloqués à des stades plus tardifs (Bayen *et al.*, 1967). Il s'ensuivit alors un travail d'obtention de mutants de *B. subtilis* stoppés à des étapes plus tardives de sporulation obtenus par d'autres méthodes, sans distinction de la pigmentation (traitement des colonies au chloroforme par exemple, la méthode est décrite par (Millet and Ryter, 1972). Un grand nombre de mutants seront ainsi générés par l'application de différents traitements mutagènes (UV, NiTrosoGuanidine) (Schaeffer, 1967; Balassa, 1969). Le nombre de marqueurs génétiques de la sporulation de *B. subtilis* serait porté à 800. L'ensemble de ces marqueurs formerait un véritable « sporulon » (Balassa, 1969). Néanmoins, ce nombre sera revu à la baisse à la suite des croisements réalisés permettant d'identifier des mutants portant sur de mêmes marqueurs. Ces travaux mettent en évidence que le blocage d'un marqueur nécessaire à la réalisation complète d'une étape de sporulation précoce stoppe irrémédiablement tout le processus de sporulation. Ainsi naît l'idée d'un mécanisme de sporulation pléiotropique dans lequel intervient une suite (souvent qualifiée de « cascade ») de régulation génique (Balassa, 1969).

1.4) Cartographie du chromosome : de nouvelles avancées

À l'heure où les Américains sont encore engagés dans la guerre du Vietnam, les

techniques de modifications du génome et de clonage moléculaire relèvent du fantasme. Pourtant, débute un lent travail de localisation des différentes mutations sur un chromosome dont on ignorait presque tout. Ce travail nécessita une rigueur qui paraît extraordinaire aujourd'hui et qu'on aurait peine à croire possible si l'on ne savait déjà qu'il a été réalisé. L'Institut Pasteur occupera une place prépondérante dans ce nouveau chantier.

Les mutants sont méthodiquement «croisés» entre eux (c.-à-d. qu'un mutant est transformé par l'ADN d'un autre mutant) afin de déterminer le taux de liaison génétique existant entre les loci portant les mutations. Cette méthode repose sur le fait que l'introduction d'un ADN exogène comportant des portions homologues à l'ADN endogène de la bactérie receveuse entraîne une recombinaison génétique entre les deux molécules d'ADN. Le taux d'apparition de cet événement est directement fonction de la distance séparant les différents marqueurs. Ainsi cette approche permet de déterminer un taux de liaison génétique reflétant la distance séparant les caractères en question. Il est ensuite possible de regrouper les différents caractères en groupes de liaisons et déterminer le caractère pléiotrope d'une mutation sur une autre (Michel and Cami, 1969).

Durant la même période, un caractère permettant de restaurer la sporulation dans la souche de *B. subtilis* 168 est introduit (ou transduit) via le phage PBS1 (Takahashi, 1961; Takahashi, 1963). La possibilité d'introduire de l'ADN étranger par l'intermédiaire d'un phage vient compléter l'approche par transformation. Bien que moins précise, la transduction permet de mobiliser de plus grandes fractions de chromosome. Ainsi, en utilisant la transduction, on observe des recombinaisons non obtenues par transformation (Takahashi, 1965.). Plus tard, il sera évalué à environ 5 % de la taille du chromosome la portion d'ADN transférable par transduction (contre 1 % par transformation) (Lepesant-Kejzlarová *et al.*, 1975)

En 1967, par le croisement d'un ensemble de six souches bloquées au stade II de la sporulation, il a pu être mis en évidence que trois d'entre elles forment un groupe de liaisons. En d'autres termes, trois de ces mutants affectent le même marqueur de la sporulation. Par ailleurs, il n'existe pas de liaisons entre ce groupe et les mutations portées par les trois autres souches. Il est à noter que ces trois autres souches ne sont pas liées entre elles. Ces trois souches affectent donc des marqueurs différents. Ensemble, ces résultats amènent à la conclusion que le passage du stade II au stade III de la sporulation est gouverné à *minima* par quatre loci non liés. Dans la même étude, un travail similaire permet de déterminer que c'est également cinq loci différents qui gouvernent, à *minima*, la transition du stade III au stade IV (Rouyard, Ionesco and Schaeffer *et al.*,

1967). Il apparaît donc que chaque étape de la sporulation est contrôlée par plusieurs gènes dispersés à différents endroits du génome (car non liés génétiquement). Ainsi, les gènes de la sporulation ne seraient pas regroupés dans une seule région du génome.

En cette même année 1967 est réalisée une cartographie du chromosome de *B. subtilis* affichant la localisation des principaux marqueurs disponibles (auxotrophie, résistance, production antibiotique). Pour parvenir à ce résultat, les auteurs ont repris les méthodes de transformation, de transduction et suivi l'ordre dans lequel se répliquent ces différents marqueurs dans une culture synchronisée, le but étant de positionner les marqueurs entre eux, de déterminer la distance qui les sépare et ainsi en déduire une cartographie du chromosome (Dubnau *et al.*, 1967) (Fig. 3). Cette carte n'affiche pas encore l'emplacement des gènes de la sporulation. Elle sera rapidement reprise afin d'être complétée. Des croisements ont ainsi été réalisés afin de lier les mutations de la sporulation aux différents marqueurs cartographiés par Dubnau. Ce qui permet ainsi d'obtenir leur positionnement relatif (Ionesco and Schaeffer, 1968). Se dessine alors peu à peu et de plus en plus précisément le positionnement relatif des gènes sur le chromosome. Une nouvelle cartographie incluant 30 marqueurs de la sporulation est publiée en 1970 (Ionesco *et al.*, 1970) (Fig. 4). Les marqueurs de la sporulation viennent combler des régions de la carte de Dubnau restées vierges et il en ressort que ces gènes ne sont pas regroupés au sein d'une région du chromosome, mais apparaissent dispersés le long du chromosome, ce qui confirme des travaux plus anciens (Balassa, 1969). Par ailleurs, les marqueurs qui se suivent ne se ressemblent pas forcément. Ainsi, entre les deux marqueurs d'auxotrophie *phe* et *lys*, les marqueurs de sporulation suivants se succèdent; 0B, IV, III, 0A, 0C et II. Ainsi un marqueur de la phase de sporulation 0 précède un marqueur de la phase IV, lui-même suivi d'un marqueur de la phase III puis d'un marqueur de la phase 0. La séquence dans laquelle ces marqueurs peuvent être lus (dans un sens ou dans l'autre) ne peut être corrélée à la succession des phases de la sporulation (Ionesco *et al.*, 1970). Ainsi, bien que la connaissance de l'organisation du génome de *B. subtilis* s'étoffe entre 1960 et 1970, la logique de répartition des différents marqueurs sur le chromosome reste incomprise.

Force est de constater que ces travaux, malgré la grande ingéniosité et la force de travail qu'ils ont réclamé de la part de leurs auteurs, paraissent aujourd'hui dérisoires face aux nombres de génomes séquencés chaque jour et tombent peu à peu dans l'oubli. Ainsi, alors que la carte des marqueurs de la sporulation fut fortement reprise à l'époque (81 citations entre 1970 et 2000) elle n'a été citée qu'à deux reprises dans des journaux internationaux depuis 2001. Pourtant ces

approches sont riches d'enseignements et pourraient s'avérer utiles. Pourquoi ne pas utiliser, par exemple, ces approches de mutations non ciblées pour obtenir un grand nombre de mutations de gènes de la sporulation d'espèces (comme *B. cereus*) dont la modification par génie moléculaire reste aujourd'hui encore difficile? La mise en œuvre des techniques de séquençage actuelles sur de tels mutants pourrait s'avérer fructueuse. Un grand nombre de gènes est bien trop souvent délaissé de nos études de caractérisation. Ainsi ces gènes, affublé d'un nom oubliable par annotation automatique, sont souvent condamnés à l'anonymat éternel. Pourtant, par essence, la découverte ne vient-elle pas des zones les plus obscures, les moins prévisibles? Dans tous les cas, la connaissance de ces approches ainsi que l'ingéniosité et la créativité qu'elles ont requises sont des opportunités pour les approches moléculaires d'aujourd'hui. Aussi leur historique nous permet-il de mieux comprendre d'où sont issues les connaissances actuelles, mais aussi d'où proviennent certains manques de connaissance.

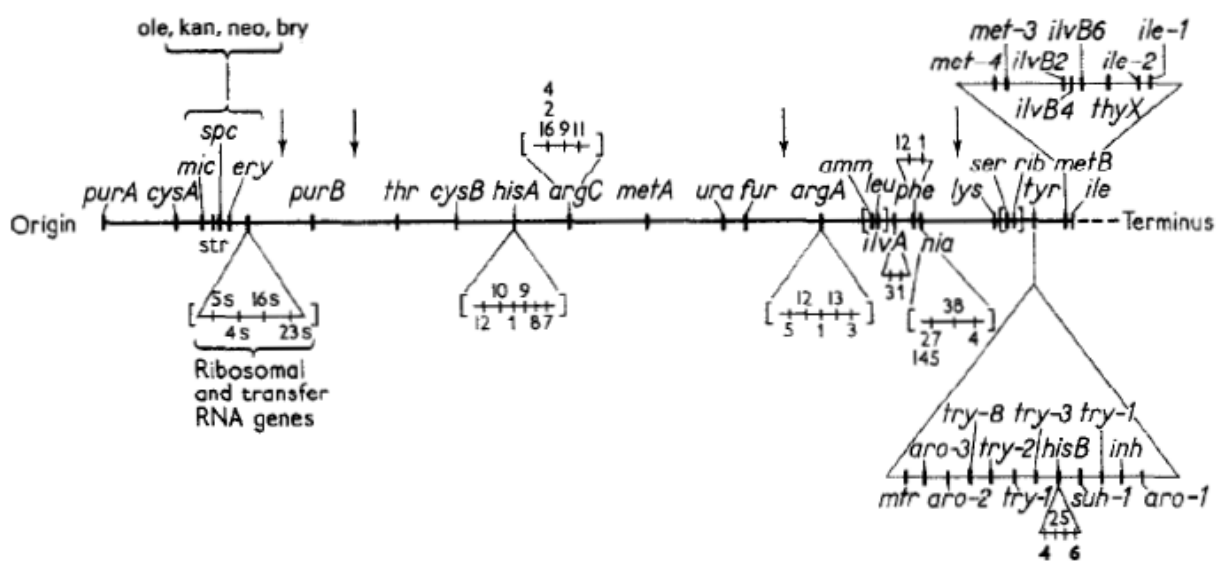


FIG 3. La carte du génome de *B. subtilis* 168. En 1967, D. Dubnau et C. Goldthwaite déterminent les liaisons existant entre les principaux marqueurs utilisés à cette époque. Pour ce faire, ils emploient la transformation, la transduction et étudient l'ordre dans lequel se répliquent ces différents marqueurs dans une culture synchronisée (d'après Dubnau and Goldthwaite, 1967).

1.5) La nomenclature et l'avènement de la génétique moderne

En parallèle, des travaux d'identification, de différenciation et de localisation des différents marqueurs de la sporulation, s'est développée une nomenclature spécifique de ces marqueurs. Une nomenclature proche de celle que nous connaissons actuellement peut être attribuée à Hélène Ionesco de l'Institut Pasteur lors de ses premiers travaux sur la transformation des mutants de *B. subtilis* (Ionesco, 1967). Dans le matériel et la méthode, elle propose la désignation suivante :

« Ils [les mutants] sont désignés par les symboles Sp^- [asporogènes] ou Osp [oligosporogène] avec en indice un chiffre romain indiquant leur stade de blocage cytologique. Le numéro suivant cette désignation est celui de l'isolement ; la lettre finale désigne le traitement à la suite duquel le mutant a été isolé : U pour irradiation ultraviolette, H pour sélection en milieu contenant de l'histidine comme seule source de carbone. Ainsi la souche Sp^-_{0-3U} désigne un mutant bloqué au stade 0 obtenu lors d'une mutagenèse aux UV, la troisième lors de l'isolation. » (Ryter, Schaeffer and Ionesco *et al.*, 1967).

Par la suite viendra s'ajouter une collection de nouvelles lettres pour indiquer les traitements mutagènes appliqués (Z pour traitement aux nitrites, Y pour le traitement au gaz moutarde, SA après incubation en anaérobiose et bien d'autres). En 1976, la nomenclature moderne proposée par Piggot et Coote (Piggot and Coote, 1976) que nous connaissons actuellement voit le jour. Elle concerne uniquement les gènes impliqués dans la sporulation et n'ayant pas d'effet dans des conditions normales de croissance. Cette nomenclature intuitive permet ainsi de différencier les gènes de sporulation des gènes nécessaires aux fonctions primaires de la bactérie et ayant donc indirectement un rôle dans la sporulation. Elle regroupe toutes les données de l'époque concernant la caractérisation des mutations de la sporulation de *B. subtilis* 168. Cette nouvelle nomenclature contribue à l'émergence d'un modèle générique du contrôle génétique de la sporulation. Son principe est simple : les *loci* clairement différenciés par les expériences de transformation et de transduction (ou bien séparés par un marqueur végétatif) sont notés *spo* suivi du stade auquel ils sont bloqués. La notation *spo* est complétée par une lettre permettant de distinguer entre eux des *loci* qui contrôlent le passage d'un stade donné à un autre stade (*spo0A* et *spo0B* sont par exemple deux loci différents impliqués dans le passage du stade 0 au stade I).

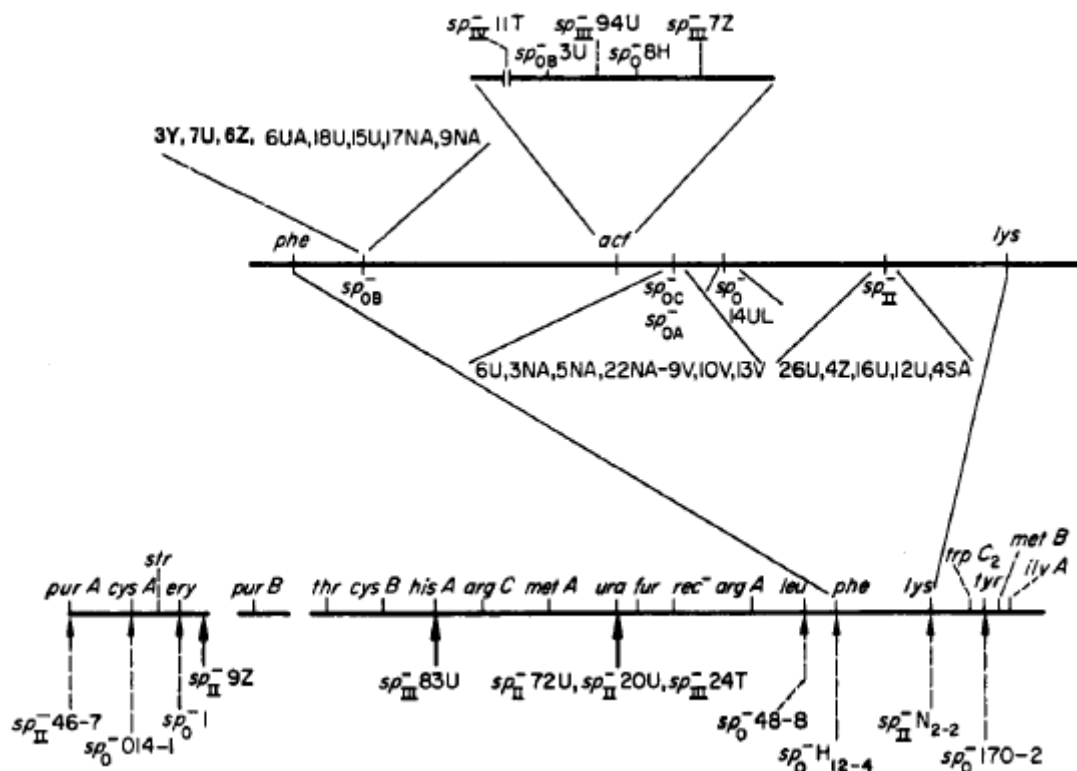


FIG 4. Le positionnement de 30 marqueurs de la sporulation dans le génome de *B. subtilis* 168. La carte de Dubnau et Goldthwaite et les méthodes utilisées sont reprises par l'équipe de P. Schaeffer de l'Institut Pasteur pour positionner les marqueurs de la sporulation. Ces résultats montrent que les marqueurs de la sporulation sont dispersés le long du chromosome. Certains vides laissés dans la carte de Dubnau et Goldthwaite (comme la section phe-lys) sont complétés par des segments portant plusieurs marqueurs de la sporulation. (d'après Ionesco and Schaeffer, 1970).

Les mutations causant un blocage aux stades 0 ou I sont notées indifféremment *spo0* afin d'éviter la confusion avec les publications précédentes qui ne se sont pas attachées à distinguer les mutants de ces deux stades. Dans les faits, le blocage au stade du filament axial (stade I) n'a jamais été noté en 1976, en raison probablement d'une instabilité du filament d'ADN qui caractérise cette étape. C'est pour cette raison qu'il n'existe pas de gène *spoI*. Ainsi, dans la nouvelle nomenclature l'exemple précédemment cité du gène Spo^{-3U} devient le locus *spoOF*.

Maintenant, clairement différenciés et annotés, les auteurs, en cette fin des années 1970, estiment à 40 environ le nombre de *loci* porteurs de marqueurs de sporulation. À ce moment, il n'est pas encore possible de parler de gène. La technique de transformation ne peut permettre de distinguer si, par exemple, une mutation affecte l'ensemble d'un opéron ou seulement un gène de cet opéron. Les chercheurs considèrent alors que le *loci*, ici, pourrait s'apparenter à un opéron. Le nombre de gènes de la sporulation est ainsi sous-estimé. L'étude des mutants de la sporulation de *B. subtilis* et leur nomenclature a lieu de façon concomitante à l'identification des gènes impliqués dans le cycle cellulaire d'*E. coli* par un système tout aussi remarquable connu sous la lignée des gènes Fts pour « Filamentation Thermo sensible » (Hirota *et al.*, 1968; Hirota *et al.*, 1971). Ces deux volets apparus parallèlement entre la fin des années 60 et le début des années 70 contribueront à la naissance de la génétique et de la biologie moléculaire des bactéries qui prendra tout son essor entre les années 1980 à 2000 menant au succès de ces organismes comme modèles.

1.6) La microbiologie moléculaire: la consécration

Les années 1980 sont marquées par un important développement des outils de génétique disponibles grâce à l'utilisation de plasmides et des enzymes de restriction nécessaires au développement du clonage moléculaire (Smith and Welcox, 1970; Segall and Losick, 1977).

Une contribution majeure à la compréhension de la sporulation est apportée. Jusqu'alors, une question concernant la cartographie des *loci* de la sporulation subsistait et prenait de plus en plus d'ampleur après chaque publication. Comment des gènes portés par des *loci* éparpillés le long du chromosome, sans logique appréciable, peuvent-ils s'exprimer avec la temporalité requise et dans le bon compartiment du sporange ? Des travaux réalisés dans la bactérie *E. coli* et objets de deux communications dans le journal Nature vont s'avérer essentiels. On y démontre qu'un facteur protéique, réutilisable par l'ARN polymérase (ou ARNP) nommé « facteur sigma »,

est nécessaire à la transcription par l'ARNP de l'ADN du bactériophage T4 (Burgess *et al.*, 1969; Travers and Burgess, 1969). La réponse était là. Ainsi, à leur tour, par une communication dans le journal Nature la même année, Richard Losick et Abraham Sonenshein démontrent que l'ARNP purifiée d'une cellule végétative de *B. subtilis* est capable de transcrire *in vitro* l'ADN du phage virulent de *B. subtilis phiE*, alors que l'ARNP purifiée de cellules en sporulation en est incapable (Losick and Sonenshein, 1969). Ainsi l'expression des gènes de la sporulation et l'extinction des gènes propres aux cellules végétatives peuvent s'expliquer par l'existence d'une ARNP « végétative » et d'une ARNP de la sporulation. Chacune des ANRP a ses cibles spécifiques. S'en suivent de nombreux travaux qui permirent de purifier les ARNP capables de transcrire des fragments contenant des gènes de la sporulation impliqués dans la transition des différents stades. Le premier facteur sigma alternatif permettant la transcription d'un gène de sporulation fut le facteur P³⁷, nommé ainsi en raison de son poids moléculaire après séparation du cœur de l'ARNP (Haldenwang and Losick, 1979; Haldenwang and Losick, 1980). Fait intéressant, on sait aujourd'hui que le facteur sigma P³⁷, ou plutôt SigB, ne fait pas partie des facteurs sigma spécifiques de la sporulation, mais permet d'induire l'expression de gènes impliqués dans l'adaptation au stress oxydatif (Tran and Bonilla, 2021). Ainsi le premier facteur sigma spécifique de la sporulation (c.-à-d. uniquement détecté pendant la sporulation) fut P²⁹ (Linn *et al.*, 1975; Nakayama *et al.*, 1978; Haldenwang *et al.*, 1981; Trempy *et al.*, 1985), renommé ensuite σ^E suivant la nomenclature proposée par Richard Losick dans sa revue de 1986 (Losick *et al.*, 1986). S'en suivra la découverte de σ^G qui permet de transcrire un gène codant pour une des petites protéines solubles exprimées spécifiquement dans le compartiment de la préspore et dont le facteur sigma impliqué dans sa transcription restait inconnu (Sun *et al.*, 1989). Cette étude permit aussi de valider que σ^F , génétiquement très proche de σ^G , est également un facteur sigma de la sporulation. Dans la même période, dans une seconde étude acceptée à seulement 5 jours d'intervalle, le dernier facteur spécifique de la sporulation est identifié, mais aussi l'existence d'une autre protéine majeure est révélée. Dans cette communication de la revue scientifique Science, l'équipe de Richard Losick rapporte que σ^K est capable de transcrire fortement le gène *cotD* et faiblement *spoIVCB* (Kroos *et al.*, 1989). Mais il détermine également qu'une petite protéine de 14 kDa, encodée par le gène *spoIIID* et co-purifiée avec l'ARNP, est responsable d'un changement d'affinité de σ^K pour *cotD* et *spoIVCB* (Kroos *et al.*, 1989). Ce facteur aujourd'hui connu comme un facteur de transcription est alors nommé : protéine « switch ». Ainsi cette découverte permet-elle de comprendre comment deux gènes régulés par un même facteur peuvent s'exprimer de façons

différentes. La décennie 80 se termine ainsi en apothéose avec l'identification de deux effecteurs directs de l'expression des gènes, les facteurs sigma et les facteurs de transcription.

En parallèle de ces travaux pionniers, un outil va créer une révolution en permettant de caractériser la temporalité de l'expression des gènes. Le clonage moléculaire du gène rapporteur *lacZ* dans les différents fragments contenant les gènes de la sporulation posera les jalons d'une nouvelle ère, celle de la caractérisation fonctionnelle du produit des gènes (Zuber and Losick, 1983). Cette ère où nous nous trouvons encore actuellement nous semble infinie tant les protéines qui façonnent les corps biologiques et les mécanismes dans lesquels elles sont impliquées semblent innombrables. Les connaissances obtenues par ces travaux ont permis de développer des outils de biotechnologie incroyables. Parmi les plus connus est la PCR (ou Polymerase Chain Reaction) (Saiki *et al.*, 1985; Mullis *et al.*, 1986; Mullis and Faloona, 1987) issue de la connaissance de l'ADN polymérase d'*E coli* (Kornberg *et al.*, 1956). Le développement de la technologie Crisper-cas9 est également dans la lignée de ces travaux (Doudna and Charpentier, 2014). Elle permet originellement aux bactéries d'enregistrer les menaces passées pour se prémunir des attaques futures. Aujourd'hui, nous nous sommes approprié ce mécanisme moléculaire en biotechnologie et sommes devenus capables de remanier les génomes à l'envie (Hsu *et al.*, 2014). Il apportera le prix Nobel à ses découvreuses. C'est aussi à la lumière de ces connaissances que des vaccins prometteurs utilisant les spores des bactéries comme plateforme de présentation d'antigènes ont parfois été proposés (Isticato *et al.*, 2001). En attendant, à l'aube de la dernière décennie du 20e siècle, un clonage précautionneux de l'ensemble de ce qui était jusque-là des marqueurs de sporulation, permettra de déterminer la séquence d'activation des gènes et leur hiérarchie génétique lors de la sporulation (Fig. 5) (pour revue Errington, 1993).

Cet historique sur la genèse des connaissances des mécanismes moléculaires de la sporulation se conclut ici. Deux concepts fondateurs ont émergé. (i) La sporulation est un mécanisme séquentiel scindé en grandes étapes. Chaque étape nécessite l'expression d'un ensemble de gènes disposés le long du chromosome. (ii) L'expression des gènes spécifiques de la sporulation nécessite de modifier l'affinité de l'ARNP pour ses cibles au travers de facteurs sigma alternatifs, et de facteurs de transcription changeant l'affinité d'un facteur sigma pour une séquence ADN. Ces travaux conduits majoritairement sur *B. subtilis* finirent par réduire l'étude de la sporulation chez *B. cereus* et chez les bactéries apparentées à la portion congrue. Néanmoins, la compréhension fine des mécanismes moléculaires mis en évidence dans *B. subtilis* est un prérequis essentiel pour aborder la mécanique moléculaire de la sporulation de *B. cereus*. Ainsi, les prochains cha-

pitres seront dédiés aux connaissances des bases moléculaires de l'assemblage des couches protéiques externes (CPE) des spores bactériennes issues de nouveaux de travaux réalisés dans *B. subtilis*. Enfin les connaissances dont nous disposons sur l'assemblage des couches protéiques externes des spores de *B. cereus* seront évoquées.

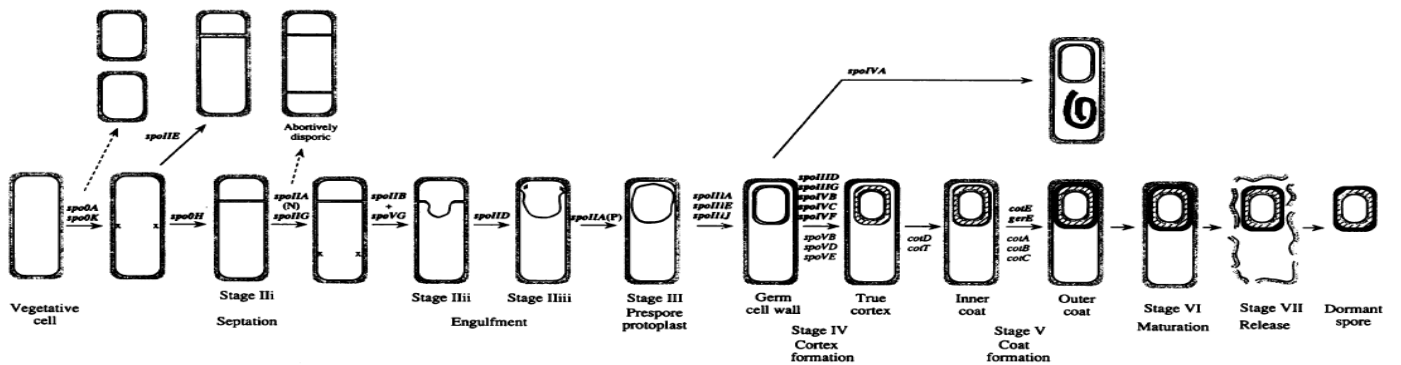


FIG 5. Le contrôle génétique de la sporulation de *B. subtilis* 168. En 1993 est édité ce schéma par J. Errington dans une revue d'ampleur qui reprend l'intégralité des données issues de l'analyse génétique de la sporulation de *B. subtilis* 168 à l'aube du second millénaire. La nomenclature proposée de Piggot et Coote de 1976 est utilisée et les stades décrits par A. Ryther sont repris. Du fait du blocage entraîné par certaines mutations des stades intermédiaires sont représentés. L'ensemble des gènes nécessaires à la transition d'une étape de la sporulation à la suivante est représentée. Des phénotypes particuliers observés dans certains mutants sont représentés au dessus. Ainsi, en absence de SpoIVA les coats sont produits mais ne sont pas rattachés à la présore (d'après Errington, 1993).

Chapitre 2 : Le contrôle transcriptionnel de la sporulation

Le développement des couches protéiques externes (CPE) des spores de *B. subtilis* est dicté par l'activité successive de SigE (σ^E) et SigK (σ^K) dans la cellule-mère (Henriques and Moran, 2007; de Hoon *et al.*, 2010; McKenney *et al.*, 2013). Néanmoins, lors de leur synthèse, les facteurs sigma (σ) de la cellule-mère sont maintenus inactifs par différents mécanismes. La levée de ces inhibitions dépend d'une communication établie entre la cellule-mère et la préspore. Par ailleurs, l'activation des facteurs σ de la préspore est elle-même coordonnée avec les grandes étapes de la sporulation. Dans ce premier volet, je vais revenir sur les bases moléculaires permettant l'activation des facteurs σ dans le bon compartiment avec le bon timing dans l'organisme modèle *B. subtilis*. Aujourd'hui, en 2021, aucune étude portant sur le contrôle de l'activation des facteurs σ de sporulation au sein du groupe *B. cereus* n'a encore été réalisée.

2.1) L'activation de SigF et SigE est couplée à la septation

2.1.1) La formation du septum asymétrique génère une « asymétrie génétique »

Le premier événement clairement identifiable de la sporulation est la mise en place d'un septum en position asymétrique. Ce septum subdivise la cellule en deux compartiments de volume inégal ; la préspore qui donnera naissance à la future spore et la cellule-mère qui va accueillir le développement de la préspore et se lyser dans les ultimes phases de la sporulation. Le septum asymétrique est issu d'un assemblage de la protéine FtsZ en protofilaments qui s'organisent à leur tour en un anneau, « l'anneau Z ». Dans une cellule végétative, une douzaine de protéines essentielles pour la division s'associent à l'anneau Z pour former le « divisome » (Du and Lutkenhaus, 2017). Ensemble ces protéines constituent une machinerie complexe aux fonctions multiples qui permet, entre autre, de ségréger l'ADN et de contrôler la qualité de sa réplication (Bigot *et al.*, 2006; Bigot *et al.*, 2007; Stouf *et al.*, 2013; Fournes *et al.*, 2016). Un second groupe de protéines, dont de nombreuses Penicillin Binding Proteins (PBP) s'ajoutent au divisome pour synthétiser le peptidoglycane (PG) septal.

Lors de la sporulation, la formation de deux anneaux Z est initiée, à chacun des pôles de la cellule pré-divisionnelle (Fig. 6A, anneaux rouges). Cependant, un seul site est « choisi » et donnera le septum asymétrique (Fig. 6B) (Errington, 2003). En TEM, le septum asymétrique

apparaît plus fin que le septum des cellules végétatives (Young and Fitz-James, 1959a). La formation du septum asymétrique a pour effet de piéger une partie seulement (environ 30%) d'une des copies du chromosome dans la chambre présporale (Fig. 6B) (Wu and Errington, 1998). Cet événement génère une asymétrie « génétique » transitoire dans la préspore qui est impliquée dans l'activation de σ^F , le premier facteur spécifique de la sporulation actif. L'asymétrie génétique est levée lorsque SpoIIIE, homologue de FtsK, transporte activement la partie restante du chromosome dans la préspore. Par ailleurs, cette translocation active du chromosome dans le petit espace de la préspore génère une pression de turgescence au sein de ce compartiment lui conférant sa forme ovoïde bombée (Lopez-Garrido *et al.*, 2018).

2.1.2) Un subtil déséquilibre à l'origine de l'activation de SigF

Le facteur σ^F est encodé par le gène *spoIIAC* et forme l'opéron *spoIIA* avec *spoIIAA* et *spoIIAB*. Les protéines SpoIIAA, SpoIIAB et σ^F sont présentes avant la formation du septum asymétrique (Gholamhoseinian and Piggot, 1989). Néanmoins, avant la formation du septum, σ^F est maintenu inactif (Fig. 6A). SpoIIAA et SpoIIAB contrôlent l'activation de σ^F (Schmidt *et al.*, 1990): SpoIIAB agit comme un anti-facteur σ ; il se fixe à σ^F l'empêchant de s'associer à l'ARNP (Fig. 6A) (Duncan and Losick, 1993). SpoIIAA est un anti-anti-facteur σ pouvant se fixer à SpoIIAB et l'empêcher d'interagir avec σ^F (Fig. 6A) (Diederich *et al.*, 1994; Duncan *et al.*, 1995). Enfin, SpoIIAB est une kinase qui peut phosphoryler SpoIIAA (Fig. 6A). Dans sa forme phosphorylée, SpoIIAA est incapable d'interagir avec SpoIIAB. Lorsque ces trois partenaires sont présents dans la cellule pré-divisionnelle, σ^F est inactif (Fig. 6A) (Min *et al.*, 1993).

La levée de l'inhibition de σ^F repose sur SpoIIIE (Partridge *et al.*, 1991; Margolis *et al.*, 1991). SpoIIIE est positionnée spécifiquement aux pôles de la cellule pré-divisionnelle et participe à la mise en place de l'anneau Z (Fig. 6A) (Król *et al.*, 2017). SpoIIIE est également une phosphatase dont l'activité s'oppose à celle de SpoIIAB (Fig. 6A). Ainsi, SpoIIIE permet de contourner l'inhibition de SpoIIAA par SpoIIAB (Duncan *et al.*, 1995; Feucht *et al.*, 1996). Cependant, SpoIIIE est également présente dans la cellule pré-divisionnelle et ne suffit pas à lever l'inhibition de σ^F (Fig. 6A). Le repositionnement artificiel du gène *spoIIAC* (codant pour σ^F) près de l'origine de réplication du chromosome (Fig. 6B, *ori*) permet l'activation de σ^F sans SpoIIAA ou SpoIIIE (Frandsen *et al.*, 1999). Ce résultat montre un lien entre l'asymétrie « génétique » et la régulation de σ^F par le système SpoIIAA-AB-E.

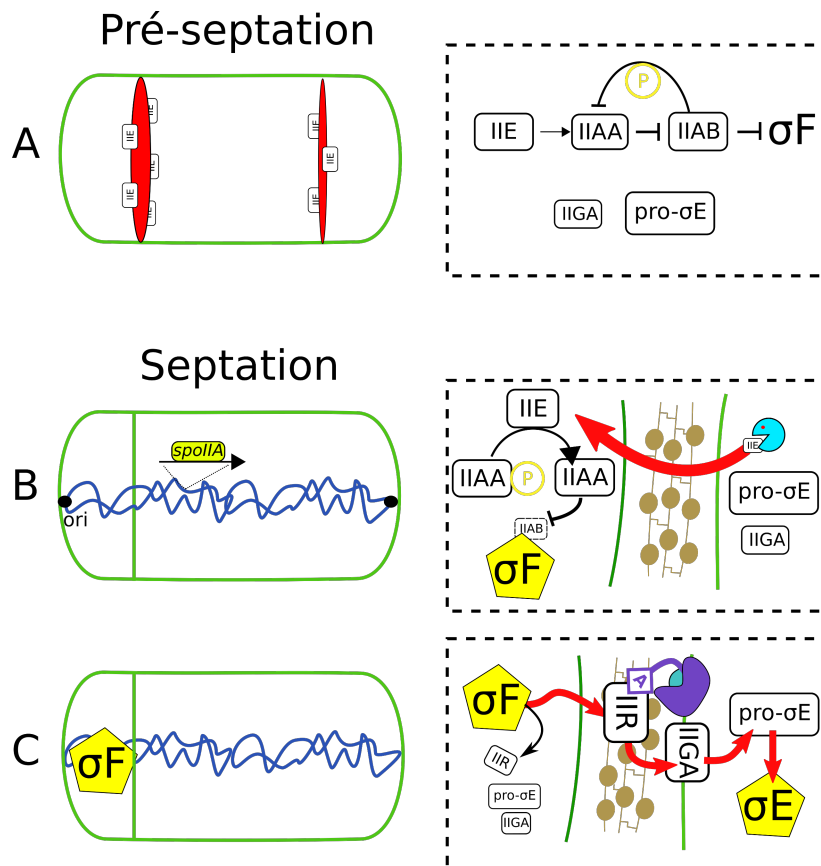


Fig 6. La septation déclenche l'activation séquentielle de SigF puis de SigE. (A) Avant la formation du septum, deux anneaux Z (disques rouge) sont positionnés à chacun des pôles par SpoIIE (IIE). Durant cette période SigF (σ^F), SpoIIB (IIB), SpoIIAA (IIAA) et IIE sont présents. L'équilibre entre IIAA-AB-E rend σ^F inactif. SigE (σ^E) est présent dans sa pro-forme inactive. La protéase SpoIIGA (IIGA) est également présente mais ne permet pas de cliver pro- σ^E . (B) La maturation d'un des deux anneaux Z est à l'origine du septum en position asymétrique qui cloisonne le sporange. La septation piège une partie d'une copie du chromosome incluant la région portant l'origine de réplication (*ori*, cercle noir). Cet événement génère une asymétrie génétique entre la préspore et la cellule-mère. L'opéron *spoIIA* ne fait pas partie de la portion de chromosome présent dans la préspore. IIB est dégradée par ClpCP. Il en résulte une baisse de la concentration locale de IIB dans la préspore. Dans le même temps, IIE est transférée dans la préspore et dégradée dans la cellule-mère, entraînant une hausse locale de IIE dans la préspore. L'équilibre IIAA-AB-E devient favorable pour l'activation de σ^F dans la préspore. (C) L'activation de σ^F permet la synthèse de SpoIIR (IIR). IIR est transféré dans l'espace inter-membranaire entre la préspore et la cellule-mère. Cet événement nécessite le clivage d'un peptide signal (non représenté). Dans cet espace la machinerie de synthèse des acides gras de la cellule-mère (en mauve) acétyle IIR. L'acétylation de IIR permet d'activer la protéase IIGA qui, à son tour, clive la pro-séquence de σ^E . Noter que pro- σ^E et IIGA sont également présents dans la préspore. Seulement, IIR n'est pas acétylée et ne peut donc activer IIGA dans ce compartiment. Les facteurs sigma actifs sont représentés dans un pentagone jaune. La membrane de la préspore est vert foncé alors que celle de la cellule-mère est vert-clair. Dans l'espace inter-membranaire est représenté en marron clair le PG septal. Le « P » jaune indique la phosphorylation de IIAA. Le « A » mauve indique l'acétylation de IIR.

SpoIIAB est un facteur instable, dégradé par ClpCP (Pan *et al.*, 2001; Pan and Losick, 2003). Par ailleurs, l'opéron *spoIIA* est positionné à l'opposé de la région ori du chromosome (Fig. 6B). *spoIIA* n'est donc pas présent dans la préspore durant la période d'asymétrie génétique (Fig. 6B). Ainsi, pendant le laps de temps où seule une partie du chromosome est présente dans la chambre présporale (Fig. 6B), la dégradation de SpoIIAB par la protéase ClpCP permet la levée de l'inhibition de SpoIIAA (Fig. 6B) (Pan *et al.*, 2001; Pan and Losick, 2003). Cette déstabilisation de l'équilibre stochiométrique SpoIIAA-AB-E, qui maintient σ^F inactif, est renforcée par le transfert de SpoIIIE du septum vers la chambre présporale (Fig. 6B). Une fois dans la préspore, SpoIIIE est protégée de la dégradation et son activité phosphatase paraît stimulée (Bradshaw and Losick, 2015). Ainsi, lorsque le septum est formé, l'asymétrie génétique entraîne une baisse de la quantité de SpoIIAB dans la préspore. Dans le même temps, le transfert de SpoIIIE dans la préspore augmente sa concentration dans ce compartiment. Ces deux événements permettent à SpoIIAA de prendre l'avantage sur SpoIIAB (Fig. 6B), ce qui permet l'activation de σ^F (Fig. 6B).

2.1.3) La communication entre les compartiments et l'activation de SigE

Similairement aux produits de l'opéron *spoIIA*, SigE (σ^E) (encodé par *spoIIGB*) et SpoIIGA sont présents dans le sporange avant la détection du septum asymétrique (Fig. 6A) (Gholamhoseinian and Piggot, 1989). Le facteur σ^E est produit sous une pro-forme inactive, désignée par « pro- σ^E » (Trempey *et al.*, 1985; LaBell *et al.*, 1987). Pour être activée, pro- σ^E doit être clivée par SpoIIGA (Stragier *et al.*, 1988). Cependant, un autre facteur de régulation est nécessaire à ce clivage puisque pro- σ^E et SpoIIGA sont tous deux présents dans une cellule pré-divisionnelle alors que σ^E n'est pas actif (Fig. 6A).

L'activation de σ^E dépend de σ^F , la délétion de plusieurs gènes impliqués dans l'activation de σ^E affectant également l'activation de σ^E (Losick and Stragier, 1992). SpoIIR (aussi nommé CsfX), dont le gène est sous le contrôle de σ^F , est suffisante pour permettre le clivage de pro- σ^E (Fig. 6C) (Londoño-Vallejo and Stragier, 1995; Karow *et al.*, 1995). SpoIIR est une protéine dite « signal » car elle est synthétisée dans la préspore, puis est transférée dans l'espace inter-membranaire (Fig. 6C) (Londoño-Vallejo and Stragier, 1995). C'est dans cet espace, séparant la cellule-mère de la préspore, que SpoIIR interagit et active SpoIIGA (Fig. 6C) (Diez *et al.*, 2012). Le mécanisme permettant à SpoIIR d'activer SpoIIGA reste inconnu. Cependant, le transfert de SpoIIR dans l'espace inter-membranaire nécessite le clivage d'une séquence signal et une acylation de SpoIIR est nécessaire à l'activation de SpoIIGA (Diez *et al.*, 2012). Ces deux

événements sont liés à la présence de la machinerie de synthèse des acides gras (Fig. 6C) (Diez *et al.*, 2012).

La machinerie de synthèse des acides gras pourrait permettre d'acyler spécifiquement les molécules de SpoIIR présentes dans l'espace inter-membranaire (Fig. 6C). En retour, la forme acylée de SpoIIR activerait spécifiquement les molécules de SpoIIGA présentes dans la membrane de la cellule-mère (Diez *et al.*, 2012; Tan and Ramamurthi, 2014). Ainsi, l'activation de σ^E repose principalement sur l'activation de σ^F . De même, puisque l'activation de σ^F dépend de la formation du septum (Fig. 6B), l'activation de σ^E dépend indirectement de la formation du septum. De plus, la machinerie de synthèse des acides gras de la cellule-mère permettrait d'assurer l'activation unilatérale de σ^E dans le compartiment de la cellule-mère (Fig. 6C). Enfin, les molécules pro- σ^E présentes dans la préspore pourraient être dégradées suite à l'activation d'une protéase spécifiquement synthétisée sous le contrôle de σ^F (Errington, 2003).

2.2) Le mécanisme moléculaire de l'engulfment

L'activation coordonnée de σ^F et de σ^E lors de la septation entraîne l'expression de deux programmes génétiques différents au sein de chaque chambre du sporange (Fig. 7A). L'expression de ces régulateurs déclenche l'étape suivante de la sporulation dite de « l'engulfment ». L'engulfment consiste en une phagocytose de la préspore par la cellule-mère. Au cours de ce processus, les membranes de la cellule-mère migrent autour de la préspore jusqu'à la recouvrir entièrement (Fig. 7A-D). La préspore, alors privée du contact avec son environnement, forme un protoplaste au sein de la cellule-mère (Fig. 7D). Le mécanisme d'engulfment implique des remodelages complexes des structures cellulaires, tout en maintenant une communication entre les deux compartiments du sporange. Ainsi, deux barrières naturelles s'opposent à ce processus : la première est le PG présent dans le septum et dans la paroi qui couvre la préspore (Fig. 7A, collier de perles marron clair) empêchant physiquement le mouvement des membranes de la cellule-mère autour de la préspore. ; la seconde barrière est le cytosquelette de la cellule qui doit être remodelé en profondeur pour permettre la migration des membranes de la cellule-mère sur le pourtour de la préspore. Enfin, un dernier événement est nécessaire à l'accomplissement de l'engulfment : la fission des extrémités des membranes à la fin du processus (Fig. 7C). Ce dernier événement aboutit mécaniquement à l'individualisation de la préspore à l'intérieur de la cellule-mère (Fig. 7D).

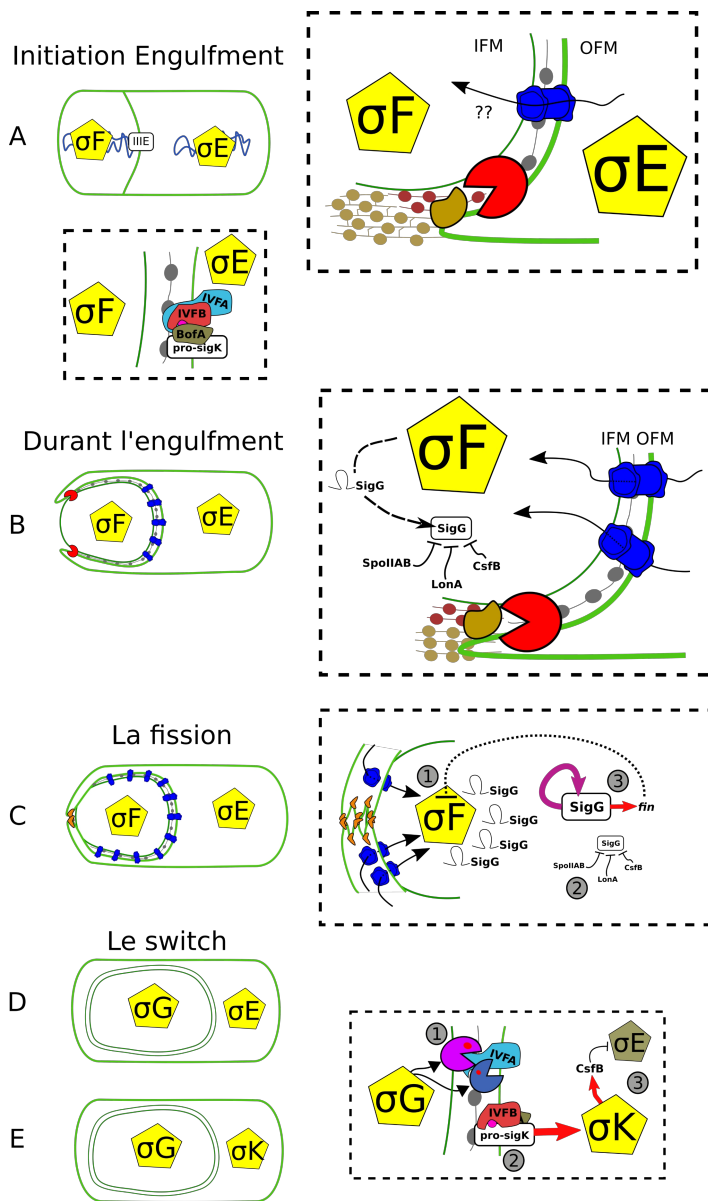


Fig 7. L'engulfment et l'activation des facteurs sigma tardifs de la sporulation.

(A) L'engulfment s'initie lorsque σ^F est actif dans la cellule-mère. Deux principaux complexes protéiques contrôlent l'avancée de l'engulfment. SpoIIIDMP (Pacman rouge) remodèle le PG septal. Une machinerie de synthèse de PG (protéiforme marron) en amont du complexe DMP peut fournir un substrat (PG pourpre) pour l'avancée de ce complexe. En parallèle, la dégradation du PG septal offre des sites pour la formation du tunnel IIQ*III AA-AH (tube bleu). Un facteur inconnu semble transiter à travers ce canal. L'activation de σ^E permet de produire σ^K dans sa proforme inactive ainsi que les SpoIVFA (IVFA), SpoIVFB (IVFB) et BofA. Ces protéines sont nécessaires pour le clivage de la proséquence de σ^K mais sont maintenues inactives dans la membrane de la cellule-mère. (B) Durant l'engulfment σ^G est produit mais un ensemble de facteurs empêche son activation. Pour plus de détails veuillez vous referer au texte. (C) Les protrusions de membranes arrivées au pôle distal de la préspore fissionnent sous l'effet de l'oligomérisation de FisB (protéiforme orange). A ce moment la quantité maximale de canaux IIQ*III AA-AH est présente entre la préspore et la cellule mère. (1) En résulte une arrivée massive d'un facteur inconnue qui soutient la transcription de σ^G par σ^F . (2) Une part des molécules SigG produites échappe aux contrôles négatifs. (3) Une boucle de rétrocontrôle positif s'enclenche où σ^G soutient sa propre transcription et permet la synthèse de fin, un inhibiteur de σ^F . (D) L'activation de σ^G à la fin de l'engulfment entraîne la synthèse de SpoIVB (Pacman rose), CtpB (Pacman bleu) ainsi que BofC (non montré). (1) IVB et CtpB clivent IVFA ce qui déstabilise le complexe IVFA-FB-BofA. (2) Le site catalytique de IVFB devient libre et clive la proséquence inhibant σ^K . (3) σ^K devient actif et enclenche une boucle de rétrocontrôle positif qui éteint σ^F . (E) Le switch est terminé, σ^G et σ^K sont actifs et vont contrôler la formation des différentes couches des spores.

Depuis les premières observations de cellules bactériennes sporulantes, on sait que le PG du septum asymétrique est plus fin que celui observé dans le septum d'une cellule en division végétative (Young and Fitz-James, 1959a). L'étude de mutants incapables d'engager le processus d'engulfment a montré que l'activation de σ^E intervient dans ce mécanisme de dégradation du PG septal nécessaire à l'engulfment (Illing and Errington, 1991b). La machinerie permettant le remodelage du PG lors de l'engulfment est bien décrite pour *B. subtilis* et implique deux complexes protéiques ainsi que des protéines additionnelles. Les protéines impliquées dans l'engulfment sont largement conservées au sein des bactéries sporulantes, suggérant une certaine unicité du mécanisme d'engulfment au sein des bactéries sporulées (de Hoon *et al.*, 2010; Galperin *et al.*, 2012; Ramos-Silva *et al.*, 2019; Soto-Avila *et al.*, 2021).

2.2.1) Le complexe DMP : le moteur

Le complexe multiprotéique formé des protéines SpoIID, SpoIIM et SpoIIP (ou complexe DMP) occupe une fonction centrale dans l'engulfment. Ce complexe participe à la dégradation du PG septal et est également nécessaire à la migration de la membrane de la cellule-mère autour de la préspore (Mello *et al.*, 2002; Chastanet and Losick, 2007; Morlot *et al.*, 2010; Gutierrez *et al.*, 2010). Les protéines SpoIID-M-P sont produites sous le contrôle de σ^E , liant le déroulement de l'engulfment à l'activation de σ^E (Steil *et al.*, 2005). Ces protéines se positionnent au niveau du septum de manière interdépendante les unes des autres. Le positionnement des protéines formant le complexe DMP nécessite également SpoIIB (Chastanet and Losick, 2007).

SpoIID et SpoIIP sont deux hydrolases aux activités complémentaires dans la dégradation du PG (Mello *et al.*, 2002; Chastanet and Losick, 2007; Morlot *et al.*, 2010). SpoIIM, grâce à ses 5 domaines transmembranaires, en coordination avec SpoIIB, ancre le complexe DMP autour de la préspore. Le complexe DMP se positionne autour de la préspore en suivant le front de migration des membranes d'engulfment (Fig. 7A, pacman rouge). Il est proposé que l'assemblage/dé-assemblage du complexe DMP, au fur et à mesure qu'il dégrade le PG encerclant la préspore, entraîne la migration des membranes de la cellule-mère à laquelle il est ancré (Morlot *et al.*, 2010). Récemment, grâce à une approche de cryotomographie sur coupes ultrafines, une étude a révélée qu'un fin feuillet de PG persiste dans l'espace intermembranaire (Fig. 7A, collier de perles gris) (Tocheva *et al.*, 2013; Khanna *et al.*, 2019). Les mêmes auteurs ont démontré que l'extrémité des membranes d'engulfment sont le lieu de synthèse de PG (Fig. 7A, collier de perles pourpre) (Ojkic *et al.*, 2016). Cette synthèse *de novo* de PG sur le front d'avancée des membranes

d'engulfment fournirait un substrat pour le complexe DMP (Fig. 7A) (Khanna *et al.*, 2019). Enfin, la progression des complexes DMP en direction du pôle distal de la préspore est accompagnée par les protéines du cytosquelette bactérien, MreB, Mbl et MreBH. La présence de ces protéines permettrait de guider la synthèse de PG dans le sens de la migration des membranes de la cellule-mère (Ojkic *et al.*, 2016).

D'autres modèles sont également possibles : le complexe DMP est strictement nécessaire à la progression de l'engulfment car il dégrade le PG, un obstacle par sa rigidité à la progression des membranes de la cellule-mère autour de la préspore. Cette fonction du complexe DMP explique également son positionnement au front de migration des membranes d'engulfment. Cependant, il est difficile de déterminer si le complexe DMP a un rôle direct dans la migration des membranes puisque sa fonction de dégradation est limitante pour la migration des membranes. Ainsi, il est possible que la dégradation et le remodelage du PG par le complexe DMP offrent de nouveaux sites de fixation pour des protéines qui seraient impliquées, elles, directement dans la migration des membranes d'engulfment. Néanmoins, pour déterminer si un tel facteur existe, il est nécessaire de pouvoir dissocier la fonction de dégradation du PG de SpoIID et/SpoIIP, de la migration des membranes.

2.2.2) Le complexe SpoIIQ*SpoIIIAA-AH et la fermeture éclair

L'engulfment peut être comparé au processus de phagocytose chez les eucaryotes en raison des mouvements des membranes autour de leur cible. La cellule phagocytée joue, le plus souvent, un rôle passif. L'engulfment semble similaire. En effet, hormis la dépendance de σ^F pour l'activation de σ^E (Fig. 6C), l'engulfment peut avoir lieu en absence de l'expression des gènes de la préspore (Sun *et al.*, 2000). Ce résultat montre que l'engulfment est un processus où la cellule-mère joue un rôle actif et la préspore un rôle passif. Néanmoins, SpoIIQ, une protéine membranaire synthétisée sous le contrôle de σ^F , devient nécessaire pour l'engulfment dans certaines conditions (Sun *et al.*, 2000).

SpoIIQ est initialement positionnée sur le septum asymétrique puis suit les membranes d'engulfment lors de leur progression autour de la préspore (Rubio and Pogliano, 2004). SpoIIQ forme, avec les huit protéines de l'opéron *spoIIIA* synthétisées sous le contrôle de σ^E , nommées SpoIIIAA à SpoIIIAH (ou IIIAA-III AH), un canal nommé « tunnel nourricier » (ou « Feeding Tube ») (Camp and Losick, 2009). Ce tunnel relie la membrane de la cellule-mère à celle de la préspore (Fig. 7A, canal bleu) (Camp and Losick, 2009; Rodrigues *et al.*, 2016; Morlot and Rodrigues, 2018).

La formation du complexe IIQ*III^{AA}-AH repose sur de nombreuses interdépendances entre les protéines qui le composent et dépend également de la lipoprotéine GerM (Rodrigues *et al.*, 2016). Le tunnel nourricier est nécessaire pour l'activation de σ^G . Cette dépendance semble liée au transit de molécules inconnues entre la cellule-mère et la préspore par ce tunnel (Camp and Losick, 2009).

Durant la sporulation, les molécules de GFP-SpoIIQ photoblanchies ne sont remplacées qu'en partie par l'assemblage de nouvelles molécules, indiquant que SpoIIQ forme une structure stable autour de la préspore (Broder and Pogliano, 2006). Les auteurs proposent que cette rigidité de l'assemblage de SpoIIQ empêche le reflux des membranes lors de leur migration autour de la préspore (Broder and Pogliano, 2006). De façon importante, SpoIIQ et SpoIII^{AH} deviennent strictement nécessaires à l'engulfment et au mouvement des membranes lorsque : (i) l'assemblage du complexe DMP est affecté, ou (ii) que l'activité hydrolytique du complexe DMP est réduite, ou (iii) lorsque le PG a été préalablement détruit (Broder and Pogliano, 2006). Le complexe IIQ*III^{AA}-AH constitue un lien physique entre les membranes de la cellule-mère et de la préspore. Ainsi, dans les conditions énumérées ci-dessus, l'assemblage du complexe IIQ*III^{AA}-AH autour de la préspore pourrait entraîner mécaniquement la migration de la membrane de la cellule-mère autour de la préspore (Broder and Pogliano, 2006). Ce mécanisme peut être visualisé comme une fermeture éclair où chaque glissière serait l'une des deux membranes entourant la préspore et la navette serait le complexe IIQ*III^{AA}-AH (Fig. 8). Dans une souche sauvage, le complexe IIQ*III^{AA}-AH semble donc soutenir l'activité du complexe DMP qui, en retour, lui offre de nouveaux sites d'assemblage à mesure qu'il remodèle le PG (Fig. 8) (Broder and Pogliano, 2006).

La combinaison de la double machinerie DMP/IIQ*III^{AA}-AH, impliquant respectivement les protéines IIB et GerM, accompagnée d'une machinerie de biosynthèse du PG et de protéines du cytosquelette, assurent la migration unidirectionnelle des membranes de la cellule-mère autour de la préspore. Arrivé au pôle MCD de la préspore, les membranes de la cellule-mère qui forment des projections en « forme de doigts » (pour « Finger Like Projections ») fusionnent entre elles pour finaliser l'engulfment (Khanna *et al.*, 2019; Khanna *et al.*, 2020).

2.2.3) La fission des membranes à la fin de l'engulfment

Pendant longtemps, le seul facteur connu ayant un rôle dans la fusion des membranes en fin d'engulfment était la protéine SpoIII^E, également connue pour sa fonction de translocation du

chromosome dans la préspore (Wu and Errington, 1994). C'est un criblage génétique visant à identifier des facteurs impliqués dans la fission des membranes en fin d'engulfment qui a permis d'identifier seulement des variants de SpoIII^E (Sharp and Pogliano, 1999). Certaines de ces mutations ont montré qu'il existe un découplage entre l'activité de translocation de l'ADN et le rôle dans la fusion des membranes de SpoIII^E (Sharp and Pogliano 1999). SpoIII^E possède un domaine moteur de la translocation possédant une activité ATPase, un linker et un domaine transmembranaire (Barre, 2007). C'est le domaine transmembranaire de SpoIII^E qui est important dans la fonction de fusion des membranes en fin d'engulfment (Sharp and Pogliano, 2003). La fonction précise de SpoIII^E dans la fission des membranes reste discutée (Khanna *et al.*, 2020). Très récemment, un lien a été mis en évidence entre la ségrégation du chromosome par SpoIII^E et le remodelage du PG. Ce lien repose sur une interaction entre SpoIII^E et PbpG (Mohamed *et al.*, 2021). Cependant, SpoIII^E et PbpG semblent faire partie d'un complexe plus large impliquant le complexe IIQ*III^{AA}-AH et SpoIII^M, une protéine nouvellement caractérisée (Mohamed *et al.*, 2021). Ces liens entre SpoIII^E et différentes protéines membranaires pourraient être dus à la fonction de SpoIII^E dans la fission des membranes, qui se produit à la fin de l'engulfment.

Un second facteur, FisB, produit dans la cellule-mère, est requis pour la fission des membranes en fin d'engulfment. Contrairement à SpoIII^E, la délétion de *fisB* est sans impact sur le déroulement normal de l'engulfment (Doan *et al.*, 2013). Par ailleurs, le rôle de FisB dans la fission des membranes a été démontré *in vitro* où FisB permet le remodelage des liposomes (Doan *et al.*, 2013). FisB semble se fixer spécifiquement aux cardiolipines, des lipides enrichis dans les membranes de courbure négative, comme les membranes d'engulfment (Doan *et al.*, 2013). La protéine FisB est positionnée autour de la préspore pendant l'engulfment, mais forme un *foci* net au pôle MCD de la préspore en fin d'engulfment (Doan *et al.*, 2013). Cette position particulière de FisB pourrait être la conséquence de l'accumulation de cardiolipines au pôle MCD de la préspore, où fissionnent les membranes (Doan *et al.*, 2013; Tan and Ramamurthi, 2013). Néanmoins, des études *in vitro* récentes suggèrent que FisB ne possède pas d'affinité particulière pour les membranes de courbures négatives. Seules les capacités de FisB à se fixer aux lipides et à former des oligomères entre molécules positionnées sur des vésicules différentes seraient nécessaires pour réaliser la fission (Landajuela *et al.*, 2021). Ainsi, on peut proposer un modèle de fission des membranes en fin d'engulfment : l'avancée du complexe DMP, soutenu par l'assemblage de complexe IIQ*III^{AA}-AH (Fig. 8) entraîne la progression de projections de membranes sur le pourtour de la préspore (Fig. 7B).

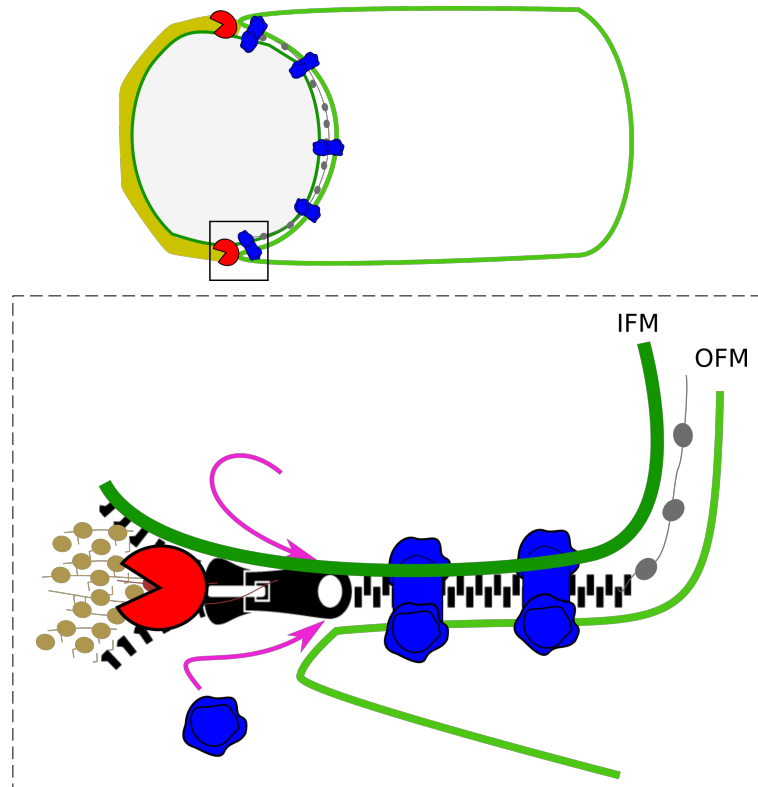


Fig 8. Modèle du mécanisme de migration des membranes de la cellule-mère autour de la présore. En haut est représenté un sporange durant l'étape d'engulfment. Le feuillet marron représente le PG entourant la présore et s'opposant au mouvement des membranes. En bas est représenté comment la formation du complexe IIQ*III AA-AH peut entraîner la migration des membranes sur le front d'engulfment. Le PG entourant la présore est remodelé par le complexe DMP. Cet évènement génère de nouveaux sites d'assemblage pour le complexe IIQ*III AA-AH. A chaque complexe IIQ*III AA-AH assemblé entre la présore et la cellule-mère, la membrane de la cellule-mère est entraînée sur le pourtour de la présore. Ce mécanisme est similaire à une fermeture éclair que l'on zippe. A mesure que la navette avance (IIQ*III AA-AH) les deux glissières se rejoignent (la membrane de la cellule-mère progresse sur celle de la présore). Dans ce modèle, il faut imaginer un morceau de coton (le PG entourant la présore) présent en amont de la navette empêchant sa progression. Le complexe DMP permet d'évacuer cet obstacle.

Arrivées au MCD pôle de la présore, les projections de membranes sont enserrées dans un espace restreint (Fig. 7C). Les molécules de FisB s'accumulent alors aux extrémités de ces membranes (Fig. 7C). La proximité spatiale des différentes projections de membranes permettrait le pontage par trans-oligomérisation des molécules FisB, qui se trouvent au sein des lipides de ces membranes. En résulterait la fission des projections de membranes aboutissant au relargage mécanique de la présore dans la cellule-mère (Fig. 7D).

2.3) L'alternance des facteurs sigma à la fin de l'engulfment.

La fin de l'engulfment marque un changement majeur dans l'expression des gènes du sporange ; elle coïncide avec le début de l'activité du facteur σ^G qui remplace brutalement celle de σ^F (Partridge and Errington, 1993; Mearls *et al.*, 2018). Par ailleurs, une relation directe lie la fin de l'engulfment et l'activation de σ^G . Ainsi, tous les mutants défectueux pour l'engulfment le sont également dans l'activation de σ^G (Smith *et al.*, 1993; Frandsen and Stragier, 1995). Parmi ces mutants, le facteur σ^G est uniquement activé dans le mutant *fisB*, affecté seulement dans la fission des membranes (Doan *et al.*, 2013).

2.3.1) L'activation de SigG est lié à la fin de l'engulfment

Le gène *spoIIIIG* (codant pour σ^G) est transcrit sous le contrôle de σ^F (Fig. 7B) (Sun *et al.*, 1991). Cependant, les molécules de σ^G produites sont maintenues inactives jusqu'à la fin de l'engulfment (Fig. 7B). Aujourd'hui encore, le mécanisme permettant la levée de l'inhibition de σ^G reste mal compris et apparaît comme le résultat d'un ensemble de mécanismes moléculaires fins, intriqués et complexes.

Le fait le plus communément admis est que l'activation de σ^G est dépendante de la formation du tunnel nourricier formé par le complexe IIQ*III^{AA}-AH. Notamment le domaine ATPase de III^{AA} est indispensable à l'activation de σ^G (Illing and Errington, 1991a; Kellner *et al.*, 1996; Sun *et al.*, 2000; Camp and Losick, 2009; Doan *et al.*, 2009). Cependant, le complexe IIQ*III^{AA}-AH est présent dès la formation du septum, alors que σ^G est inactif (Fig. 7B). Cela implique que d'autres paramètres régulent l'activation de σ^G . σ^G est structuralement très similaire à σ^F . Le facteur anti- σ SpoIIAB, qui se fixe à σ^F pour l'inhiber, peut également se fixer à σ^G (Fig. 7B) (Kellner *et al.*, 1996). De façon intéressante, un variant de σ^G incapable de fixer SpoIIAB n'est pas dépendant de l'opéron *spoIII^A* pour son activation (Kellner *et al.*, 1996). Ce résultat suggère que le rôle du complexe IIQ*III^{AA}-AH dans l'activation de σ^G est lié à la levée de l'inhibition par SpoIIAB.

Un autre anti-facteur σ , CsfB, intervient dans l'inhibition de l'activité transcriptionnelle de σ^G . CsfB est synthétisée sous le contrôle de σ^F , mais, contrairement à SpoIIAB, CsfB n'est pas capable d'inhiber l'activité de σ^F (Fig. 7B) (Serrano *et al.*, 2004; Karmazyn-Campelli *et al.*, 2008; Rhayat *et al.*, 2009; Serrano *et al.*, 2011). La protéase LonA intervient également dans l'inhibition de l'activation de σ^G (Fig. 7B) (Schmidt *et al.*, 1994). Ensemble, SpoIIAB, CsfB et LonA empêchent l'activation précoce de σ^G (Fig. 7B), qui est létale pour la cellule (Mearls *et al.*, 2018). Plus récemment, il a été démontré qu'une architecture très particulière de la région promotrice de *sigG* entraîne un retard de l'expression de *sigG* comparé à d'autres gènes sous contrôle de σ^F (Fig. 7B) (Mearls *et al.*, 2018). σ^G est produit plus tard que les autres protéines dont la synthèse dépend de σ^F . De fait, σ^G s'accumule alors que les nombreux inhibiteurs qui le ciblent sont déjà présents dans la préspore (Fig. 7B). La faible quantité de σ^G synthétisée pendant l'engulfment est ainsi maintenue inactive par l'ensemble des inhibiteurs (Fig. 7B). Pour passer outre ces inhibitions, une certaine concentration de σ^G dans la préspore doit être atteinte. En effet, σ^G s'autorégule et contrôle l'expression de *fin*, un anti-facteur sigma qui inhibe l'activité de σ^F (Camp *et al.*, 2011). Le modèle actuel propose que seules les propriétés intrinsèques de *spoIIIIG*, qui entraînent un retard de synthèse, permettent de synchroniser l'activation de σ^G et la fin de l'engulfment (Mearls *et al.*, 2018). Ce modèle ne semble cependant pas pouvoir expliquer l'inactivité de σ^G dans les différents mutants, comme *spoIIQ* ou *spoIIIAH* (Doan *et al.*, 2009) dans lesquels les propriétés intrinsèques de *spoIIIIG* ne sont pas modifiées.

On peut cependant proposer un modèle prenant en compte à la fois (i) le lien entre l'activation de σ^G et le complexe IIQ*III AA-AH, (ii) les propriétés intrinsèques de *spoIIIIG* et (iii) le fait que seul le mutant de l'engulfment *fisB* permettent d'activer σ^G (Fig. 7C). Dans ce modèle, le transit de molécules apportées par la cellule-mère à travers le tunnel IIQ*III AA-AH est nécessaire pour soutenir la transcription de *sigG* sous le contrôle de σ^F (Fig. 7C, étape 1). L'assemblage de SpoIIQ suit la progression de l'engulfment, ainsi le nombre de canaux IIQ*III AA-AH établi entre la cellule-mère et la préspore atteint son maximum au moment de l'achèvement de l'engulfment (Fig. 7B-C, comparez le nombre de tubes bleus sur les schémas de gauche). A ce moment, les ressources transitant à travers les canaux IIQ*III AA-AH atteignent également leur maximum. Cet apport de ressources permet de soutenir la transcription maximale de *sigG* par σ^F et augmente la concentration de σ^G dans la préspore. Alors seulement, σ^G peut passer échapper aux nombreuses inhibitions dont il est la cible (Fig. 7B, étape 2). Dès lors que des molécules de σ^G sont libres d'assurer leur propre transcription, une boucle de régulation positive s'enclenche (Fig. 7B, étape

3). C'est ainsi que l'activation de σ^G pourrait être finement coordonnée avec la fin de l'engulfment. De façon importante, selon ce modèle, dans un mutant *fisB* où la migration des membranes se déroule normalement et que seule la fission est altérée, un nombre suffisant de canaux IIQ*IIIAA-AH pourraient s'assembler. Dans ce cas, les canaux pourraient fournir en quantité suffisante l'élément nécessaire à l'expression de *spoIII*G par σ^F pour atteindre la concentration limite de σ^G nécessaire pour contourner les inhibitions (Fig. 7C).

2.3.2) L'activation de SigK fait suite à l'activation de SigG

Le facteur σ^K est la cible de nombreuses régulations qui empêchent son activation précoce. Premièrement, le gène *spoIVCB-spoIIIC*, codant pour σ^K , est interrompu par un élément de type prophage dit *skin element*. L'excision de *skin* fait intervenir la recombinase SpoIVCA (Stragier *et al.*, 1989; Kunkel *et al.*, 1990). Cependant, la régulation de cette excision n'est pas synchronisée avec l'activation de σ^K , puisque des cellules où le gène *sigK* a été artificiellement reconstitué, sporulent normalement (Kunkel *et al.*, 1990). L'expression de *sigK* et du gène de la recombinase SpoIVCA dépendent du facteur de transcription SpoIIID qui assure leur synthèse vers la fin de l'engulfment (Kunkel *et al.*, 1989; Halberg and Kroos, 1994; Eichenberger *et al.*, 2004). Deuxièmement, σ^K est synthétisé sous forme inactive nommée pro- σ^K (Kroos *et al.*, 1989; Cutting *et al.*, 1990; Lu *et al.*, 1990; Zhang *et al.*, 1998). La pro-séquence de σ^K est clivée par la protéase SpoIVFB (Rudner and Losick, 2002). Cependant, SpoIVFB est elle-même maintenue inactive dans la cellule-mère par BofA et SpoIVFA (Fig. 7A) (Cutting *et al.*, 1990; Ricca *et al.*, 1992; Dong and Cutting, 2003; Ramírez-Guadiana *et al.*, 2018). SpoIVFB, SpoIVFA, BofA et pro- σ^K sont produits sous le contrôle de σ^E et sont positionnées dans la membrane de la cellule-mère (Fig. 7A) (Ramírez-Guadiana *et al.*, 2018). Plusieurs facteurs, sous le contrôle de σ^G , sont nécessaires pour déstabiliser le complexe SpoIVFB-SpoIVFA-BofA-pro- σ^K et permettre de transformer pro- σ^K en σ^K actif (Fig. 7D-E).

Le point de contrôle majeur liant l'activation de σ^K à σ^G est SpoIVB. SpoIVB est une protéase d'abord synthétisée dans la présore, puis est transférée dans l'espace inter-membranaire (Fig. 7D, étape 1, Pacman rose). Une fois dans cet espace, SpoIVB clive SpoIVFA (Fig. 7D, étape 1). Ce clivage a pour effet de déstabiliser le complexe SpoIVFB-IVFA-BofA activant SpoIVFB, qui à son tour clive pro- σ^K ce qui l'active (Fig. 7D, étape 2) (Cutting *et al.*, 1991; Campo and Rudner, 2006; Ramírez-Guadiana *et al.*, 2018). Cependant, bien que SpoIVB soit l'acteur principal du clivage de SpoIVFB, BofC et CtpB interviennent également dans cet événement (Fig. 7D, pacman bleu) (Wakeley *et al.*, 2000; Pan and Losick, 2003; Campo and Rudner, 2006; Mastny

et al., 2013). L'activation de σ^K entraîne la synthèse de CsfB (Fig. 7D, étape 3). Dans le compartiment de la cellule-mère, CsfB inhibe spécifiquement σ^E permettant de finaliser le switch entre σ^E et σ^K (Fig. 7D, étape 3) (Serrano *et al.*, 2015). CsfB a un rôle particulier dans le contrôle de l'activation des facteurs σ de la sporulation. Dans la présore, CsfB se fixe spécifiquement à σ^G empêchant son activité précoce (Fig. 7C, étape 2). Dans la cellule-mère, CsfB inhibe spécifiquement σ^E lorsque σ^K s'active (Fig. 7D, étape 3). Cette présence de CsfB dans les deux compartiments du sporange permet d'empêcher l'activation ectopique de σ^E dans la présore et de σ^G dans la cellule-mère (Serrano *et al.*, 2015). Ce mécanisme renforce l'ensemble des contrôles qui ont lieu durant l'activation des facteurs σ de la sporulation (Fig 6 et 7).

Chapitre 3 : Les différentes couches de la spore de *B. subtilis*

Lorsque l'engulfment est terminé, la présore apparaît comme un protoplaste entouré de deux membranes. C'est sur ce substrat que se développent les différentes couches de la spore. La structure générale d'une spore mature est bien conservée au sein des *Firmicutes* et une coupe transverse se caractérise, de l'intérieur vers l'extérieur, par : le cœur, le cortex et les couches protéiques externes (CPE) (Fig. 9A). L'ensemble de ces structures est détaillé dans les paragraphes suivants.

3.1) Les couches internes de la spore et les déterminants moléculaires de leur formation

Au centre de la spore se trouve le cœur (« core ») déshydraté avec le chromosome, éventuellement des plasmides ainsi que des ARN messagers (Korza *et al.*, 2019). La déshydratation du cœur est en grande partie responsable des propriétés de résistance de la spore (Setlow *et al.*, 2006; Setlow, 2016). Deux facteurs s'accumulent particulièrement dans le cœur, l'acide dipicolinique (DPA) et des petites protéines solubles en milieu acide (ou SASP pour Small Acid Soluble Protein). Les SASPs synthétisées sous le contrôle de σ^G , en se liant à l'ADN, sont responsables de la résistance de la spore aux radiations. Les SASPs fournissent également une source d'acides aminés pour la cellule lors de la germination (Setlow *et al.*, 2000). Le DPA est formé par la DPA synthase composée de deux sous unités, DpaA et DpaB synthétisées sous contrôle de σ^K (Daniel and Errington, 1993). L'accumulation de DPA est importante pour la déshydratation du cœur, mais peut être compensée par un apport exogène pendant la sporulation (Daniel and Errington, 1993). Le cœur est délimité par une membrane interne (ou IFM, pour Inner Forespore Membrane), qui correspond à la membrane de la présore. La membrane interne est surmontée par une large couche de PG, elle-même délimitée par la membrane externe, qui correspond à l'ancienne membrane de la cellule-mère (OFM pour Outer Forespore Membrane).

Le PG de la spore est divisé en une fine paroi (« thin germ cell wall » ou GCW) et une couche épaisse, le cortex. Le GCW semble dérivé du fin feuillet de PG remodelé durant l'engulfment dans l'espace inter-membranaire (Fig. 7, collier de perles gris). Sa structure est proche du PG de cellules végétative et il est à l'origine de la future paroi de la nouvelle cellule après germination (Popham and Bernhards, 2016). Le cortex est composé de PG modifié et

permet de maintenir la déshydratation du cœur de la spore. Il est dégradé lors de la germination sous l'action d'enzymes lytiques. La synthèse du GCW est dirigée par la présore (McPherson *et al.*, 2001) alors que la formation du cortex dépend de σ^k et donc de la cellule-mère (Vasudevan *et al.*, 2007; Popham and Bernhards, 2016).

La synthèse du cortex implique SpoVD, SpoVE, SpoVR et SpoVB (Fig. 9) (Popham and Bernhards, 2016). Deux activités sont nécessaires à la synthèse de PG : une activité glycosyltransferase assurant la polymérisation, et une activité transpeptidase assurant la réticulation (Macheboeuf *et al.*, 2006). Les PBP de classe A contiennent ces deux activités enzymatiques, alors que les PBP de classe B possèdent seulement une activité transpeptidase (Macheboeuf *et al.*, 2006). SpoVD est une PBP de classe B et forme une machinerie de synthèse du PG complète avec SpoVE qui possède une activité glycosyltransferase (Fay *et al.*, 2010; Sjodt *et al.*, 2020). Par ailleurs, SpoVD est positionnée dans la membrane externe sous la dépendance de SpoVE (Fig. 9) (Fay *et al.*, 2010). La fonction de SpoVB dans l'assemblage du cortex reste inconnue. Cependant SpoVB est une flippase et pourrait permettre le passage, à travers la OFM, de précurseurs du PG formés dans la cellule-mère (Meeske *et al.*, 2015). Tout comme les mutants *spoVD* et *spoVE*, le mutant *spoVB* est dépourvu de cortex (Vasudevan *et al.*, 2007). La similitude des phénotypes de ces mutants suggère que SpoVB pourrait appartenir au complexe SpoVD-VE ou être nécessaire à son activité. Enfin, la formation du cortex semble moins affectée par une mutation *spoVR* et le rôle de SpoVR reste inconnu (Beall and Moran, 1994; Vasudevan *et al.*, 2007).

3.2) Le manteau multi-couches de *B. subtilis*

Le manteau protéique (ou coat) apparaît comme la structure la plus externe des spores de *B. subtilis*. C'est une structure très majoritairement protéique, avec environ 80 protéines le composant ou ayant un rôle dans la formation de cette structure (Driks and Eichenberger, 2016). En microscopie électronique, on distingue deux feuillets dans le coat : un coat interne (ou IC pour Inner Coat) d'apparence lamellaire en coupe transverse, et un coat externe, présentant des stries opaques (ou OC pour Outer Coat) (Warth *et al.*, 1963; Driks, 1999). Cependant deux feuillets additionnels ont été décrits. Un feuillet glycoprotéique présent à la surface du manteau externe a été mis en évidence grâce à l'utilisation de rouge de ruthenium (Waller *et al.*, 2004).

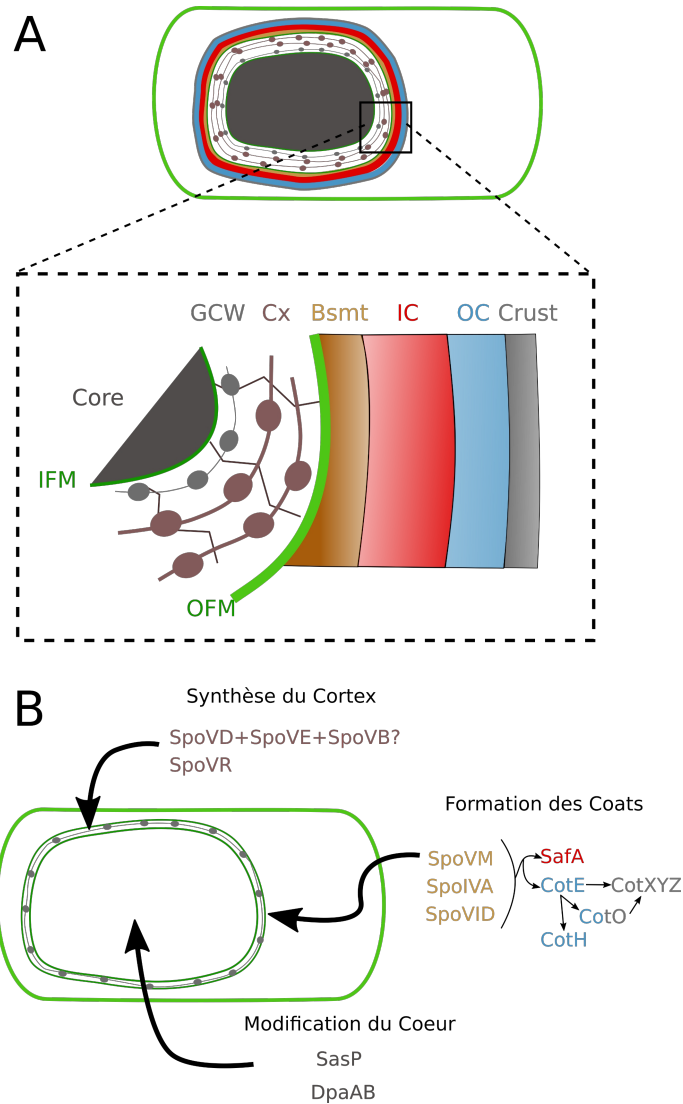


Fig 9. Organisation et déterminants protéiques des couches des spores de *B. subtilis*. (A) En haut est représenté un sporange mature et en bas est un zoom permettant de distinguer les différentes structures des spores. Au centre est le cœur déshydraté contenant l'information génétique. Le cœur est délimité par la membrane interne de la préspore (IFM, ancienne membrane de la préspore). Au dessus de l'IFM est le PG de la spore subdivisée en un fin Germ Cell wall (GCW), possiblement issu du PG persistant dans l'espace inter-membranaire durant l'engulfment. Lors de la germination, le GCW donnera la paroi de la nouvelle cellule. Au dessus du GCW est l'épais cortex, protégeant le cœur de la déshydratation. Le cortex est délimité par la membrane externe de la préspore (OFM, ancienne membrane de la cellule mère). Sur l'OFM, reposent les différents feuillets des coats. Le plancher des coats (Bsmt), surmonté du coat interne (IC) et du coat externe (OC) et enfin le crust, un feuillet glycoprotéique. (B) La modification du cœur repose sur la synthèse des SASPs par la préspore. Ces petites protéines s'associent à l'ADN. De l'acide dipicolinique est synthétisé par l'enzyme DPA synthase formée des deux protéines DpaA-B. Le développement du cortex dépend de SpoVD, SpoVE qui forment un complexe aux activités complémentaires. SpoVB est possiblement présent dans ce complexe. SpoVR est également lié au développement du cortex mais la délétion de *spoVR* a un effet mineur comparé aux autres protéines. Le développement du coat repose sur les protéines morphogénétiques. SpoVM, SpoIVA et SpoVID forment le plancher des coats et sont nécessaires pour l'assemblage de SafA et CotE. SafA permet l'assemblage des protéines qui forment l'IC. CotE dirige l'assemblage de l'OC avec CotH et CotO. CotE et CotO interviennent également dans la mise en place des protéines morphogénétiques du crust CotXYZ.

La composition protéique de ce feuillet nommé « crust » est déterminée (Imamura *et al.*, 2010; McKenney *et al.*, 2010; Imamura *et al.*, 2011). Un groupe de protéines, dont l'assemblage n'est pas impacté par l'absence de protéines des autres couches des coats, possèdent une localisation plus interne et forment un feuillet, qui n'est pas visible directement en MET et constitue le «plancher des coats» (pour « Basement Layer ») (McKenney *et al.*, 2010; McKenney and Eichenberger, 2012; McKenney *et al.*, 2013). Ainsi, le manteau protéique des spores de *B. subtilis* peut être représenté (de l'intérieur vers l'extérieur de la spore) par quatre structures, le basement layer, l'IC, l'OC et le crust (Fig. 9A) (McKenney *et al.*, 2013).

L'assemblage de chacune des couches du manteau protéique de *B. subtilis* repose sur une ou plusieurs protéines dites morphogénétiques, dont la présence est nécessaire pour l'assemblage de sous-ensembles de protéines. Ainsi, les protéines SpoVM, SpoIVA et SpoVID du plancher des coats sont requises pour l'ancrage de l'ensemble des couches supérieures du coat, la protéine SafA est nécessaire pour la formation de l'IC et affecte indirectement l'ancrage de l'OC, la protéine CotE affecte l'assemblage de l'outer coat et du crust et enfin les protéines CotXYZ contrôle l'assemblage du crust (McKenney *et al.*, 2010). Deux protéines affectent dans une moindre mesure l'assemblage de l'OC : (i) CotH qui agit similairement à CotE et dont la surproduction permet de supplémer un mutant *cotE*, et (ii) CotO, un mutant *cotO* produisant des spores avec un phénotype similaire à celui de spores d'un mutant *cotH* (Fig. 9B) (McPherson *et al.*, 2005).

Chapitre 4 : L'assemblage des coats de *B. subtilis*

4.1) La formation des coats repose sur une armature formée de protéines précoces

D'après le schéma original de la sporulation de *B. subtilis* établi par Ryter, l'assemblage des coats est associé au stade V (Fig. 2) (Ryter, 1965), soit après la formation du cortex. Par ailleurs, dans un mutant *sigK*, ni le cortex ni les coats ne sont visibles en microscopie électronique à transmission (TEM) (Piggot and Coote, 1976; Cutting *et al.*, 1991; Errington, 1993). Néanmoins, la formation des coats de *B. subtilis*, comme celle du cortex, est un évènement qui débute précocement durant la sporulation.

4.1.1) Des vagues de transcription génique contrôlent l'encapsulation de la préspore par les protéines des coats

La formation des différents feuillets des coats de *B. subtilis* repose sur le positionnement précoce d'un ensemble de protéines, majoritairement morphogénétiques, dont la synthèse dépend de σ^E (Fig. 10-11) (Henriques and Moran, 2007; McKenney *et al.*, 2013; Driks and Eichenberger, 2016). L'assemblage de ces protéines dite « précoces » constitue une armature autour de la préspore, qui accueillera les protéines synthétisées plus tardivement (McKenney and Eichenberger, 2012; McKenney *et al.*, 2013). Les protéines des coats encapsulent la préspore avec différentes séquences. Ces séquences sont directement dictées par les vagues de transcription qui ont lieu dans la cellule-mère. Un travail minutieux consistant à suivre le positionnement au cours de la sporulation de 41 protéines des coats fusionnées au reporter fluorescent GFP (Green Fluorescent Protein) a permis d'établir six groupes de protéines en fonction de la séquence dans laquelle elles encapsulent la préspore (Wang *et al.*, 2009; McKenney *et al.*, 2010; McKenney and Eichenberger, 2012; McKenney *et al.*, 2013).

La formation de l'armature des coats débute par le positionnement des protéines sous la forme d'un croissant (ou « cap ») à l'emplacement du septum, au moment de sa courbure sous l'effet de la dégradation du PG septal par le complexe DMP (Fig. 10A) (McKenney and Eichenberger, 2012). Cette première étape, nommée « targeting » (ou ciblage) est dirigé par SpoIVA (Fig. 10A, étape 1) (Wang *et al.*, 2009).

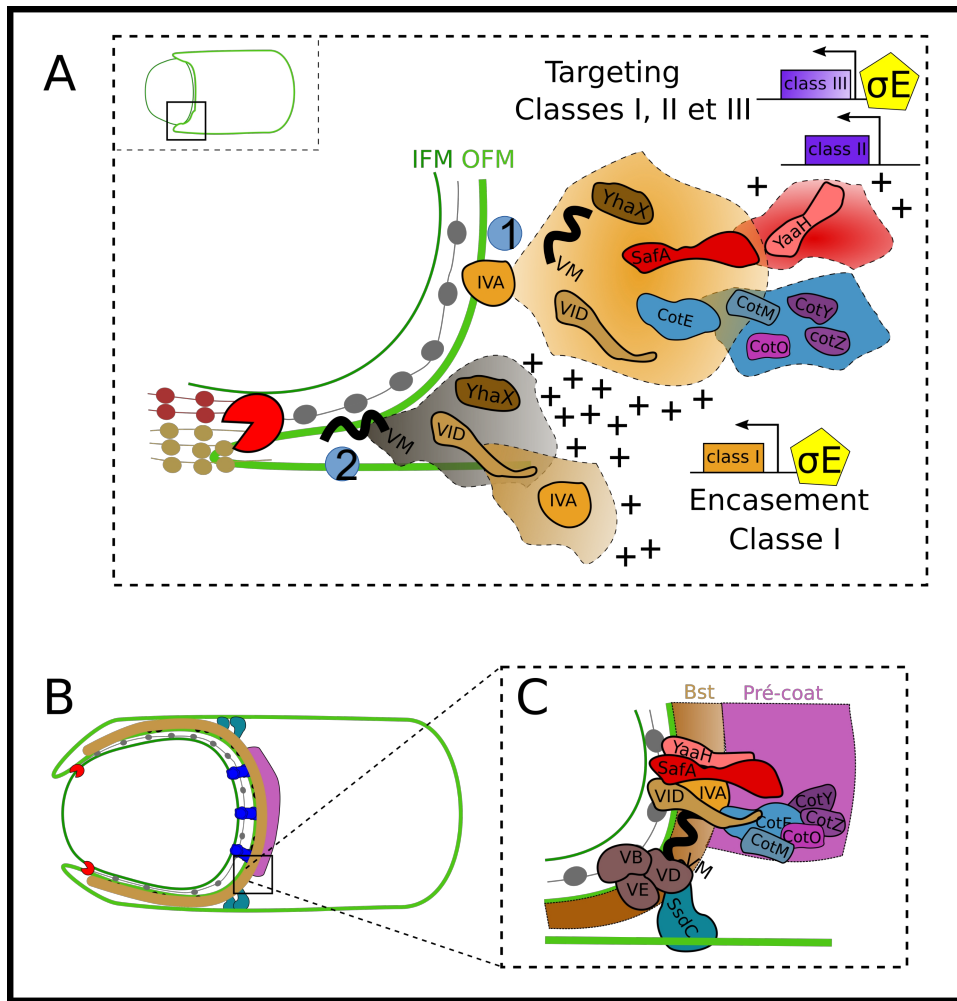


Fig 10. Mise en place du plancher et de l'armature des coats. (A) Représentation des dépendances génétiques guidant l'assemblage du plancher des coats et de la formation de l'armature des coats au MCP pôle de la présore. (1) SpoIVA est nécessaire pour le positionnement sous la forme d'un cap (ou targeting) de l'ensemble des protéines formant l'armature. Une dépendance directe pour SpoIVA est matérialisée par un nuage marron. La dépendance de CotM, CotO, CotY et CotZ pour SpoIVA peut être indirecte du fait de la dépendance de CotE pour SpoIVA. Cette dépendance indirecte est représentée par un nuage bleu. De la même façon un nuage rouge indique une dépendance directe pour SafA et indirect pour SpoIVA. (2) Avec la progression de l'engulfment dirigé par le complexe SpoIIDMP (Pacman rouge), de nouvelles membranes de courbure positives sont générées. SpoVM (VM) s'associe spécifiquement dans ces membranes et entraîne l'encapsulation de la présore par SpoVID (VID) ainsi que d'un groupe de protéine dont fait partie YhaX. L'encapsulation de la présore par SpoVID transmet cette dynamique à SpoIVA. Une dépendance directe de l'encapsulation pour SpoVM est représentée par un nuage gris, et pour SpoVID par un nuage marron. L'étape de targeting par les protéines des classes I, II et III est dictée par σ^E . Contrairement aux protéines de classe II et III, la synthèse sous le contrôle de σ^E est suffisante pour entraîner une encapsulation complète de la présore par les protéines de classe I. Le taux de synthèse des protéines est symbolisée par des « + ». Un schéma général du sporange en haut à gauche représente l'étape de sporulation en cours. (B) L'encapsulation par les protéines de classe I forment le plancher des coats (ou Bst) représenté par un feuillet marron. Le targeting des protéines de classe II-III forme l'armature des coats, matérialisée par un feuillet violet. (C) Organisation finale des protéines au sein des feuilletts. Noter que SpoVM est liée aux précurseurs du cortex ainsi qu'à SsdC.

Le développement de l'armature progresse au fur et à mesure de l'avancée de l'engulfment avec l'encapsulation de la préspore par SpoIVA, SpoVM, SpoVID et YhaX (Fig. 10A, étape 2 et 10B) (McKenney and Eichenberger, 2012). Les protéines qui encapsulent la préspore en suivant l'avancée de l'engulfment sont dites de classe I (Fig. 10A, étape 2 et 10B, feuillet marron) (McKenney and Eichenberger, 2012). Les protéines des classes II et III se positionnent au début de l'engulfment avec les protéines de classe I (Fig. 10A, étape 1), mais ce positionnement sous la forme d'un croissant reste inchangé pendant l'engulfment (Fig. 10B et C, comparez le feuillet marron formé par les protéines de classe I et le feuillet violet formé par les protéines de classe II et III) (McKenney and Eichenberger, 2012). Le positionnement des protéines de classes II et III évolue après l'achèvement de l'engulfment : les protéines de classe II, telles que SafA, CotE et CotO, forment un second cap au MCD pole nouvellement formé, au site de fission des membranes d'engulfment. Ensuite, elles encapsulent la préspore avant que le cœur ne se déshydrate (Fig. 11) (McKenney and Eichenberger, 2012; Nunes *et al.*, 2018). Un second groupe de protéines synthétisées sous le contrôle de σ^k , débute son assemblage lorsque l'engulfment est terminé (McKenney and Eichenberger, 2012). Ces protéines sont qualifiées de « tardives » (ou late) et sont absentes de l'armature des coats (Fig. 10-12) (McKenney and Eichenberger, 2012; McKenzie *et al.*, 2013). Les protéines tardives se distinguent en fonction du moment auquel elles s'associent à la préspore : ainsi, les protéines de classe IV sont détectées dès la fin de l'engulfment, les protéines de la classe V lorsque le cœur de la préspore est déshydraté, apparaissant sombre en microscopie à contraste de phase, et les protéines de classe VI quand la préspore est réfringente (McKenney and Eichenberger, 2012). Les protéines assemblées tardivement sont présentes dans les quatre feuillets des coats de la spore mature de *B. subtilis* (Fig. 12A) (McKenney and Eichenberger, 2012). Cela implique que l'armature des coats reste suffisamment perméable pour permettre l'insertion des protéines tardives (McKenney and Eichenberger, 2012). Il est également possible que l'armature des coats constitue une matrice protéique monocouche. Au sein d'une telle matrice, chacune des protéines morphogénétiques resterait directement accessible pour interagir et guider l'assemblage des protéines synthétisées tardivement. Le fait que l'armature des coats, composée de protéines de l'ensemble des feuillets des coats, ne soit pas détectable directement par MET pendant l'engulfment peut supporter l'hypothèse que l'armature des coats soit une matrice monocouche.

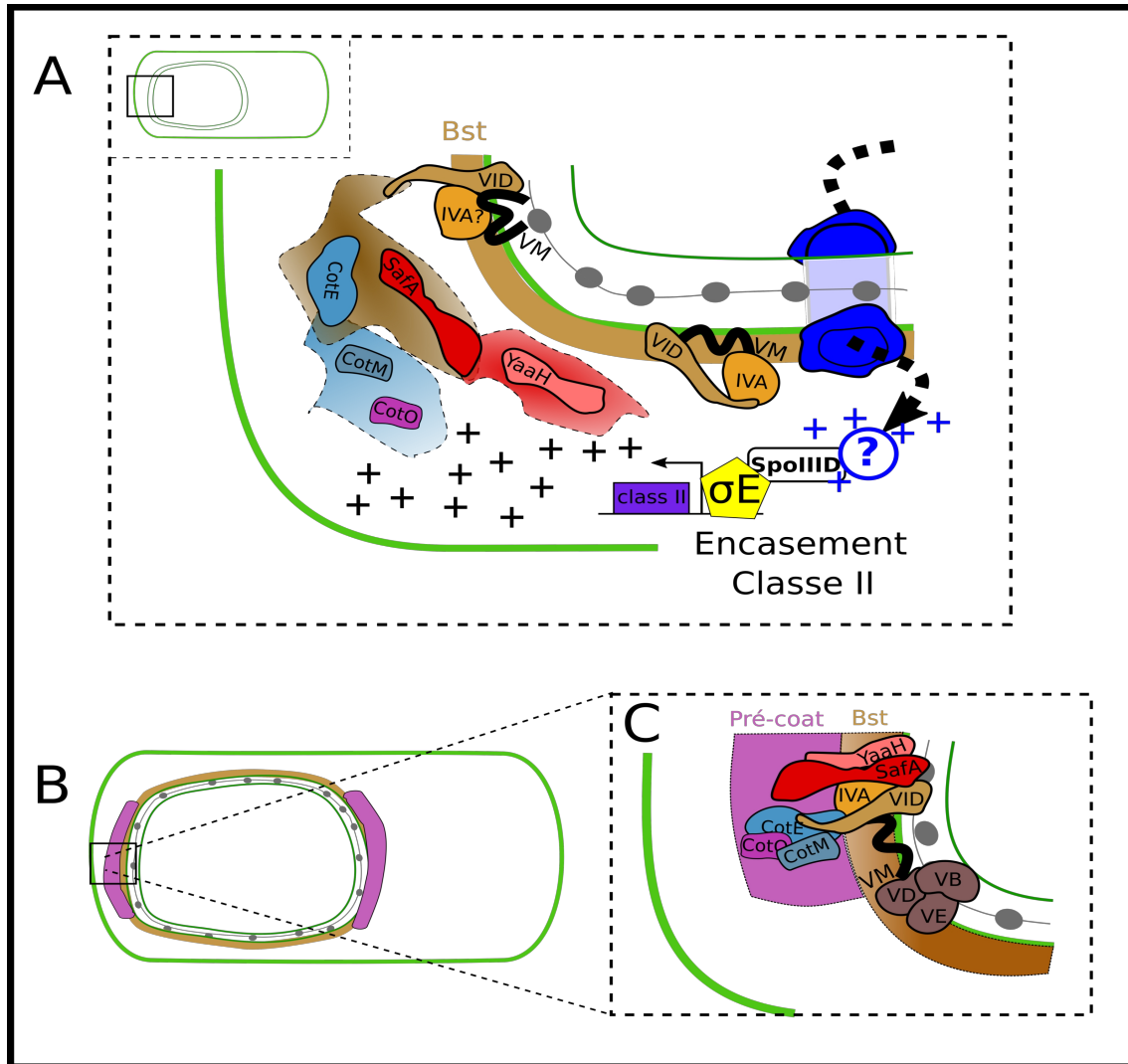


Fig 11. L'encapsulation par les protéines de classe II. (A) Représentation des dépendances génétiques guidant la première étape de l'encapsulation (ou encasement) par les protéines de classe II. Le complexe SpoVM-IVA-VID dessine le feuillet basal autour de la présore (feuillet marron). Cependant SpoVID guide l'assemblage de CotE et SafA seulement au niveau du MCD pôle de la présore. L'insertion de SpoVM dans les membranes dépend du degré de courbures de celles-ci. Dans la région MCD de la présore la membrane est plus convexe que dans les régions latérales. Ainsi la conformation du complexe VM-IVA-VID peut être affectée dans cette région et SpoVID peut-être plus accessible pour interagir avec SafA et CotE. SpoIIQ et SpoIIIAH sont nécessaires pour le positionnement de CotE en un second cap au pôle MCD de la présore (Mckenney and Eichenberger., 2012). Il est possible que le « feeding tube » (ou FT) formé par IIQ et IIIAH (tube bleu) puisse affecter le taux d'expression de *spoIIID*. Cette hypothèse est matérialisée par un symbole « ? » bleu, les symboles « + » bleus représentent une activation par un facteur pouvant transiter (flèche pointillée) par le FT. Les dépendances génétiques directes et indirectes sont représentées similairement à la Fig. 10 par des nuages dont la couleur représente la protéine morphogénétique dirigeant l'assemblage. SafA et CotE interagissent avec SpoVID et transmettent directement la dynamique d'encapsulation à un petit groupe de protéines « accompagnatrices ». Cette nouvelle synthèse de protéines de classe II est dictée par SpoIIID en coordination avec σ^E . (B) Les protéines de classe II synthétisées sous contrôle de σ^E et SpoIIID et dont l'assemblage est guidé par SpoVID au pôle MCD de la présore donnent naissance à une seconde armature au pôle distal de la présore. (C) Organisation finale des protéines au sein des feuillots. 50/136

4.1.2) SpoVM et SpoIVA, une dépendance mutuelle au cœur de la formation du plancher des coats

Parmi l'ensemble des protéines des coats, le mécanisme moléculaire de l'assemblage de SpoIVA et SpoVM est le mieux décrit. SpoIVA, *in vitro*, fixe puis hydrolyse l'ATP entraînant sa polymérisation irréversible en filaments statiques (Ramamurthi and Losick, 2008; Castaing *et al.*, 2013; Wu *et al.*, 2015). Cette activité ATPase est nécessaire pour l'assemblage de SpoIVA pendant la sporulation (Castaing *et al.*, 2013). L'assemblage de SpoIVA autour de la préspore implique SpoVM, une petite protéine formant une hélice amphipathique (Fig. 10) (Levin *et al.*, 1993; Ramamurthi *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2015; Kim *et al.*, 2017; Peluso *et al.*, 2019). SpoVM s'insère préférentiellement dans les membranes de courbure positive (ou convexe), permettant son assemblage au niveau de l'OFM pendant l'engulfment (Fig. 10A) (Ramamurthi and Losick, 2009; Wu *et al.*, 2015; Gill *et al.*, 2015; Kim *et al.*, 2017; Peluso *et al.*, 2019). Dans un triple mutant *spoIID-spoIIM-spoIIP*, incapable de procéder à l'engulfment, du fait de l'absence de membranes courbées positivement, SpoVM se positionne indifféremment dans les membranes de la cellule-mère et au niveau du septum (Ramamurthi *et al.*, 2009). Par ailleurs, dans environ 1 % de la population de ce triple mutant DMP, la membrane de la préspore « perce » à travers le septum, formant une protrusion (ou bulging) dans le cytoplasme de la cellule-mère (Blaylock *et al.*, 2004). Dans ce cas, SpoVM possède une forte affinité pour ces protrusions et se positionne très spécifiquement dans ces membranes fortement convexes (Ramamurthi *et al.*, 2009). Ce résultat démontre que la mauvaise localisation de SpoVM dans le triple mutant DMP n'est pas due à l'absence d'un facteur tierce, mais est un effet spécifique lié à la géométrie des membranes (Ramamurthi *et al.*, 2009).

SpoVM est nécessaire et suffisant à l'assemblage de SpoIVA, comme démontré *in vitro* avec des billes de silice (Wu *et al.*, 2015) et réciproquement, le recrutement de SpoIVA par SpoVM stabilise *in vitro* l'assemblage de SpoVM (Peluso *et al.*, 2019). Il est proposé que SpoIVA forme une « cage » qui empêche le désassemblage de la structure formée par SpoVM (Peluso *et al.*, 2019). Ensemble, par un jeu de stabilisation réciproque, SpoIVA et SpoVM forment la majeure partie du plancher des coats, qui constitue une structure essentielle à l'ancrage des autres feuillettes, assemblés ultérieurement.

4.1.3) Les protéines associées au plancher des coats

D'autres protéines semblent associées au plancher des coats (Driks and Eichenberger, 2016). Le critère principal permettant de déterminer si une protéine fait partie du plancher des coats est son indépendance d'assemblage aux protéines morphogénétique SafA et CotE. Ainsi, YhaX, LipC, CotJABC et SpoVID dépendent seulement de SpoIVA pour leur assemblage (McKenney *et al.*, 2010; McKenney and Eichenberger, 2012; Driks and Eichenberger, 2016). LipC est une phospholipase affectant la germination (Masayama *et al.*, 2007; Masayama *et al.*, 2010). Son assemblage dépend des facteurs tardifs σ^k et GerE, ce qui exclut tout rôle dans la construction du plancher des coats (Fig. 12A) (McKenney and Eichenberger, 2012). La fonction et le positionnement au cours de la sporulation des protéines CotJABC restent inconnues, leur absence n'entraînant pas de défauts visibles dans la structure de la spore, ni dans ses propriétés de résistance (Henriques *et al.*, 1995). Par ailleurs, CotJC est présente dans les espèces *B. cereus*, *B. subtilis* et *C. difficile* (Abhyankar *et al.*, 2013), ce qui suggère que CotJC pourrait intervenir dans un mécanisme clef de la sporulation. De manière similaire, YhaX est une protéine de classe I fortement conservée au sein des *Firmicutes* (Fig. 10A) (McKenney and Eichenberger, 2012, Henriques and Moran, 2007). Puisque la majeure partie des protéines de classe I occupe des fonctions primordiales dans l'assemblage des coats (Henriques and Moran 2007, Driks and Eichenberger, 2016), ce pourrait être le cas également pour YhaX.

CotJC porte un domaine catalase dépendant du manganèse et YhaX possède un domaine HAD (pour holoacide dehydrogénase), cependant aucune donnée n'est disponible pour déterminer si ces domaines sont fonctionnels et s'ils possèdent un rôle dans la sporulation. Le domaine catalase de CotJC est suggéré comme pouvant être impliqué dans la gestion du stress oxydatif rencontré dans l'environnement de sporulation (Henriques *et al.*, 1995; Seyler *et al.*, 1997). Bien que peu décrites, des origines de stress oxydatif endogène existent également (Imlay, 2019). La présence de pseudocatalases synthétisées spécifiquement durant la sporulation suggère que de tels stress pourraient être générés pendant au sein de la cellule en sporulation. De façon intéressante, une superoxyde dismutase (ou SOD), liée au stress oxydatif, est impliquée dans l'assemblage de CotG, une protéine des coats (Henriques *et al.*, 1998). CotJC est détectée précocement pendant la sporulation (Henriques *et al.*, 1995) et tout comme les SOD, CotJC pourrait intervenir dans l'assemblage des coats, mais sa fonction propre pourrait être masquée par d'autres enzymes aux fonctions redondantes.

Un criblage dit « synthetic lethal sporulation screen » (ou SL) visant à identifier des

protéines ayant un rôle vital en absence de *cotJ* permettrait de mieux cerner le rôle de CotJC dans la sporulation. Cette approche pourrait également aider à comprendre la fonction d'YhaX. La méthode de SL a été récemment utilisée avec succès pour démontrer les liens existant (i) entre l'assemblage des coats et du cortex par SsdC et (ii) entre la ségrégation du chromosome et la machinerie de remodelage du PG ayant permis de caractériser SpoIIIIM (Luhur *et al.*, 2020; Mohamed *et al.*, 2021).

4.2) L'encapsulation de la préspore par les protéines des coats

4.2.1) Rôle du complexe protéique SpoVM-IVA-VID

L'étape d'encapsulation de la préspore dépend de SpoVM et SpoVID (Wang *et al.*, 2009) : SpoVID est nécessaire pour l'encapsulation par la majeure partie des protéines des coats et sa propre encapsulation dépend de SpoVM (Wang *et al.*, 2009). L'absence de SpoVID entraîne un phénotype similaire à celui causé par l'absence de SpoIVA : les coats sont bien présentes, mais ne sont pas raccordées à la préspore (Beall *et al.*, 1994, Wang *et al.*, 2009). Alors que SpoVM est capable d'encapsuler la préspore en absence de SpoVID, l'encapsulation par SpoIVA n'est pas possible en absence de SpoVID (Wang *et al.*, 2009). Cette observation montre que l'encapsulation de la préspore par SpoVM n'est pas suffisante pour promouvoir celle de SpoIVA, qui nécessite SpoVID (Wang *et al.*, 2009). Ce résultat peut paraître surprenant car SpoVM est suffisant pour permettre l'assemblage *in vitro* de SpoIVA sur des billes de silice (Ramaturthi *et al.*, 2006, Wu *et al.*, 2015, Kim *et al.*, 2017, Peluso *et al.*, 2019). Ainsi, il est proposé que SpoVM, SpoIVA et SpoVID forment un complexe tripartite (Wang *et al.*, 2009). Dans ce modèle, l'assemblage de chaque composant viendrait stabiliser le pré-assemblage des autres membres du complexe. Au vu de l'effet important de SpoVID sur l'assemblage de SpoIVA *in vivo*, l'étude de l'impact de SpoVID sur l'assemblage de SpoIVA-SpoVM *in vitro* constitue une perspective attrayante.

L'encapsulation de la préspore par SpoVM dirige l'encapsulation par SpoVID, mais également par YhaX, LipC et YsnD (Wang *et al.*, 2009), qui sont capables d'encapsuler la préspore en absence de SpoVID, mais pas en l'absence de SpoVM (Wang *et al.*, 2009). Cette observation montre que les protéines des coats qui participent à l'encapsulation de la préspore peuvent-être divisées en deux sous-groupes : (i) les protéines dont l'encapsulation dépend de SpoVID et (ii) les protéines dont l'encapsulation dépend de SpoVM et pas de SpoVID.

4.2.2) L'interaction de SpoVID avec SafA et CotE est au centre de l'encapsulation par les protéines des coats

Le rôle de SpoVID est lié à son organisation structurale qui a été largement étudiée. SpoVID possède ainsi plusieurs domaines: un domaine N-terminal (ou N-ter, acides aminés 1-137), un domaine M (pour middle, acides aminés 140 à 484) et un domaine C-terminal (ou C-ter, acides aminés 500 à 525) (Costa *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2009; de Francesco *et al.*, 2012; Nunes *et al.*, 2018). Le domaine C-ter est formé d'un domaine LysM de fixation au PG (acides aminés 525-575) et d'un domaine A (acides aminés 500-524) qui interagit avec SpoIVA (Wang *et al.*, 2009). Nécessaire à l'interaction avec SpoIVA, le domaine C-ter de SpoVID est également indispensable pour l'assemblage de SpoVID autour de la préspore (Wang *et al.*, 2009). La fonction du domaine M est inconnue mais est dispensable pour la fonction de SpoVID dans l'encapsulation par les protéines des coats (Wang *et al.*, 2009).

Le domaine N-ter est nécessaire pour diriger l'encapsulation de la préspore par CotE, SafA et par les protéines dont l'assemblage dépend de ces dernières (Wang *et al.*, 2009, De Francesco *et al.*, 2012, Nunes *et al.*, 2018). La partie E, (pour Encasement, acides aminés 125 à 136) du domaine N-ter de SpoVID, interagit directement avec SafA (par L125, I127 et I133) (Nunes *et al.*, 2018) et CotE (par I131 et L127) (De Francesco *et al.*, 2012) et est nécessaire pour l'assemblage de ces protéines autour de la préspore (Ozin *et al.*, 2000; Ozin *et al.*, 2001; Müllerová *et al.*, 2009; de Francesco *et al.*, 2012; Nunes *et al.*, 2018). Une mutation de la L125 dans le domaine E, spécifiquement impliquée dans l'interaction avec SafA, empêche l'encapsulation de la préspore par CotE. De façon intéressante, les mutations affectant l'interaction SpoVID/SafA, tout comme une délétion de *spoVID* donnent des endospores ayant des fragments d'IC mal localisés, qui agiraient comme des attracteurs pour l'assemblage des protéines des couches supérieures des coats (Nunes *et al.*, 2018).

SpoVID interagit par son domaine C-terminal avec SpoIVA et permet, grâce à son domaine LysM, son positionnement sous la forme d'un cap au pôle MCP de la préspore (Wang *et al.*, 2009). Par la suite, SpoVID encapsule la préspore en suivant la progression de SpoVM (Fig. 10) (Wang *et al.*, 2009). Après l'engulfment, SafA et CotE sont synthétisées et recrutées par SpoVID (via la partie E de son domaine Cter) au niveau du pôle MCD de la préspore (Fig. 11) (Ozin *et al.*, 2000; Ozin *et al.*, 2001; Costa *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2009; de Francesco *et al.*, 2012; Qiao *et al.*, 2013; Nunes *et al.*, 2018). L'encapsulation par SafA et CotE crée une plateforme nécessaire pour guider l'assemblage des protéines placées sous leur contrôle (Fig. 11). SpoVID est également

nécessaire pour l'encapsulation de la préspore par les protéines du crust (De Francesco *et al.*, 2012). Cependant cette fonction de SpoVID semble indirecte et reposerait sur l'encapsulation par CotE, qui interagit directement avec les protéines majeures composant le crust (Fig. 12) (McKenney *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2016b; Liu *et al.*, 2016a; Krajčiková *et al.*, 2017).

4.2.3) Des inconnues dans la mise en place du plancher des coats

Le plancher des coats est établi par l'encapsulation du complexe tripartite SpoVM-IVA-VID, qui permet de positionner les protéines morphogénétiques SafA et CotE par interactions directes (Fig. 10-11). Néanmoins, des zones d'ombre persistent concernant ce mécanisme. Ainsi, on ignore si SpoIVA joue un rôle actif dans le phénomène d'encapsulation par SpoVID (Fig. 11A) puisque SpoIVA est nécessaire à l'étape de targeting de SpoVID, elle-même nécessaire à l'étape d'encapsulation par SpoVID. Pour démontrer si SpoIVA intervient dans le mécanisme d'encapsulation par SpoVID, il peut être envisagé de produire SpoIVA en quantité suffisante uniquement pour assurer son propre targeting et celui de SpoVID. Ce test pourrait être réalisé en exprimant SpoIVA sous le contrôle d'un promoteur d'une protéine de classe II, dont l'assemblage est bloqué à un cap pendant l'engulfment. Dans ces conditions, si SpoVID n'est pas capable d'assurer l'encapsulation de la préspore alors qu'elle est correctement positionnée sous la forme d'un cap, cela signifierait que SpoIVA joue un rôle actif dans l'encapsulation et n'est pas limité à assurer le targeting de SpoVID.

De même, on peut se demander pourquoi l'encapsulation de la préspore par SafA et CotE démarre par la formation d'un second croissant au MCD pôle (Fig. 11B couche violette) alors que SpoVM-IVA-VID forme une plateforme complète sur l'ensemble du pourtour de la préspore (Fig. 11, couche marron). Comment expliquer cette affinité particulière pour le second pôle de la préspore qui paraît virtuellement plus distant du centre de la cellule-mère, là où SafA et CotE sont synthétisées ?

Il est proposé que SpoIIQ puisse établir une polarité au sein de la préspore car en absence de SpoIIQ ou SpoIII^{AH}, CotE ne forme pas le second cap au MCD pôle (McKenney and Eichenberger, 2012). Les protéines SpoIIQ et SpoIII^{AH} interviennent dans l'activation de nombreux facteurs de la sporulation et sont notamment impliquées dans l'activation de σ^G (voir chapitre 2). Par ailleurs, l'encapsulation de la préspore par CotE dépend du facteur de transcription SpoIII^D (McKenney and Eichenberger, 2012). Ainsi, le caractère indispensable de SpoIIQ et SpoIII^{AH} pour l'encapsulation par CotE pourrait être lié à une dépendance de

l'expression de SpoIIID pour SpoIIQ et/ou SpoIIIAH (Fig. 11A). Cette hypothèse est en accord avec le fait que l'encapsulation par SpoVM-IVA-VID ne dépend, ni de SpoIIQ, ni de SpoIIIAH ou de SpoIIID (Mckenney and Eichenberger, 2012).

SpoIIID intervient dans le relai entre σ^E et σ^K , en réprimant les gènes contrôlés par σ^E et en activant la synthèse des gènes contrôlant l'activation de σ^K (Henriques and Moran 2007, De Hoon *et al.*, 2010, Mckenney *et al.*, 2013). Le rôle de SpoIIID coïncide donc avec la fin de l'engulfment. Ainsi, il est possible que l'activité de SpoIIID dépende de l'assemblage du complexe IIQ*IIIAA-AH qui semble crucial au même moment pour l'activation de σ^G (Fig. 11A). Cette proposition est supportée par le fait que l'expression de *spoIIQ* précède celle de *spoIIID* (Steil *et al.*, 2005). Ainsi, l'absence du second cap formé par CotE dans un mutant *spoIIQ* ou *spoIIIAH* pourrait être due à un niveau d'expression insuffisant de *cotE*, lié à un problème d'expression de *spoIIID*. D'après ce modèle, l'hypothèse suggérant que SpoIIQ crée une asymétrie dans la préspore ne semble pas pouvoir expliquer l'affinité particulière de CotE, et potentiellement de SafA, pour le second pôle de la préspore.

Une autre possibilité peut expliquer l'assemblage préférentiel de CotE et SafA au pôle MCD plutôt que sur les côtés longitudinaux de la préspore. SpoVM s'insère en profondeur dans les membranes, et cela différemment en fonction leur degré de courbure (Gill *et al.*, 2015). La préspore apparaît comme une structure ovale, en forme de ballon de rugby, dont les pôles sont plus convexes que les parties latérales. Ainsi SpoVM serait insérée différemment aux pôles de la préspore, fortement courbés. Cette insertion différente de SpoVM affecterait la conformation du complexe SpoVM-IVA-VID aux pôles comparativement à la conformation de ce même complexe dans les régions latérales de la préspore (Fig. 11A). La conformation aux pôles du complexe SpoVM-IVA-VID serait plus favorable aux interactions entre SpoVID-SafA et SpoVID-CotE que dans les régions latérales de la préspore, moins courbées (dans la Fig. 11A, les différences de conformation du complexe VM-IVA-VID dans la région MCD et la région latérale de la préspore sont montrées). Une fois les deux pôles de la préspore couverts par SafA et CotE, les deux protéines s'assemblent ensuite par oligomérisation dans les régions latérales de la préspore, moins favorables, mais seules disponibles. Ici aussi il est possible de vérifier ces hypothèses par des expériences de biologie synthétique. Ainsi, sur des billes de silice possédant des degrés de courbures différents (Kim *et al.*, 2017) il faudrait dans un premier temps ajouter SpoVID au pré-assemblage SpoVM-SpoIVA. Ensuite il suffirait de suivre le taux d'association de molécules CotE sur ces billes et voir si le degré de courbures affecte l'association de CotE.

Enfin, il faut noter que certaines protéines dont l'assemblage dépend de SafA ou CotE sont des protéines de classe II. Parmi ces protéines se distinguent YaaH, dont l'assemblage dépend de SafA (Mckenney *et al.*, 2010, Mckenney and Eichenberger, 2012, Nunes *et al.*, 2018), ainsi que CotO et CotM dont l'assemblage dépend de CotE (Fig. 11A) (Mckenney and Eichenberger, 2012). Cette observation montre que l'encapsulation de la préspore par CotE et SafA entraîne directement l'encapsulation par YaaH, CotO et CotM. Les protéines du scaffold sont majoritairement morphogénétiques, c'est à dire nécessaires pour guider l'assemblage de nombreuses protéines synthétisées plus tardivement. A ce titre, on peut s'interroger quand au rôle de YaaH, CotO et CotM qui accompagnent l'assemblage précoce des protéines morphogénétiques. CotO intervient dans l'encapsulation de la préspore par les protéines du crust (Shuster *et al.*, 2019a). CotM et YaaH participent-elles d'une façon similaire à la mise en place des feuillets des coats ?

4.3) L'assemblage du crust

La majorité des protéines morphogénétiques, SpoIVA, SpoVID, CotE, SafA, CotY et CotZ ont montré des capacités à former des oligomères *in vitro* (Krajčiková *et al.*, 2009; Müllerová *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2016a; Liu *et al.*, 2016b). Parmi ces protéines, l'activité de CotY semble au cœur de la construction du crust (Jiang *et al.*, 2015). Le crust est formé suivant une hiérarchie génétique bien précise (Shuster *et al.*, 2019a). La protéine morphogénétique CotZ est en haut de cette hiérarchie et son assemblage dépend seulement de CotE et CotO, deux protéines de l'OC (Shuster *et al.*, 2019a). CotY et CotX dépendent de CotZ et sont nécessaires pour l'assemblage de CgeA, qui est en bas de la cette hiérarchie (Bartels *et al.*, 2019; Shuster *et al.*, 2019a). L'assemblage et la stabilisation de ce réseau protéique font également intervenir la protéine CotW qui forme des fibres, *in vitro*, lorsqu'elle est associée à CotV (Jiang *et al.*, 2015; Bartels *et al.*, 2019).

CotY et CotZ sont des protéines particulièrement riches en résidus cystéine (Mckenney *et al.*, 2010, Imamura *et al.*, 2011), sont capables d'interagir entre elles et la genèse de ponts disulfure entre ces deux protéines pourrait diriger la formation du crust (Krajčiková *et al.*, 2009; Jiang *et al.*, 2015; Krajčiková *et al.*, 2017). CotY forme de larges réseaux cristallins pouvant résister aux conditions de dénaturation les plus drastiques, lorsqu'elle est synthétisée en abondance dans *E. coli* (Jiang *et al.*, 2015). Ces cristaux naturels comportent un motif, en forme de couronne avec six sous-unités autour d'une cavité centrale, qui se répète pour former d'immenses réseaux (Jiang

et al., 2015). Il est probable que CotZ soit associé au réseau formé par CotY lors de la sporulation en raison, (i) des similitudes structurales de CotY et CotZ, (ii) de leur capacité à interagir, (iii) de leur expression sous contrôle du même promoteur, et (iv) de l'assemblage de CotY dépendant de CotZ (Krajčiková *et al.*, 2009; McKenney and Eichenberger, 2012; Jiang *et al.*, 2015; Shuster *et al.*, 2019a). Ces éléments suggèrent également que la dynamique d'assemblage de CotY et CotZ au cours de la sporulation puisse être identique.

Des interactions CotE-CotX, et CotY-CotZ ont été montrées par microscopie de force atomique (AFM) (Liu *et al.*, 2016b; Liu *et al.*, 2016a) et des expériences de double-hybride ultérieures ont confirmé l'interaction CotE-CotY (Krajčiková *et al.*, 2017). Ainsi, l'association de CotE avec l'armature des coats, peut permettre, par des interactions directes, de diriger le positionnement de CotX, CotY et CotZ au cours de la sporulation (Fig. 12). Notamment CotZ (et potentiellement CotY, voir ci-dessus) est décrite comme une protéine de classe III. CotZ s'assemble donc avec un léger retard comparé à CotE et CotO (Fig. 10-12) (McKenney and Eichenberger, 2012). Ainsi, l'assemblage de CotZ (et potentiellement de CotY) s'effectue sur une strate de CotE et de CotO qui encapsule déjà la préspore (Fig. 12). Cette strate de CotE/CotO peut permettre de guider la polymérisation de CotY, et potentiellement CotZ.

4.4) Les modifications post-traductionnelles des protéines de coats

L'assemblage des feuillettes des coats ne se conclut pas lorsque l'encapsulation de la préspore par les protéines qui les forment est terminée (Fig. 12 et 13). Ces protéines sont l'objet d'un ensemble de modifications post-traductionnelles (MPT). La majorité de ces modifications arrivent tardivement dans le processus de sporulation. Certaines de ces MPT interviennent après la libération de la spore. Les modifications affectant les protéines des coats comprennent des pontages (ou cross-links), phosphorylations, glycosylations et clivages protéolytiques. Comment ces modifications peuvent-elles intervenir dans l'assemblage des feuillettes des coats ? Quelle est leur fonction ? C'est à ces questions que nous allons tenter de répondre dans le paragraphe suivant.

4.4.1) Les pontages entre protéines des coats

La transglutaminase Tgl est responsable de pontages affectant majoritairement l'extraction des protéines de l'IC, telles que SafA, SafAC30 (une forme tronquée de *safA*) GerQ et YeeK (Ragkousi and Setlow, 2004; Zilhão *et al.*, 2005; Monroe and Setlow, 2006; Takamatsu *et al.*,

2009; Fernandes *et al.*, 2018; Fernandes *et al.*, 2019). Un pontage entre SpsB et CotR, deux protéines associées aux couches externes de la spore, dépendant de Tgl, a été récemment mis en évidence par une approche protéomique (Ursem *et al.*, 2021). Tgl est synthétisée par l'intermédiaire de σ^k et n'est active qu'après la libération de la spore (Fig. 12B et C) (Ragkousi and Setlow, 2004; Zilhão *et al.*, 2005; Kuwana *et al.*, 2006). Ainsi, Tgl participe à la maturation finale des coats, en préparant les coats à résister aux conditions difficiles que la spore pourrait rencontrer dans l'environnement (Henriques and Moran 2007). L'assemblage de Tgl pendant la sporulation dépend de la présence de ses substrats et de SafA (Fernandes *et al.*, 2018; Fernandes *et al.*, 2019). L'association de Tgl dans les spores dépend également de CotE (Fernandes 2018).

La protéase YabG est également synthétisée sous le contrôle de σ^k et intervient dans la maturation des coats (Fig. 12C). YabG protéolyse notamment SpoIVA et SafA (Fig. 12C) (Takamatsu *et al.*, 2000b; Takamatsu *et al.*, 2000a). SpoIVA est peu détectable dans les spores par Western Blot, mais est mieux détectée en absence de YabG (Takamatsu *et al.*, 2000b). Les modifications dues à YabG pourraient stabiliser les coats assemblés et rendre les protéines des coats moins sensibles à de possibles dégradations externes.

YabG et Tgl coopèrent dans la multimérisation de GerQ où la modification entraînée par YabG préparerait les substrats pour Tgl (Fig. 12C)(Kuwana *et al.*, 2006, Henriques and Moran, 2007). GerQ est normalement pontée par Tgl et forme des multimères. Cependant, en absence de Tgl, GerQ multimérise partiellement, suggérant l'implication d'un autre facteur. En absence de YabG, une faible quantité de multimères de GerQ est observée, indiquant que YabG n'est pas suffisant à lui seul pour la multimérisation de GerQ. Toutefois, l'absence de YabG peut être compensée par une activité plus importante de Tgl. Enfin, en absence de YabG et Tgl, aucun multimère de GerQ n'est détecté (Kuwana *et al.*, 2006). Ces observations montrent que YabG et Tgl agissent ensemble pour la multimérisation de GerQ (Fig. 12C). YabG se positionne de manière coordonnée aux mêmes endroits que YeeK, un autre substrat de Tgl. YeeK semble également protéolysée par YabG *in vivo* (Takamatsu *et al.*, 2009). Ces observations renforcent la possibilité que Tgl et YabG coopèrent dans leurs fonctions.

Des pontages issus de la formation de ponts disulfure entre résidus cystéine semblent jouer un rôle important dans l'assemblage et/ou la maturation des protéines des coats. CotX, CotY et CotZ sont riches en résidus cystéine et forment un ensemble insoluble dans les spores, (Zhang *et al.*, 1993). Par ailleurs, de récentes observations suggèrent l'existence de ponts disulfure au sein de ces protéines (Ursem *et al.*, 2021). De même, des ponts disulfures sont mis en évidence

dans des dimères de CotE et entre CotJA-CotJC dans les spores de *B. subtilis* (Ursem *et al.*, 2021). Néanmoins, le mécanisme de formation de ces pontages est peu décrit, en particulier à quelle étape de la sporulation ils se forment. CotZ, et potentiellement CotY, s'assemblent autour de la présore sous la forme d'un cap à une étape précoce de sporulation (Fig. 10A)(Mckenney and Eichenberger, 2012). La formation de ponts disulfure participe-t-elle au recrutement de ces protéines autour de la présore ou constitue-t-elle un évènement de maturation tardif (Fig. 13)? CotY est capable de former de manière autonome des réseaux protéiques très denses et très étendus et, selon toute vraisemblance, CotZ semble être associée à ces réseaux (Krajčiková *et al.*, 2009; Jiang *et al.*, 2015), sans que l'on sache si ces pontages nécessitent des enzymes dédiées (Fig. 12C). Enfin, l'existence de pontages via des ponts entre des résidus tyrosine pour former des complexes SpsB-CotJB ou CotH-YhbB a récemment été rapportée, là encore le rôle de ces ponts lors du développement des coats et le mécanisme de formation de ces liaisons reste à explorer (Ursem *et al.*, 2021).

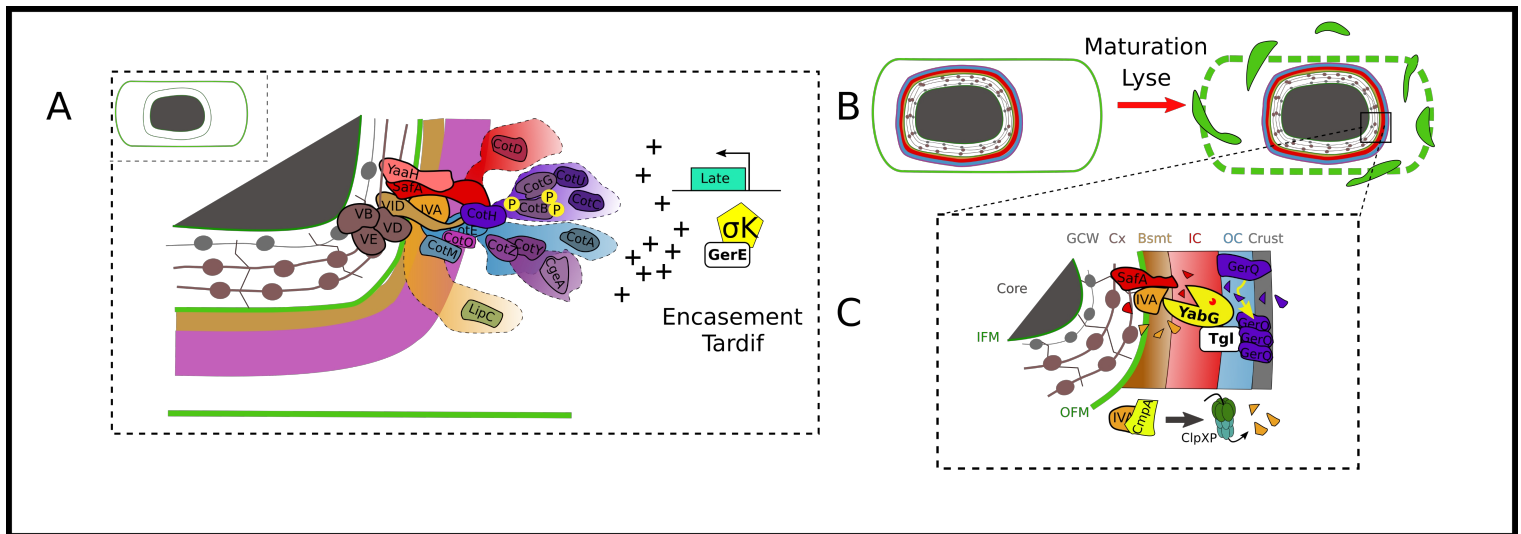


Fig 12. L'encapsulation de la préspore par les protéines tardives et la maturation des coats. (A) Représentation des dépendances guidant les dernières étapes de l'encapsulation par les protéines des coats. Le cœur de la préspore est déshydraté et est surmonté par le cortex. Noter que dans cette représentation, seules les protéines dont l'encapsulation dépend de GerE sont représentées. Ainsi les protéines de classes II dont l'encapsulation ne dépend pas de GerE recouvrent la préspore sous la forme d'une armature (couche violette). Les différentes protéines morphogénétiques pré-assemblées guident l'assemblage des protéines nouvellement synthétisées sous le contrôle de σ^k et GerE. Des protéines présentes dans l'ensemble des futurs feuillettes de la spore sont installées. Notez que les protéines dont l'assemblage dépend de CotE peuvent être subdivisées en protéines dont l'assemblage dépend (i) de CotH et de son activité de phosphorylation (représentée par des « P » jaunes) (ii) de CotYZ et qui constituent le crust (iii) ni de CotH ni de CotXZ. (B) L'insertion des protéines tardives donne naissance aux différents feuillettes des coats. Néanmoins les coats subissent des MPT avant et après lyse de la cellule-mère. (C) SpoIVA et SafA sont protéolysés par YabG (Pacman jaune). La protéolyse de GerQ par YabG est liée à la multimerisation de GerQ par Tgl. A ce stade, on constate généralement une absence de SpoIVA dans les spores matures. Les formes clivées de SpoIVA pourraient être reconnues par CmpA, qui les adresse à la machinerie de dégradation ClpXP. En fin de sporulation, CmpA semble lui-même dégradé sous le contrôle de σ^k . Le crust est représenté en gris, les coats externes (ou OC) en bleu, les coats internes (ou IC) en rouge et la couche basale des coats (ou Bsmt) en marron. Les feuillettes de PG sont également représentés, avec le Germ Cell Wall (ou GCW) par un collier de perle gris et le cortex (ou Cx) par un collier de perle gris/rose le cortex (ou Cx).

4.4.2) Les protéines kinases et leurs rôles dans la formation des coats

CotH est protéine morphogénétique et une kinase capable de phosphoryler CotG et CotB (Fig. 12A) (Nguyen *et al.*, 2016; Freitas *et al.*, 2020). L'activité kinase de CotH est par ailleurs nécessaire à sa fonction morphogénétique et intervient pendant la sporulation contrairement aux MPTd énumérées préalablement (Fig. 12A) (Zilaho *et al.*, 2005, Nguyen *et al.*, 2016, Freitas *et al.*, 2020). Il est proposé que la phosphorylation par CotH stabilise les protéines de coats, particulièrement sensibles à la protéolyse (Freitas *et al.*, 2020). Les protéines CotH, CotG et CotB forment un cluster conservé au sein des *Firmicutes* (Galperin *et al.*, 2012; Secaira-Morocho *et al.*, 2020). CotH et CotG sont impliquées dans la morphogenèse de l'OC et de la formation de ses stries denses, pour laquelle CotG joue un rôle majeur (Henriques and Moran, 2007, Freitas *et al.*, 2020). CotH détermine l'assemblage de CotG et de CotB dans la spore (Zilhão *et al.*, 2004; Saggese *et al.*, 2014). De manière coordonnée avec CotG, CotH phosphoryle de nombreux résidus de CotB (Freitas *et al.*, 2020). CotH est également nécessaire pour l'assemblage de CotC et CotU, protéines homologues de l'OC et capables de former des hétérodimères (Fig. 12A) (Baccigalupi *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2006; Istatico *et al.*, 2008; Istatico *et al.*, 2010; Saggese *et al.*, 2014). CotC et CotU semblent être la cible de MPT car sont extraites sous différentes formes protéiques, mais on ignore si elles sont phosphorylées par CotH. De façon surprenante, CotG et CotH ont une action antagoniste dans l'assemblage de CotC et CotU : en absence de CotH, les dimères CotC-CotU ne sont pas détectés mais le sont dans un double mutant *cotH-cotG* (Saggese *et al.*, 2014). Ce résultat suggère également qu'un autre facteur permet l'assemblage de CotC-CotU dans le double mutant *cotH-cotG*. Il reste difficile de comprendre le rôle joué par CotG dans l'assemblage de CotC-CotU et comment CotG s'oppose à l'action de CotH dans cette situation.

De façon intéressante, CotH interagit avec CotE et la fonction morphogénétique de CotE peut être compensée en grande partie par une surproduction de CotH dans un mutant *cotE* (Istatico *et al.*, 2013; Istatico *et al.*, 2015). En effet, CotB, CotG, CotC et CotU ne sont pas détectées dans des spores d'un mutant *cotE* mais la surproduction de CotH permet de les détecter à nouveau. Cependant certaines protéines telles que CotA, une autre protéine de l'OC ne peut être assemblée dans un mutant *cotE* malgré une sur-expression de CotH (Istatico *et al.*, 2013). Ces résultats suggèrent que CotH permet d'assembler un module de protéines de l'OC, qui dépendent donc indirectement de CotE pour leur assemblage (Fig. 12A), l'assemblage de CotH dépendant lui-même de CotE (Kim *et al.*, 2006).

Enfin, d'autres protéines des coats, telles que, CotS et CotI, YsxE, YutH, portent des

domaines kinases-like sans que leur activité n'ait été encore démontré et leur substrat déterminé (Scheeff *et al.*, 2010). Les domaines kinases de CotS et CotI sont particulièrement conservés au sein des *Firmicutes* et CotI est capable de fixer l'adénosine, suggérant que son domaine kinase peut être actif (Scheefe *et al.*, 2010). CotS et CotI font partie du régulon σ^k et sont positionnées dans l'OC (Takamatsu *et al.*, 1998; McKenney and Eichenberger, 2012; Krajčiková *et al.*, 2017; Steil *et al.*, 2005). YsxE et YutH s'assemblent précocement et sont des protéines de classe III, dont l'assemblage dépend de SafA (Mckenney and Eichenberger, 2012). Notamment, *ysxE* est en opéron avec *spoVID*, ce qui suggère une fonction pendant les étapes précoces de l'assemblage des coats (Beall and Moran, 1994). Contrairement à CotH, l'absence de CotS ou YsxE n'entraîne pas de défaut d'assemblage de la spore (Beall and Moran, 1994; Takamatsu *et al.*, 1998). Toutes deux régulées par σ^k , positionnées dans l'OC, CotS et CotI pourraient être des kinases aux fonctions redondantes. De même, YsxE et YutH partagent une même dynamique d'assemblage et sont toutes deux dépendantes de SafA pour leur assemblage. L'analyse d'une double délétion *cotI-cotS* et *ysxE-yutH* permettrait de mieux comprendre le rôle de ces protéines au cours de la sporulation et si leurs actions interviennent dans la formation des coats.

4.4.3) Les glycosylations et la formation des coats

La glycosylation est une MPT décrite pour les protéines des coats de *B. subtilis* et de très récentes études ont considérablement amélioré notre connaissance de ces mécanismes et les acteurs impliqués (Bartels *et al.*, 2019; Shuster *et al.*, 2019a; Shuster *et al.*, 2019b; Dubois *et al.*, 2020). Le crust apparaît comme une structure glycoprotéique, révélée par coloration au rouge de ruthénium (Waller *et al.*, 2004). Ainsi, une couche de polysaccharides (PS) est présente à la surface des spores de *B. subtilis* et pourrait décorer le crust (Faille *et al.*, 2014). Dans ce sens, les protéines CotX, CotV, CotY et CotZ du crust contiennent toutes un motif de glycosylation (Fig. 13) (Bartels *et al.*, 2019).

Plusieurs clusters de gènes, *spsABCDEFGHIJKL*, *spsM*, *yfnHGF*, *yfnED*, *ytdA*, *yticABC*, *cgeAB*, *cgeCDE*, interviennent dans la synthèse des PS présents à la surface des spores de *B. subtilis*, leur absence seule ou en combinaison, pouvant entraîner des modifications de phénotypes très marquées (Fig. 13) (Plata *et al.*, 2012; Abe *et al.*, 2014; Cangiano *et al.*, 2014; Arrieta-Ortiz *et al.*, 2015; Bartels *et al.*, 2019; Shuster *et al.*, 2019a; Shuster *et al.*, 2019b; Dubois *et al.*, 2020). Les gènes *sps IJKL* interviennent dans la biosynthèse du rhamnose, un sucre présent à la surface des spores de *B. subtilis*, et du groupe *B. cereus* (Plata *et al.*, 2012; Cangiano *et al.*, 2014; Arrieta-Ortiz *et al.*,

2015; Shuster *et al.*, 2019b). L'absence de l'un de ces gènes modifie la structure des PS à la surface de la spore, la rend plus fortement hydrophobe et réduit la taille du crust qui devient à peine visible (Shuster *et al.*, 2019b). Néanmoins, en l'absence de SpsI, les protéines structurales du crust, CgeA, CotX, CotY et CotZ se positionnent normalement autour de la spore (Shuster *et al.*, 2019b). De façon intéressante, SpsI et SpsK sont positionnées directement dans les coats, avec SpsI associée spécifiquement à l'OC car son assemblage dépend de CotE mais pas de CotXYZ (Fig. 13) (Arrieta-Ortiz *et al.*, 2015).

Les protéines codées par les gènes *spsA-G*, interviennent avec SpsM dans la synthèse et le transfert d'un acide nonulosonique, l'acide legionaminique (ou leg) à la surface du crust (Dubois *et al.*, 2020). SpsC, SpsD, SpsE et SpsG sont impliquées dans la synthèse du leg et SpsF dans son transfert à la surface de la préspore. La fonction de SpsA et SpsB reste à élucider mais leur absence, ainsi que celle de l'un ou plusieurs composants de cette voie de biosynthèse, augmentent considérablement l'hydrophobicité des spores (Dubois *et al.*, 2020). La structure des PS recouvrant la spore est également fortement perturbée, et seul un fin feuillet, correspondant à des fragments du crust, est présent à la surface des pôles de ces spores mutantes (Dubois *et al.*, 2020). Ainsi, la glycosylation apparaît importante pour l'assemblage même du crust. Néanmoins, les gènes *spsA-F* n'interviennent pas, ou seulement en partie, dans la formation des PS aux pôles qui semble donc faire intervenir d'autres facteurs.

Les gènes du cluster *yfnHGFED* semblent avoir une activité antagoniste à celle des gènes de l'opéron *spsA-L* : en absence des gènes *spsA-L*, la taille du feuillet de PS à la surface des spores est réduite alors qu'en absence des gènes *yfnHGFED* le feuillet de PS couvre les spores est plus étendue (Shuster *et al.*, 2019 b, Bartels *et al.*, 2019). De plus, les effets d'une délétion affectant le cluster *yfn* peuvent être partiellement annulés par une seconde mutation affectant *spsI* ou *spsA-L* (Shuster *et al.*, 2019b, Bartels *et al.*, 2019). Ces résultats suggèrent que les opérons *yfnH-D* et *spsA-L* puissent coopérer dans leur fonction de synthèse et de modifications des PS présents à la surface des spores.

Les protéines codées par l'opéron *cgeAB* interviennent dans la formation du crust, CgeA étant un composant structural (Imamura *et al.*, 2010; Imamura *et al.*, 2011; Shuster *et al.*, 2019a). En absence de CgeA ou CgeB, les spores deviennent très hydrophobes (Roels and Losick, 1995; Shuster *et al.*, 2019a). Par ailleurs le crust disparaît en MET en absence de CgeB et de CgeA/CgeB, alors qu'il reste présent, mais dans une forme « ballonnée », en absence de CgeA seule (Shuster *et al.*, 2019a).

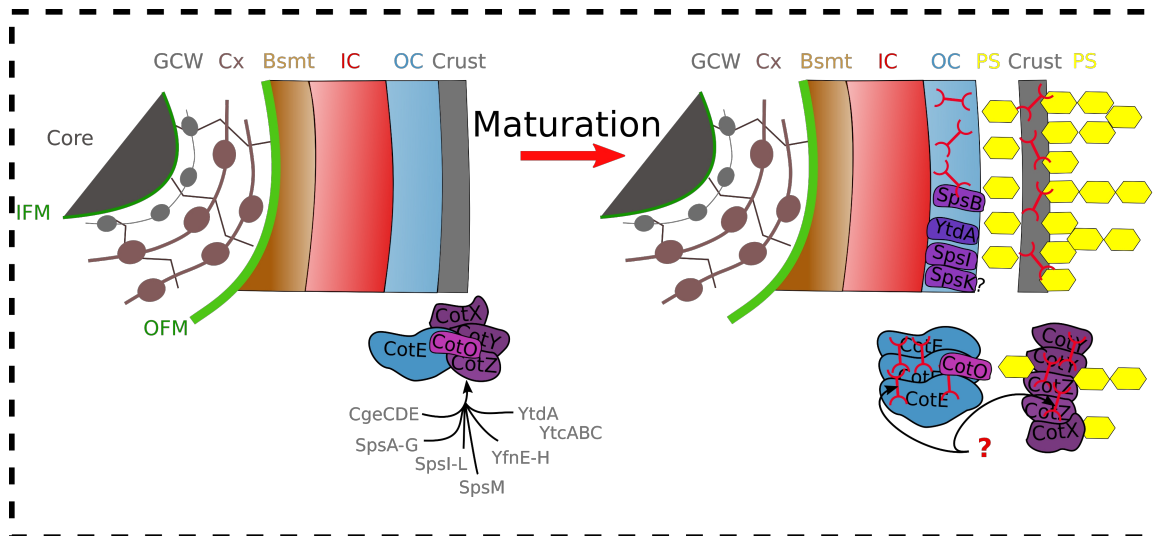


Fig 13. Les modifications post-traductionnelle qui affectent le crust. Un ensemble de protéines est impliqué dans la synthèse du polysaccharide (PS ; hexagone jaune) présent à la surface du crust. Les trois protéines du complexe CotXYZ sont associées au sein d'une fraction insoluble et leur assemblage dépend d'interactions avec CotE et CotO. CotXYZ portent des motifs de glycosylation qui pourraient être les cibles des protéines de glycosylation (en caractères gris). Dans certains mutants dépourvus des gènes de la glycosylation, le crust n'est pas détectable par MET mais les protéines CotXYZ encapsulent la présspore. Ainsi il est possible qu'une glycolysation de CotXYZ affecte le complexe CotE-CotO-CotXYZ. La présence de PS à la surface du crust et une relative séparation du crust de l'outer coat (OC) pourrait permettre la visualisation du crust par MET. Un certain nombre de protéines impliquées dans la glycosylation du crust sont positionnées dans l'OC mais celle de SpsK n'a pas cependant pas été confirmée. Des ponts disulfures entre dimères de CotE, et entre les protéines CotXYZ sont matérialisés par des symboles rouges. Des enzymes pourrait être impliquées dans la génération d'un environnement propice à la formation des ponts di-sulfures.

Malgré une apparente absence de crust, le positionnement des protéines structurales qui le constituent n'est pas modifié dans un double mutant *cgeAB* (Shuster *et al.*, 2019a). De façon intéressante, la délétion de *cgeB* permet de contourner en partie la délétion affectant les gènes du cluster *yfn*, montrant, là aussi, les interconnexions existant entre les différents clusters de gènes impliqués dans la formation des PS de la spore (Fig. 13) (Bartels *et al.*, 2019). Il faut noter qu'une délétion de l'operon *cgeCDE*, situé en aval de *cgeAB*, n'induit pas de changements significatifs de l'hydrophobicité de la spore (Roels and Losick, 1995, Shuster *et al.*, 2019b), la délétion de *cgeD* entraînant un phénotype proche de celui de *yfnH*, *i.e.* une expansion du PS (Shuster *et al.*, 2019b, Bartels *et al.*, 2019). Enfin, une délétion du cluster *ytdA-ytcABC* n'affecte pas les propriétés d'hydrophobicité de la spore mais perturbe la structure de l'OC (Shuster *et al.*, 2019b, Bartels *et al.*, 2019), YtdA étant positionné dans l'OC, comme son paralogue SpsI (Arrieta-Ortiz *et al.*, 2015).

A l'exception de *yfnED*, l'ensemble des gènes intervenant dans la formation du PS présent à la surface des spores sont exprimés sous contrôle du facteur tardif σ^k (Roels and Losick, 1995; Eichenberger *et al.*, 2004; Arrieta-Ortiz *et al.*, 2015; Bartels *et al.*, 2019; Shuster *et al.*, 2019a; Shuster *et al.*, 2019b). Ainsi, ces glycosylations ne peuvent être impliquées dans la formation de l'armature des coats, qui apparaît précocement dans le processus de sporulation. Néanmoins, l'assemblage des protéines morphogénétiques du crust est un événement en partie tardif, dépendant de σ^k et GerE (Mckenney and Eichenberger, 2012). Il est donc possible que l'activité des enzymes de glycosylation puisse intervenir dans l'assemblage des protéines des coats, comme le suggère l'observation de fragments de crust aux pôles des spores d'un mutant *spsA-F* (Dubois *et al.*, 2020).

4.4.4) Une hypothèse pour expliquer le rôle de la glycosylation dans la formation du crust

Au regard des connaissances récemment acquises et présentées dans le paragraphe 4.4.3, un résultat est intrigant : le crust n'est pas visible, en partie ou totalement, dans les images de MET des mutants *cgeAB* et *spsI*, alors que l'assemblage des protéines structurales du crust CotX, CotY, CotZ et CgeA n'est pas modifié (Shuster *et al.*, 2019 a,b). L'assemblage des protéines CotXYZ dépend prioritairement de CotE avec lesquelles elles interagissent (Mckenney *et al.*, 2010, Krajcikova *et al.*, 2017, Shuster *et al.*, 2019a). On peut ainsi supposer que les protéines CotXYZ

sont associées à CotE dans les mutants *cgeAB* et *spsI* où le crust n'est pas visible (Shuster *et al.*, 2019 a,b). Néanmoins, un évènement faisant intervenir la glycosylation rend le crust indétectable par MET dans ces mutants. On peut formuler l'hypothèse que les protéines CotXYZ sous forme glycosylées ne seraient plus capable d'interagir avec CotE (nécessaire à leur encapsulation), ce qui entraînerait leur séparation de l'OC (Fig. 13). Cette hypothèse peut également expliquer la dépendance de l'assemblage de SpsI et YtdA pour CotE, ainsi que l'association de SpsB avec CotR, une protéine de l'OC (Arrieta-Ortiz *et al.*, 2015, Ursem *et al.*, 2021). En effet le positionnement de ces protéines impliquées dans la maturation du crust au niveau de l'OC plutôt que dans le crust lui-même suggère que les glycosylations intervenant dans la formation du PS à la surface des spores ont lieu au niveau de l'OC.

4.5) Les connexions entre la mise en place de l'armature des coats et l'assemblage du cortex

L'assemblage du cortex, comme celui des coats, dépend de σ^k (Errington, 1993). Les premières descriptions de mutants dépourvus des protéines morphogénétiques des coats ont montré un lien entre l'assemblage des coats et celui du cortex. Le développement du cortex est également lié à SpoVB-E-D et SpoVR, des protéines synthétisées sous contrôle de σ^E (voir chapitre 3) (Beall and Moran, 1994; Popham and Bernhards, 2016; Steil *et al.*, 2005.). Ainsi les acteurs de la formation du cortex paraissent s'assembler de façon concomitante à la formation de l'armature des coats.

4.5.1) Le contrôle qualité de l'assemblage de SpoIVA et la synthèse du cortex

Plusieurs études ont établi les relations existant entre l'assemblage de SpoVM-IVA et l'initiation de la synthèse du cortex. Il faut noter qu'en absence de SpoVID, présent dans le plancher des coats avec SpoVM et SpoIVA, le cortex s'assemble (Beall and Moran, 1994). Par ailleurs, dans un mutant *spoVID*, l'assemblage de SpoIVA autour de la préspore est stoppé à la formation d'un cap au MCP pole (Wang *et al.*, 2009). On peut déduire de ce résultat que seul l'assemblage de SpoIVA sous la forme d'un cap est nécessaire à l'assemblage du cortex. SpoVM est la protéine qui lie les changements de géométrie des membranes à l'assemblage des coats. Les liens entre SpoVM et la formation du cortex ont reçu une attention particulière du fait du positionnement de SpoVM au sein des membranes où sont présents les précurseurs protéiques

de la synthèse du cortex. Une étude a déterminé que l'allèle *spoVM_{II5A}* permet la formation des coats mais empêche l'assemblage du cortex (Ebmeier *et al.*, 2012). Une recherche de mutation compensatrice de *spoVM_{II5A}* a permis d'identifier la protéine CmpA (pour Cortex Morphogenetic Protein) (Ebmeier *et al.*, 2012). CmpA est synthétisée sous le contrôle de σ^E et SpoIIID, et son l'assemblage dépend partiellement de SpoVM et fortement de SpoIVA (Ebmeier *et al.*, 2012; Tan *et al.*, 2015). CmpA est un adaptateur permettant d'adresser SpoIVA à la machinerie protéolytique ClpXP lorsqu'une anomalie dans la formation de la préspore est constatée (Fig. 12C) (Tan *et al.*, 2015), interrompant ainsi le process de sporulation. Si la formation de la préspore se déroule normalement, CmpA est protéolysée par une protease non identifiée mais certainement synthétisée sous contrôle de σ^K (Ebmeier *et al.*, 2012, Tan *et al.*, 2015).

On peut faire un rapprochement entre la disparition de SpoIVA des spores matures, un évènement dépendant de YabG, et l'adressage de SpoIVA par CmpA au complexe ClpXP. Ainsi la dégradation de SpoIVA en fin de sporulation pourrait impliquer YabG et CmpA (Fig. 12C). Dans cette hypothèse, le clivage induit par YabG constituerait un marquage de SpoIVA, qui serait alors reconnue par CmpA, qui l'adresserait alors à la machinerie ClpXP pour dégradation (Fig. 12C).

4.5.2) Les liens directs entre SpoVM et la machinerie de synthèse du cortex

Récemment, la capacité de SpoVM et SpoIVA à interagir avec SpoVB, VD ou VE a été examinée afin de déterminer la nature du lien entre les protéines la formation du coat et celle du cortex (Krajčiková *et al.*, 2021). Une interaction convaincante SpoVM-SpoVD et une interaction plus faible SpoVM-SpoVE ont été mises en évidence par des expériences de double hydride bactérien (Krajčiková *et al.*, 2021). SpoVE et SpoVD possèdent chacune *a minima* un segment transmembranaire et sont placées dans l'OFM (Fay *et al.*, 2010), où elles sont potentiellement au contact de SpoVM (Fig. 10). Par ailleurs, il est établi que le positionnement de SpoVD dans la préspore dépend partiellement de SpoVM (Krajčiková *et al.*, 2021). Ce lien entre assemblage d'un précurseur de la formation du cortex et SpoVM peut expliquer le caractère indispensable de SpoVM à l'assemblage du cortex (Krajčiková *et al.*, 2021).

Enfin, un dernier lien entre l'assemblage des coats et la morphogenèse du cortex a été mis en évidence très récemment : la délétion du gène de la protéine SsdC, anciennement YdcC affecte la formation du cortex (Luhur *et al.*, 2020). Par ailleurs, l'assemblage de SsdC requiert SpoVM et SpoIVA (Fig. 10). Ensemble, SpoVM, SpoIVA et SsdC formeraient une connexion entre les coats et le cortex (Luhur *et al.*, 2020).

Ainsi, SpoVM et SpoIVA (i) sont directement impliquées dans l'assemblage des protéines de la synthèse du cortex au niveau de l'OFM, (ii) forment un checkpoint pour le démarrage de la synthèse du cortex, via CmpA et (iii) sont également requises d'une façon plus complexe dans le contrôle de la formation du cortex par l'assemblage de SsdC. SpoVM est partiellement requis pour l'assemblage de SpoVD. Il est possible que la formation du plancher des coats au-dessus de l'OFM puisse consolider l'association de la machinerie SpoVBDE autour de la préspore, empêchant ainsi de possibles « désassemblages » de SpoVBDE, comme observés dans le mutant *spoVM* (Krajčíková *et al.*, 2021). Par ailleurs, le positionnement de SsdC est très particulier : en forme de disque à l'emplacement du pôle MCP, et semble absente du MCD de la préspore (Luhur *et al.*, 2020). On peut rapprocher ce positionnement de SsdC avec le fait que seul l'assemblage de SpoIVA en un unique cap à l'emplacement du pôle MCP apparaît nécessaire pour l'assemblage du cortex (voir précédemment). Ainsi, le cap formé par les protéines de l'armature des coats au MCP pole de la préspore semble constituer un centre névralgique pour la mise en place du cortex.

Chapitre 5 : l'assemblage des couches protéiques externes des spores du groupe *B. cereus*

5.1) Structure et fonction des couches protéiques externes des spores du groupe *B. cereus*

5.1.1) Le coat, l'interspace et l'exosporium

L'exosporium est une structure lâche, irrégulière ayant l'apparence d'un ballon dans lequel « flotterait » la spore (Fig. 14). Les seules estimations disponibles sur la composition de l'exosporium de *B. cereus* indiquent que cette structure est majoritairement protéique, à hauteur de 52 %, composé également de 20 % polysaccharides, de 18 % lipides et 4 % d'autres composés (Matz *et al.*, 1970). L'exosporium est subdivisé en 2 couches principales ; un feuillet basal cristallin surmonté d'une bordure en brosse (ou hairy nap) (Fig. 14B et 14C) (Ball *et al.*, 2008). La bordure en brosse est composée de filaments dont la longueur varie d'une souche à l'autre (Sylvestre *et al.*, 2003). Chez *B. cereus* ATCC 14579, les filaments présents à la surface de la bordure en brosse mesurent entre 25 et 36 nm de long (Faille *et al.*, 2010; Lequette *et al.*, 2011a). La bordure en brosse des spores de *B. anthracis* est plus prononcée et la longueur des filaments atteint 60 nm (Faille *et al.*, 2010). En microscopie électronique, le feuillet basal de l'exosporium apparaît constitué de nombreux hexamères organisés individuellement en couronne, chacune entourant une cavité d'un diamètre compris entre 24 et 36 Å (Ball *et al.*, 2008). Cet hexamère en couronne forme un motif conservé au sein du groupe *B. cereus* (Kailas et al 2011) et constitue une matrice pour la fixation ou l'adsorption de protéines.

L'assemblage de l'exosporium est un évènement précoce détecté dès les premiers signes du démarrage de l'engulfment, *i.e.* au moment de la courbure du septum. L'exosporium se matérialise alors sous la forme d'un fin feuillet adjacent à la OFM nommé « cap » (Figure 15Ai, feuillet violet) (Ohye and Murrell, 1973; Boydston *et al.*, 2006; Giorno *et al.*, 2007; Boone *et al.*, 2018). Le cap ne change pas d'aspect pendant l'engulfment (Boydson *et al.*, 2006) (Figure 15Aii, feuillet violet). Néanmoins, le cap se sépare de l'OFM une fois l'engulfment terminé (Ohye and Murrell 1973, Giorno *et al.*, 2007)(Figure 15Ai, feuillet violet). L'espace formé entre le cap et l'OFM est nommé « interspace » (ou IS). L'IS apparaît transparent aux électrons (Ohye and Murrell 1973)

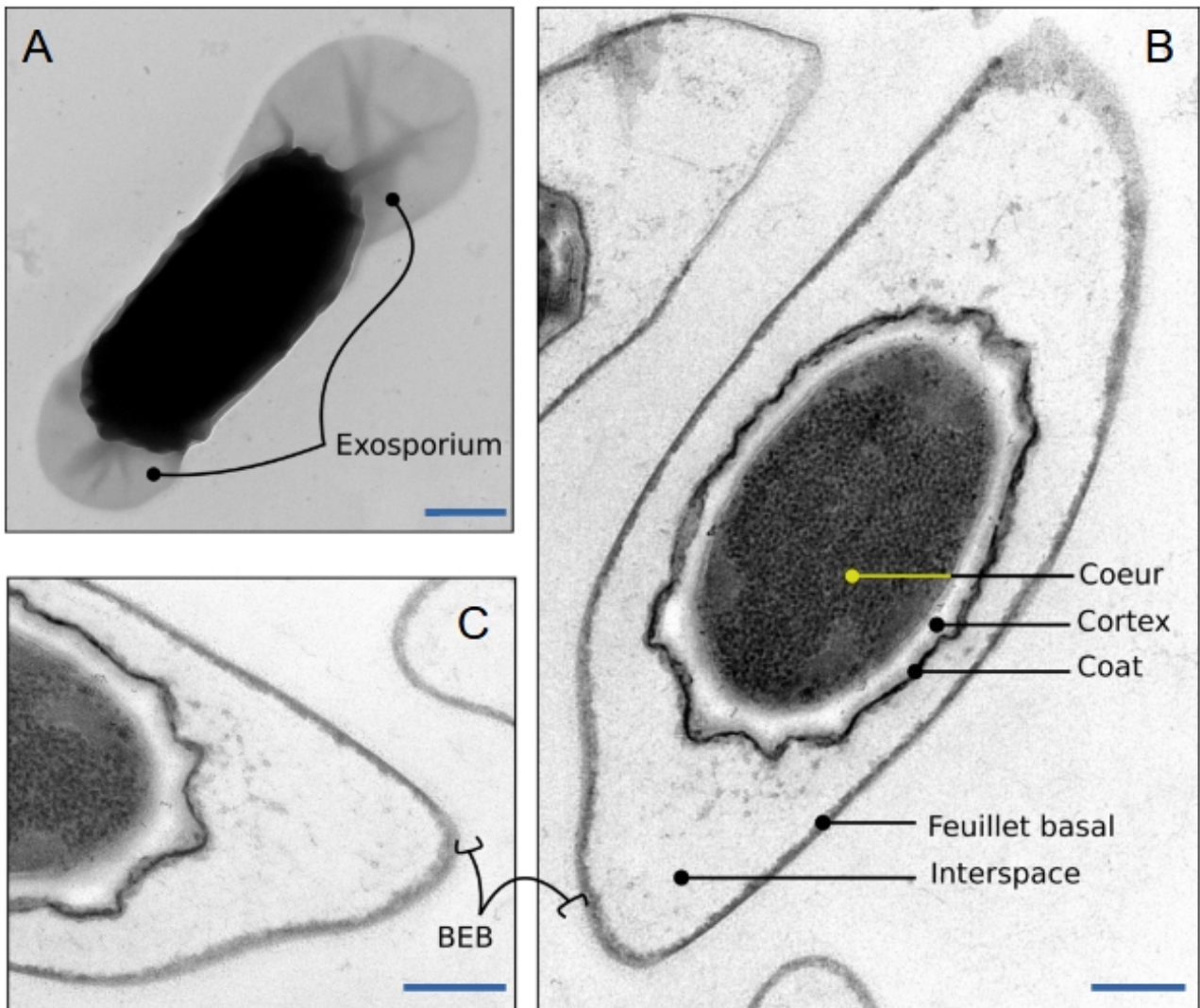


FIG 14. Ultrastructure des spores de *B. cereus* souche ATCC 10876 révélée par MET (A) Spore entière observée après coloration négative. L'exosporium est reconnaissable à sa forme irrégulière et ses extensions aux pôles. (B) Coupe ultra fine laissant apparaître les couches plus internes de la spore. (C) agrandissement permettant d'apercevoir la fine bordure en brosse (BEB) des spores de *B. cereus*. L'échelle indique 400nm en A et 200nm en B et C. (Crédit : Lablaine et Bornard, INRAE)

(Fig. 14B et C). Sa composition chimique et sa nature physique demeurent encore inconnues. Au moment où l'IS se forme entre le cap de l'exosporium et le pôle MCP de la préspore, aucun fragment de coat n'est détectable par TEM (Fig. 15Aii, feuillet violet) (Ohye and Murrell 1973, Giorno *et al.*, 2007, Boone *et al.*, 2018). Les autres régions de l'exosporium, dites « non-cap », sont détectées de façon concomitante à la formation du coat, du cortex et à la déshydratation du cœur (Ohye and Murrell 1973, Boone *et al.*, 2018) (Figure 15Aiii-v, feuillet violet).

Les subdivisions du coat en inner (IC) et outer coat (OC) de *B. cereus* sont moins visibles que les subdivisions des coats de *B. subtilis*, très nettement délimitées sur des images de TEM. Ainsi c'est un « coat » unique qui est désigné chez *B. cereus* (Stewart, 2015) (Fig. 14B) et nous garderons cette définition et parlerons de « the coat » pour *B. cereus*. Néanmoins, un IC et un OC sont parfois distingués (Ghosh *et al.*, 2018). Dans tous les cas, les auteurs s'accordent à dire que le coat de *B. cereus* est bien plus fin que les coats de *B. subtilis* (Giorno *et al.*, 2007; Giorno *et al.*, 2009; Stewart, 2015). Le coat de *B. cereus* apparaît comme une couche très dense aux électrons et composée de stratifications (Fig. 14B) (Ohye and Murrell 1973). L'aspect du coat de *B. cereus* rappelle plus l'OC que l'IC de *B. subtilis*. D'après des observations en TEM, l'assemblage du coat de *B. cereus* (et de *B. anthracis*) se fait par dépôt de larges fragments sur le pourtour de la préspore (Ohye and Murrell 1973, Boone *et al.*, 2018) (Figure 15Aiii-v, feuillet marron). Le dépôt de ces fragments de coat suit une séquence bien particulière : (i) dans un premier temps sur les bords longitudinaux de la préspore, (ii) puis au pôle MCD de la préspore et (iii) et enfin au pôle MCP (Fig. 15iii-v, feuillets marron) (Ohye and Murrell 1973, Boone *et al.*, 2018). Dans *B. anthracis*, cette séquence est affectée par la présence du cap de l'exosporium au pôle MCP de la préspore (Boone *et al.*, 2018). Il en résulte que dans des mutants ne formant pas le cap de l'exosporium, les fragments de coat peuvent se déposer d'abord dans la région du pôle MCP de la préspore (Fig. 15iii-v, feuillets marron, mutants *cotY*, *cotE*, *cotO* et possiblement *ywdL*) (Boone *et al.*, et al 2018). Ainsi la formation du coat et celle de l'exosporium semblent liées. Néanmoins, bien que la séquence dans laquelle les fragments de coat sont déposés dans ces mutants soit nettement différente de celle de la souche sauvage, l'assemblage d'un coat complet est assuré (Fig. 2v, feuillets marron) (Boone *et al.*, 2018).

La formation du cap de l'exosporium rappelle le positionnement sous forme d'un cap des protéines morphogénétiques au cours de la sporulation de *B. subtilis* (Fig. 14 chap 4). D'un autre côté, la séquence d'assemblage des fragments de coat, dans *B. cereus* et *B. anthracis*, se termine au pôle MCP de la préspore (Fig. 15iii-v, feuillets marron). Ainsi, cette séquence ne semble refléter

aucune dynamique de positionnement connue de protéines des coats de *B. subtilis*. Ces données suggèrent que l'assemblage des coats de *B. cereus* et *B. anthracis* répond à des bases moléculaires différentes de celles décrites pour *B. subtilis* mais que l'assemblage de l'exosporium partage certaines similitudes avec le développement des coats de *B. subtilis*.

5.1.2) Quelle fonction pour les couches protéiques externes des spores de *B. cereus* ?

La fonction de l'exosporium reste un sujet débattu au sein de la communauté. De plus, son étude est complexe du fait que de nombreux mutants affectés dans l'assemblage de l'exosporium présentent également des défauts d'assemblage du coat (Bailey-Smith *et al.*, 2005; Johnson *et al.*, 2006; Bressuire-Isoard *et al.*, 2016). L'exosporium est d'abord la surface la plus externe des spores et, en ce sens, est en contact direct avec l'environnement de la spore, ce qui inclut les défenses immunitaires des espèces animales infectées par la bactérie (Stewart, 2015). En accord avec cette vision, la bordure en brosse permet d'être reconnu spécifiquement et endocyté par les macrophages, une étape cruciale pour établir l'infection par les spores de *B. anthracis* (Bozue *et al.*, 2007; Oliva *et al.*, 2008; Stewart, 2015). Cependant, de nombreuses études notent que, en condition de laboratoire, l'exosporium n'est pas nécessaire pour établir une infection par les spores de *B. anthracis* (Giorno *et al.*, 2009, Giorno *et al.*, 2007).

L'étude de nombreux mutants affectés dans l'assemblage de l'exosporium met en évidence un rôle particulier de l'exosporium dans la germination. C'est le cas de mutants *cotE* de *B. anthracis* et de *B. cereus*, où l'exosporium n'est pas physiquement lié aux coats (Bressuire *et al.*, 2016, Giorno *et al.*, 2007). D'autres mutants affectant différentes protéines de l'exosporium, comme YwdL ou BxpB, sont également affectés dans la germination (Giorno *et al.*, 2009; Terry *et al.*, 2011). YwdL de *B. cereus* est homologue à GerQ de *B. subtilis*, où elle est requise pour l'assemblage de CwlJ, une enzyme qui intervient dans la dégradation du cortex lors de la germination (Terry *et al.*, 2011). Un homologue de CwlJ est présent dans le groupe *B. cereus* (Henriques and Moran 2007), et pourrait être associée à l'exosporium expliquant sa fonction dans la germination (Terry *et al.*, 2011). Des enzymes capables de dégrader des germinants ou de catalyser la conversion de la L-alanine (un germinant) en D-alanine, un inhibiteur de la germination sont également présentes à la surface de l'exosporium (Steichen *et al.*, 2007; Thompson and Stewart, 2008; Thompson *et al.*, 2012). De prime abord, la présence dans l'exosporium de systèmes inhibiteurs de la germination peut paraître surprenante, mais il paraît

crucial d'empêcher toute germination, lorsque les conditions optimales ne sont pas réunies pour soutenir le développement d'une population bactérienne. Ainsi, l'exosporium pourrait moduler l'entrée des germinants pour assurer que la germination ait lieu dans l'environnement adéquat. Ce mécanisme peut s'avérer essentiel dans le cadre d'une infection par *B. anthracis* où la spore est la forme infectieuse de la bactérie et où l'emplacement de la germination est essentiel pour établir l'infection (Dixon *et al.*, 2000). Enfin, la région cap de l'exosporium constitue le point de sortie de la nouvelle cellule lors de la germination ce qui montre aussi un lien direct entre la germination de la spore et son exosporium au travers de l'organisation structurale de ce dernier (Steichen *et al.*, 2007).

La fonction des coats de *B. subtilis* est de protéger le cortex contre des enzymes de dégradation, telles que le lysozyme (Henriques and Moran 2007, Driks and Eichneberger, 2016). Les rares mutants de *B. cereus* affectés uniquement dans la formation des coats montrent des phénotypes fortement sensibles au lysozyme (Aronson and Fitz-James, 1975; Stelma *et al.*, 1978; Stelma *et al.*, 2005). L'exosporium ne semble pas impliqué dans cette résistance car des spores dont l'exosporium a été éliminé mécaniquement ou des mutants fortement impactés dans l'assemblage de l'exosporium ne montrent pas de différence dans la résistance au lysosyme avec des spores non traitées ou celles d'une souche sauvage (Bressuire *et al.* 2016, Johnson *et al.* 2006, Boydson *et al.* 2006, Giorno *et al.* 2007, Terry *et al.* 2011). Néanmoins, lors d'un contact prolongé avec le lysozyme, des effets ont été notés sur un mutant *exsY* ne présentant pas d'exosporium (Johnson *et al.* 2006). Cependant, ce résultat peut indiquer que la structure du coat d'un mutant *exsY* est également affectée. Des mutants affectant à la fois l'exosporium et le coat montrent une forte sensibilité au lysozyme (Bailey-Smith *et al.* 2005, Bressuire *et al.* 2016). Une de ces études est remarquable à ce propos : les spores d'un mutant *cotE* de *B. cereus*, formées à 20°C possèdent à la fois un coat et un exosporium modifiés et sont alors très sensibles au lysozyme (Bressuire *et al.* 2016). En revanche, les spores *cotE* formées à 37 °C ont un exosporium affecté mais leur coat ne présente pas de défauts d'assemblage et leur résistance au lysozyme est similaire à celle de spores WT. De manière également remarquable, les spores de mutants *exsM* de *B. cereus* et de *B. anthracis* sont entourées par deux exosporiums, et leur résistance au lysozyme est supérieure à celle d'une spore WT (Fazzini *et al.*, 2010). Ainsi, bien que ne jouant pas un rôle prépondérant dans la résistance au lysozyme, l'exosporium semble une barrière contre l'activité de cette molécule. Par ailleurs, les spores *exsM* germent, dans certaines conditions, plus efficacement et plus rapidement que des spores WT, renforçant l'idée d'un rôle important de l'exosporium dans le

contrôle de la germination (Fazzini *et al.*, 2010).

L'exosporium est également impliqué dans les propriétés d'hydrophobicité de la spore et rappelle en ce sens la fonction du crust de *B. subtilis* (Shuster *et al.*, 2019 a,b). Les spores de plusieurs espèces de *Bacillus* entourées d'un exosporium montrent une partition dans l'hexadécane plus élevée que les spores qui n'en possèdent pas (Koshikawa *et al.*, 1989). Le partitionnement dans l'hexadécane reflète le caractère hydrophobe des spores possédant un exosporium (Faille *et al.*, 2010). Après insertion de transposons, un criblage des spores présentant une hydrophobicité modifiée a permis d'obtenir les premiers mutants de *B. cereus* affectés dans l'assemblage de leur exosporium; (Bailey-Smith *et al.*, 2005, Johnson *et al.*, 2006). La présence d'une imposante bordure en brosse à la surface de l'exosporium affecte la capacité des spores à se fixer à de l'acier inoxydable (Lequette *et al.*, 2011b). L'absence de la bordure en brosse ou la modification des glycoprotéines qui la constituent a pour effet de rendre les spores plus hydrophobes (Lequette *et al.*, 2011 a,b). Ainsi les glycoprotéines de la bordure en brosse, sans homologue chez *B. subtilis* (Henriques and Moran, 2007) semblent réguler le caractère hydrophobe des spores et affectent les propriétés d'adhésion de la spore. Ces propriétés apparaissent fortement liées aux sucres associés aux protéines de la bordure en brosse (Lequette *et al.*, 2011 a,b).

Dans l'ensemble, les propriétés de l'exosporium semblent le reflet de sa structure perméable. L'exosporium peut laisser diffuser des petites molécules, inducteurs de la germination mais empêche le passage de molécules plus grosses, comme le lysozyme ou des anticorps (Ball *et al.*, 2008). Le coat, malgré une épaisseur plus faible que les coats multicouches de *B. subtilis*, semble avoir conservé son rôle primaire de barrière contre le lysozyme. La fonction de l'IS reste inconnue. Cela peut s'expliquer par la difficulté de différencier des mutants affectant l'exosporium de ceux affectant l'IS. En effet, pour l'heure, il n'existe pas de mutants où les protéines de l'exosporium seraient correctement assemblées et où l'IS ne serait pas généré.

5.2) Les déterminants protéiques de l'assemblage du coat dans le groupe *B. cereus*

La protéine ExsA, d'abord identifiée pour son rôle dans l'assemblage de l'exosporium, est une des rares protéines connues ayant un rôle important dans la formation du coat (Bailey smith 2005). ExsA, homologue de SafA de *B. subtilis*, possède un domaine LysM de fixation au cortex

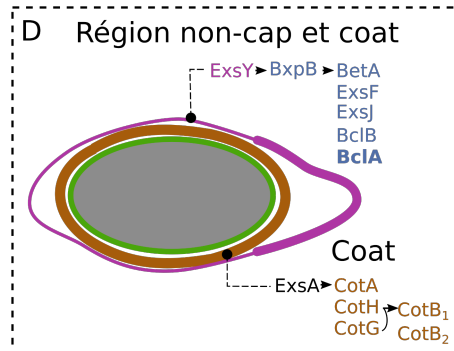
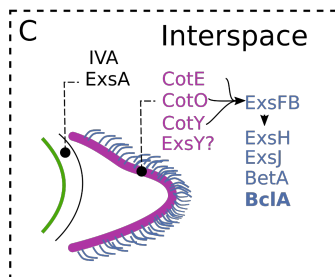
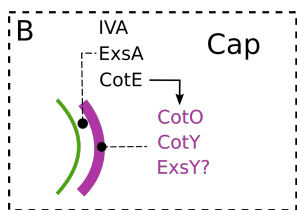
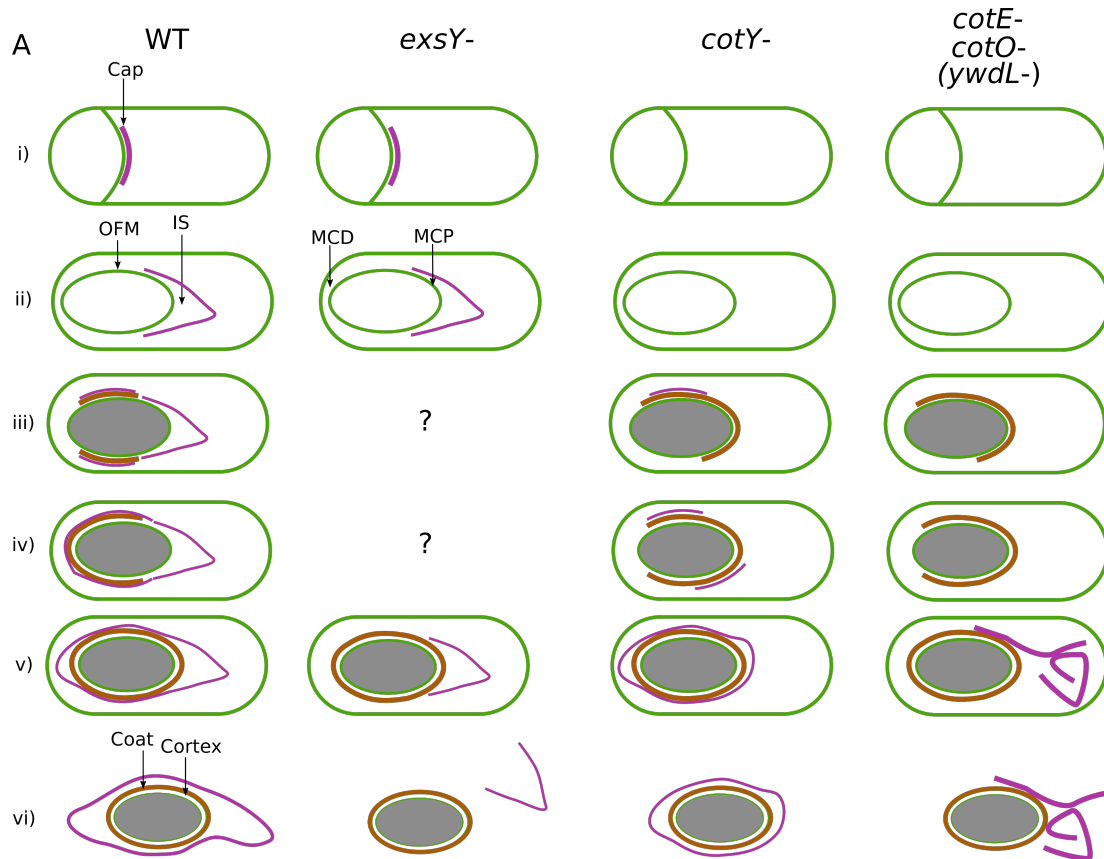


Fig 15. La formation des couches protéiques externes pendant la sporulation du groupe *B. cereus*. (A) Synthèse des données obtenues par MET concernant la mise en place des couches protéiques externes (CPE) dans le groupe *B. cereus*. (i) Dans les souches avec le fond génétique de type sauvage (WT), l'exosporium est d'abord détecté sous la forme du cap, un fin feuillet adjacent au septum courbé (feuillet violet). L'absence de la protéine ExsY n'affecte pas la formation du cap alors qu'il est absent dans les souches mutantes *cotY*, *cotE* et *cotO*. Comme les spores d'une souche *ywdL* présentent un phénotype similaire aux mutants *cotE* et *cotO*, leur séquence précoce d'assemblage des CPE pourrait être identique. (ii) Après l'engulfment, le cap est séparé de l'OFM par l'interspace (IS). (iii-v) Quand le cœur de la préspore est déshydraté, le coat s'assemble par dépôt successif de larges fragments (feuillet marron), (iii) d'abord sur les bords longitudinaux, (iv) puis au pôle distal (MCD) de la préspore et enfin (v) au pôle proximal (MCP). Le dépôt du coat au pôle MCP de la préspore est empêché transitoirement par la présence du cap. (iii-iv) Ainsi l'absence de cap dans les mutants *cotY*, *cotE* et *cotO* modifie la séquence de dépôt des fragments du coat. (v) Cependant, un coat complet est formé. (iii-v) L'encapsulation de la préspore par l'exosporium est concomitant au dépôt du coat. (v) En absence de ExsY, cet assemblage n'a pas lieu. Dans le mutant *cotY*, l'initiation de l'assemblage de l'exosporium a lieu de façon aléatoire autour de la préspore; cependant, un exosporium complet encapsule la spore. Noter que cet exosporium possède une morphologie différente de celui d'une souche sauvage. En absence de CotE, CotO ou YwdL, l'exosporium ne forme pas une structure recouvrant la spore. Des fragments peuvent parfois adhérer à la surface des spores. (B-D) Positionnement des protéines au sein des différents feuillets des sporanges et des spores. (B) Lors de la formation du cap, SpoIVA (IVA) ExsA et CotE semblent présents autour de la préspore. CotE est nécessaire pour la formation du cap et peut interagir avec CotO. CotE et CotO peuvent permettre l'assemblage de CotY qui formerait le feuillet basal du cap. On ignore si ExsY est présent dans le cap. (C) Lors de la formation de l'IS, CotE, CotO et CotY seraient associées au feuillet basal du cap alors que IVA et ExsA resteraient associées à l'OFM. La formation de la BEB dans cette région semble dépendre de ExsFB. (D) ExsY forme la région non-cap de l'exosporium et permet l'assemblage de BxpB qui en retour permet le développement de la BEB dans cette région. ExsA pourrait permettre l'assemblage des protéines formant le coat. Cot α forme la périphérie et les homologues du module CotGHB interviendraient dans la formation des couches plus internes.

(Bailey-Smith *et al.*, 2005). SafA est nécessaire à l'assemblage de l'IC, mais son absence impacte également l'assemblage de l'OC de *B. subtilis* (Takamatsu *et al.*, 1999). Il est donc possible que le défaut d'assemblage de l'exosporium des spores *exsA* soit une conséquence de la désorganisation du coat sous-jacent. Récemment, il a été montré qu'en absence d'ExsA, les protéines GerP du coat ne peuvent pas s'assembler (Ghosh *et al.*, 2016). Néanmoins, le positionnement de ces protéines n'est pas affecté par l'absence de CotE (Ghosh 2016). Ainsi, de manière similaire à *B. subtilis*, les fonctions d'ExsA et de CotE dans l'assemblage des CPE de *B. cereus* semblent distinctes : ExsA contrôle l'attachement du coat (et indirectement celui de l'exosporium) et CotE celui de l'exosporium (Fig. 15B-D).

SpoIVA de *B. subtilis*, qui est l'une des protéines des coats les mieux conservées parmi les bactéries sporulées, possède un homologue dans le groupe *B. cereus* (Giorno 2007). À ce titre, l'absence de SpoIVA dans les spores de *B. anthracis* entraîne, tout comme pour *B. subtilis*, de graves défauts d'attachement de toutes les CPE de la spore et une absence de cortex (Giorno 2007). Ce résultat montre une fonction commune de SpoIVA dans l'ancrage des CPE aux spores des *Baccillaceae* (Giorno *et al.*, 2007) (Fig. 15B et C).

La délétion de *cotH* dans *B. anthracis* n'entraîne pas de changement significatif de la structure de la spore (Giorno *et al.*, 2007), alors que la structure de l'OC est fortement affectée dans les spores *cotH* de *B. subtilis* (Freitas *et al.*, 2019). De façon intéressante, *Cot α* , une petite protéine de 13 kDa, qui ne possède pas d'homologue dans *B. subtilis*, est essentielle pour la formation d'une couche sombre, observée en périphérie du coat de *B. anthracis* (Kim *et al.*, 2004). *Cot α* est synthétisée sous le contrôle de σ^k et est positionnée à la périphérie du coat de *B. anthracis* (Kim *et al.*, 2004). La résistance au lysozyme des spores *cot α* n'est pas modifiée, mais elles sont sensibles à d'autres stress, tels que le phénol ou le chloroforme (Kim *et al.*, 2004). Ainsi, le coat de *B. anthracis*, et possiblement des autres espèces du groupe *B. cereus*, semble porter différentes fonctions liées à différentes sous-divisions de cette structure. La périphérie du coat majoritairement formée par *Cot α* , fortement dense aux électrons, est impliquée dans la résistance au phénol et au chloroforme, alors que les strates plus internes sont liées à la résistance au lysozyme. Les composants protéiques de ces strates internes du coat ne sont pas connus.

La protéine ExsB a été initialement détectée dans des fractions d'exosporium de *B. cereus* (Todd *et al.*, 2003). Plus récemment, une immuno-localisation par MET a révélé la présence de ExsB, renommée à cette occasion *Cot γ* chez *B. anthracis*, dans la partie interne du coat de *B. anthracis*, (Aronson *et al.*, 2014). La protéine *Cot γ* contient 20 résidus cystéine parmi ses

192 résidus et est phosphorylée sur 14 de ses 19 thréonines. Son environnement génétique correspond à l'environnement de *cotG* de *B. subtilis*. Au cours de la sporulation, CotGamma s'assemble tardivement, lorsque la préspore devient réfringente, d'abord dans la région du pôle MCP avant de couvrir totalement la préspore (McPherson *et al.*, 2010).

Deux homologues de CotB sont présents dans le coat de *B. cereus*. CotB1 intervient dans la biosilication du coat de *B. cereus*, qui joue un rôle dans la résistance des spores en milieu acide (Hirota *et al.*, 2010; Motomura *et al.*, 2016). CotB1 est retrouvée en plus grande quantité en absence de Cot γ (Mcpherson *et al.*, 2010). Comme nous l'avons vu plus tôt, dans *B. subtilis*, CotH, CotG et CotB forment un module dans lequel CotH et CotG interviennent dans l'assemblage de CotB (Freitas *et al.*, 2019). Les homologues de CotH, CotB et CotG sont présents dans le coat du groupe *B. cereus* (Fig. 15D). Puisque Cot γ est fortement phosphorylée et affecte l'extraction de CotB-1, il semble que le module CotGHB intervient également dans la formation du coat au sein du groupe *B. cereus* (Fig. 15D).

Cot γ est également requis pour l'assemblage de BxpB, BclA, Alr, ExsY et CotY et pour l'attachement de l'exosporium à la spore lorsque la sporulation a lieu en milieu liquide (Mcpherson *et al.*, 2010, Aronson *et al.*, 2014). Ces résultats peuvent toutefois être liés à une désorganisation du coat sous-jacent dans un mutant *cot γ* . Néanmoins, l'absence de BxpB, une protéine de l'exosporium, affecte le positionnement de CotGamma autour de la spore suggérant que Cot γ puisse être présent également dans l'exosporium (Mcpherson *et al.*, 2010).

5.2.1) Des homologues de protéines des coats de *B. subtilis* forment le feuillet basal de l'exosporium de *B. cereus*

Plus de 20 protéines ont été identifiées comme composant du feuillet basal de l'exosporium. Une grande majorité des travaux entrepris s'est attachée à caractériser la localisation de ces protéines au sein de spores matures (Stewart, 2015), mais peu de données concernant la dynamique d'assemblage de ces protéines du feuillet basal au cours de la sporulation sont actuellement disponibles. De plus, la localisation de ces protéines souvent déterminée par des approches protéomique par exemple, reste sujet à débats. Ainsi, ExsB a été renommée Cot γ chez *B. anthracis* et reclassée parmi les protéines majoritairement présentes dans le coat (Aronson *et al.*, 2014). Plusieurs facteurs peuvent expliquer ces difficultés à classer les protéines liées aux CPE des spores du groupe *B. cereus* : (i) des contaminations récurrentes des

fractions d'exosporium par les protéines formant les couches sous-jacentes (Lai *et al.*, 2003, Abhyankar *et al.*, 2013) et (ii) une localisation de certaines protéines au sein de plusieurs feuillets (Aronson *et al.*, 2014, McPherson *et al.*, 2010, Giorno *et al.*, 2007, Bressuire *et al.*, 2016).

5.2.2) Le duo CotY-ExsY au cœur de la formation du feuillet basal

La protéine ExsY de *B. cereus* partage des homologies de séquence avec les protéines CotY et CotZ de *B. subtilis* (Johnson *et al.*, 2006; Jiang *et al.*, 2015; Terry *et al.*, 2017) et est le constituant majoritaire du feuillet basal de l'exosporium (Terry *et al.*, 2017). Similairement, à son orthologue CotY de *B. subtilis*, ExsY s'auto-assemble sous la forme d'hexamères (Jiang *et al.*, 2015), hexamères qui forment de grands feuillets lorsque produits chez *E. coli* (Terry *et al.*, 2017). La structure de ces feuillets formés par ExsY correspond, de façon frappante, au motif retrouvé au sein du feuillet basal de l'exosporium (Ball *et al.*, 2008, Jiang *et al.*, 2015, Terry *et al.*, 2017). Toutefois, la structure formée par l'auto-assemblage de ExsY ne suffit pas à expliquer à elle seule la complexité de la surface du feuillet basal de l'exosporium, qui nécessite d'autres protéines (Ball *et al.*, 2008, Terry *et al.*, 2017). De plus, la région cap de l'exosporium est visible dans un mutant *exsY*, lorsque les spores sont formées sur milieu solide, indiquant que ExsY n'a pas de rôle majeur dans la structuration du cap (Fig. 15A-B) (Boydson *et al.*, 2006).

La protéine CotY du groupe *B. cereus* présente une homologie de séquence de 90 % avec ExsY. Les divergences de séquence sont concentrées dans la région N-terminale des protéines (Johnson *et al.*, 2006). En microscopie de fluorescence, CotY est positionnée dans la région cap de la spore de *B. anthracis* (Thompson *et al.*, 2012). Ainsi, une hypothèse serait que CotY se substitue à ExsY pour former le feuillet basal de la région cap de l'exosporium (Stewart, 2017; Terry *et al.*, 2017). Cette hypothèse est supportée par le fait qu'en absence de CotY, le cap de l'exosporium n'est pas détecté (Fig. 15A) (Boone *et al.*, 2018). Lorsqu'elle est surproduite dans *E. coli*, CotY de *B. cereus* s'auto-assemble en structures cristallines. Néanmoins, les cristaux formés par CotY sont moins organisés et sont produits en moins grande quantité que ceux générés par la surproduction de ExsY (Terry *et al.*, 2017).

De par leur homologie de séquence et leur capacité d'auto-assemblage, CotY et ExsY pourraient également s'assembler au sein d'hétéro-multimères pour former le feuillet basal de l'exosporium (Terry *et al.*, 2017). La formation de ponts disulfures entre les résidus cystéines de ces protéines pourrait expliquer la grande résistance des complexes protéiques de l'exosporium face aux traitements dénaturants (Terry *et al.*, 2017). Enfin, la double délétion des gènes *cotY-exsY*

entraîne une absence totale d'exosporium, ainsi que des lésions dans le coat (Johnson *et al.*, 2006). Ces résultats renforcent l'idée que ExsY et possiblement CotY ont également un rôle dans la structuration du coat tout en ayant un rôle majeur dans l'assemblage de l'exosporium.

En début de sporulation ExsY, et possiblement CotY, sont détectées en immuno-blotting sous formes de monomères et d'hexamères. En fin de sporulation, ExsY et CotY sont détectées dans un complexe de haut poids moléculaire >200 kDa (Johnson *et al.*, 2006). Au sein de ce complexe, décrit comme « le complexe signature de l'exosporium » (Stewart, 2015), ExsY et/ou CotY semblent associées aux protéines BclA, BclB et BxpB de la bordure en brosse (Steichen *et al.*, 2005). Ce complexe, extrêmement résistant à la dénaturation rappelle la fraction insoluble formée par les protéines homologues CotY, CotZ et CotX, impliquées dans la formation du crust de *B. subtilis* (Zhang *et al.*, 1993).

5.2.3) CotE, CotO et YwdL sont associées au feuillet basal

Dans *B. anthracis*, CotE est nécessaire à l'attachement de l'exosporium à la spore (Fig. 15A) (Giorno 2007). Similairement, en absence de CotE, l'exosporium de *B. cereus* est très souvent nettement détaché de la spore (Bressuire *et al.*, 2016). Comme relaté plus tôt, à une température de sporulation sous-optimale (20°C), l'absence de CotE de *B. cereus* entraîne également des défauts d'assemblage du coat, ce qui suggère une localisation et/ou un rôle de CotE au sein du coat (Bressuire *et al.*, 2016). Fait intéressant, une quantité plus importante de CotE est extraite des spores formées à 20°C (Bressuire *et al.*, 2016). Ce résultat peut être dû soit (i) à la production d'une plus grande quantité de CotE, (ii) à une meilleure extraction, ou à (iii) une différence des MPT de CotE en fonction de la température de sporulation.

Au cours de la sporulation de *B. anthracis*, CotE est détectée d'abord dans une forme majoritaire monomérique puis une forme dimérique apparaît avec l'avancement de la sporulation. En fin de sporulation, CotE est détectée dans un complexe de haut poids moléculaire d'environ 200 kDa, pouvant correspondre au « complexe signature » de l'exosporium (Giorno *et al.*, 2007). Des résultats similaires ont été obtenus dans des spores de *B. cereus* et *B. thuringiensis* (Bressuire *et al.*, 2016, Terry *et al.*, 2017) suggérant une possible association de CotE dans la fraction insoluble de l'exosporium du groupe *B. cereus*. Autre fait notable, alors que CotE est détectée dans des fractions d'exosporium purifiées de *B. cereus* ou de *B. thuringiensis*, CotE est absent d'une fraction d'exosporium de *B. anthracis* (Bressuire *et al.*, 2016, Giorno *et al.*, 2007, Terry *et al.*, 2017). Cette observation suggère que la fonction de CotE pourrait différer au sein du groupe *B.*

cereus. Il est également possible que des phénomènes de MPT rendent CotE indétectable dans les spores de *B. anthracis*. Enfin, une forme clivée de 8 kDa correspondant à la partie N-terminale de CotE est présente dans des fractions d'exosporium purifiées de *B. cereus* (Todd *et al.*, 2003, Terry *et al.*, 2017). La détection spécifique de cette forme raccourcie de la protéine suggère que CotE fait bien l'objet de MPT dans *B. cereus*.

En absence des orthologues de *B. subtilis* CotO et de GerQ (YwdL) l'attachement de l'exosporium au reste de la spore est perturbé (Boone *et al.*, 2018, Terry *et al.*, 2011). Cet exosporium faiblement attaché ou souvent détaché du reste de la spore se retrouve également dans les spores d'un mutant *cotE* (Fig. 15A). Des images en MET après immuno-marquage a montré que la protéine YwdL est clairement positionnée dans la face interne du feuillet basal de l'exosporium (Terry *et al.*, 2011). La localisation précise de CotO dans les spores matures est inconnue, mais CotO se positionne sous la forme d'un cap en début de sporulation, suggérant son association avec le cap de l'exosporium (Fig. 15B-C) (Boone 2018). De façon intéressante, ExsY, CotY, YwdL et CotO, toutes impliquées dans l'assemblage de l'exosporium, sont des orthologues de protéines dont l'assemblage dépend de CotE dans *B. subtilis* (Mckenny *et al.*, 2010, Ragbouzy *et al.*, 2004, Kim *et al.*, 2006). Également, leurs orthologues CotY, CotZ, GerQ et CotO, respectivement interagissent avec la protéine CgeA, composant du crust de *B. subtilis* (Immamura *et al.*, 2010, 2011).

Ainsi, de nombreuses similitudes entre l'exosporium et le crust existent. Premièrement, comme le crust, l'exosporium est une structure glycoprotéique à la surface de la spore affectant les propriétés d'hydrophobicité de la spore. Ensuite, l'assemblage de ces deux structures repose sur un duo de paralogues, CotY/ExsY ou bien CotY/CotZ, riches en cystéines et capable de s'auto-assembler en structures de géométrie semblable. L'exosporium et le crust dépendent tous deux de CotE pour leur assemblage. Enfin, les protéines présentes dans l'exosporium et nécessaires à son assemblage sont toutes des orthologues de protéines sous dépendance de CotE dans le crust de *B. subtilis*. Ces observations suggèrent une origine commune du feuillet basal de l'exosporium et du crust.

5.3) Les protéines de l'exosporium spécifiques du groupe *B. cereus*

5.3.1) La bordure en brosse

Les spores formées par le groupe *B. cereus* se caractérisent par la présence d'une bordure

en brosse qui surmonte le feuillet basal de l'exosporium. Les filaments de la bordure en brosse de l'exosporium sont composés de trimères de la glycoprotéine BclA (pour « Bacillus Collagen-Like protein of anthraxis») aussi bien dans *B. anthracis* que dans *B. cereus* (Sylvestre *et al.*, 2002; Lequette *et al.*, 2011a). La région centrale de BclA contient des répétitions de type collagène majoritairement composées de glycine-proline-threonine GPT (Fig. 15C-D, feuillet bleu). Le nombre de répétitions de ce triplet de collagène est dépendant des souches. En augmentant artificiellement le nombre de triplet GPT au sein du domaine « collagen-like » de BclA, la longueur de la bordure en brosse augmente (Lequette *et al.*, 2011a). BclA possède dans sa partie N-terminale une séquence nécessaire à son incorporation dans l'exosporium et un site de clivage. Le clivage de cette séquence est nécessaire à l'insertion stable de BclA dans l'exosporium (Thompson and Stewart, 2008, Thompson *et al.*, 2011 Steichen *et al.*, 2003, Sylvestre *et al.*, 2002, Lequette *et al.*, 2011 a,b)

D'autres glycoprotéines contenant des séquences de type collagène ont été identifiées dans des fractions d'exosporium purifiées (Johnson *et al.*, 2006, Todd *et al.*, 2003). Ainsi, BclB est une glycoprotéine contenant une région « collagen-like » ainsi qu'une séquence signal d'incorporation à l'exosporium en position N-terminale similaire à BclA. Cette séquence ne contient pas de site de clivage comme celle de BclA. BclB est retrouvée en moindre quantité que BclA dans les spores. Des images de MET après immuno-marquage montrent que BclB est présente dans l'exosporium d'une spore mature et également dans le coat, en plus faible quantité (Thompson *et al.*, 2007). En microscopie à épifluorescence, une fusion traductionnelle BclB-mcherry se positionne autour de la spore de *B. anthracis*, excepté dans la région cap (Fig. 15D, feuillet bleu) et est mieux visualisée en absence de BclA, ce qui signifierait que BclB est sous-jacente à BclA dans la bordure en brosse (Thompson *et al.*, 2012). BclB est retrouvée au sein du « complexe signature » de l'exosporium et cette détection n'a plus lieu en absence de BxpB (Thompson *et al.*, 2012). Chez *B. anthracis*, l'absence de BclB affecte la détection des protéines CotY et BxpB, mais n'affecte pas les propriétés de résistance ni de germination de la spore (Thompson *et al.*, 2012).

La protéine BetA possède également une séquence d'incorporation dans l'exosporium, homologue à celle de BclA et BclB, et des répétitions de type « collagen-like ». Une fusion traductionnelle BetA-GFP est détectée d'abord dans la cellule mère, puis au cap et enfin entoure totalement la présore. BetA-GFP est mieux détectée en absence de BclA et n'est plus incorporée dans l'exosporium en absence de CotE, ce qui indique que BetA serait localisée possiblement sous

BclA dans la bordure en brosse (Fig. 15C et D, feuillet bleu). Son incorporation dans l'exosporium est également partiellement dépendante de BxpB. BetA est détectée sous forme de monomères et de complexes de tailles variant entre 30 kDa et 60 kDa, mais n'apparaît pas associée au complexe de >200 kDa, auquel BclA et BclB sont associées (Thompson *et al.*, 2011a).

Les protéines ExsH et ExsJ sont deux glycoprotéines homologues (à 81 %) détectées dans des fractions d'exosporium et contenant des répétitions « collagen-like » (Todd *et al.*, 2003). Leur domaine N-terminal est plus long que celui de BclA (Todd *et al.*, 2003). La délétion de *exsH* n'affecte pas la structure de l'exosporium de *B. cereus*, ni les capacités d'adhésion ou d'hydrophobicité des spores mutantes (Lequette *et al.*, 2011). Il est proposé que ces deux protéines soient des composants minoritaires de la bordure en brosse (Fig. 15B et D).

Comme précédemment mentionné, BclA, BclB ont été détectées directement dans la bordure en brosse et possèdent une séquence signal nécessaire à leur incorporation dans l'exosporium (Thompson *et al.*, 2007), tout comme BetA (Thompson *et al.*, 2011a). La localisation de BetA pendant la sporulation est similaire à celle de BclA et dépend de CotE, suggérant fortement que BetA est également présente dans l'exosporium (Thompson *et al.*, 2011a). La dynamique d'assemblage ainsi que la localisation au sein des feuillets de la spore de ExsH et ExsJ, qui ne possèdent pas de séquence d'incorporation dans l'exosporium, restent à décrire.

La bordure en brosse est raccordée au feuillet basal de l'exosporium par des protrusions qui constituent le site d'attachement des filaments de BclA (Rodenburg *et al.*, 2014) (Fig. 15D). Ces protrusions sont formées par BxpB dont l'absence, affecte la présence de la bordure en brosse, et impacte l'assemblage de ExsK, ExsB, BclA, BclB et partiellement de BetA dans la spore (Severson *et al.*, 2009; McPherson *et al.*, 2010; Thompson *et al.*, 2011b; Thompson *et al.*, 2011a). De façon intéressante, BclA est réciproquement impliquée dans l'incorporation de BxpB dans l'exosporium (Thompson *et al.*, 2011b). ExsFB est homologue à BxpB, sauf pour sa partie N-terminale. Contrairement à BxpB, l'absence de ExsFB n'affecte pas la structure de l'exosporium. La double délétion *exsFB/bxpB* entraîne une absence totale d'assemblage de BclA (Sylvestre *et al.*, 2005). Le gène *exsFB* est co-exprimé avec *bxpB* et *bclA* et ces protéines sont toutes incorporées dans « le complexe signature » de l'exosporium. En absence de ExsFB ou BxpB, le feuillet basal de l'exosporium est instable et 2 feuillets distincts sont observés (Sylvestre *et al.*, 2005). Ainsi, ExsFB semble avoir une fonction complémentaire à celle de son paralogue BxpB dans l'assemblage des filaments de la bordure en brosse de l'exosporium (Fig. 15B). Puisque BxpB semble absent de la région cap de l'exosporium, il est possible que ExsFB permettent l'assemblage d'une bordure en

brosse dans cette région (Stewart, 2015, 2017).

5.3.2) Les enzymes associées à l'exosporium de *B. cereus*

La protéine Alr est une alanine racemase présente dans l'exosporium de *B. cereus* et de *B. anthracis* (Todd *et al.*, 2003, Redmond *et al.*, 2004). Alr convertit la L-alanine, un activateur de la germination, en D-alanine un inhibiteur de la germination. En absence d'Alr, les spores de *B. anthracis* germent plus efficacement (Chesnokova *et al.*, 2009). Les glycanes du cortex sont consolidés par des peptides contenant de la D-alanine (Popham and Bernhards, 2016). L'activité racemase d'Alr pourrait être nécessaire à la synthèse correcte du cortex. L'exosporium et le cortex se forment de façon concomitante, et l'exosporium pourrait ainsi avoir un rôle dans la synthèse du cortex par la mise en place d'Alr facilitant la production de D-alanine. La transcription du gène *alr* est biphasique : il est exprimé en faible quantité en début de sporulation et de façon plus importante en fin de sporulation et pourrait jouer un rôle dans l'incorporation d'Alr dans l'exosporium (Chesnokova *et al.*, 2009). Des images en MET après immuno-marquage révèle que la protéine Alr n'est pas détectée dans la région cap de l'exosporium (Steichen *et al.*, 2007). Ce résultat suggère que Alr est absente dans cette région, ou non accessible aux anticorps anti-Alr.

Une nucléoside hydrolase, nommée IunH, est également présente dans l'exosporium de *B. cereus*. IunH est une nucléase qui hydrolyse l'inosine, un autre germinant de *B. cereus* (Todd *et al.*, 2003). L'inosine et l'alanine possèdent des récepteurs à la surface de la membrane interne, sous-jacente au cortex.

Des superoxydes dismutases dépendant du Fer ou du manganèse (ou Fe/Mn SOD) ont également été détectées dans des fractions d'exosporium de *B. anthracis* (Steichen *et al.*, 2003). La Fe/Mn SOD est clivée dans sa partie N-ter sans que son domaine catalytique soit affecté. Une fonction possible est de protéger la spore des anions superoxyde formés par des stress oxydatifs. Chez *B. anthracis*, les anions superoxyde déclenchent la germination (Baillie *et al.*, 2005). Ainsi, les enzymes Alr ou IunH et Fe/Mn-SOD pourraient être nécessaires pour protéger la spore d'évènements de germination précoce.

Chez *B. subtilis*, la superoxyde dismutase SodA est nécessaire pour l'assemblage de CotG (Henriques *et al.*, 1998). Ainsi les superoxydes dismutases associées à l'exosporium de *B. cereus* pourraient avoir un rôle similaire dans l'assemblage de Cot γ qui est analogue du CotG de *B. subtilis*.

5.3.3) Les protéines possiblement présentes dans le feuillet basal de l'exosporium

ExsM est une protéine identifiée dans l'exosporium de *B. cereus* et *B. anthracis* dont l'absence dans une souche mutante se caractérise par la formation d'un second exosporium (Fazzini *et al.*, 2010). L'assemblage de ExsM débute au cap puis un second cap se forme et enfin la spore est totalement entourée par ExsM (Fazzini *et al.*, 2010).

La protéine ExsK, présente dans l'exosporium de *B. anthracis*, est asymétriquement répartie au cap de la spore (Severson *et al.*, 2009). ExsK semble localisée au niveau du feuillet basal de l'exosporium, car, la fluorescence émise par une fusion traductionnelle ExsK-GFP est plus importante (i) en absence de BclA, (ii) dans des spores ayant perdu leur exosporium après sonication et (iii) dans le mutant *cotE*. Ces résultats suggèrent que ExsK est également localisée à la surface de la spore ou dans l'interspace (Severson *et al.*, 2009). ExsK est présente sous forme de mono et dimères et dans des complexes de plus haut poids moléculaire dont le « complexe signature » de l'exosporium. ExsK n'est plus détectée dans ce complexe en absence de BclA, suggérant que ExsK forme un complexe avec BclA dans l'exosporium (Severson *et al.*, 2009).

La protéine BxpA a été isolée dans l'exosporium de *B. anthracis* et possède un homologue chez *B. cereus* (Steichen *et al.*, 2003). BxpA est retrouvée sous une forme clivée dans l'exosporium par les protéases Tgl et/ou YabG (Moody *et al.*, 2010). BxpA est fortement détectée dans le cortex de la spore par MET après immunomarquage et son absence n'affecte pas les propriétés de résistance ou de germination de la spore (Moody *et al.*, 2010).

Les protéines ExsC, ExsD, ExsE, et ExsG ont été également identifiées dans des fractions d'exosporium purifiées de *B. cereus* (Todd *et al.*, 2003), n'ont pas d'homologies avec des protéines de *B. subtilis* et leurs fonctions demeurent inconnues.

5.4) Le modèle d'assemblage de l'exosporium

Le modèle de l'assemblage de l'exosporium est largement issu d'observations réalisées par MET (Stewart, 2015). Néanmoins, plusieurs éléments peuvent être déduits des données de localisation des protéines présentées dans les sections 5.2 et 5.3 de ce chapitre. Les protéines influençant la formation de l'exosporium et détectées précocement lors de la sporulation sont SpoIVA, ExsA, CotE, CotO, CotY et ExsY (Bailey-Smith *et al.*, 2005, Boone *et al.*, 2018, Giorno *et al.*, 2007, Johnson *et al.*, 2006). Toutes ces protéines sont des homologues de protéines

morphogénétiques des coats de *B. subtilis* (Henriques and Moran 2007, Mckenney *et al.*, 2013).

Comme discuté précédemment, le mauvais assemblage du coat sous-jacent dû à l'absence de SpoIVA et ExsA aurait aussi et indirectement pour conséquence l'assemblage défectueux de l'exosporium. Aucune protéine intervenant précocement dans l'assemblage de l'exosporium n'a encore été identifiée dans le groupe *B. cereus*. Si de telles protéines existent, il serait intéressant de découvrir comment les fonctions des protéines morphogénétiques s'adaptent à de tels partenaires.

L'assemblage de l'exosporium débute par la formation du cap au pôle proximal de la préspore (Ohye and Murrell 1973, Giorno *et al.*, 2007, Boone *et al.*, 2018). L'assemblage de l'exosporium est bloqué à la formation d'un cap en absence de ExsY, indiquant que ExsY est requise pour la formation de la région « non-cap » de l'exosporium (Boydson *et al.*, 2006). ExsY est le composant majoritaire du feuillet basal mais le cap formé dans le mutant *exsY* présente un feuillet basal, ce qui suggère que le feuillet basal du cap pourrait avoir une composition différente du reste de l'exosporium. La protéine CotY, homologue de ExsY, est détectée préférentiellement dans la région cap de spores de *B. anthracis* (Thompson *et al.*, 2012). De même, ExsFB est asymétriquement positionné au cap, alors que BclB ou Alr sont décrites, comme étant uniquement localisées dans la région « non-cap » de l'exosporium (Steichen *et al.*, 2007, Thompson *et al.*, 2012). ExsFB est homologue à BxpB et CotY est homologue à ExsY. Ainsi CotY et ExsFB, majoritairement détectées au cap, pourraient constituer le feuillet basal de la région cap de l'exosporium dans un mutant *exsY*. La région cap est la première région lysée lors de la germination (Steichen *et al.*, 2007). Une asymétrie dans la composition protéique de la région cap et non-cap pourrait être à l'origine d'une asymétrie de structure qui rendrait le cap particulièrement fragile. Les données d'assemblage de ces protéines dans *E. coli* soutiennent cette hypothèse : CotY a la capacité de s'auto-assembler en une structure proche de celle formée par ExsY. Néanmoins, cette structure est moins organisée et produite en moins grande quantité que celle formée par ExsY (Terry *et al.*, 2017). Le feuillet basal de la région cap de l'exosporium serait ainsi formé par CotY (Stewart, 2015, 2017, Terry *et al.*, 2017).

La formation de l'exosporium est un évènement très précoce et apparaît dès le début de l'engulfment sur des images en MET (Boone *et al.*, 2018, Giorno *et al.*, 2007) mais on ignore si ExsY est associée ou non au cap à ce moment de la sporulation (Stewart, 2017). Le cap est absent dans les mutants *cotE* et *cotO* de *B. anthracis* (Boone *et al.*, 2018). Ainsi, dans le groupe *B. cereus*, CotE et CotO pourraient être impliquées directement ou non dans l'assemblage de CotY en un

cap. CotE, CotO et CotZ interagissant entre elles dans les endospores de *B. subtilis* (Liu *et al.*, 2016b; Krajčiková *et al.*, 2017).

La portion non-cap de l'exosporium est détectée plus tardivement dans le processus de sporulation que la région cap, soit après la fin de l'engulfment, au moment où se déposent les fragments de coats autour de la préspore (Ohye and Murrell 1973, Boone *et al.*, 2018). L'assemblage tardif de la partie non-cap de l'exosporium reflète l'assemblage de ExsY car : (i) ExsY est le composant majoritaire du feuillet basal de l'exosporium (Terry *et al.*, 2017) et (ii) la région non-cap n'est pas assemblée en absence de ExsY (Boydson *et al.*, 2006). Ainsi, d'après les observations de la formation de l'exosporium par MET, l'assemblage de ExsY semble progresser depuis le cap de l'exosporium en direction du pôle MCD de la préspore (Stewart, 2015, 2017, Terry *et al.*, 2017, Steichen *et al.*, 2007). La formation de ce feuillet basal dans la région non-cap serait accompagnée de l'insertion de BxpB et des protéines formant la bordure en brosse (Stewart 2015, 2017, Terry *et al.*, 2017, Steichen *et al.*, 2007). Il faut ajouter qu'en absence de CotY, le cap n'est pas détecté et l'assemblage de l'exosporium (et donc de ExsY) s'initie de façon aléatoire sur le pourtour de la préspore de *B. anthracis* (Boone *et al.*, 2018). Ce résultat montre que le cap n'est pas nécessaire à un assemblage complet de l'exosporium.

Chapitre 6 : Questions ouvertes concernant l'assemblage des CPE des spores de *B. cereus* et objectif de la thèse

Comme nous l'avons vu au cours de cette introduction bibliographique, l'assemblage du feuillet basal de l'exosporium de *B. cereus* et du feuillet des coats de *B. subtilis* partagent certaines similitudes. La littérature scientifique souligne par ailleurs le rôle crucial de CotE dans l'assemblage des couches protéiques les plus externes de ces deux espèces bactériennes. Les travaux de thèse de Christelle Bressuire-Isoard, qui m'a précédée, ont permis d'obtenir dans *B. cereus* un mutant *cotE* et de caractériser son phénotype, altéré dans l'assemblage de l'exosporium (Bressuire-Isoard *et al.*, 2016). Dans des travaux préliminaires, nous avons également observé la présence de CotE dans l'exosporium de *B. cereus*. Ce résultat contraste avec ceux obtenus dans *B. anthracis* (Giorno *et al.*, 2007), mais est confirmé par une étude plus récente chez *B. cereus* (Terry *et al.*, 2017). La localisation précise de CotE dans les spores de *B. cereus* a été étudiée, en microscopie de fluorescence, à l'aide de fusions traductionnelles de CotE avec une étiquette SNAP, située en N-ter (SNAP-CotE) ou C-ter (CotE-SNAP) de CotE. Ces résultats préliminaires indiquent que le signal fluorescent provenant de la construction CotE-SNAP est plus interne que le signal émis par SNAP-CotE dans une spore de *B. cereus* (Bressuire-Isoard and Lablaine, en préparation). Néanmoins, l'origine de cette différence de localisation des signaux émis par CotE-SNAP et SNAP-CotE reste inconnue. Enfin, ces travaux révèlent un positionnement de CotE sous la forme d'un second cap pendant la sporulation. Ce résultat paraît étonnant au vu du modèle d'assemblage de l'exosporium décrit comme unidirectionnel par Terry *et al.* (Terry *et al.*, 2017).

Dans *B. subtilis*, une grande diversité de dynamique de positionnement des protéines des coats autour de la préspore est observée pendant la sporulation. Un ensemble de ces protéines forme une armature dont le rôle est crucial pour la morphogénèse des coats (Mckenney *et al.*, 2013, Driks and Eichenberger 2016, Henriques and Moran 2007). Parmi ces protéines figurent SpoIVA, SafA, CotE, CotO, CotY et CotZ, dont les homologues ont également une fonction dans l'assemblage des CPE du groupe *B. cereus* (Mckenney *et al.*, 2013, Stewart, 2015, Giorno *et al.*, 2007, Boone *et al.*, 2018). De façon intéressante, CotE CotO et CotZ se positionnent sous la forme d'un second cap pendant la sporulation de *B. subtilis* (Mckenney and Eichenberger, 2012). Ainsi, le positionnement de CotE observé pendant la sporulation de *B. cereus* pourrait refléter celui de son orthologue dans *B. subtilis*. Le positionnement de CotY et ExsY au cours de la sporulation de *B. cereus* n'a pas été étudié. Néanmoins, d'après l'analyse de l'assemblage de l'exosporium par MET,

il semble que ExsY s'assemble de manière unidirectionnelle, débutant au pôle MCP de la présore en direction du pôle MCD (Stewart, 2017). Dans ce cas, le positionnement de ExsY semble différer de CotY, son homologue dans *B. subtilis* qui, se positionne sous la forme d'un second cap après l'engulfment, avec un léger retard par rapport à CotE (Mckenney and Eichenberger 2012).

Mes travaux de thèse ont visé à caractériser l'assemblage moléculaire des CPE des spores de *B. cereus* et plus particulièrement le rôle de CotE dans ces mécanismes. Mon objectif était de répondre aux questions suivantes :

(i) Existe-t-il une relation entre CotE, CotY et ExsY pendant la sporulation de *B. cereus*, sachant que ces trois protéines sont associées à l'exosporium d'une spore mature et que leurs homologues sont liées dans les spores de *B. subtilis* avec CotE qui dirige l'assemblage de CotY et CotZ par un jeu d'interactions au centre de la formation du crust ? (Liu *et al.*, 2016 a,b, Mckenney *et al.*, 2010).

Dans le groupe *B. cereus*, CotY semble positionnée majoritairement dans la région cap de l'exosporium alors que ExsY serait localisée préférentiellement dans la région non-cap (Stewart, 2017, Terry *et al.*, 2017). La dynamique d'assemblage et de positionnement de CotY et ExsY pendant la sporulation ainsi que leur interaction possible avec CotE n'est pas connue.

(ii) Quelle est l'origine de la différence de localisation de CotE-SNAP et SNAP-CotE dans les spores ?

(iii) Quels facteurs peuvent être associés à CotE pendant la mise en place du feuillet basal de l'exosporium ? Une armature de protéines, dont CotE fait partie, se forme sous le contrôle de σ^E dans *B. subtilis* (Mckenney and Eichenberger, 2012). Des homologues des protéines formant l'armature des coats de *B. subtilis* sont identifiées dans *B. cereus* (Henriques and Moran, 2007). Parmi ces protéines, lesquelles sont présentes pendant les événements précoces de la mise en place de l'exosporium ?

(iv) le contrôle transcriptionnel de la formation des CPE de *B. cereus* est-il semblable ou différent de celui décrit pour le crust de *B. subtilis*?

Dans *B. subtilis* l'assemblage des CPE dépend directement des vagues de transcription ayant cours dans la cellule-mère (Mckenney and Eichenberger, 2012, Mckenney *et al.*, 2013). L'étude du contrôle transcriptionnel de la formation des CPE au sein du groupe *B. cereus* n'est pas connu, seule une étude récente montre que GerE ne se fixe pas sur le promoteur de *exsY* de *B. thuringiensis* (Peng *et al.*, 2016), alors que l'assemblage de son homologue CotZ de *B. subtilis* dépend de GerE (Mckenney and Eichenberger, 2012).

II-Résultats

1) La protéine morphogénétique CotE positionne les protéines CotY et ExsY pendant la sporulation de *Bacillus cereus*

publié dans mSphere

Les spores produites par les bactéries du *phylum* des *Firmicutes* sont encapsulées dans un bouclier protéique nommé le (ou les) « coat (s) ». Le coat est essentiel pour protéger les couches plus internes de la spore des stress exogènes. Des études dans l'organisme modèle *B. subtilis* ont permis d'établir le mécanisme moléculaire de la mise en place des différents feuillets des coats de cette espèce.

Les spores formées par les bactéries du groupe *Bacillus cereus sensu lato*, dont les espèces pathogènes *B. anthracis* et *B. cereus sensu stricto*, sont enfermées dans un exosporium, absent de *B. subtilis*. L'exosporium est une structure majoritairement protéique subdivisée en un feuillet basal cristallin surmonté d'une bordure en brosse formée de glycoprotéines. L'exosporium présente un aspect irrégulier inhabituel, qui semble séparé des couches plus internes de la spore par un interspace. On décrit l'exosporium comme un sac dans lequel flotterait la spore. L'exosporium filtre les molécules pouvant accéder aux couches plus internes des spores permettant d'assurer la germination de la spore dans l'environnement le plus adéquate. Dans le cas de l'anthrax, l'étape de germination de la spore est essentielle pour établir l'infection.

Nos connaissances concernant les mécanismes moléculaires impliqués dans la mise en place de l'exosporium demeurent parcellaires. Un ensemble d'homologues de protéines contrôlant la formation du crust, la couche la plus externe des coats de *B. subtilis*, est important pour la mise en place de l'exosporium. Parmi ces protéines, CotY et ExsY sont deux paralogues riches en résidus cystéine capables de s'organiser en larges feuillets cristallins lorsqu'ils sont surexprimés dans *E. coli*. De façon frappante, ces propriétés sont similaires à celles décrites pour CotZ et CotY les orthologues de *B. subtilis*. Durant la sporulation de *B. subtilis*, la protéine CotE dirige l'assemblage de CotY et CotZ par un jeu d'interactions protéiques. Similairement, CotE dans

B. anthracis ou *B. cereus* est nécessaire à l'assemblage de l'exosporium. Pourtant, dans *B. anthracis*, CotE n'est pas détectée dans des fractions d'exosporium.

Afin de comprendre le rôle de CotE durant l'assemblage de l'exosporium, nous avons étudié les relations existant entre CotE, CotY et ExsY. Pour cela, nous avons d'abord suivi la dynamique de positionnement de CotE, CotY et ExsY au cours de la sporulation et avons observé pour la première fois des sporanges du groupe *B. cereus* en microscopie de fluorescence super résolution (ou SR-SIM) . Dans cette publication, nous montrons que l'approche SR-SIM permet de visualiser directement l'exosporium au sein des sporanges, dès sa séparation des membranes de la préspore lors de la formation de l'interspace. Nos résultats révèlent que ces trois protéines s'assemblent précocement, dès les premières marques de la sporulation. Par ailleurs, ces protéines partagent une même séquence d'assemblage durant la sporulation qui reflète la dynamique d'assemblage de l'orthologue CotE durant la sporulation de *B. subtilis*. Nous avons également décrit les hiérarchies génétiques qui régissent l'assemblage de ces protéines : l'assemblage de CotE ne dépend pas de ExsY ni de CotY. L'assemblage de CotY et de ExsY dépend de CotE et CotY dépend partiellement de ExsY pour son assemblage. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus pour *B. subtilis*. Nos résultats montrent que CotE est capable d'interagir directement avec CotY et ExsY. Enfin, ces protéines sont présentes au sein de complexes protéiques tout au long de la sporulation. Ainsi, durant la sporulation de *B. cereus*, CotE guide l'assemblage de l'exosporium en positionnant les protéines formant le feuillet basal par des interactions directes.

Dans l'ensemble, nos résultats permettent de décrire un nouveau modèle de l'assemblage de l'exosporium du groupe *B. cereus*. Au vu des nombreuses similitudes avec les données concernant l'assemblage du crust de *B. subtilis*, nous proposons qu'un principe général gouverne l'assemblage des couches protéiques externes des spores des *Bacillaceae*.

The morphogenetic protein CotE positions exosporium proteins CotY and ExsY during sporulation of *Bacillus cereus*

Armand Lablaine, Mònica Serrano, Christelle Bressuire-Isoard, Stéphanie Chamot, Isabelle Bornard, Frédéric Carlin, Adriano Henriques, Véronique Broussolle

► **To cite this version:**

Armand Lablaine, Mònica Serrano, Christelle Bressuire-Isoard, Stéphanie Chamot, Isabelle Bornard, et al.. The morphogenetic protein CotE positions exosporium proteins CotY and ExsY during sporulation of *Bacillus cereus*. *MSphere*, American Society for Microbiology., 2021, 6 (2), 10.1128/mSphere.00007-21 . hal-03210873

HAL Id: hal-03210873

<https://hal.inrae.fr/hal-03210873>

Submitted on 28 Apr 2021


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

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





The Morphogenetic Protein CotE Positions Exosporium Proteins CotY and ExsY during Sporulation of *Bacillus cereus*

Armand Lablaine,^a Mònica Serrano,^b Christelle Bressuire-Isoard,^a Stéphanie Chamot,^a Isabelle Bornard,^c Frédéric Carlin,^a Adriano O. Henriques,^b  Véronique Broussolle^a

^aINRAE, Avignon Université, UMR SQPOV, Avignon, France

^bInstituto de Tecnologia Química e Biológica, Universidade Nova de Lisboa, Oeiras, Portugal

^cINRAE, Pathologie végétale, Montfavet, France

ABSTRACT The exosporium is the outermost spore layer of some *Bacillus* and *Clostridium* species and related organisms. It mediates the interactions of spores with their environment, modulates spore adhesion and germination, and has been implicated in pathogenesis. In *Bacillus cereus*, the exosporium consists of a crystalline basal layer, formed mainly by the two cysteine-rich proteins CotY and ExsY, surrounded by a hairy nap composed of glycoproteins. The morphogenetic protein CotE is necessary for the integrity of the *B. cereus* exosporium, but how CotE directs exosporium assembly remains unknown. Here, we used super-resolution fluorescence microscopy to follow the localization of SNAP-tagged CotE, CotY, and ExsY during *B. cereus* sporulation and evidenced the interdependencies among these proteins. Complexes of CotE, CotY, and ExsY are present at all sporulation stages, and the three proteins follow similar localization patterns during endospore formation that are reminiscent of the localization pattern of *Bacillus subtilis* CotE. We show that *B. cereus* CotE guides the formation of one cap at both forespore poles by positioning CotY and then guides forespore encasement by ExsY, thereby promoting exosporium elongation. By these two actions, CotE ensures the formation of a complete exosporium. Importantly, we demonstrate that the assembly of the exosporium is not a unidirectional process, as previously proposed, but occurs through the formation of two caps, as observed during *B. subtilis* coat morphogenesis, suggesting that a general principle governs the assembly of the spore surface layers of *Bacillaceae*.

IMPORTANCE Spores of *Bacillaceae* are enveloped in an outermost glycoprotein layer. In the *B. cereus* group, encompassing the *Bacillus anthracis* and *B. cereus* pathogens, this layer is easily recognizable by a characteristic balloon-like appearance and separation from the underlying coat by an interspace. In spite of its importance for the environmental interactions of spores, including those with host cells, the mechanism of assembly of the exosporium is poorly understood. We used super-resolution fluorescence microscopy to directly visualize the formation of the exosporium during the sporulation of *B. cereus*, and we studied the localization and interdependencies of proteins essential for exosporium morphogenesis. We discovered that these proteins form a morphogenetic scaffold before a complete exosporium or coat is detectable. We describe how the different proteins localize to the scaffold and how they subsequently assemble around the spore, and we present a model for the assembly of the exosporium.

KEYWORDS spore, morphogenetic proteins, exosporium, SR-SIM, endospores

Bacterial endospores are one of the most resistant life forms (1). Endospores (here referred to as “spores” for simplicity) formed by members of the *Firmicutes* share a general morphological plan and are composed of several concentric layers. The core is

Citation Lablaine A, Serrano M, Bressuire-Isoard C, Chamot S, Bornard I, Carlin F, Henriques AO, Broussolle V. 2021. The morphogenetic protein CotE positions exosporium proteins CotY and ExsY during sporulation of *Bacillus cereus*. *mSphere* 6: e00007-21. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00007-21>.

Editor Craig D. Ellermeier, University of Iowa

Copyright © 2021 Lablaine et al. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution 4.0 International license](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Address correspondence to Adriano O. Henriques, aoh@itqb.unl.pt, or Véronique Broussolle, veronique.broussolle@inrae.fr.

Received 7 January 2021

Accepted 19 March 2021

Published 21 April 2021

the most internal structure and contains the bacterial chromosome. The core is surrounded by an “inner” membrane, then by a thin layer of peptidoglycan (the germ cell wall), and then by an external and thicker layer of modified peptidoglycan (the cortex). The cortex, delimited by the outer forespore membrane (OFM), is enveloped in two main proteinaceous layers: the coat and the exosporium. While the coat is common to all species of spore-forming bacteria, the exosporium is found only in some *Bacillus* and *Clostridium* species and related organisms. In the *Bacillus cereus* group, encompassing the foodborne pathogen *B. cereus sensu stricto*, the etiologic agent of anthrax, *Bacillus anthracis*, and the entomopathogenic species *Bacillus thuringiensis*, the exosporium appears under transmission electron microscopy (TEM) as an irregular balloon-like structure, separated from the rest of the spore by the interspace, an electron-transparent region of unknown composition. The exosporium is described as a thin “basal layer” with a paracrystalline structure surrounded by a “hairy nap” composed of different glycoproteins (2, 3). Whether the exosporium is somehow directly linked to the coat across the interspace remains unclear (4).

The exosporium directly contacts the environment, including host cells and the host immune system. It has a role in adhesion to abiotic surfaces and contributes to protection against predation and internalization by macrophages, as shown for *B. anthracis* spores (5). Despite its importance, assembly of the exosporium remains a poorly understood process. Electron microscopy reveals that its formation begins early in sporulation, at the onset of engulfment of the forespore by the mother cell, when the engulfing membranes start to curve, and before the coat or the cortex becomes recognizable (4, 6, 7). At this stage, the exosporium forms a single electron-dense structure, named the “cap,” adjacent to the OFM at the mother cell-proximal (MCP) forespore pole (4, 6, 7). After the completion of engulfment, the cap appears more markedly electron dense and becomes separated from the OFM by the interspace (4, 6, 7). The noncap part of the exosporium is detected later, concomitantly with coat deposition (7). The assembly of the coat and the assembly of the exosporium appear to be interdependent, as shown recently for *B. anthracis*, where the formation of the cap part of the exosporium interferes with coat deposition at this site (7). Indeed, the coat assembles first along the longitudinal sides of the forespore, then at the mother cell-distal (MCD) forespore pole, and finally at the MCP forespore pole (7).

The exosporium is composed of at least 20 different proteins (5). Among them, ExsY, the main structural component of the exosporium basal layer, self-assembles into large 2-dimensional crystalline arrays (8). *B. cereus* *exsY* mutant spores are devoid of an exosporium, but a cap-like structure is observed during the sporulation of a *B. anthracis* *exsY* mutant on agar plates (9, 10). Strikingly, CotY self-assembles like its paralogue ExsY and may form the basal layer of the MCP cap structure observed in *B. anthracis* *exsY* mutant spores (8, 10). Both ExsY and CotY are cysteine-rich proteins, and cooperative disulfide bond formation seems to play a role in their self-assembly (8). The current model of exosporium assembly proposes that CotY forms the cap, possibly in association with ExsY (5, 8). From this cap, ExsY self-polymerizes to assemble unidirectionally towards the MCD pole, forming the remaining noncap part of the basal layer. This structure offers a scaffold for the assembly of additional exosporium proteins, such as BxpB, required for the attachment of the collagen-like glycoproteins that form the hairy nap (11–17).

ExsY and CotY are orthologues of *Bacillus subtilis* CotZ and CotY, which are important structural crust components (9, 18–20), and the self-organization of these cysteine-rich proteins plays an important role in the formation of both layers (8, 21). Moreover, the morphogenetic protein CotE guides both outer coat and crust assembly in *B. subtilis* (18, 19, 22), and its *B. cereus* CotE orthologue is required for exosporium assembly (6, 23). These observations suggest that the assembly mechanisms of the crust and exosporium could be similar. The assembly of the proteins forming the different layers of the *B. subtilis* coat is a two-step process. First, a group of early-synthesized proteins, mainly morphogenetic proteins, forms an organizational center on the MCP

forespore pole, named the cap, which is dependent on the morphogenetic ATPase SpoIVA (20, 24). CotE and CotZ are part of this cap (20). In the second step, the different coat proteins encapsulate the circumference of the spore from the single cap, a process that requires SpoVID and is named encasement (25). Encasement by CotE depends on a direct interaction with SpoVID and involves the formation of a second cap at the MCD following engulfment completion, at the site of membrane fission (20, 25, 26). Other proteins, designated kinetic class II proteins (20), share this sequence of localization and encasement.

How the exosporium proteins localize during the course of sporulation, which proteins dictate the different steps of exosporium assembly, and on which interactions the process relies are unknown for the *B. cereus* group. In particular, how CotE contributes to the assembly of the exosporium is unknown. Here, we study the localization and the dependencies between CotY, ExsY, and CotE during *B. cereus* sporulation using super-resolution fluorescence microscopy. We show that CotY, ExsY, and CotE exhibit the same pattern of assembly throughout sporulation, a pattern reminiscent of the localization of the kinetic class II coat proteins of *B. subtilis* to which CotE belongs. Importantly, our results also reveal that CotE forms complexes with CotY and ExsY during sporulation and that CotE interacts directly with these proteins. CotE guides the assembly of CotY and ExsY via direct and indirect interactions, allowing the formation of two cap structures and the subsequent elongation of the morphogenetic scaffold of the exosporium. These two crucial steps ensure the progressive assembly of the exosporium around the spore. These features are highly similar to those observed during coat layer formation in *B. subtilis*, suggesting that the principle governing the assembly of spore surface layers is conserved among distant members of the *Bacillus* group.

RESULTS

CotY, ExsY, and CotE follow the same assembly dynamics during sporulation.

To determine the role of CotE, together with CotY and ExsY, in the formation of the *B. cereus* exosporium, we first monitored the localization of these three proteins during sporulation by using super-resolution structured illumination microscopy (SR-SIM) (27). We used translational fusions to the SNAP tag, which becomes fluorescent (red signal on overlay images) upon covalent binding of the TMR-Star substrate (28–31). The SNAP fusions were constructed using a low-copy-number plasmid, which we used previously to complement *B. cereus cotE* mutant cells (23). However, spores of the complemented *cotE* mutant showed partial exosporium attachment (23), and we therefore preferred to study the localization of SNAP proteins in a wild-type (WT) background. We checked by conventional fluorescence microscopy that the localization patterns of CotE-SNAP (SNAP at the C-terminal end of CotE) and SNAP-CotE (SNAP at the N-terminal end of CotE) in *cotE* mutant and WT cells harboring those constructions were identical, i.e., without any bias caused by additional copies of *cotE* (data not shown). Previous work also showed that more *B. cereus* CotE was extracted in spores formed at 20°C than at 37°C (23). We therefore performed sporulation of ATCC 14579 cells producing CotY-, ExsY-, or CotE-SNAP fusions or SNAP-CotE at 20°C and showed that their patterns of localization during sporulation at 20°C and 37°C were identical (data not shown). Culture samples were collected throughout sporulation and were labeled with TMR, and the different patterns of SNAP fusion localization were scored with respect to the stages of sporulation identified using the MitoTracker Green (MTG) dye (green fluorescent signal on overlay images) (32).

We first detected CotY-SNAP as a discrete fluorescent signal on curved septa at the onset of engulfment (Fig. 1, pattern *a*, white arrow) in 13% and 2% of the sporangia scored after hour 20 and hour 24 of sporulation, respectively (see Fig. S1C in the supplemental material). This signal then extended along the engulfing membranes and became cap-shaped, representing 33% and 7% of the sporangia after hour 20 and hour 24 of sporulation, respectively (Fig. 1 and Fig. S1C, pattern *b*). Importantly, the cap pattern of CotY-SNAP persisted until the end of engulfment, representing 33% and

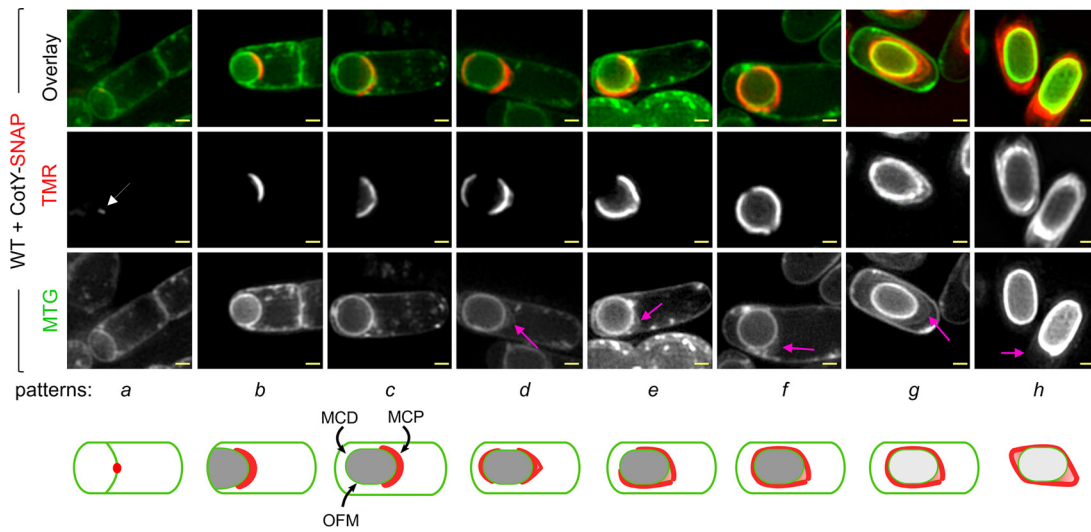


FIG 1 Stages of CotY-SNAP localization during sporulation. Sporulating cells of *B. cereus* producing CotY-SNAP were labeled with the SNAP substrate TMR-Star and with the membrane dye MTG and were imaged by SR-SIM. Images of a representative cell for each pattern of localization identified at a particular stage of sporulation are shown, with schematic representations (patterns *a* to *h*) below. The white arrow points to the weak signal of CotY-SNAP detected at curved septa; pink arrows point to the exosporium at different stages of its formation; curved black arrows point to the mother cell-proximal (MCP) and -distal (MCD) forespore poles and to the outer forespore membranes (OFM). Bars, 0.5 μ m. The stages of ExsY-SNAP, SNAP-CotE, and CotE-SNAP localization during sporulation are shown in Fig. S1A, Fig. S1B, and Fig. S2A, respectively.

25% of the sporangia at hours 20 and 24 of sporulation, respectively (Fig. 1 and Fig. S1C, pattern *c*). At hour 24, we distinguished different patterns of CotY-SNAP localization in sporangia that had completed engulfment: (i) a red fluorescent cap-shaped signal at the MCP pole in 25% of the sporangia (Fig. 1 and Fig. S1C, pattern *c*), (ii) caps at both forespore poles in 10% of the sporangia (pattern *d*), (iii) a red fluorescent signal covering three-quarters of the forespore in 26% of the sporangia (pattern *e*), and (iv) a ring of red fluorescence in 30% of the sporangia (pattern *f*). Remarkably, in fully engulfed sporangia, a layer labeled by MTG was detected at the MCP forespore pole, separated from the forespore membrane (Fig. 1, pink arrows, patterns *d*, *e*, and *f*). Strikingly, the CotY-SNAP signal appeared to migrate from the OFM (Fig. 1, pattern *c*) to this nascent layer (patterns *d*, *e*, and *f*). Later, this layer exhibited the recognizable balloon-like structure of the exosporium and completely surrounded the spore, showing that MTG also labeled the exosporium (Fig. 1, pink arrows, patterns *g* and *h*). Hence, this layer, when detected at the MCP forespore pole in sporangia that had completed engulfment, likely corresponds to the MCP cap of the exosporium (patterns *d*, *e*, and *f*). From hour 48, only sporangia of phase-bright spores and free spores were observed by phase-contrast microscopy (data not shown), and the CotY-SNAP signal was clearly superimposed on the exosporium basal layer (Fig. 1, pattern *g*). In free spores, the signal was present in the different regions of the exosporium (Fig. 1, pattern *h*). Similar localization patterns were observed for ExsY-SNAP and SNAP-CotE (Fig. S1A, B, and C). The dynamic of CotE-SNAP assembly was globally similar, with slight differences in sporangia that had completed the engulfment process and presented a transient defect in MCP cap separation from the OFM (Fig. S2 and Text S1).

Taken together, these results show that CotY, ExsY, and CotE share a common pattern of localization during sporulation, behaving as cap proteins at the MCP forespore pole during engulfment; then, after engulfment completion, localizing as a second cap at the MCD spore pole; and finally completely encasing the forespore. Strikingly, during encasement by CotE, CotY, and ExsY, the exosporium MCP cap structure (Fig. 1 and Fig. S1 and S3, patterns *e* and *f*, pink arrows) can be differently oriented with regard to the mother cell (MC) axis. This suggests that the MCP cap becomes mobile after its separation from the OFM (Fig. S3 and Text S1). Moreover, the detection of an off-center

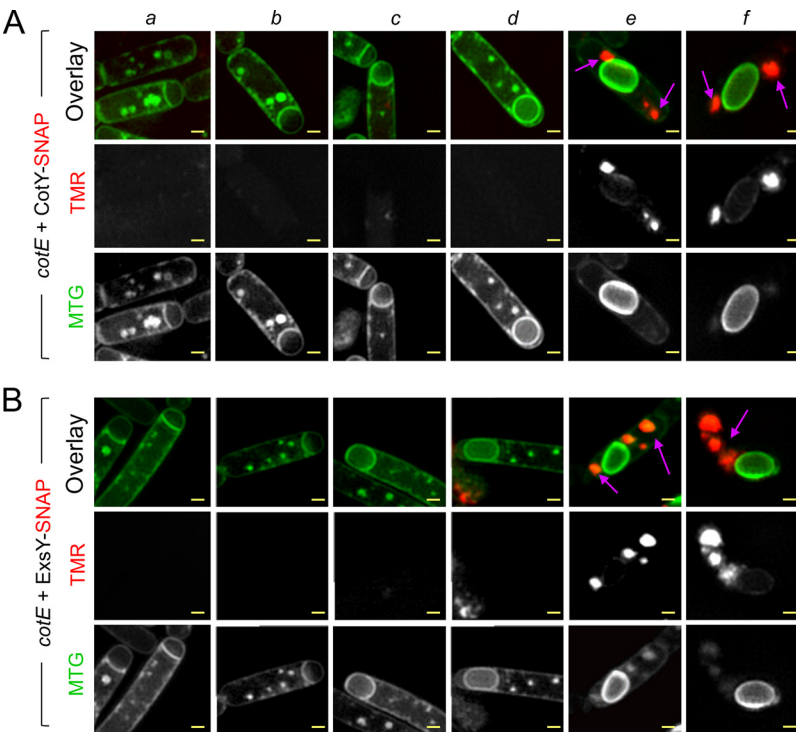


FIG 2 CotE is required for cap formation, allowing CotY and ExsY to localize as caps. Samples were collected from cultures of a *cotE* mutant producing CotY-SNAP (A) or ExsY-SNAP (B) during sporulation, and the cells were imaged by SR-SIM following staining with TMR-Star and MTG. Cells representative of the different localization patterns observed are shown (panels *a* to *f*). Purple arrows point to the signal from CotY-SNAP or ExsY-SNAP (panels *e* and *f*). In the *cotE* mutant, CotY-SNAP and ExsY-SNAP never formed the cap or the subsequent patterns identified in the WT (Fig. 1 and Fig. S1A) but formed large patches or aggregates in the mother cell cytoplasm. Bars, 0.5 μ m.

MCP exosporium cap appears linked to the observation of a three-quarters-of-a-circle localization with an MCD pole not encased by CotY-SNAP, ExsY-SNAP, or SNAP-CotE (Fig. S1, pattern *e*, and Fig. S3). Indeed, cells expressing CotE-SNAP, which presents a defect in MCP cap separation, always presented a three-quarters-of-a-circle localization with an encased MCD pole and showed a small fluorescence gap only at one longitudinal forespore side (Fig. S3E). Those results show that encasement by CotE, but also by CotY and ExsY, starts at the MCD pole and occurs asymmetrically, covering the rest of the forespore one side before the other (Fig. S3 and Text S1). Finally, we found that encasement of the forespore by CotY, ExsY, and CotE is completed early in most of the sporangia, i.e., from hour 24 (Fig. 1 and Fig. S1, pattern *f*). Importantly, at the same time, coat was not visible on TEM images, and only the cap region of the exosporium was visible on TEM or SR-SIM images (Fig. 1 and Fig. S1 and S4B). Hence, the localization of CotE, CotY, and ExsY does not give rise to any structure visible by TEM in the noncap region, in contrast to the MCP region. Thus, those proteins are present, before coat detection, in the noncap region as an immature morphogenetic scaffold.

CotE is required for the localization of CotY and ExsY as two caps. We used SR-SIM to analyze the localization of CotY and ExsY in *cotE* sporangia and in mature spores. Neither cap formation nor encasement by CotY-SNAP or by ExsY-SNAP was observed in the absence of CotE (Fig. 2A and B, panels *a* to *f*). Remarkably, in the absence of CotE, CotY-SNAP accumulated as dots at the forespore poles, while ExsY-SNAP formed large aggregates in the mother cell, often close to the poles (Fig. 2A and B, respectively, purple arrows in panel *f*).

Since CotY and ExsY cap-shaped signals were never seen in *cotE* mutant sporangia, we reasoned that the cap could be absent in this strain, as reported for a *B. anthracis* *cotE* mutant (6). With TEM, we confirmed the absence of cap formation in *B. cereus*,

and we found that in the absence of CotE, deposition of the coat follows a modified pathway (Fig. S4E to G and Text S1). Both fluorescence microscopy and TEM showed that CotE is required to form the MCP cap of the exosporium by allowing CotY and ExsY localization first as caps at the MCP forespore pole but then also for their localization as a second cap at the MCD forespore pole. This localization pattern and/or the presence of CotE appears to be important for guiding the subsequent encasement of the forespore by CotY and ExsY.

ExsY is required for encasement by CotY but not for encasement by CotE. CotY, ExsY, and CotE appeared to encase the forespore early in sporangia presenting only the cap region of the exosporium. Thus, we wondered whether the assembly of CotY and CotE is affected by the absence of ExsY, since only the cap region of the exosporium is assembled in *B. anthracis* *exsY* endospores (10). To test whether the localization of CotY and CotE requires ExsY, we used an *exsY* mutant previously obtained in ATCC 10876 (9). The amino acid sequences of *B. cereus* strains ATCC 10876 and ATCC 14579 are 100% identical for CotE and 92.9% identical for CotY. Moreover, we showed that the CotY-SNAP construction from the *B. cereus* ATCC 14579 CotY sequence complements the *cotY* mutation in ATCC 10876 (Fig. S5C). For this strain, however, for reasons we do not presently understand, when sporulation is induced at 20°C, engulfment is stopped in a fraction of the cells (not shown). We therefore induced sporulation at 37°C; in *exsY* mutant sporangia, CotY-SNAP localized as a cap at the onset of engulfment (Fig. 3A, pattern *b*) and until the end of engulfment (pattern *c*); together, these patterns represented 64% of the cells observed at hour 12. In engulfed sporangia at hour 12, CotY-SNAP formed a second, smaller cap at the MCD forespore pole (pattern *d*) in 13% of the cells and localized as a cap at the MCP pole and as a weak dot at the MCD pole (pattern *j*) in 19% of the cells. Importantly, the localization of CotY-SNAP did not change over time, suggesting a blockage of CotY assembly. Patterns *c*, *d*, and *j* were observed in phase-bright endospores and spores (Fig. 3A, patterns *c**, *d**, and *j**). From hour 14, an inner signal was detected in phase-bright sporangia (Fig. 3A, cyan arrow), likely due to unspecific binding of the TMR to the forespore, as observed in a strain without a SNAP fusion (data not shown). In free spores observed at hour 34, CotY-SNAP never formed the fluorescent ring fully encasing WT spores. These results show, first, that as with *B. anthracis*, the MCP cap is assembled in a *B. cereus* *exsY* mutant. Second, they show that ExsY is required for asymmetric CotY encasement but not for CotY localization as two caps. Third, considering that the exosporium cap is made of CotY in *exsY* sporangia, these results suggest that CotY could form the basal layer of the cap independently of ExsY but relying on CotE.

The sequences of CotE-SNAP and SNAP-CotE localization in *exsY* sporangia (Fig. 3B and Fig. S5A) were both similar to those in the WT (Fig. S1B and S2A). Interestingly, no signal from CotE-SNAP or SNAP-CotE was observed in the cap region of *exsY* spores after hour 34, despite a visible cap structure in phase-contrast images (Fig. 3B and Fig. S5A, yellow arrows). These observations suggest that CotE is not present or not detectable in *exsY* spores, although it assembles correctly during sporulation. A faint inner red TMR signal was observed, possibly corresponding to unspecific TMR binding to phase-bright forespores (Fig. 3B). To check this, we used SR-SIM to analyze *exsY* spores of strains producing CotY-SNAP or CotE-SNAP or *exsY* spores from a strain bearing no SNAP fusion. As suggested by conventional fluorescence microscopy (Fig. 3B), we detected only a faint internal TMR signal in *exsY* spores with CotE-SNAP (Fig. 3C, cyan arrow), which was also seen in WT spores and *exsY* spores without SNAP fusion. In spores of *exsY* producing either CotY-SNAP or CotE-SNAP and presenting a two-cap MTG signal (Fig. 3C, yellow arrows), we clearly observed fluorescence from CotY-SNAP-TMR (Fig. 3C), while no signal was observed for CotE-SNAP (Fig. 3C). This suggests that CotY was present in the cap of *exsY* mutant spores, while CotE was not (Fig. 3C). These results confirm the absence of a detectable signal from CotE-SNAP in spores lacking ExsY, even in the cap region. This observation suggests that CotE is required during sporulation only to guide cap assembly and that once the cap is formed by CotY, CotE

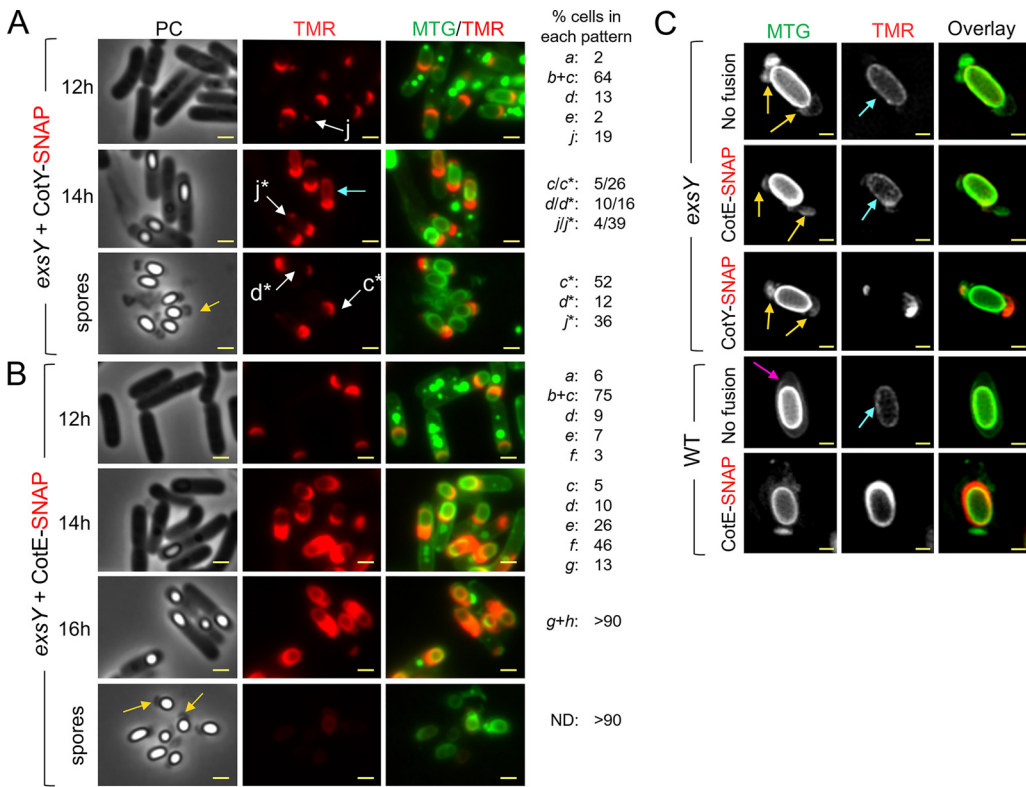


FIG 3 ExsY is required for encasement by CotY but not by CotE. (A and B) Samples were withdrawn at the indicated times from 37°C cultures of an *exsY* mutant producing CotY-SNAP (A) or CotE-SNAP (B). The cells were labeled with TMR-Star and MTG and were imaged by phase-contrast and fluorescence microscopy. Localization patterns *a* to *g* are identical to patterns *a* to *g* observed in WT cells in Fig. 1. Patterns *c**, *d**, and *j** (white arrows) correspond to patterns *c*, *d*, and *j* observed in sporangia of phase-bright spores or in free spores. Numbers on the right show the percentage of cells with each of the indicated patterns relative to the total number of sporulating cells expressing the different SNAP fusions. ND; no signal detected. (C) Spores of the indicated strains were stained with MTG and TMR-STAR and were imaged by SR-SIM. The strains were ATCC 10876 (WT) and a derivative producing CotE-SNAP, as well as a congenic *exsY* mutant and derivatives producing CotE-SNAP or CotY-SNAP. Yellow arrows point to exosporia blocked at the two-cap stage. The pink arrow points to a complete exosporium. Cyan arrows point to nonspecific TMR signals. Bars, 1 μm in panels A and B and 0.5 μm in panel C.

is no longer required for the maintenance of cap integrity. These results also show that the arrested localization of CotY as a second cap in the MCD region of *exsY* sporangia gives rise to a second, smaller exosporium cap structure. We used immunoblotting to test for the presence or absence of CotE in *exsY* and *cotY* spores (Fig. S5B). In line with the microscopic analysis, CotE was not detected in *exsY* spores, but, more surprisingly, it was not detected in *cotY* spores, either (Fig. S5B).

Taken together, the localizations of CotE and CotY in the *exsY* mutant demonstrate that CotE encasement is independent of ExsY but also of CotY encasement, since ExsY is required for CotY encasement. Moreover, the absence of ExsY or CotY possibly affects the association of CotE with the released spores. Hence, since *cotY* spores possess a seemingly normal exosporium (7, 9), our results suggest that CotE is needed during sporulation, only to guide cap localization and encasement by ExsY and CotY, but seems dispensable later for maintaining the integrity of the structure once assembled. Finally, while CotE completely encased *exsY* forespores, CotY assembly was blocked at the two-cap stage. Thus, encasement by CotE is not sufficient to direct encasement by CotY, which additionally requires ExsY.

CotE, CotY, and ExsY form a complex *in vivo* during sporulation and interact *in vitro*. Since CotE is required for the correct localization of CotY and ExsY and exhibits a similar sequence of localization during sporulation, we wondered whether CotE could form complexes with CotY and ExsY during spore formation. We used the ability of the SNAP tag to covalently bind SNAP capture agarose beads (33) to follow *in vivo* complex

formation between CotE, CotY-SNAP, and ExsY-SNAP. Several of the proteins that form the exosporium are organized in complexes that resist solubilization (5, 8). Most of the exosporium proteins, however, assemble only late during sporulation (5). In addition, at an early time of sporulation, up to hour 24 in our experiments, only the MCP cap region of the exosporium is visible by TEM, while CotE, CotY, and ExsY already encase the forespore as a morphogenetic scaffold. Thus, in order to determine whether CotE is present in protein complexes involved in the early events of morphogenetic scaffold formation, pulldown assays with CotY-SNAP and/or ExsY-SNAP were conducted with extracts prepared from sporangia collected during engulfment (hour 20) and at the end of engulfment (hour 24). These studies were extended by performing pulldown assays with extracts from a mixture of phase-bright sporangia and spores (hours 48 and 72, respectively) and from purified spores collected at hour 72. In line with the microscopy observations, we observed accumulation of CotE (Fig. 4A, extracts), CotY-SNAP, and ExsY-SNAP (Fig. S6A, extracts) from hour 20 to hour 72 of sporulation, showing the better solubility of those proteins when sporulation takes place at 20°C. CotE was extracted as a species of about 20 kDa, corresponding to the expected size of the monomer; an abundant species of about 40 kDa, possibly corresponding to a dimer; and a less abundant multimeric form of about 75 kDa. We also detected species of intermediate apparent molecular weight, which may correspond to cleaved forms of CotE. SNAP fusion proteins were detected in the supernatant after the incubation of extracts collected from hour 48 with SNAP beads (Fig. S6A). All SNAP fusions were detected with anti-SNAP antibodies after the pulldown, and since the SNAP moiety binds covalently to SNAP capture beads, this suggests that the SNAP fusions could self-interact (Fig. S6A, pulldown). We found that CotY-SNAP and ExsY-SNAP pulled down the different forms of CotE extracted from sporulating cells and from purified spores (Fig. 4A, pulldown). Notably, the high-molecular-weight CotE species seems to be preferentially enriched in the pulldown compared to the extracts (Fig. 4A, three red asterisks). In contrast, a nonspecific species (Fig. 4A, green asterisk) detected from hour 0 (i.e., vegetative cells) was present in the extract and flowthrough fractions but absent in the pulldown. The SNAP tag alone, produced under the control of the *cotE* promoter (Fig. S6B, P_{cotE} -SNAP fusion), did not retain CotE (Fig. 4A, pulldown). These results show that CotE formed complexes with CotY and with ExsY during sporulation and in mature spores of *B. cereus*. We also performed SNAP pulldown assays on extracts of sporulating *exsY* cells harboring CotY-SNAP, in which CotY assembly was blocked at the two-cap stage (Fig. 3A and Fig. S7B). The results indicate that CotE and CotY are present in complexes in the two caps and that the formation of these complexes is independent of the presence of ExsY (Fig. S7A and Text S1).

To determine if CotE interacts directly with CotY and/or ExsY, the proteins were coproduced in *Escherichia coli* and tested for pairwise interactions (34). Coexpression using the pETDuet system allows interactions to occur in the cell and the purification of protein complexes (34). Notably, organized supramolecular structures formed by *B. subtilis* coat proteins were purified with this approach (21). To determine possible interactions, we coexpressed CotE with His₆-CotY or His₆-ExsY in *E. coli*. We observed that CotE was extracted as monomers when produced alone (Fig. 4B, lane CE), while multimeric forms were present when CotE was coproduced with His₆-CotY or His₆-ExsY (data not shown). We observed that His₆-CotY, His₆-ExsY, and CotE accumulated in *E. coli* and were correctly detected by the appropriate antibodies. CotE, when produced alone, was detected in the extracts (Fig. 4B, lane CE, top), in the flowthrough (Fig. 4B, lane FT, top), and in the first wash (Fig. 4B, lane w₁, top) and was not retained by the Ni²⁺ beads after washes (Fig. 4B, lanes E₁ to E₃, top). When coproduced with His₆-ExsY, CotE was eluted in large amounts mainly in E₁ (including multimeric forms [two or three red asterisks]) and partly in E₂ (Fig. 4B, lanes E₁ and E₂, top). When CotE was coproduced with His₆-CotY, only a small fraction of CotE was eluted in E₁ (Fig. 4B, lane E₁, top, one red asterisk). These results show that CotE clearly interacts with ExsY and interacts slightly with CotY.

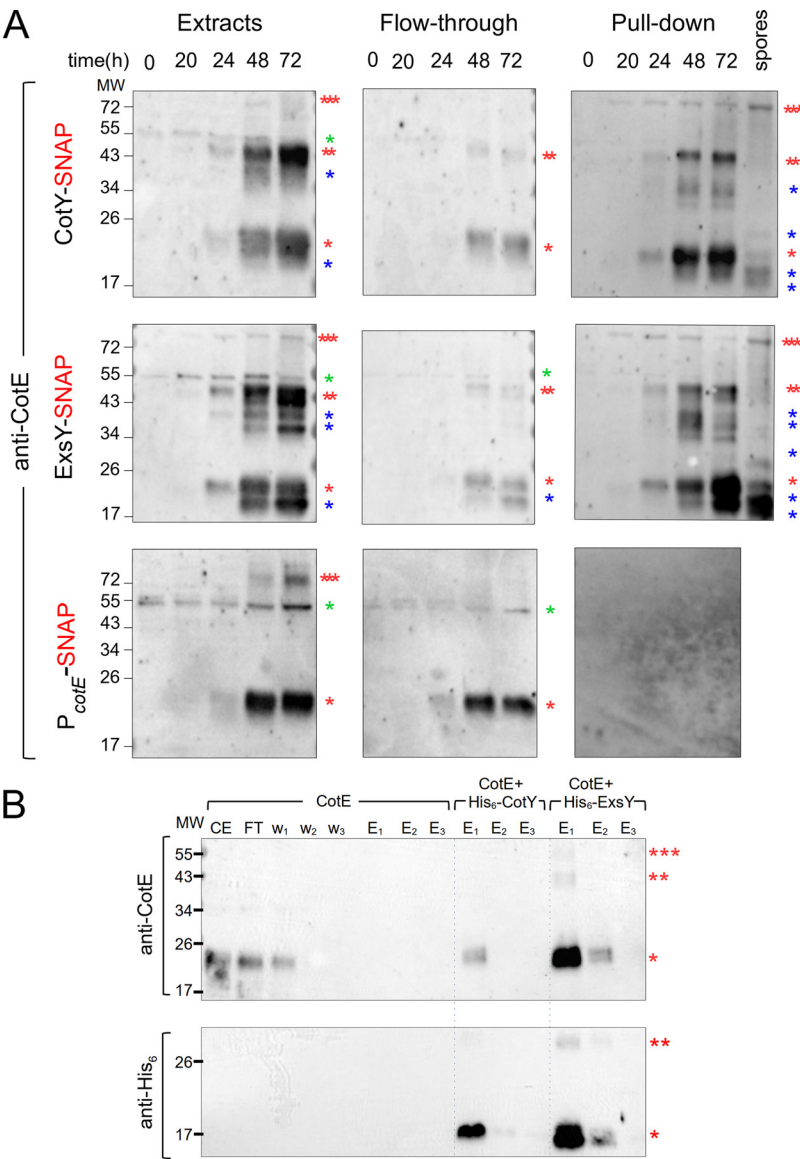


FIG 4 CotE, CotY, and ExsY form complexes *in vivo* and interact *in vitro*. (A) Samples were collected at the indicated times from sporulating cultures of *B. cereus* strains producing various SNAP fusions. Whole-cell extracts were prepared and subjected to pull-down assays with a SNAP capture resin. Whole-cell extracts, flowthrough, and bound proteins were resolved by SDS-PAGE and subjected to immunoblot analyses with anti-CotE antibodies. A lane corresponding to a pull-down assay performed on proteins extracted from purified CotY-SNAP and ExsY-SNAP spores was added. One red asterisk indicates a monomer of CotE; two red asterisks, a potential dimer of CotE; three red asterisks, multimers; blue asterisks, possible proteolytic products of CotE. A nonspecific signal in the extracts from vegetative cells (hour 0) is indicated by a green asterisk. (B) Heterologous coexpression pull-down assays. *E. coli* BL21(DE3) cells either producing CotE alone or coproducing CotE with His₆-CotY or His₆-ExsY were lysed and subjected to pull-down assays. Proteins were subjected to immunoblot analysis with anti-CotE (top) or anti-His₆ (bottom) antibodies. While CotE produced alone was not eluted from the Ni²⁺ beads (6th to 8th lanes, top), His₆-CotY pulled down CotE in E1 (9th lane, top) and was detected in E1 and E2 (9th and 10th lanes, bottom). CotE was pulled down with His₆-ExsY in E1 and E2 (12th and 13th lanes, top) and was detected in E1 and E2 (12th and 13th lanes, bottom). CE, cell extract; FT, flowthrough; w₁ to w₃, washes; E₁ to E₃, elutions. Red asterisks indicate the different species of CotE (upper panels), His₆-tagged CotY (9th to 11th lanes, bottom), or His₆-tagged ExsY (12th to 14th lanes, bottom). The positions of molecular weight (MW) markers (in kDa) are indicated on the left.

DISCUSSION

Here, we examined the assembly of the exosporium in *B. cereus*, focusing on CotY and ExsY and on their relationship with CotE. We show that CotY, ExsY, and CotE share a common pattern of localization and are detected as complexes throughout

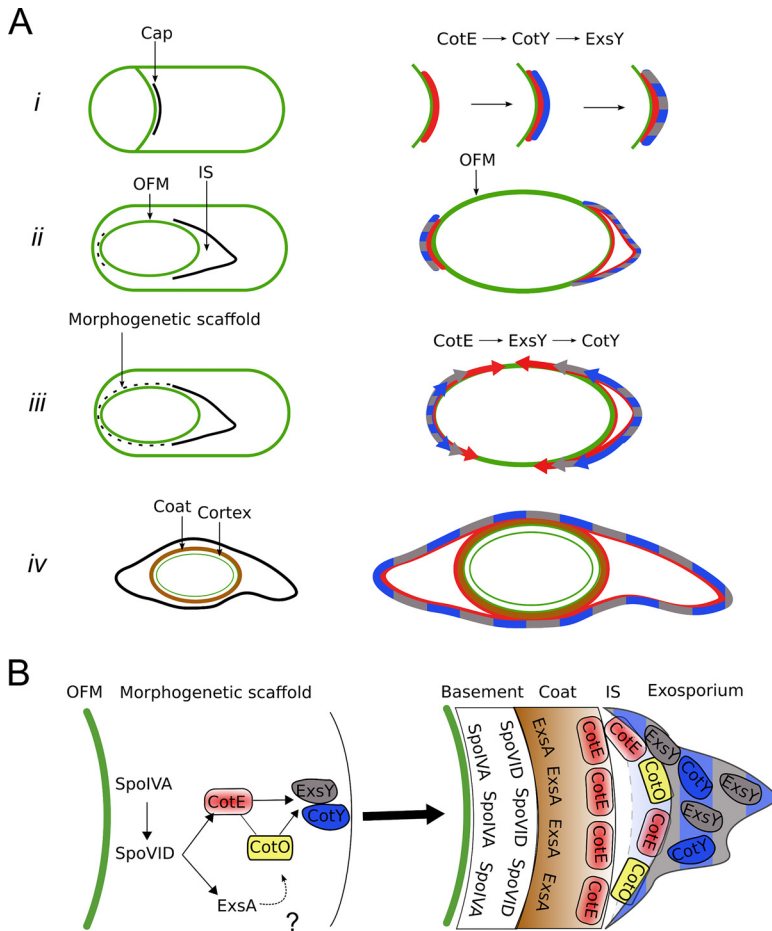


FIG 5 Successive localization, interactions, and interdependence among CotE, CotY, and ExsY during exosporium formation. (A) (Left) Assembly of the indicated spore structures as observed by TEM. Dotted lines show the new structures found in the present study. (Right) Diagrams showing the temporal sequence of localization of CotE, CotY, and ExsY inferred from our results. (i) CotE (red) forms a cap in the septal region at the onset of engulfment and recruits CotY (blue), which, in turn, recruits ExsY (gray). Once positioned, CotY and ExsY form the basal layer of the cap (mixed gray and blue). The cap remains unchanged until the completion of engulfment. (ii) After the completion of engulfment, the MCP cap is separated from the OFM by the formation of the interspace (IS), and CotE directs the localization of CotY, and therefore of ExsY, as a second cap on the MCD pole (dotted line). (iii) CotE progressively encases the spore starting from one longitudinal side of the forespore (red arrows), guiding the simultaneous encasement of ExsY (gray arrows), which, in turn, is required for the encasement of CotY (blue arrows). After the completion of encasement by CotE, CotY and ExsY cover the noncap region of the forespore as an immature morphogenetic scaffold (dotted line). (iv) After coat formation and insertion of the late-synthesized proteins, CotE, CotY, and ExsY are found in all the regions of the mature exosporium. (B) Formation of the morphogenetic scaffold and its maturation in *B. cereus*. Based on their roles in *B. subtilis*, SpoIVA and SpoVID homologs are good candidates for directing the recruitment and encasement, respectively, of CotE and CotE-controlled proteins. CotO, possibly through its interaction with CotE, may participate in the recruitment of CotY and/or ExsY. ExsA, a SafA homologue that controls *B. cereus* coat protein deposition, is also present in the morphogenetic scaffold. After sporulation completion, the proteins of the morphogenetic scaffold are positioned in the different layers of the mature spore.

sporulation and that CotE can interact directly with CotY and ExsY. CotY, ExsY, and CotE colocalize at the MCP forespore pole during engulfment, forming the MCP cap structure (Fig. 5Ai). After the completion of engulfment, the three proteins colocalize as a second cap at the MCD forespore pole (Fig. 5Aii). CotE is required for the localization of both ExsY and CotY as a cap at both poles; however, their MCD cap localization does not give rise to a structure detectable by TEM (Fig. 5Aii, dotted line). In the absence of CotE, CotY-SNAP forms dots at the forespore poles and ExsY-SNAP becomes dispersed throughout the mother cell cytoplasm. Finally, from the two caps, the three

proteins encase the forespore asymmetrically, covering one longitudinal side after the other (Fig. 5Aiii and iv). Thus, the assembly of the *B. cereus* exosporium does not seem to be unidirectional, as had been deduced from *B. anthracis* studies (5, 12, 35).

Certain aspects of this pathway deserve special attention. With SR-SIM, we were able to distinguish the cap part of the exosporium at the time of its separation from the OFM by the formation of the interspace, just after engulfment completion. We show that at this stage in morphogenesis, CotY, ExsY, and CotE migrate from the OFM to form the visible basal layer of the cap region of the exosporium and to start the encasement of the forespore (Fig. 5Aii and iii). How the separation of CotY, ExsY, and CotE to form the cap is brought about is unclear. With a CotE-SNAP fusion, we noticed that the cap was closer to the OFM, suggesting that the SNAP tag interferes with a function of the C-terminal region of CotE in the separation of the cap from the OFM and, more generally, that CotE may be implicated in interspace formation. However, this question, often raised (5, 22), has to be further investigated.

The localization of CotE, CotY, and ExsY at the MCP forespore pole gives rise to a visible separated MCP cap structure observed by SR-SIM and TEM. In contrast, we show that these proteins are already localized as a second cap at the MCD forespore pole, while this exosporium region is detectable by TEM only after coat assembly begins (Fig. 5Aii, dotted line). We detected a second cap structure by SR-SIM in *exsY* sporangia only, in which CotY-SNAP encasement is blocked. This second cap, not observed by TEM in *B. anthracis exsY* sporangia (10), is observed in *exsY* spores (without SNAP fusion) and in *exsY* spores with CotY-SNAP, whose fluorescent signal colocalizes with that from ExsY-SNAP inside the exosporium MCD cap structure. Notably, the CotY-SNAP signal at the MCD cap is often weaker than the signal from the MCP cap (pattern j) and is detected only in half of the free spores, while most of the sporangia present an MCD signal. This suggests that the MCD cap is less connected than the MCP cap to *exsY* spores and possibly dissociates when the spore is released. This presumably explains why the MCD cap was not reported by TEM, a more-disruptive technique, in previous studies (10).

The last events in the assembly of CotY, ExsY, and CotE around the forespore follow a particular dynamic, in that a three-quarters-of-a-circle localization pattern (pattern e) is detected. While CotY-SNAP localized as two caps (pattern d) in *exsY* sporangia, pattern e was not observed, showing that the localization as a three-quarter circle occurred after the localization as two caps and that this localization of CotY relies on ExsY. In addition, since the three-quarter-circle localization of CotE is independent of ExsY, it seems that CotE imposes this localization on ExsY and thus on CotY (Fig. 5Aiii). Recently, Boone et al. reported that the assembly of the exosporium in a *cotY* mutant, and therefore the assembly of ExsY, initiates at random locations (7). Based on our results, we propose that the encasement of the forespore by ExsY in a *cotY* mutant is allowed by a CotE-ExsY interaction, since asymmetric CotE encasement appears to be independent of CotY encasement. Therefore, it appears that CotE-ExsY interaction can bypass the possible requirement of CotY for ExsY recruitment.

Importantly, encasement by CotY, ExsY, and CotE was completed before the appearance of the noncap part of the exosporium or coat formation, as observed by TEM. We propose that these proteins form a morphogenetic scaffold at the surface of the noncap part of the forespore. Previous studies suggested that a region named the spore-free sacculus, or “sac,” is implicated in exosporium assembly, allowing the attachment of the cap in *exsY* sporangia as well as the assembly of ExsY (8, 10, 22). The morphogenetic scaffold that we describe here seems to correspond to this “sac” and relies largely on the interactions of CotE with CotY and ExsY during exosporium formation.

The assembly pathway of CotY, ExsY, and CotE is reminiscent of that of class II coat proteins in *B. subtilis*, which localize as an MCP cap and an MCD cap following engulfment completion when encasement starts. There are, however, differences to be highlighted. *B. subtilis* CotZ is a class III protein, i.e., it begins encasement only when the

forespore turns phase-dark. However, in *B. subtilis*, but not in *B. cereus*, the transcription of *cotY* and *cotZ* is under the control of GerE, which could explain the different behavior, since encasement also depends on waves of gene expression (20, 36). Finally, in the absence of CotZ, *B. subtilis* CotY fails to form a second cap (37).

Nevertheless, the assembly of the spore surface layers may follow common principles across species. The *B. subtilis* coat initially assembles as a scaffold composed of proteins present in the four layers of the mature coat, including SpoIVA, SpoVID, SafA, CotE, and CotZ. SpoIVA recruits proteins to the spore surface; SpoVID controls encasement; SafA controls the assembly of the inner coat; CotE directs the assembly of the outer coat; and together, CotE and CotZ govern the assembly of the crust (18–20). SpoIVA and SpoVID are conserved in the *B. cereus* group, where a *spoIVA* mutation leads to important defects of exosporium and coat assembly, as in *B. subtilis* (6, 22). It is likely that SpoIVA and SpoVID have similar roles in the *B. cereus* group (Fig. 5B). Recently, it was shown that the GerP coat proteins did not localize properly in a *B. cereus* *exsA* mutant but localized normally in a *cotE* mutant, suggesting separate control of coat and exosporium assembly (38). ExsA, a paralogue of *B. subtilis* SafA, is transcribed just after the initiation of sporulation, and while an *exsA* mutation impairs exosporium assembly, this is likely an indirect effect due to the misassembly of the internal coat (39). Thus, ExsA may also be present in the morphogenetic scaffold of *B. cereus* that we propose here (Fig. 5B) and may have a role equivalent to that of SafA in *B. subtilis* (40). Also recently, in *B. anthracis*, CotO was shown to share similar characteristics with CotY and ExsY. CotO is an orthologue of a class II morphogenetic protein implicated in the encasement of the spore by crust proteins in *B. subtilis* (20, 37). *B. anthracis* CotO interacts with CotE, is dependent on CotE for its localization, and shows potential class II localization kinetics (7). Thus, it is tempting to propose that CotO is part of the morphogenetic scaffold of *B. cereus* together with CotE, CotY, and ExsY (Fig. 5B). Interestingly, CotO is required for the assembly of the exosporium, and *cotO* mutation leads to a phenotype similar to that of *cotE* mutation (7), suggesting that CotE and CotO work in concert, possibly by stabilizing the complexes formed by CotE, CotY, and ExsY that we describe here.

The formation of the coat scaffold of *B. subtilis* and the dynamics of the coat/crust proteins are driven by self-polymerization and by direct interactions (21, 24). Similarly, it has been shown that CotY and ExsY could self-polymerize in *B. cereus* (8). We found that ExsY polymerization seems not to be dependent on CotE and is not required for CotE assembly around the spore but appears necessary for the assembly of CotY. The cross-linking, via formation of disulfide bonds, between ExsY monomers and with CotY, could be a driver of exosporium formation. The resulting ExsY/CotY expansion around the developing spore is guided by a sublayer of CotE, which, in turn, may rely on a SpoIVA/SpoVID platform. Thus, CotE and the CotE-controlled proteins, CotO, CotY and ExsY, are recruited in the *B. cereus* morphogenetic scaffold (Fig. 5B).

The incorporation of a second group of late-synthesized proteins, such as CotB, ExsB, ExsK, BxpB, BetA, or BclA, could allow the maturation of the coat and exosporium structures (3, 15, 16, 36, 41–44). Most of these proteins are unique to the *B. cereus* group and are likely responsible for the distinctive properties of the spore surface layers (22). In any case, regardless of the important structural differences observed between the *B. subtilis* and *B. cereus* proteinaceous layers, a scaffold made of morphogenetic proteins fulfills the same role in both by guiding the localization of other components through direct protein-protein interactions.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains and growth conditions. The bacterial strains and plasmids used in the present study are listed in Table S1. LB broth with orbital shaking (200 rpm) or LB agar plates were used for routine growth of *B. cereus* and *E. coli* at 37°C. When needed, liquid cultures or plates were supplemented with the following antibiotics at the indicated concentrations: ampicillin (Amp) at 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ for *E. coli* cultures, spectinomycin (Spc) at 275 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, and erythromycin (Erm) at 5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ for *B. cereus* cultures.

Other general methods. The construction of SNAP fusions and plasmids for the coproduction of proteins in *E. coli*, as well as the methods used for protein coproduction, pulldown assays, and immunoblot analysis, are described in Text S2 in the supplemental material.

Sporulation kinetics. Sporulation was induced in liquid SMB medium at either 20°C or 37°C with orbital shaking at 180 rpm, as described previously (23). Cells were harvested at the desired time by centrifugation for 10 min at $10,000 \times g$ before microscopy or immunoblot analysis. When necessary, spores were collected after 72 h of incubation and were purified by successive centrifugations and washes with cold water as described elsewhere (23). For immunoblot analysis, *B. cereus* spores were also produced at 20°C on modified fortified nutrient agar (mFNA) (23).

SNAP labeling and fluorescence microscopy. Samples (5 to 10 ml) were withdrawn from cultures in SMB at selected times during sporulation. Cells were collected by centrifugation ($10,000 \times g$ for 10 min), suspended in 200 μ l of phosphate-buffered saline (PBS), and labeled with TMR-Star (New England Biolabs) for 30 min at 37°C in the dark at a final concentration of 250 nM. This TMR-probed suspension was centrifuged ($12,000 \times g$, 3 min); then the cell sediment was washed with 1 ml of PBS, suspended again in 1 ml of PBS, and labeled with MitoTracker Green (MTG; Thermo Fisher) for 1 min at room temperature at a final concentration of 1 μ g/ml. The cells were then washed three times in PBS and suspended in 50 μ l to 200 μ l PBS, depending on the concentration of sporulating cells. For phase-contrast and fluorescence microscopy, a 3- μ l volume of the labeled cell suspension was applied to 1.7% agarose-coated glass slides and observed with an epifluorescence microscope (BX-61; Olympus) equipped with an Orca Flash 4.0 LT camera (Hamamatsu). Images were acquired using CellSens Olympus software, and micrographs were processed using ImageJ software. For quantification of the subcellular localization of SNAP fusions, a minimum of 150 cells were counted, and the different patterns identified were randomly examined and scored. Super-resolution structured illumination microscopy (SR-SIM) images were acquired using an Elyra PS.1 microscope (Zeiss) equipped with a Plan-Apochromat 63 \times /1.4 oil DIC M27 objective and a Pco. edge 5.5 camera, using 488-nm (100-mW) or 561-nm (100-mW) laser lines, at 5 to 20% of total potency (27). The grid periods used were 23 mm, 28 mm, or 34 mm for acquisitions with the 488-nm or 561-nm lasers. For each SR-SIM acquisition, the corresponding grating was shifted and rotated five times, giving a total of 25 acquired frames. Final SR-SIM images were reconstructed using ZEN software (black edition, 2012, version 8,1,0,484; Zeiss), using synthetic, channel-specific optical transfer functions (OTFs). At least 100 sporangia/30 spores produced at 20°C were examined at each sampling time. The distance between the cap and the forespore membranes was evaluated on at least 34 sporangia. All the kinetics were replicated at least twice using conventional fluorescence microscopy before being imaged once by SR-SIM.

Transmission electron microscopy. Sporulating cells were centrifuged at $3,500 \times g$ for 5 min and were fixed for 1 h at room temperature and overnight at 4°C with 5% (vol/vol) glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer (pH 7.2) containing 1 mg·ml⁻¹ ruthenium red. Cells suspended in 0.2 M sodium cacodylate were subjected to three successive centrifugations (5 min at $3,500 \times g$) and supernatant elimination and postfixed for 1 h at room temperature with 2% osmium tetroxide. Cells were observed by TEM (Hitachi HT7800). A minimum of 30 sporangia were examined at the different sampling times. The distance between the cap and the forespore membranes was scored on at least 15 sporangia (except for CotY-SNAP [$n = 11$]).

SUPPLEMENTAL MATERIAL

Supplemental material is available online only.

TEXT S1, DOCX file, 0.04 MB.

TEXT S2, DOCX file, 0.03 MB.

FIG S1, TIF file, 0.3 MB.

FIG S2, TIF file, 0.3 MB.

FIG S3, TIF file, 0.5 MB.

FIG S4, TIF file, 0.5 MB.

FIG S5, TIF file, 0.3 MB.

FIG S6, TIF file, 0.3 MB.

FIG S7, TIF file, 0.3 MB.

TABLE S1, DOCX file, 0.04 MB.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Mariana Pinho for providing access to the SR-SIM microscope, Pedro Matos for very efficient training on image acquisition and analysis software, Bénédicte Doublet for validation tests of *B. cereus* anti-CotE antibodies, and Cécile Morlot for fruitful discussions. We also thank Anne Moir for the gift of *exsY* and *cotY* mutant strains.

Work on A.L.'s Ph.D. thesis was funded by INRAE and PACA Region and was partly supported by a grant of MICA division and a Perdiguier grant of Avignon University. This work was also supported by FCT, "Fundação para a Ciência e a Tecnologia" Portugal,

through grant PEst-OE/EQB/LA0004/2011 to A.O.H. and by program IF (IF/00268/2013/CP1173/CT0006) to M.S. Financial support also came from project LISBOA-01-0145-FEDER-007660 (“Microbiologia Molecular, Estrutural e Celular”), funded by FEDER funds through COMPETE2020–“Programa Operacional Competitividade e Internacionalização,” and by project PPBI (Portuguese Platform of BioImaging) (PPBI-POCI-01-0145-FEDER-022122), cofunded by national funds from OE (Orçamento de Estado) and by European funds from FEDER (Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional). This work was also supported by the microscopy facilities of Platform 3A, funded by the European Regional Development Fund, the French Ministry of Research, Higher Education and Innovation, the PACA region, Vaucluse Departmental Council, and Avignon Urban Community.

REFERENCES

- Setlow P. 2014. Spore resistance properties. *Microbiol Spectrum* 2:TBS-0003-2012. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.TBS-0003-2012>.
- Ball DA, Taylor R, Todd SJ, Redmond C, Couture-Tosi E, Sylvestre P, Moir A, Bullough PA. 2008. Structure of the exosporium and sublayers of spores of the *Bacillus cereus* family revealed by electron crystallography. *Mol Microbiol* 68:947–958. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06206.x>.
- Sylvestre P, Couture-Tosi E, Mock M. 2002. A collagen-like surface glycoprotein is a structural component of the *Bacillus anthracis* exosporium. *Mol Microbiol* 45:169–178. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.03000.x>.
- Ohye DF, Murrell WG. 1973. Exosporium and spore coat formation in *Bacillus cereus* T. *J Bacteriol* 115:1179–1190. <https://doi.org/10.1128/JB.115.3.1179-1190.1973>.
- Stewart GC. 2015. The exosporium layer of bacterial spores: a connection to the environment and the infected host. *Microbiol Mol Biol Rev* 79:437–457. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00050-15>.
- Giorno R, Bozue J, Cote C, Wenzel T, Moody K-S, Mallozzi M, Ryan M, Wang R, Zielke R, Maddock JR, Friedlander A, Welkos S, Driks A. 2007. Morphogenesis of the *Bacillus anthracis* spore. *J Bacteriol* 189:691–705. <https://doi.org/10.1128/JB.00921-06>.
- Boone TJ, Mallozzi M, Nelson A, Thompson B, Khemmani M, Lehmann D, Dunkle A, Hoeprich P, Rasley A, Stewart G, Driks A. 2018. Coordinated assembly of the *Bacillus anthracis* coat and exosporium during bacterial spore outer layer formation. *mBio* 9:e01166-18. <https://doi.org/10.1128/mBio.01166-18>.
- Terry C, Jiang S, Radford DS, Wan Q, Tzokov S, Moir A, Bullough PA. 2017. Molecular tiling on the surface of a bacterial spore—the exosporium of the *Bacillus anthracis/cereus/thuringiensis* group. *Mol Microbiol* 104:539–552. <https://doi.org/10.1111/mmi.13650>.
- Johnson MJ, Todd SJ, Ball DA, Shepherd AM, Sylvestre P, Moir A. 2006. ExsY and CotY are required for the correct assembly of the exosporium and spore coat of *Bacillus cereus*. *J Bacteriol* 188:7905–7913. <https://doi.org/10.1128/JB.00997-06>.
- Boydston JA, Yue L, Kearney JF, Turnbough CL. 2006. The ExsY Protein is required for complete formation of the exosporium of *Bacillus anthracis*. *J Bacteriol* 188:7440–7448. <https://doi.org/10.1128/JB.00639-06>.
- Thompson BM, Stewart GC. 2008. Targeting of the BclA and BclB proteins to the *Bacillus anthracis* spore surface. *Mol Microbiol* 70:421–434. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06420.x>.
- Thompson BM, Hoelscher BC, Driks A, Stewart GC. 2012. Assembly of the BclB glycoprotein into the exosporium and evidence for its role in the formation of the exosporium ‘cap’ structure in *Bacillus anthracis*. *Mol Microbiol* 86:1073–1084. <https://doi.org/10.1111/mmi.12042>.
- Thompson BM, Waller LN, Fox KF, Fox A, Stewart GC. 2007. The BclB glycoprotein of *Bacillus anthracis* is involved in exosporium integrity. *J Bacteriol* 189:6704–6713. <https://doi.org/10.1128/JB.00762-07>.
- Sylvestre P, Couture-Tosi E, Mock M. 2005. Contribution of ExsFA and ExsFB proteins to the localization of BclA on the spore surface and to the stability of the *Bacillus anthracis* exosporium. *J Bacteriol* 187:5122–5128. <https://doi.org/10.1128/JB.187.15.5122-5128.2005>.
- Steichen CT, Kearney JF, Turnbough CL. 2005. Characterization of the exosporium basal layer protein BxpB of *Bacillus anthracis*. *J Bacteriol* 187:5868–5876. <https://doi.org/10.1128/JB.187.17.5868-5876.2005>.
- Thompson BM, Hsieh H-Y, Spreng KA, Stewart GC. 2011. The co-dependence of BxpB/ExsFA and BclA for proper incorporation into the exosporium of *Bacillus anthracis*. *Mol Microbiol* 79:799–813. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07488.x>.
- Rodenburg CM, McPherson SA, Turnbough CL, Dokland T. 2014. Cryo-EM analysis of the organization of BclA and BxpB in the *Bacillus anthracis* exosporium. *J Struct Biol* 186:181–187. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2014.02.018>.
- McKenney PT, Driks A, Eskandarian HA, Grabowski P, Guberman J, Wang KH, Gitai Z, Eichenberger P. 2010. A distance-weighted interaction map reveals a previously uncharacterized layer of the *Bacillus subtilis* spore coat. *Curr Biol* 20:934–938. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2010.03.060>.
- McKenney PT, Driks A, Eichenberger P. 2013. The *Bacillus subtilis* endospore: assembly and functions of the multilayered coat. *Nat Rev Microbiol* 11:33–44. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2921>.
- McKenney PT, Eichenberger P. 2012. Dynamics of spore coat morphogenesis in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* 83:245–260. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07936.x>.
- Jiang S, Wan Q, Krajcikova D, Tang J, Tzokov SB, Barak I, Bullough PA. 2015. Diverse supramolecular structures formed by self-assembling proteins of the *Bacillus subtilis* spore coat. *Mol Microbiol* 97:347–359. <https://doi.org/10.1111/mmi.13030>.
- Henriques AO, Moran CP, Jr. 2007. Structure, assembly, and function of the spore surface layers. *Annu Rev Microbiol* 61:555–588. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.61.080706.093224>.
- Bressuire-Isoard C, Bornard I, Henriques AO, Carlin F, Broussolle V. 2016. Sporulation temperature reveals a requirement for CotE in the assembly of both the coat and exosporium layers of *Bacillus cereus* spores. *Appl Environ Microbiol* 82:232–243. <https://doi.org/10.1128/AEM.02626-15>.
- Castaing J-P, Nagy A, Anantharaman V, Aravind L, Ramamurthi KS. 2013. ATP hydrolysis by a domain related to translation factor GTPases drives polymerization of a static bacterial morphogenetic protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:E151–E160. <https://doi.org/10.1073/pnas.1210554110>.
- Wang KH, Isidro AL, Domingues L, Eskandarian HA, McKenney PT, Drew K, Grabowski P, Chua M-H, Barry SN, Guan M, Bonneau R, Henriques AO, Eichenberger P. 2009. The coat morphogenetic protein SpoVID is necessary for spore encasement in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* 74:634–649. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06886.x>.
- de Francesco M, Jacobs JZ, Nunes F, Serrano M, McKenney PT, Chua M-H, Henriques AO, Eichenberger P. 2012. Physical interaction between coat morphogenetic proteins SpoVID and CotE is necessary for spore encasement in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 194:4941–4950. <https://doi.org/10.1128/JB.00914-12>.
- Gustafsson MGL. 2000. Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy. *J Microsc* 198:82–87. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2818.2000.00710.x>.
- Pereira FC, Saujet L, Tomé AR, Serrano M, Monot M, Couture-Tosi E, Martin-Verstraete I, Dupuy B, Henriques AO. 2013. The spore differentiation pathway in the enteric pathogen *Clostridium difficile*. *PLoS Genet* 9:e1003782. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003782>.
- Saujet L, Pereira FC, Serrano M, Soutourina O, Monot M, Shelyakin PV, Gelfand MS, Dupuy B, Henriques AO, Martin-Verstraete I. 2013. Genome-wide analysis of cell type-specific gene transcription during spore formation in *Clostridium difficile*. *PLoS Genet* 9:e1003756. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003756>.
- Serrano M, Kint N, Pereira FC, Saujet L, Boudry P, Dupuy B, Henriques AO, Martin-Verstraete I. 2016. A recombination directionality factor controls the cell type-specific activation of σ^K and the fidelity of spore

- development in *Clostridium difficile*. PLoS Genet 12:e1006312. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006312>.
31. Cassona CP, Pereira F, Serrano M, Henriques AO. 2016. A fluorescent reporter for single cell analysis of gene expression in *Clostridium difficile*, p 69–90. In Roberts AP, Mullany P (ed), *Clostridium difficile: methods and protocols*. Springer, New York, NY.
 32. Mercier R, Kawai Y, Errington J. 2013. Excess membrane synthesis drives a primitive mode of cell proliferation. Cell 152:997–1007. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.01.043>.
 33. Serrano M, Crawshaw AD, Dembek M, Monteiro JM, Pereira FC, Pinho MG, Fairweather NF, Salgado PS, Henriques AO. 2016. The SpoIIQ-SpoIIAH complex of *Clostridium difficile* controls forespore engulfment and late stages of gene expression and spore morphogenesis. Mol Microbiol 100:204–228. <https://doi.org/10.1111/mmi.13311>.
 34. Krajčiková D, Lukáčová M, Müllerová D, Cutting SM, Barák I. 2009. Searching for protein-protein interactions within the *Bacillus subtilis* spore coat. J Bacteriol 191:3212–3219. <https://doi.org/10.1128/JB.01807-08>.
 35. Stewart GC. 2017. Assembly of the outermost spore layer: pieces of the puzzle are coming together. Mol Microbiol 104:535–538. <https://doi.org/10.1111/mmi.13651>.
 36. Peng Q, Kao G, Qu N, Zhang J, Li J, Song F. 2016. The regulation of exosporium-related genes in *Bacillus thuringiensis*. Sci Rep 6:19005. <https://doi.org/10.1038/srep19005>.
 37. Shuster B, Khemmani M, Abe K, Huang X, Nakaya Y, Maryn N, Buttar S, Gonzalez AN, Driks A, Sato T, Eichenberger P. 2019. Contributions of crust proteins to spore surface properties in *Bacillus subtilis*. Mol Microbiol 111:825–843. <https://doi.org/10.1111/mmi.14194>.
 38. Ghosh A, Manton JD, Mustafa AR, Gupta M, Ayuso-Garcia A, Rees EJ, Christie G. 2018. Proteins encoded by the *gerP* operon are localized to the inner coat in *Bacillus cereus* spores and are dependent on GerPA and SafA for assembly. Appl Environ Microbiol 84:e00760-18. <https://doi.org/10.1128/AEM.00760-18>.
 39. Bailey-Smith K, Todd SJ, Southworth TW, Proctor J, Moir A. 2005. The ExsA protein of *Bacillus cereus* is required for assembly of coat and exosporium onto the spore surface. J Bacteriol 187:3800–3806. <https://doi.org/10.1128/JB.187.11.3800-3806.2005>.
 40. Takamatsu H, Kodama T, Nakayama T, Watabe K. 1999. Characterization of the *yrbA* gene of *Bacillus subtilis*, involved in resistance and germination of spores. J Bacteriol 181:4986–4994. <https://doi.org/10.1128/JB.181.16.4986-4994.1999>.
 41. Thompson BM, Hoelscher BC, Driks A, Stewart GC. 2011. Localization and assembly of the novel exosporium protein BetA of *Bacillus anthracis*. J Bacteriol 193:5098–5104. <https://doi.org/10.1128/JB.05658-11>.
 42. Motomura K, Ikeda T, Matsuyama S, Abdelhamid MAA, Tanaka T, Ishida T, Hirota R, Kuroda A. 2016. The C-terminal zwitterionic sequence of CotB1 is essential for biosilicification of the *Bacillus cereus* spore coat. J Bacteriol 198:276–282. <https://doi.org/10.1128/JB.00447-15>.
 43. McPherson SA, Li M, Kearney JF, Turnbough CL. 2010. ExsB, an unusually highly phosphorylated protein required for the stable attachment of the exosporium of *Bacillus anthracis*. Mol Microbiol 76:1527–1538. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07182.x>.
 44. Severson KM, Mallozzi M, Bozue J, Welkos SL, Cote CK, Knight KL, Driks A. 2009. Roles of the *Bacillus anthracis* spore protein ExsK in exosporium maturation and germination. J Bacteriol 191:7587–7596. <https://doi.org/10.1128/JB.01110-09>.

SUPPLEMENTAL TEXT

The morphogenetic protein CotE positions exosporium proteins CotY and ExsY during sporulation of *Bacillus cereus*

Armand Lablaine^a, Monica Serrano^b, Christelle Bressuire-Isoard^a, Stephanie Chamot^a, Isabelle Bornard^c, Frederic Carlin^a, Adriano O. Henriques^{b*} and Veronique Broussolle^{a*}

^a INRAE, Avignon Université, UMR SQPOV, F-84000 Avignon, France

^b Instituto de Tecnologia Quimica e Biologica, Universidade Nova de Lisboa, 2780-157 Oeiras, Portugal

^c INRAE, Pathologie végétale, F-84143 Montfavet, France

* address correspondence to Veronique Broussolle, veronique.broussolle@inrae.fr and Adriano O. Henriques, aoh@itqb.unl.pt

Running title: Assembly of *Bacillus cereus* exosporium

Keywords: Spore, morphogenetic proteins, exosporium, SR-SIM

SUPPLEMENTAL RESULTS AND DISCUSSION

A role for CotE in separation of the cap from the forespore. Previous proteomic studies reported the presence of a cleavage product of CotE corresponding to the N-terminal domain of the protein in the exosporium basal layer of *B. cereus* (1, 2). Here we noticed that the fluorescence signal from CotE-SNAP (*i.e.*, with the SNAP-tag fused to the C-terminal end of CotE) slightly differs from the signal obtained with SNAP-CotE (with the SNAP-tag fused to the N-terminal end of CotE) in cells having completed engulfment (Fig. S2A): notably, we did not observe migration of CotE-SNAP from the OFM into the MCP exosporium cap, as seen for CotY-, ExsY-SNAP and SNAP-CotE (Fig. 1 and Fig. S1). We consider two possibilities: i) CotE domains may be partitioned between the exosporium and the coat, or ii) the exosporium cap may not correctly separate from the OFM after engulfment completion. In trying to answer this question, we analyzed 46 SR-SIM images of post-engulfed WT cells producing CotE-SNAP: we estimated that the average distance between the external limit of the MTG cap signal and the signal of the forespore membranes was 180 ± 38 nm (mean \pm sd, n=46) (Fig. S2A, panels *c* to *f*, pink arrows) and therefore was less than that measured in WT post-engulfed cells without SNAP fusion 238 ± 70 nm, (n=34; not shown) or in WT cells producing CotY-SNAP (242 ± 79 nm, n=72; Fig. 1). However, while the signals from CotY-SNAP, ExsY-SNAP and SNAP-CotE clearly appeared in the exosporium layer labeled with MTG in sporangia imaged at hour 48 (Fig. 1, S1A and B, panels *g* and *h*), CotE-SNAP seemed to be present in a more internal layer, distinct from the exosporium (Fig. S2A, panel *g*, blue arrow). These differences suggest that the CotE-SNAP fusion interferes with the separation of the cap from the forespore membranes. Additionally, on TEM images of CotE-SNAP sporangia that had completed engulfment (Fig. S2C), we never observed the separated cap structure seen in WT sporangia (Fig. S3C). Based on measurements made on 22 TEM images of post-engulfed CotE-SNAP sporangia, we estimate that the average distance between the external limit of the cap from the forespore membranes was only of 83 ± 38 nm (Fig. S2B), shorter than in WT cells (147 ± 51 nm, n=26; Fig. S3C) or in CotY-SNAP sporangia (161 ± 27 nm, n=11; not shown). Together those results show that

the presence of the CotE-SNAP fusion in the WT background interferes with the separation of the exosporium cap after engulfment completion. However, as the wild-type CotE copy is also present and may carry out normal interactions, this interference seems surprising. Morphogenetic coat proteins are known to interact with multiple partners (3-7), notably *B. anthracis* CotE interacts with CotO and the complex formed by those proteins is proposed to be involved in the separation of the exosporium from the coat (8). Thus, if the addition of the SNAP-tag at the C-terminal domain of CotE impairs CotE interactions with partners, the interaction of CotE with CotE-SNAP may prevent CotE to interact with the other partners by antagonizing the site of interactions. Supporting this hypothesis, we observed that CotE-SNAP pulls down CotE during sporulation (data not shown). However, a redundant mechanism seems to allow interspace formation in the MCP region, as we observed a normal exosporium in phase-bright sporangia expressing CotE-SNAP collected at hour 48 (Fig. S2C). In the non-cap region of the exosporium, the interspace is formed later, at the time of coat deposition (9), thus the MCP cap may be separated at this later time in CotE-SNAP sporangia. Altogether, those results show that the production of CotE-SNAP in a WT background interferes transiently with the separation of the MCP cap from the OFM, in a way we presently do not fully understand.

The encasement by the proteins of the morphogenetic scaffold is bidirectional and asymmetric. After engulfment completion and before the forespore turns phase bright and coat is detected by TEM, CotE-, CotY- and ExsY-SNAP show heterogeneous localization patterns, meaning that encasement by those proteins is a rapidly evolving process (Fig. 1 and S1, patterns c to f). Importantly, the two caps localization (pattern d) may indicate that the assembly process of CotE-, CotY- and ExsY-SNAP can be bidirectional, as observed during encasement by CotE, CotY and CotZ *B. subtilis* orthologues (10-11). This is quite unexpected, as in *B. anthracis*, exosporium assembly is seen as unidirectional, starting from the MCP cap and progressing towards the MCD forespore pole. Furthermore, TEM analysis of *B. cereus* sporangia supports the same unidirectional exosporium assembly (9,12-14).

To better understand how CotE, CotY and ExsY encase the forespore after engulfment completion, we analyzed specifically SR-SIM images of CotY-SNAP sporangia with an identifiable exosporium MCP cap and advanced patterns of CotY-SNAP encasement, *i. e* patterns *d* or *e* (Fig S3A-C, n=75). Surprisingly, we noticed different orientations of the exosporium MCP cap structure (pink arrows) regarding the axis of the mother cell (MC, yellow arrows). The exosporium MCP cap was aligned with the MC longitudinal axis (blue arrows) in 25 out of 75 sporangia observed, and was off-center in a majority of sporangia (50 out of 75). Most of the sporangia with an off-center MCP cap (47 out of 50 cells, panels A and B) showed a $\frac{3}{4}$ of a circle localization of CotY-SNAP, with a MCD forespore pole encased (Fig. S3B, 21 out of 50 sporangia) or not encased by CotY-SNAP (Fig S3A, 26 out of 50). In contrast, among the 25 sporangia with a MCP cap structure aligned with the axis of the MC (Fig. S3A-C, blue arrows), 21 showed a typical two caps-localization pattern (Fig. S3C), while only 4 presented a $\frac{3}{4}$ of a circle localization pattern (not shown and Fig. S3A-B). The same observations were obtained for ExsY-SNAP and SNAP-CotE sporangia (data not shown), suggesting that the MCP cap formed by CotE, CotY and ExsY can be mobile around the forespore.

The apparent mobility of the proteins forming the exosporium cap around the forespore makes it difficult to draw any conclusions regarding the final step of encasement by those proteins. However, we speculate that the offset of the MCP cap observed in cells expressing CotY-, ExsY-SNAP and SNAP-CotE should require the separation of the cap from the OFM by the interspace formation. Thus, as we reported that the expression of CotE-SNAP in WT cells precisely affects this mechanism, which normally occurs after engulfment completion, we deeply investigated the encasement by CotE-SNAP. We identified 94 engulfed sporangia showing an aggregated MTG signal close to the OFM, corresponding to the connected MCP cap, as reported in Fig. S2 (pink arrow) and showing a two caps localization (Fig. S3D) or a $\frac{3}{4}$ of a circle localization of CotE-SNAP (Fig. S3E). Only 6 of these cells presented an off-center MCP cap structure which, additionally,

appeared normally separated from the OFM (data not shown). Importantly, 88 out of 94 sporangia show a MCP exosporium cap aligned with the MC axis (panels E-F, blue arrows). This result confirms that the changes of exosporium MCP cap alignment observed in SNAP-CotE, CotY- or ExsY-SNAP cells (Fig. S3A-B and not shown) required the separation of the cap from the OFM. Moreover, half of the counted sporangia with an exosporium cap in the MC axis presented a typical two caps-localization of CotE-SNAP (Fig. S3D) and the other half showed a $\frac{3}{4}$ of circle pattern, with only one small side of the forespore not covered by a red fluorescent signal (Fig. S3E, orange arrow). Importantly, in those sporangia presenting a $\frac{3}{4}$ of a circle localization of CotE-SNAP the MCD forespore pole was always covered by CotE-SNAP (Fig. S3E), in contrast to sporangia with a $\frac{3}{4}$ of a circle CotY-SNAP localization, which are mostly partly covered (Fig. S3B) or fully uncovered in the MCD region (Fig. S3A). This result show that the observation of a $\frac{3}{4}$ of a circle localization with a MCD forespore pole not encased by CotY-SNAP is linked to the observation of an off-center MCP cap.

Altogether, our results demonstrate that the encasement by CotE, and possibly CotY and ExsY, is a bidirectional mechanism, as it occurred through the localization of CotE at the MCD pole. Additionally, the last step of this encasement is asymmetric, as it covers only one longitudinal side of the forespore before the other one. However, in sporangia where the exosporium cap is normally separated from the OFM, a movement, around the forespore, of the proteins forming the MCP cap can hide this sequence of encasement. Strikingly, in the exosporium-less *B. subtilis*, the progression of CotE and CotZ localization is one single cap, two-unconnected caps and two-connected caps (11). Little is known about the transition between the two unconnected and connected caps, except that this localization of CotE depends on the transcriptional regulator SpoIIID (11). Here, thanks to our super-resolution images, we observed a similar pattern of CotE-SNAP localization in *B. cereus* cells defective in exosporium cap separation. Altogether, those observations support that the encasement mechanism by CotE, and CotE-controlled proteins is similar in *B. cereus* and *B. subtilis*.

CotE is required for cap formation in *B. cereus*. We found that, in the absence of *cotE*, CotY-SNAP failed to assemble as a cap (Fig. 2). As CotY is proposed to be a key component of the cap, we wondered whether the cap normally assembles in the absence of CotE, as in *B. anthracis* (8). We examined *cotE* sporulating cells by TEM and we never detected the presence of a cap in *cotE* sporangia in sporangia that had just completed the engulfment process (Fig. S4E) or in sporangia presenting a dehydrated core and signs of cortex formation (Fig. S4F). In contrast, a clearly separated cap structure was visible in WT sporangia at the same sporulation stages (Fig. S4B-C). In 80% of *cotE* sporangia with visible signs of coat deposition, as assessed using TEM, exosporium material formed large aggregates that appeared connected to the MCP forespore pole or located in the mother cell cytoplasm (Fig. S4G and H), while the exosporium was absent in 20% of the sporangia. Moreover, the accumulation of exosporium material observed with TEM overlapped with the fluorescence signal of ExsY-SNAP aggregates observed with SR-SIM in the mother cell cytoplasm (Fig. 2B, panel f). ExsY self-polymerization could lead to the accumulation of exosporium material seen in *cotE* sporangia, indicating that CotE is not required for ExsY polymerization (Fig. S4G-H).

An absence of cap in *B. anthracis* resulted in abnormal coat development (8). In line with this observation, 61% of *cotE* sporangia (as opposed to 9% in WT sporangia) exhibited an abnormal pattern of coat deposition, with coat material found at the MCP forespore pole, whereas other regions of the forespore were not covered by coat material (Fig. S4G). Together, these observations indicate a failure of cap assembly in *cotE* sporangia leading to an abnormal coat deposition and delayed exosporium formation in *B. cereus*, as in *B. anthracis cotE* mutant (8, 15). Finally, in line with these observations, no cap was observed in *cotE* sporangia imaged by SR-SIM (Fig. 2A-B, panels d). This also confirms that the SR-SIM signal detected at the time of formation of the interspace, just after engulfment completion, in WT sporangia, corresponds to the cap (Fig. 1, panels d and e, pink arrows).

CotE and CotY form a complex at the cap independently of ExsY. We show that CotE

forms complexes with CotY and ExsY throughout sporulation (Fig. 4; see also the main text) and we wondered whether CotE and CotY formed a complex in the absence of ExsY. We thus performed a pull-down assay using the SNAP-capture matrix, on extracts prepared from sporulating cultures of an *exsY* mutant producing CotY-SNAP at 20°C. Note that the pathway of CotY-SNAP localization in *exsY* sporangia formed at 20°C or at 37°C were undistinguishable (Fig. 3A and S7B). We detected different forms of CotY-SNAP in cell extracts prepared from samples collected at hours 48 and 72 (Fig. S7A). CotY-SNAP was present in cells at hour 28 when imaged by fluorescence microscopy (Fig. S7B) but likely below our detection level by immunoblotting (Fig. S7A, extracts panel). CotE was detected as multimers from hour 28 and as monomers from hour 48 (Fig. S7A, extracts panel, two and one red asterisks, respectively). In the flow-through, after incubation of the extracts prepared from the *exsY* mutant producing CotY-SNAP from hour 48, we detected CotY-SNAP as monomers (one red asterisk), high molecular complex (two red asterisks), and less abundant fragments possibly resulting from proteolysis (blue asterisks). CotY-SNAP was pulled-down with the extracts produced from the *exsY* mutant producing CotY-SNAP at hour 48, but not at hour 72 (Fig. S7A, pull-down panel). We found that CotE was pulled-down by CotY-SNAP in extracts from the *exsY* mutant prepared at hour 48 (Fig. S7A, pull-down panel) while an unknown protein non-specifically recognized by the anti-CotE antibody was not and was lost in the flow-through (Fig. S7A, hour 0, green asterisk). This shows an association of CotE with CotY in the cap, independently of ExsY.

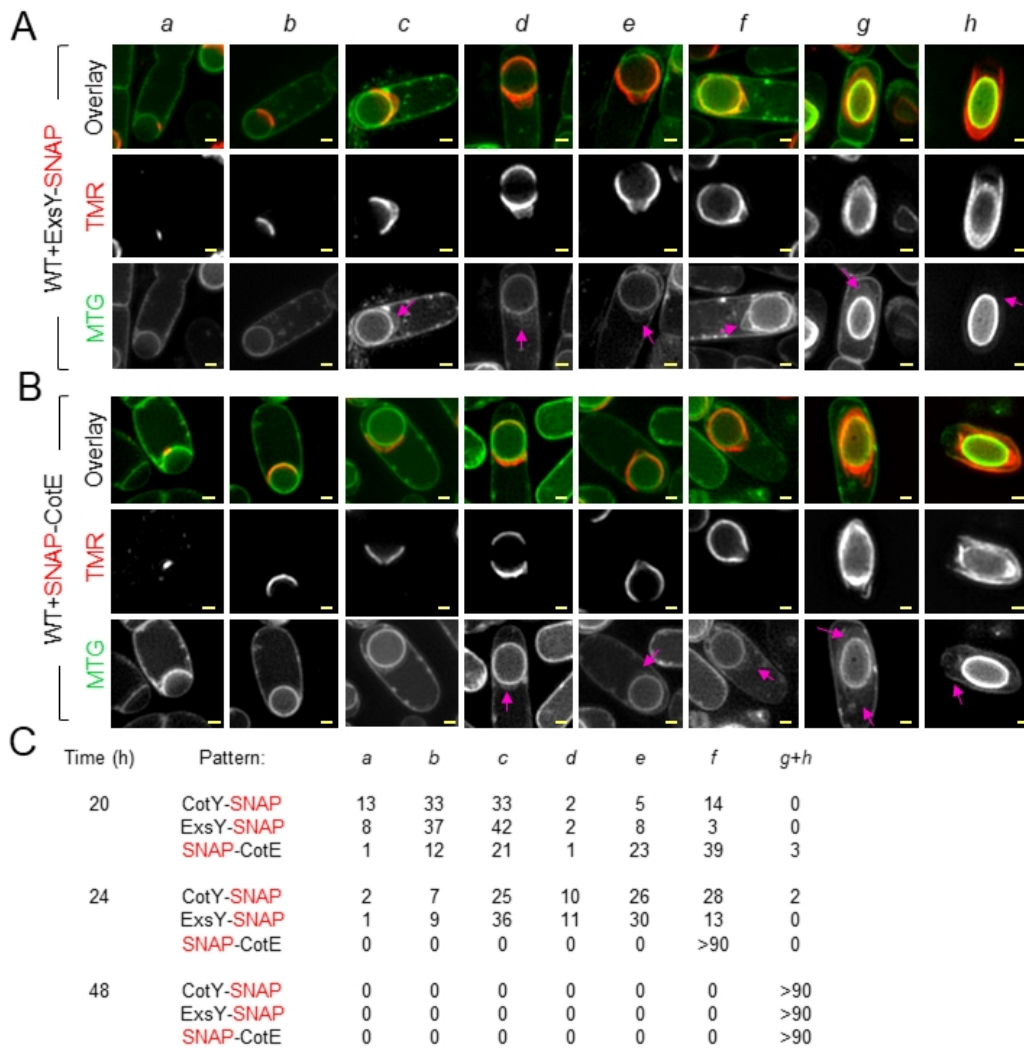


FIG S1 Stages of ExsY-SNAP and SNAP-CotE localization during sporulation. Sporulating cells of *B. cereus* producing ExsY-SNAP (A) or SNAP-CotE (B) were labeled with the SNAP substrate TMR-Star and with the membrane dye MTG and imaged by SR-SIM microscopy. Cells representative of the different localization patterns seen (a to h, see Fig. 1) are presented. TMR panels correspond to the signal from the SNAP fusion, MTG corresponds to the membrane signal. Pink arrows point to exosporium at the different steps of its formation. Scale bar, 0.5 μm . (C) The percentage of sporulating cells showing the indicated patterns at the different times of sampling is presented for CotY-SNAP, ExsY-SNAP and SNAP-CotE.

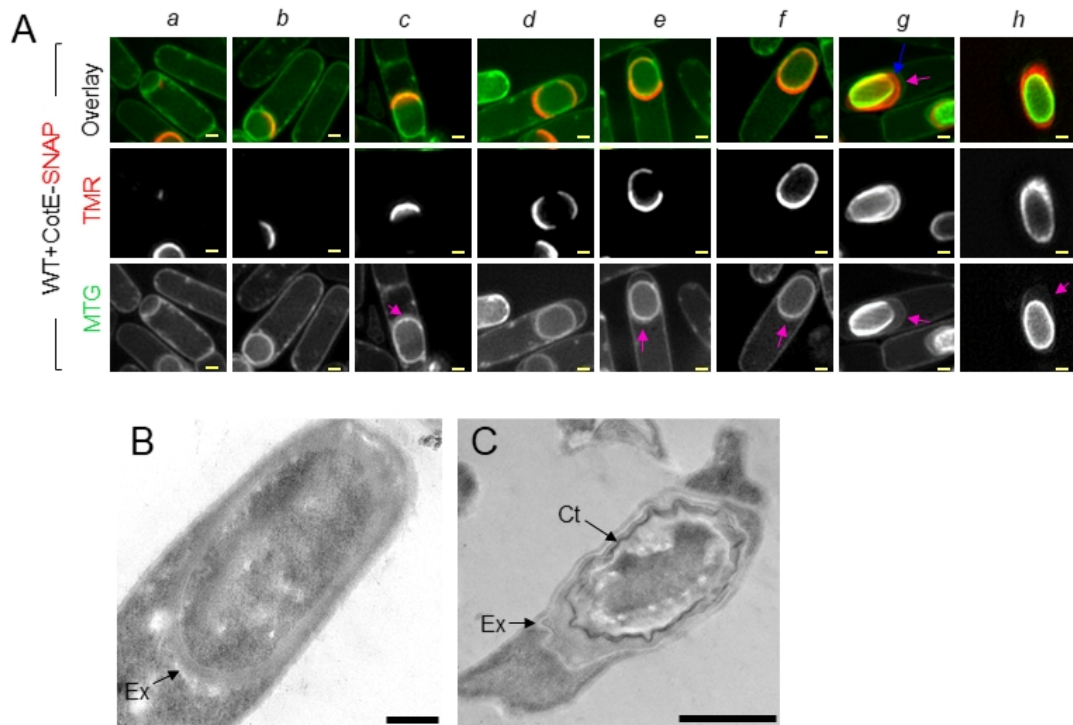


Fig S2 Fusion of the SNAP tag to the C-terminus of CotE affects separation of the MCP cap after engulfment completion. (A) Sporulating WT cells of *B. cereus* producing SNAP-CotE were labeled with TMR-Star and MTG and imaged by SR-SIM microscopy. The blue arrow points to a layer formed by CotE-SNAP distinct from the exosporium layer (pink arrows). This layer was not observed with the other SNAP-fusions tested (Fig. 1, S2A-B). Scale bar, 0.5 μ m. Thin-sections of a representative CotE-SNAP-producing sporulating cell (B) after engulfment completion showing a prominent cap at the MCP forespore pole (black arrow) Scale bar, 200 nm ; (C) following coat formation, the exosporium appeared to have a normal structure. Scale bar, 500 nm. Ex, exosporium; Ct, coat.

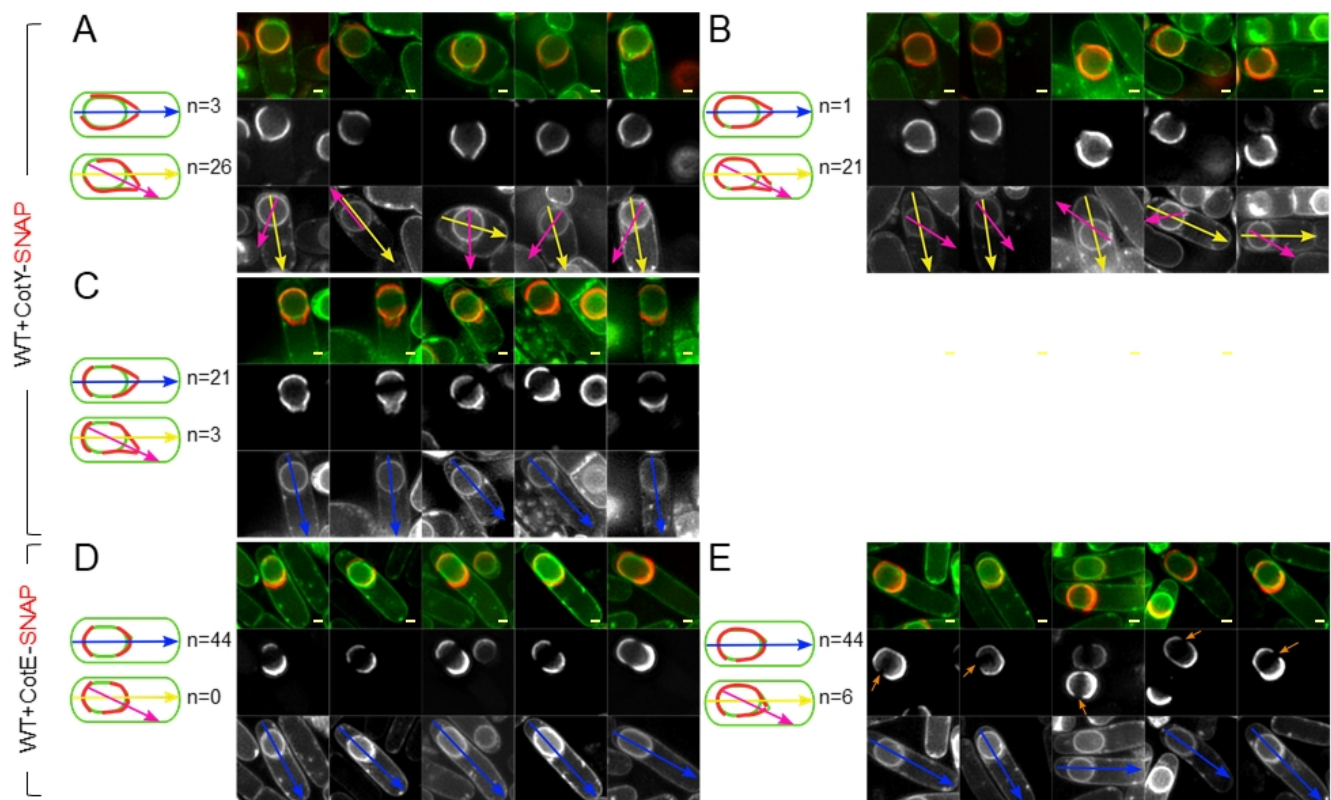


FIG S3 Asymmetric bidirectional encasement by proteins of the exosporium morphogenetic scaffold. SR-SIM images of sporulating WT cells producing CotY-SNAP (A-C) or CotE-SNAP (D-E), showing a pattern *d* (C and D) or pattern *e* (A, B and E). Sporulating cells with an exosporium MCP cap, not orientated in the mother cell (MC) axis present a $\frac{3}{4}$ of a circle localization pattern of CotY-SNAP (A-B) with; (A) a MCD forespore not encased; (B) a MCD pole encased or partly encased by CotY-SNAP. The yellow arrows represent the MC axis and the pink arrows show the orientation of the exosporium MCP cap structure. (C) sporulating cells with an exosporium cap structure in the MC axis show a two caps-localization of CotY-SNAP. The blue arrows indicate that the exosporium cap is in the MC axis. CotE-SNAP sporangia present a connected MCP exosporium in the MC axis. (D) First, the cells are not covered by CotE-SNAP on the forespore longitudinal side and (E) before a complete encasement by CotE-SNAP, cells present only a gap of fluorescence on one longitudinal side of the forespore, showing an asymmetric encasement (orange arrows). A scheme represent the different orientation of exosporium cap structures, relative to the MC axis, the relative

pattern of SNAP-protein localization (red line) and the number of sporangia scored in each category. Only images of the most abundant patterns are presented. Scale bars, 0.5 μm .

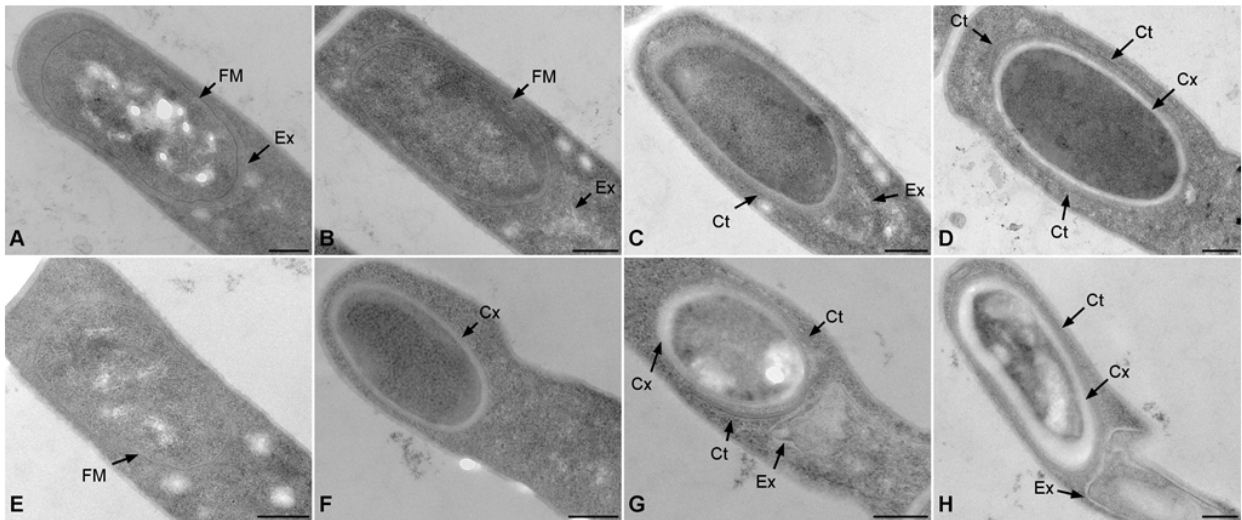


Fig S4 Absence of CotE impairs cap formation and leads to a modified pattern of coat deposition. Thin-sections of sporulating *B. cereus* ATCC 14579 (A to D) or *cotE* (E to H) cells, collected after hour 24 (A-B), hour 28 (C-D), hour 31 (E) or hour 48 (F-H) of sporulation at 20°C and observed by TEM. (A) A forespore presenting a cap at the MCP ; (B) a cap separated from the forespore surface ; (C) coat deposition on the longitudinal side or (D) coat deposition on the longitudinal sides and at the MCD forespore pole. (E-H) forespore of a *cotE* mutant after engulfment completion (E) without any visible coat or cortex (F) with a visible cortex and without any cap or exosporium material, in contrast with the WT at a similar stage of development (A-C); (G) a *cotE* forespore with altered coat assembly or (H) with large accumulation of exosporium material in the mother cell cytoplasm. FM, forespore membranes; Ex, exosporium material (cap in A-B-C); Cx, cortex; Ct, coat. Scale bar, 200nm.

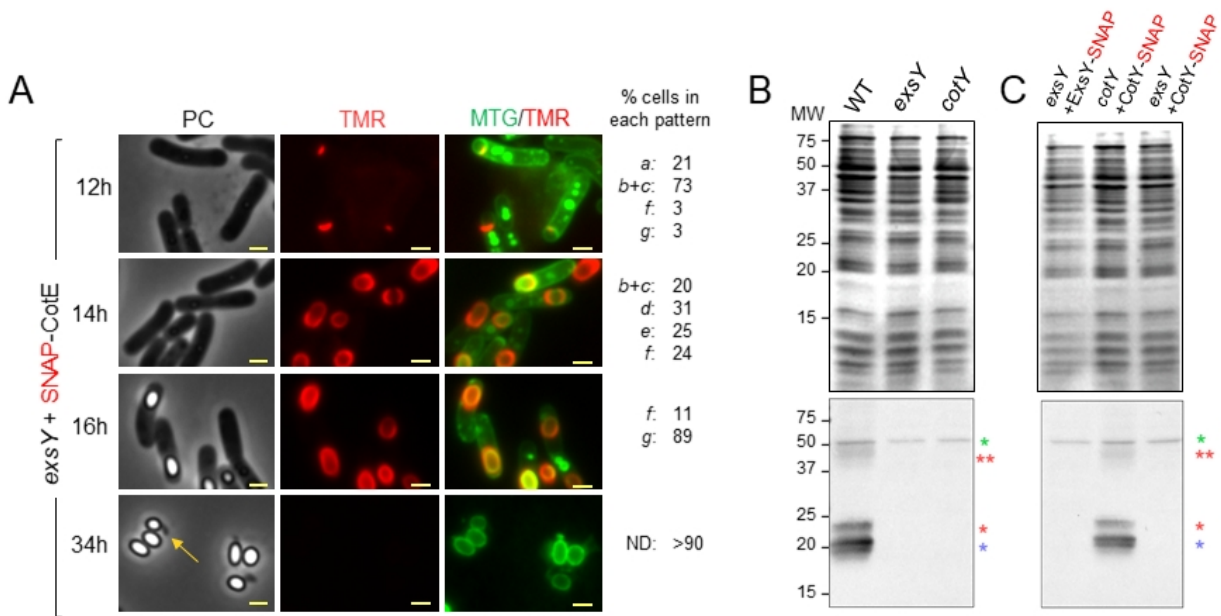


FIG S5 Localization of SNAP-CotE during sporulation of the *exsY* mutant. (A) Sporulating cells of an *exsY* mutant producing SNAP-CotE were collected at the indicated times and analyzed by fluorescence microscopy. The *a-g* patterns are similar to the ones described for WT producing SNAP-CotE (Fig. 1 and Fig. S1B). Numbers on the right indicate percentage of cells identified in each pattern (see Fig. 1 and main text). ND, the fluorescence signal from SNAP-CotE is not detected. The yellow arrow points to the cap structure typically observed in *exsY* spores. Scale bar, 1 μ m. Coat/exosporium extracts were prepared from spores of ATCC 10876 and the congenic *exsY* and *cotY* mutants (B) of and derivative strains complemented through the ectopic production of ExsY-SNAP or CotY-SNAP (C) separated by SDS-PAGE and subject to immunoblotting with anti-CotE (bottom panels). The Coomassie-stained gels are shown as a loading control (top panels). One red asterisk indicates the CotE monomer, two red asterisks indicate a possible dimer, blue asterisks point to possibly cleaved forms; green asterisks point to non-specific bands (see also Fig. S7). In B and C, the position of molecular weight markers (MW, in kDa) is shown on the left side of the panels.

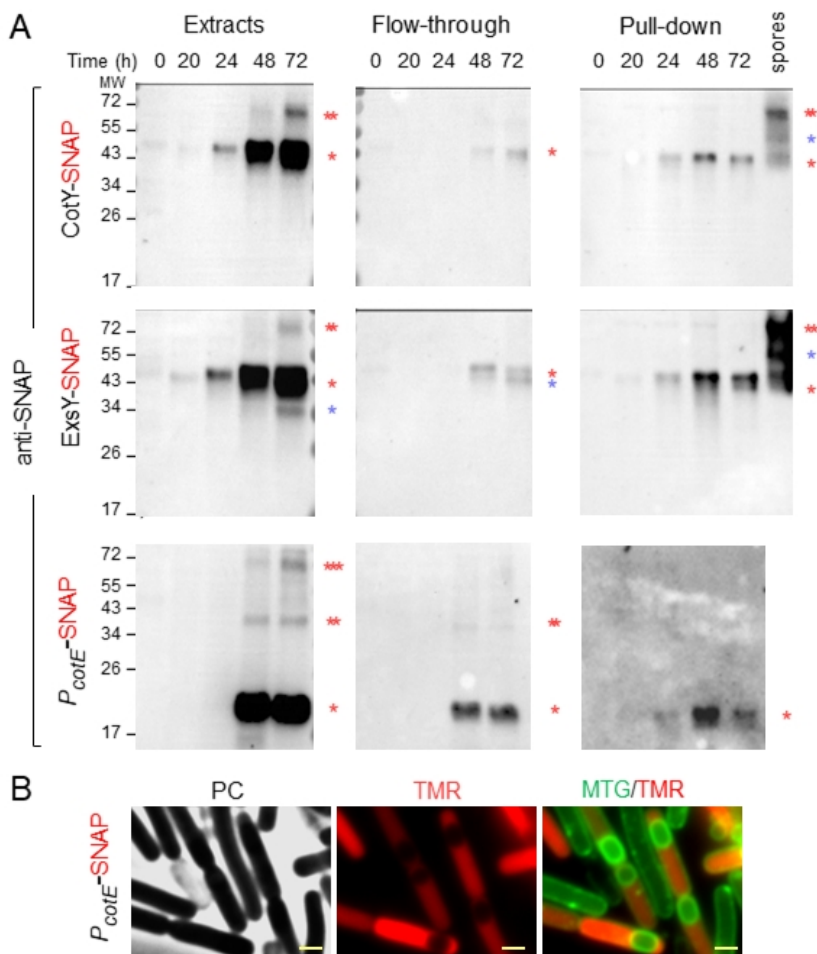


FIG S6 CotY-SNAP, ExsY-SNAP and SNAP (the latter produced under the control of *cotE* promoter, *pcotE*-SNAP) accumulate in cell extracts throughout *B. cereus* sporulation. (A) WT cells with the indicated SNAP-fusions were harvested at the indicated times during sporulation. Extracts were prepared and used in pull-down assays and immunoblot analysis with anti-SNAP antibodies. An additional “spores” lane corresponds to pull-down done with extracts prepared from spores of the CotY-SNAP- and ExsY-SNAP-producing strains. One red asterisk indicates the indicated SNAP fusions; two or three red asterisks present potential multimeric forms of the SNAP-fusion proteins. The position of molecular weight markers (MW, in kDa) is shown on the left side of the panels. (B) Cells expressing *pcotE*-SNAP were collected at hour 24 of sporulation, labeled with TMR-Star and MTG and imaged by phase contrast and fluorescence microscopy. The SNAP was detected dispersed throughout the mother cell cytoplasm. Scale bar, 1 μ m.

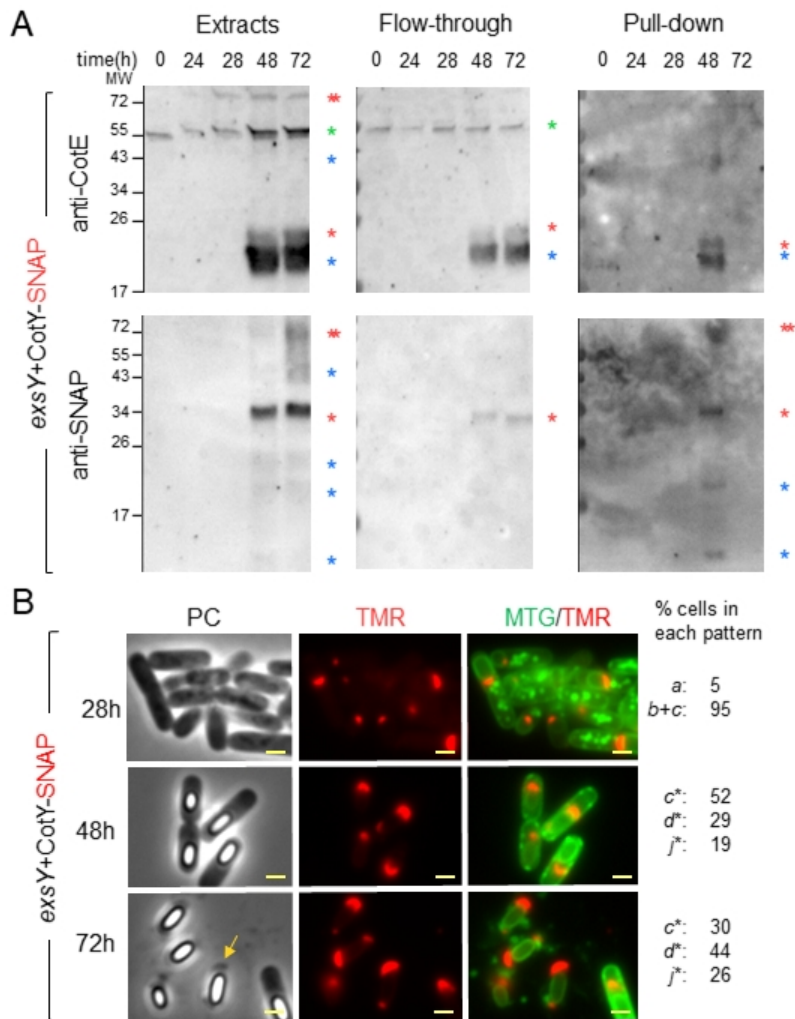


FIG S7 CotE forms complexes with CotY in the cap of the *exsY* mutant. (A) Cells of an *exsY* mutant producing CotY-SNAP were harvested at hour 0, 24, 28, 48, and 72 of sporulation and whole cell extracts were submitted to pull-down and immunoblot analysis with anti-CotE and anti-SNAP antibodies. One red asterisks indicates CotE or a CotY-SNAP monomer; two red asterisks indicate potential multimers; blue asterisks point to possible products of proteolysis; green asterisks point to non-specific bands reacting with the anti-CotE antibody on vegetative cell extracts. The position of molecular weight markers (MW, in kDa) is shown on the left side of the panels. (B) CotY-SNAP localization in *exsY* mutant at hour 28, 48 and 72 of sporulation at 20°C. The numbers on the right of the panels indicate the percentage of cells identified in each pattern (see Fig. 1 and the main text). The panels show CotY-SNAP signal blocked at the cap stage. Scale bar, 1µm.

SUPPLEMENTAL MATERIAL AND METHODS

Construction of SNAP fusions and expression plasmids. The *cotY-SNAP* and *exsY-SNAP* fusions were synthesized by ATUM (www.atum.bio, Newark, CA). Briefly, synthetic inserts corresponding to: i) the *cotY* gene (*bc_1222*) and the 264 bp sequence upstream of the *cotY* start codon or; ii) *exsY* gene (*bc_1218*) and the 265 bp sequence upstream of the *exsY* start codon of *B. cereus* ATCC14579, followed by a GCAGCTGCT linker and the SNAP sequence (16) were inserted into the pHT304-18 plasmid (17), using *SalI* and *EcoRI* restriction sites, giving rise to the pHT304-CotYSNAP and pHT304-ExsYSNAP plasmids, respectively (Table S1). To allow introduction of the CotY-SNAP-producing plasmid into a *cotY*- strain (Erm^r), the spectinomycin (Spc) resistance was amplified from the pDIA plasmid with SpcHTCotYStyI-Fw and SpcHTCotYSnabI-Rv primers (Eurogentec) (Table S2), containing a 15bp-extension homologous to the ends of a *StyI/SnaBI* digested pHT304-CotYSNAP. The fragment was then introduced into pHT304-CotYSNAP using the In-fusion cloning (Takarabio), interrupting the Erm resistance gene and yielding pHT304-CotYSNAP^{spc}. The transcriptional fusion pcotESNAP was obtained by cloning the SNAP tag sequence, amplified from pFT47 using primers SNAP-RC-IF2-FW and SNAP-RC-IF2-RV, under the control of the 189bp fragment preceding the start codon of the *cotE* open reading frame (*bc_3770*), amplified from *B. cereus* ATCC14579 genomic DNA with primers pcotERC-IF2-FW and pcotERC-IF2-RV (Table S2). These primers contained a 15bp -extension for In-fusion cloning of the two fragments into pHT304-18 digested with *SalI* and *EcoRI*. All plasmids were first introduced into *E. coli* DH5 α and clones were confirmed by PCR and/or DNA sequencing. Plasmids were then transferred to *E. coli* SCS110; the resulting unmethylated plasmids were then transferred to the *B. cereus* strains by electroporation, as described (18). The pETDuet-1 vector (Novagen) was used for co-expression of different combinations of proteins and pull-down assays. The *cotY*, *exsY* and *cotE* genes were

amplified from *B. cereus* ATCC14579 genomic DNA and introduced into pETDuet-1 to generate His tag fusions. The His-tag sequence was fused to the 5'-end of *cotY* or *exsY* primers using pETDuetCotY.His(2)-Fw, pETDuetCotYHis-Rv, pETDuetExsY.His(2)-Fw and pETDuetExsYHis-Rv, carrying *Bam*HI and *Hind*III restriction sites. After digestion, the amplified fragments were ligated into *Bam*HI and *Hind*III digested pETduet-1, to yield the pETDuetCotYHis and pETDuetExsYHis plasmids (Table 1). In the same way, *cotE* gene was amplified using primers pETDuetcotEFw and pETDuetcotERv, carrying *Bg*III and *Xho*I sites and inserted in these two plasmids and in pETduet-1, resulting in plasmids pETDuetCotYHisCotEdeltaS, pETDuetExsYHisCotEdeltaS and pETDuetCotEdeltaS, respectively. These plasmids were then introduced in *E. coli* Stellar competent cells (Takarabio) and then into BL21 (DE3) for protein production.

Sporangia and spore lysis. Sporulating cells or purified spores from cultures in SMB or from FNA plates were lysed by bead beating using a Fastprep II (MP Biomedical) for 6 cycles at speed 5 in buffer A [100mM NaCl, 10mM Tris-HCl (pH8.0), 10% glycerol, 1mM DTT]. Lysates were cleared by centrifugation for 10 min at 7,000 x g. Protein concentration was determined using a Bradford assay.

SNAP pull-down assays. For SNAP pull-down assays, 160 μ L of a 50% slurry of SNAP-Capture resin (NEB) were equilibrated with buffer A (see above), as recommended by the manufacturer. Cleared lysates from whole cell extracts (Extracts in Fig. 4, S6 and S7A) prepared from sporulating cultures from hours 20 to 72 (0.2 mg.ml⁻¹) or from purified spores (0.15 mg.ml⁻¹), were immobilized in 160 μ L of a shaken suspension of beads equilibrated in buffer A for 1 h at 4°C and then for 1 h at room temperature. After incubation, the mix was centrifuged at 11,000 x g for 1 min at 4°C and the supernatant was kept for analysis (flow-through in Fig. 4, S6 and S7). The beads were washed three times with 1mL of buffer B [200mM NaCl, 10mM Tris-HCl (pH8), 10% glycerol, 1mM DTT] agitated for 1 min and centrifuged at 11,000 x g for 1 min at 4°C. Beads were then resuspended in 50 μ L of buffer B, heated at 100°C for 5 min and kept at -20°C (Pull-down in

Fig. 4, S6 and S7). Experiments were performed at least twice, giving the same results.

Protein co-production in *E. coli* and pull-down assays. *E. coli* BL21 (DE3) containing the various plasmids (above) were grown at 37°C in LB with 100 µg.mL⁻¹ ampicillin. Protein co-production was induced in cultures at an OD_{600nm} of 0.6, by addition of 1mM isopropyl-β-galactoside (IPTG) for 3h at 37°C. Cells were then collected by centrifugation and stored at -20°C until analysis. A 4mL volume of the cell suspension was lysed in 1mL of urea buffer [8M urea, 150mM NaCl, 25mM TrisHCl (pH 8.0), 2% SDS] using a Fastprep (5 cycles of 45s at speed 6.5) and boiled for 20 min at 90°C. After sedimentation, 250 µL of supernatant were mixed with equilibration buffer (PBS, 10 mM imidazole) and the mix was incubated for 30 min at room temperature, with 100 µL of Ni²⁺ beads, equilibrated as recommended by the manufacturer. Then, equilibrated beads were washed three times with washing buffer (PBS with 25mM imidazole) and proteins were eluted once with 500 mM imidazole 8M urea and then twice with 1M imidazole 8M urea. Experiments were performed twice, giving the same results.

Immunoblotting analysis. Proteins (5 µg) of the pull-down elutions and flow-through (10µL) were mixed with a 5X buffer [300mM Tris (pH 6.8), 50% glycerol, 10% SDS, 5% β-mercaptoethanol, bromophenol blue], heated 5 min at 100°C and resolved on 12% SDS-PAGE gels, which were transferred to nitrocellulose membranes using the Iblot II system (Invitrogen). Protein transfer onto the membrane was confirmed by Red Ponceau staining. Membranes were incubated for 45 min with blocking buffer [8% (wt/vol) non-fat milk in PBS], washed three times with PBST (PBS containing 0.1% Tween 20) for 10 min and incubated with the appropriate antibodies for 2 h at room temperature. For pull-down SNAP assays, anti-*B. cereus* CotE and anti-SNAP polyclonal antibodies (diluted at 1:500 and 1:1,000 in blocking buffer, respectively) were used. For immunoblotting analysis of co-expression pull-down, we used an anti-*B. anthracis* CotE polyclonal antibody (at dilution 1:25,000) (15), and a monoclonal anti-His peroxidase-conjugated antibody (at 1:50,000). Membranes were washed three times with PBST and then incubated with secondary anti-rabbit peroxidase-conjugated antibodies (Sigma Aldrich, at 1:10,000) for 2 h. Membranes were washed

three times with PBST and incubated with ECL peroxidase substrate (Thermofischer).

SUPPLEMENTAL REFERENCES

1. Todd SJ, Moir AJG, Johnson MJ, Moir A. 2003. Genes of *Bacillus cereus* and *Bacillus anthracis* encoding proteins of the exosporium. *J Bacteriol* 185:3373–3378.
2. Terry C, Jiang S, Radford DS, Wan Q, Tzokov S, Moir A, Bullough PA. 2017. Molecular tiling on the surface of a bacterial spore – the exosporium of the *Bacillus anthracis/cereus/thuringiensis* group. *Mol Microbiol* 104:539–552.
3. Krajčiková D, Lukáčová M, Müllerová D, Cutting SM, Barák I. 2009. Searching for Protein Protein Interactions within the *Bacillus subtilis* Spore Coat. *J Bacteriol* 191:3212–3219.
4. Jiang S, Wan Q, Krajcikova D, Tang J, Tzokov SB, Barak I, Bullough PA. 2015. Diverse supramolecular structures formed by self-assembling proteins of the *Bacillus subtilis* spore coat. *Mol Microbiol* 97:347–359.
5. Liu H, Qiao H, Krajcikova D, Zhang Z, Wang H, Barak I, Tang J. 2016. Physical interaction and assembly of *Bacillus subtilis* spore coat proteins CotE and CotZ studied by atomic force microscopy. *J Struct Biol* 195:245–251.
6. Krajčiková D, Forgáč V, Szabo A, Barák I. 2017. Exploring the interaction network of the *Bacillus subtilis* outer coat and crust proteins. *Microbiol Res* 204:72–80.
7. Liu H, Krajcikova D, Wang N, Zhang Z, Wang H, Barak I, Tang J. 2016. Forces and kinetics of the *Bacillus subtilis* spore coat proteins CotY and CotX binding to CotE inspected by single molecule force spectroscopy. *J Phys Chem B* 120:1041–1047.
8. Boone TJ, Mallozzi M, Nelson A, Thompson B, Khemmani M, Lehmann D, Dunkle A, Hoepflich P, Rasley A, Stewart G, Driks A. 2018. Coordinated assembly of the *Bacillus anthracis* coat and exosporium during bacterial spore outer layer formation. *mBio* 9:e01166-18
9. Ohye DF, Murrell WG. 1973. Exosporium and spore coat formation in *Bacillus cereus* T. *J Bacteriol* 115:1179–1190.
10. Wang KH, Isidro AL, Domingues L, Eskandarian HA, McKenney PT, Drew K, Grabowski P, Chua M-H, Barry SN, Guan M, Bonneau R, Henriques AO, Eichenberger P. 2009. The coat morphogenetic protein SpoVID is necessary for spore encasement in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* 74:634–649.
11. McKenney PT, Eichenberger P. 2012. Dynamics of spore coat morphogenesis in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* 83:245–260.
12. Steichen CT, Kearney JF, Turnbough CL. 2007. Non-uniform assembly of the *Bacillus anthracis* exosporium and a bottle cap model for spore germination and outgrowth. *Mol Microbiol* 64:359–367.
13. Boydston JA, Yue L, Kearney JF, Turnbough CL. 2006. The ExsY protein is required for complete formation of the exosporium of *Bacillus anthracis*. *J Bacteriol* 188:7440–7448.
14. Stewart GC. 2015. The exosporium layer of bacterial spores: a connection to the environment and the infected host. *Microbiol Mol Biol Rev* 79:437–457.
15. Giorno R, Bozue J, Cote C, Wenzel T, Moody K-S, Mallozzi M, Ryan M, Wang R, Zielke R, Maddock JR, Friedlander A, Welkos S, Driks A. 2007. Morphogenesis of the *Bacillus anthracis* Spore. *J Bacteriol* 189:691–705.
16. Pereira FC, Saujet L, Tomé AR, Serrano M, Monot M, Couture-Tosi E, Martin-Verstraete I, Dupuy B, Henriques AO. 2013. The Spore Differentiation Pathway in the Enteric Pathogen *Clostridium difficile*. *PLOS Genet* 9:e1003782.
17. Sanchis V, Agaisse H, Chaufaux J, Lereclus D. 1996. Construction of new insecticidal *Bacillus thuringiensis* recombinant strains by using the sporulation non-dependent expression system of cryIIIa and a site specific recombination vector. *J Biotechnol* 48:81–96.
18. Brillard J, Susanna K, Michaud C, Dargaignaratz C, Gohar M, Nielsen-Leroux C, Ramarao N, Kolstø A-B, Nguyen-the C, Lereclus D, Broussolle V. 2008. The YvfTU Two-component System is involved in plcR expression in *Bacillus cereus*. *BMC Microbiol* 8:183.

TABLE S1. Strains and plasmids used in this study

Strains or plasmids	Name (designation in this work)	Genotype/ phenotype	Source or reference
<i>B. cereus</i>	ATCC 14579 wo (WT)	Cured from pclin15 plasmid	laboratory collection
	ATCC 14579 Δ <i>cotE</i> (<i>cotE</i>)	<i>cotE::spc</i> / Spc ^R	Bressuire et al 2016
	ATCC 10876 (WT)	<i>trp-1</i> /Str ^{R*}	Johnson et al 2006
	ATCC 10876 Δ <i>cotY</i> (<i>cotY</i>)	<i>trp-1 cotY::erm</i> /Str ^R Ery ^R	Johnson et al 2006
	ATCC 10876 Δ <i>exsY</i> (<i>exsY</i>)	<i>trp-1 exsY::spc</i> / Str ^R Spc ^R	“
<i>E. coli</i>	DH5 α	<i>fhuA2 lacU169 phoA glnV44 80= lacZM15 gyrA96</i> <i>recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17 L</i>	laboratory collection
	SCS110	<i>rpsL thr leu endA thi-1 lacY galK galT ara tonA tsx</i> <i>dam dcm supE44 (lac-proAB)</i>	“
	BL21(DE3)	F- <i>ompT hsdS_B (r_B-, m_B-) gal dcm</i> (DE3)	Thermoscientific
	Stellar	F-, <i>endA1, supE44, thi-1, recA1, relA1, gyrA96,</i> <i>phoA, Φ80d lacZΔ M15, Δ(lacZYA-argF) U169,</i> <i>Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC), ΔmcrA, λ-</i>	TakaraBio
Plasmids	pDIA	Spc ^R	laboratory collection
	pFT47	Cm ^R Tm ^R	Pereira 2013
	pHT304-18	Amp ^r Ery ^r	Sanchis et al 1996
	pETDuet-1	Amp ^R	Novagen
	pHT304-CotESNAP	Amp ^R Ery ^R	this study
	pHT304-SNAPCotE	Amp ^R Ery ^R	“
	pHT304-pCotESNAP	Amp ^R Ery ^R	“
	pHT304-CotYSNAP	Amp ^R Ery ^R	“
	pHT304-CotYSNAPspc	Amp ^R Ery ^R ::Spc ^R	“
	pHT304-ExsYSNAP	Amp ^R Ery ^R	“
	pETDuetCotEdeltaS	Amp ^R	“
	pETDuetCotYHis	Amp ^R	“
	pETDuetExsYHis	Amp ^R	“
	pETDuetCotYHisCotEdeltaS	Amp ^R	“
	pETDuetExsYHisCotEdeltaS	Amp ^R	“

*R, resistant to: streptomycin (Str), spectinomycin (Spc), erythromycin (Ery), ampicillin (Amp)

TABLE S2 - Primers used in this study

Primer	Sequence
SNAP-RC-IF2-FW	ATGCCTGCAGGTGCGACTTTCCTTACCCAAGTCCT
SNAP-RC-IF2-RV	AATGTCCGAATTTAGCTCGAGGGAGGAACTACT
pcotERC-IF2-FW	CTAAATTCGGACATTCGTAAC
pcotERC-IF2-RV	CAGTGCCAGTGAATTCGATGTACTAAAGGGTGAAA
SpcpHTCotYStyl-Fw	TACAAGCGTACCTTGCGCATCTTTTGTTTATAAGTG
SpcpHTCotYSnabl-Rv	TTTGAAACAAAGTACGTAGATCTGTATAATAAAGAATAATT
pETDuetExsYHis(2)-Fw	TGGTGGTGGGGATCCGAGTTGTAACGAAAATAAACACC
pETDuetExsYHis-Rv	TGGTGGTGGGAAGCTTTTAGATAGTAACGTCGCGTAAGC
pETDuetCotYHis(2)-Fw	TGGTGGTGGGGATCCGAGCTGCAATTGTAACGAAGACC
pETDuetCotYHis-Rv	TGGTGGTGGGAAGCTTTTAAATAGAAACATCGCGTAAGC
pETDuetcotEFw	TGGTGGTGGAGATCTATGTCCGAATTTAGAGAGA
pETDuetcotERv	TGGTGGTGGCTCGAGTTACTCTTCTTCTGCATCAACG

2) Les évènements tardifs de l'assemblage des couches externes sont indépendants de la fin de l'engulfment dans les endospores de *Bacillus cereus*

soumission prévue dans le journal mSphere

La sporulation est un processus de différenciation cellulaire durant lequel deux programmes génétiques différents sont exprimés au sein du sporange. Les acteurs principaux de l'expression différentielle des gènes au sein du sporange sont les facteurs sigma de l'ARN polymérase spécifiques de la sporulation : σ^F puis σ^G dans le compartiment de la préspore et σ^E puis σ^K dans la cellule-mère. L'expression des gènes de la cellule-mère détermine la mise en place des couches les plus externes de la spore. Parmi ces feuillettes, les couches protéiques sont d'une importance primordiale pour isoler la spore des stress environnants. Dans l'organisme modèle *B. subtilis*, la mise en place de la lignée génétique de la cellule-mère est interconnectée à celle de la préspore qui est elle-même liée à l'achèvement des étapes principales de la sporulation. Ainsi, la septation déclenche l'activation de σ^F qui, à son tour, permet l'activation de σ^E . Par la suite, l'achèvement du processus d'engulfment permet l'activation du facteur tardif de la préspore σ^G . L'expression des gènes sous le contrôle de σ^G permet d'activer σ^K , le dernier facteur sigma activé durant la sporulation. L'expression des gènes contrôlée par σ^K permet le développement des coats dans l'endospore. Par conséquent, dans un mutant $\Delta sigG$ ou dans un mutant incapable de terminer l'engulfment, les coats ne sont jamais détectables par microscopie électronique à transmission.

Récemment, des études réalisées sur le pathogène (*Pepto*)*Clostridium difficile* ont montré des divergences dans le contrôle de l'activation des facteurs sigma de la sporulation. Notamment, dans cet organisme, l'activation de σ^K est indépendante de l'activation de σ^G , il en résulte que σ^K est activé indépendamment de l'engulfment. Dans ce cas, le coat peut se développer sur des préspores incomplètement « engulfées » générant alors un phénotype particulier dit de « coat bearding ».

Dans *B. cereus*, on ignore si l'activation des facteurs sigma est liée à l'achèvement des différentes étapes de la sporulation. Par ailleurs, les couches protéiques externes des spores de *B. cereus* sont subdivisées en un coat, un interspace et un exosporium. L'assemblage de l'exosporium débute précocement, durant l'engulfment, mais l'interspace et le coat sont visibles en microscopie électronique à transmission, uniquement après l'engulfment (Section II-2). Ainsi, on ignore si et comment ces évènements sont synchronisés avec l'achèvement des étapes de la sporulation.

Dans cette étude, nous avons utilisé une souche de *B. cereus* présentant des défauts d'engulfment à température de sporulation sous-optimale (20°C) pour étudier l'impact d'un engulfment inachevé sur les évènements tardifs de l'assemblage des couches protéiques externes des spores. Ainsi, nous démontrons que l'assemblage du coat de *B. cereus* durant la sporulation peut directement être visualisé par SR-SIM. Notre analyse montre que les endospores dans lesquelles l'engulfment est incomplet présentent des fragments de coat partiellement assemblés. Nous montrons également que l'encapsulation par une protéine de l'exosporium, un évènement ayant lieu normalement après l'engulfment, peut se dérouler quand l'engulfment est incomplet. Ensemble, ces résultats montrent que les évènements tardifs de la mise en place des couches protéiques externes des spores de *B. cereus* sont indépendants de l'achèvement de l'engulfment. Ce résultat suggère que l'activation de σ^k ne dépend pas de l'achèvement de l'engulfment dans *B. cereus* et constitue une première différence fondamentale mise en évidence dans le contrôle de l'activation des facteurs sigma de la sporulation entre *B. cereus* et *B. subtilis*.

Late events of outerlayers assembly are independent on engulfment completion in *Bacillus cereus* endospores

Armand Lablaine^a, Stéphanie Chamot^a, Monica Serrano^b, Frédéric Carlin^a, Adriano O. Henriques^b, Véronique Broussolle^{a*}

^a INRAE, Avignon Université, UMR SQPOV, F-84000 Avignon, France

^b Instituto de Tecnologia Quimica e Biologica, Universidade Nova de Lisboa, 2780-157 Oeiras, Portugal

* address correspondence to Veronique Broussolle, veronique.broussolle@inrae.fr

Running title: Spore outerlayers assembly in engulfment defective *B. cereus*

Keywords: Spore, coat bearding, engulfment, SR-SIM, sigma factors

ABSTRACT

Sporulation is a differentiating process where two lines of genes expression are implemented inside the sporangia. In the *Firmicutes*, formation of the proteinaceous external layers, involved in spore protection and pathogenicity, is a function of the mothercell. However, the formation of the proteinaceous coats of *B. subtilis* is coordinated with the activation of the forespore line of genes expression. Hence, formation of mature coat layers rely on engulfment completion since this event is necessary for activation of the forespore specific sigma factor σ^G . In contrast, in the distant *Peptoclostridium difficile* pathogen organism, coat formation does not depend on engulfment completion since the mother cell and the forespore line of gene expression are independent. In *B. cereus*, responsible of food poisoning, proteinaceous spore layers are divided in a coat and an external balloon exosporium. We ignore how the formation of those external layers depend on engulfment completion. In this study we described a new tools allowing direct

visualization of coat deposition in *B. cereus* by fluorescence microscopy and, using an engulfment cold sensitive strain, we show that large coat fragments are partially assemble in engulfment defective cells. Additionally, spore encasement by CotE, a post-engulfment event of exosporium assembly, can occurs in absence of engulfment completion. Together our results demonstrate that late events of proteinaceous spore layers assembly does not depend on engulfment completion in *B. cereus*.

INTRODUCTION

Spores of *Bacillaceae* are wrapped in a protective proteinaceous layer named the coat. The coat protects the spore from the digestion by small organisms as nematode or protozoan but also creates a barrier to degradative enzymes, such as lysozyme, making the coat essential for spore survival in the environment (1). Formation of the spore coat was historically investigated in the model organism *Bacillus subtilis* and the actual model arose mostly from localization studies of individual coat proteins by fluorescence microscopy (2). Based on the localization sequence of coat protein fusions during sporulation, six classes of proteins, early (class I-III) and late proteins (class IV-VI) were defined, and whose assembly is dictated by transcription waves (2).

Coat gene expression is driven by the two mother cell sigma factors, σ^E for early expression and σ^K for late expression. Importantly, while an organizational center mostly made of morphogenetic coat proteins is formed under the control of σ^E (2, 3), detection of coat layers by transmission electron microscopy (TEM) occurs only when σ^K -dependent proteins are synthesized and assembled *in B. subtilis* (4). Coat synthesis is also indirectly dependent on the forespore development state, since σ^K activation required expression of genes controlled by σ^G , the late forespore specific sigma factor (5). Consequently, in *B. subtilis*, *sigG* mutant sporangia coat are not visible by TEM, as *sigK* mutant (6). This intercommunication represents a “crisscross” regulation between the two compartments, with σ^F , σ^E , σ^G and σ^K sequentially and alternatively expressed in the forespore and mother cell, respectively (7).

Activation of sigma factors in *B. subtilis* are coordinated with the completion of the key morphological sporulation events (8, 9). Hence, during the engulfment stage, defined as the forespore phagocytosis by the mother-cell, σ^G is synthesized under the control of σ^F but maintained inactive by several inhibitory mechanisms (10). The activation of σ^G coincides with the completion of the engulfment (8), and engulfment-defective mutants do not expressed σ^G -controlled genes (11, 12). For these reasons, it was proposed that σ^G activation is triggered by the

engulfment completion (8, 9). Indeed, this hypothesis was experimentally supported since an artificial delay in the engulfment process leads to a delay of σ^G activation (13). However, the idea remains challenged since a *fisB* mutant, blocked for the last event of the engulfment process, *i.e.* the fission of the engulfed membranes, successfully activates σ^G (14).

However, the crisscross pathway of sigma factor activation does not seem to be a generic rule in the *Firmicutes* group. In (*pepto*)*Clostridium difficile*, σ^G is dispensable for *sigK* expression (15, 16). In *C. difficile*, σ^G is activated before engulfment completion and large coat fragments are synthesized and partly adhere to the leading edge of the engulfing membranes in *sigG* sporangia and in engulfment-defective *spoIIIAH*, *spoIIIA* or *spoIIQ* sporangia (16, 17). This detection by TEM of coat fragments in absence of engulfment completion has been described as “coat bearding” and is highly similar to the phenotype of a *spoVM* mutant (16–18). Thus, in the distant *Peptoclostridium* group, synthesis and assembly of the spore coat does not depend on engulfment completion or σ^G activation, as observed in *B. subtilis* (16). This apparent independence between the forespore and the mother-cell development was named “bifurcated regulation” (16), in contrast to the “crisscross regulation” of *B. subtilis* (7).

In the *Bacillus cereus* group, encompassing in particular *B. cereus*, *B. anthracis* and *B. thuringiensis*, an outermost balloon-like exosporium is observed (Stewart 2015). *B. cereus* coat is lately detected by TEM compared to exosporium, which is visible during engulfment as a small layer of material adjacent to the outer forespore membrane (OFM) (19–22), named the “cap” (23). In *B. thuringiensis*, a *sigK* mutant is blocked at the stage IV of sporulation, *i.e.* before coat formation, showing that coat detection by TEM depends on σ^K , as described in *B. subtilis* (24). In the *B. cereus* group, a sequence of coat deposition around the forespore was described: first, the coat is detected after engulfment completion on the longitudinal axis of the forespore, then at the mother cell distal (MCD) pole and finally at the mother cell proximal forespore (MCP) pole (19, 21, 22). Coat deposition at the MCP region is transitory prevented by the exosporium cap and coat can assemble first in the forespore poles in absence of this cap ((21, 22).

We recently showed that a scaffold composed of morphogenetic proteins are present when no coat are detected by TEM in *B. cereus* (22). This scaffold is composed of the morphogenetic CotE, and by the CotE-controlled proteins CotY and ExsY exosporium morphogenetic proteins (22, 23, 25). Similarly to their *B. subtilis* orthologues (2), *B. cereus* CotE, CotY and ExsY start to assemble at the onset of engulfment and localized as a cap on the MCP forespore pole, forming the exosporium cap structure (22). The assembly of CotE, CotY and ExsY is

temporarily blocked and remains as a cap until the engulfment is completed, which is reminiscent of the *B. subtilis* orthologues localization (2, 22). After the formation of the mother-cell distal (MCD) pole by fission of the engulfing membranes, CotE, CotY and ExsY localized as a second cap (22). From the two caps, CotE, CotY and ExsY asymmetrically encased the forespore through direct interactions between CotE and ExsY (22). Since the assembly of CotE, CotY and ExsY during engulfment is interrupted, this suggests that the forespore encasement by these proteins is coordinated with engulfment completion.

Recently, we showed that Super Resolution Structure Illumination Microscopy (SR-SIM) allows to directly visualize the exosporium development state by using the MTG dye (22, 26). Here, using SR-SIM, we demonstrate that the MTG dye allows also following coat assembly in *B. cereus*. Moreover, we show that, at a suboptimal sporulation temperature, engulfment was blocked in part of the sporangia population of *B. cereus* ATCC 10876. We took advantage of this particular phenotype to study the impact of an incomplete engulfment on coat assembly, and on the localization of the exosporium morphogenetic protein CotE. Our results demonstrate that coat synthesis and its partial assembly, as well as the forespore encasement by CotE, do not require a proper engulfment completion. Consequently, since coat deposition depends on σ^K in the *B. cereus* group, σ^K activation appears to be not coordinated to the engulfment completion. This result constitutes the first difference evidenced between *B. cereus* and *B. subtilis* in the control of sigma factors activation.

RESULTS

SR-SIM allows direct visualization of coat development. In a previous study, we reported that the TMR-star fluorescent dye (TMR), allowing specific labelling of SNAP-tag proteins, also non-specifically labelled phase bright sporangia and spores (22). We suggested that this signal corresponds to a binding of TMR to *B. cereus* coat, as binding of different fluorescent dyes to *Firmicutes* coats was previously reported (27, 28). To check this hypothesis, we induced sporulation of *B. cereus* ATCC 14579 by suspension in SMB medium at 20°C and collected sporulating cells along the sporulation. Cells were labelled with TMR and MTG dye, allowing the identification of sporulation stages and exosporium assembly, and imaged using SR-SIM (22). Based on the MTG labelling, we analyzed representative images of endospores at different steps of sporulation, from the septum curvature (Fig. 1, panel *a*) to the spore release (Fig. 1, panel *h*). As

previously described (22), in engulfed sporangia, a layer is observed in the MTG channel at the MCP forespore pole, corresponding to the separation of the exosporium cap from the OFM. In those cells, we did not detect any TMR signal and we evaluated the distance separating the external limit of the exosporium cap from the OFM to 237 ± 70 nm (mean \pm sd, Fig. 1, pink arrow, panel *d*). We conclude that the structure binding TMR is assembled after the separation of the cap from the OFM.

We detected a non-specific TMR signal incompletely covering engulfed sporangia (Fig. 1, panel *e* and *f*, cyan arrows). In those cells, the distance separating the cap from the OFM was 504 ± 109 nm (Fig. 1, panel *e*), and significantly higher than the distance measured in sporangia presenting a cap but no TMR signal (Fig. 1, panel *d*). This result suggests that TMR binds to a structure appearing at a late stage of exosporium development. Importantly, this TMR signal is detected prior the forespore turns phase bright (data not shown). Strikingly, in sporangia presenting a TMR signal, we also noticed a bright MTG signal appearing on the OFM (Fig. 1, panel *e* and *f*, yellow arrows). This bright MTG signal was first detected as short fragments on forespore longitudinal sides (panel *e*, yellow arrows) or covering the longitudinal side and partly covering the MCD forespore pole (Fig. 1, panel *f*, yellow arrows). Importantly, TMR signal covered the forespore concomitantly with the apparition of the MTG bright signal (Fig. 1, panel *e-h*, cyan arrows). Strikingly, detection of the bright MTG signal fully reflected the sequence of coat deposition in *B. cereus* ATCC 14579 at 20°C, we previously described by TEM (Fig. 1, yellow arrows) (Lablaine et al, 2021). Taken together, these observations strongly suggest that *B. cereus* coat bind different fluorescent dyes, as observed for *B. subtilis* and *C. difficile* (27, 28).

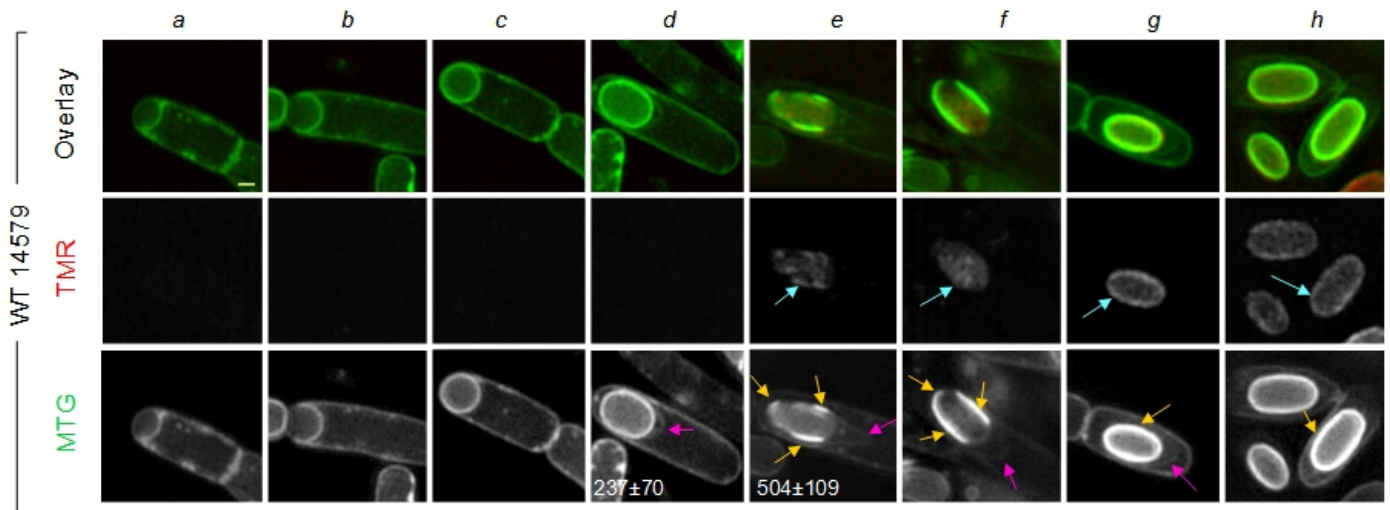


FIG 1. Bright MTG labelling reflects the scheme of coat deposition in *B. cereus* sporulating cells. Sporulating cells of *B. cereus* ATCC 14579 at 20°C were labelled with the TMR-Star and MTG dyes and imaged by SR-SIM microscopy. Representative cell of each pattern of localization at different sporulation stages are shown (*a* to *h*, Lablaine *et al*, 2021). A visible separated cap is revealed by MTG labelling after engulfment completion (panel *d*, pink arrow). At the bottom of the MTG channel, the distance separating the cap from the outer forespore membrane (OFM) is indicated (average \pm standard deviation, in nm) and is twice higher in cells showing TMR and bright MTG labelling panel *d* vs panel *c*). A bright MTG signal (yellow arrows) is observed with a TMR signal (cyan arrows) in panels *e-h*. The detection of the MTG bright signal on the OFM fully reflects the sequence of coat deposition, as previously described (Lablaine *et al*, 2021). Scale bar represents 0,5 μ m.

The exosporium cap is absent from *cotE* sporangia of *B. cereus* or *B. anthracis* (21, 22). As a result, coat deposition can start on the pole, instead of on longitudinal sides, as observed in WT sporangia (21, 22). To confirm that the bright MTG signal appearing post-engulfment can be used as a marker of coat deposition, we performed SR-SIM analysis on sporulating *cotE* cells labelled with TMR and MTG dyes (Fig. 2). According to our previous analysis (22), we did not detect any exosporium cap layer in *cotE* engulfed cells (Fig 2, panel *d*) and the free spores were not encased by a regular balloon-like structure (Fig. 2, panel *h*), as observed for WT spores (Fig 1, panel *h*). We noticed a delay in sporulation of *cotE* cells and the TMR and the MTG bright signals were detected in a population composed of both phase-dark and phase-bright sporangia (data not shown). Importantly, the pattern of bright MTG signal detection was different in *cotE* cells from that observed in WT cells (Fig. 2 yellow arrows, panels *e* and *f*): we observed cells presenting a MTG bright signal at a pole whereas longitudinal sides are not covered by a MTG bright signal (panel *e*), or cells with a MTG bright signal in the MCP while the MCD is not covered (panel *f*). These patterns together with the timing of detection were in accordance with those previously observed by TEM for coat deposition in *cotE* sporangia (22). We quantified the sporangia with a modified pattern of bright MTG signal deposition in WT and *cotE* strains. Thus, 76% of *cotE* sporangia with a strong MTG signal, exhibited a modified pattern, versus only 3% for WT cells (Fig. 2, panels *e* and *f*, with n=111 for *cotE* and n=95 for WT sporangia). This result shows that the MTG bright signal fully reflects the coat deposition sequence in WT or mutant sporangia. *B. cereus cotE* spores formed at 20°C are partly decoated (29). To conclude regarding the ability of TMR and MTG to bind to *B. cereus* coat, we analyzed by SR-SIM, *cotE* free spores collected after sporulation at 20°C (Fig. 2, panel *h* and Fig. 3). We quantified that 60% of *cotE* spores were partly labelled by MTG and TMR (Fig. 3, panel *h*, red arrows), while 100% of WT spores were fully labelled by the two dyes, which emit a perfect oval of fluorescence (Fig. 2, panel *h* and Fig. 3, cyan and yellow arrows). Altogether, these results show that MTG and TMR can bind to *B. cereus* coat. Notably, using SR-SIM, a MTG bright signal can be used to assess the state of coat development in *B. cereus*.

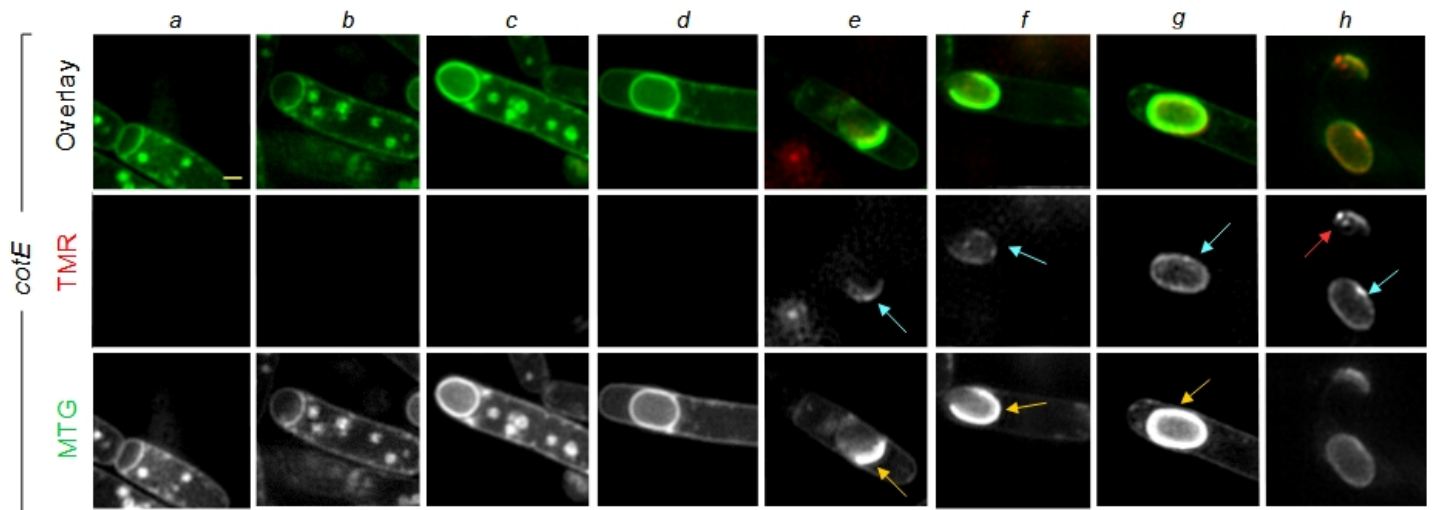


FIG 2 Bright MTG labelling revealed altered coat deposition in *cotE* endospores. Sporulating *B. cereus* ATCC 14579 *cotE* cells were labelled with TMR and MTG and imaged by SR-SIM microscopy. Images of a representative cell of each identified pattern of localization at different stages of sporulation are shown (a to h). No MTG signal corresponding to the cap or exosporium structure were observed with SR-SIM. The sequence of bright MTG signal (yellow arrows) is different to that in WT (Fig. 1) and fully reflects the coat deposition observed by TEM (Lablaine *et al*, 2021). The bright MTG signal is detected with the TMR signal (cyan arrows). We observed spores with partial MTG/TMR staining (red arrows). Scale bar represents 0,5 μ m.

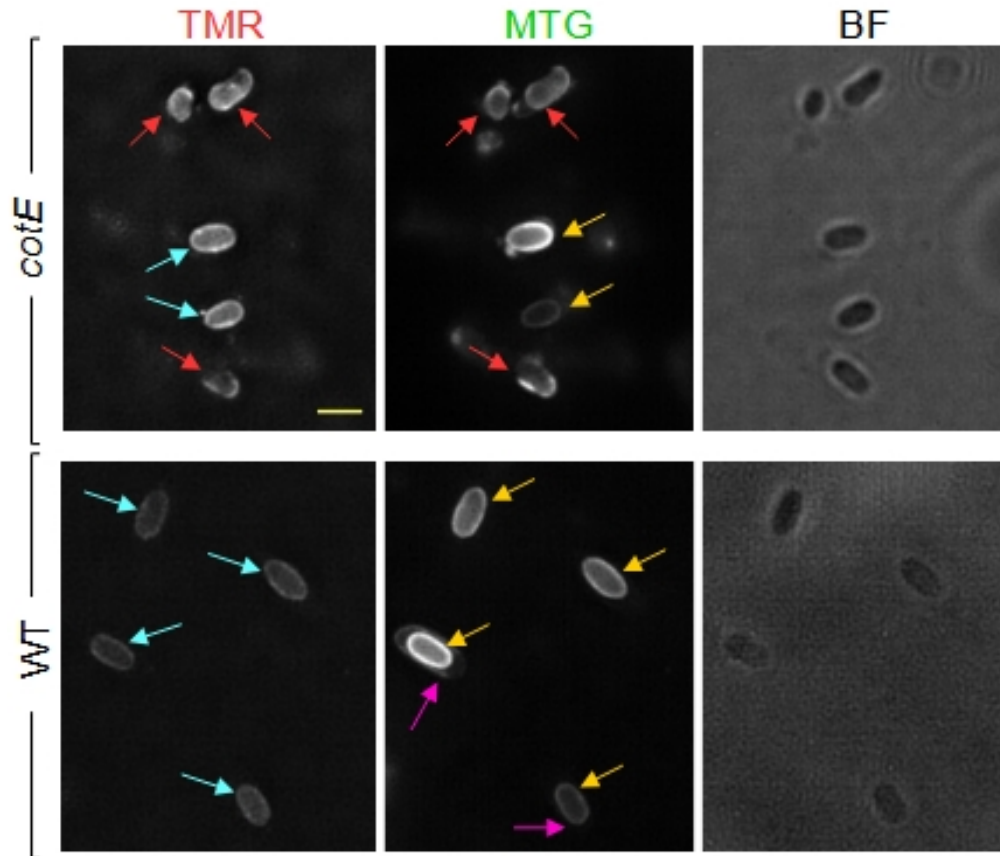


FIG 3. Incomplete labelling of partly decoated *cotE* spores by TMR and MTG dyes. *B. cereus* ATCC 14579 (WT) and *cotE* spores formed at 20°C were labeled with TMR and MTG and imaged by SR-SIM microscopy. WT spores are fully labeled by TMR (cyan arrows) and MTG (yellow arrows) and present an exosporium layer (pink arrows). In contrast, partly covering signals of MTG/TMR are observed in *cotE* spores which are impaired in coat assembly at 20°C (red arrows). These spores, however, appears fully black in bright-field field (BF). Scale bar represents 1,5 μ m

Engulfment is aborted in part of sporulating *B. cereus* ATCC 10876 cells at 20°C. In a previous analysis, we reported that sporulation at 20°C in liquid SMB media of *B. cereus* ATCC 10876 strain leads to an engulfment defect (Lablaine *et al*, 2021). To determine if the engulfment is completely aborted in this condition, we performed a test designed to assess engulfment completion in *B. subtilis* using the impermeable FM4-64 and the permeable MTG membrane dyes (14, 30). When engulfment is completed, the forespore relies as a protoplast enclosed by two membranes in the mother-cell, consequently the forespore is labelled by MTG but not by FM4-64 (14, 30). We first analyzed *B. cereus* ATCC 14579 sporulating cells at 20°C where engulfment defect was not observed (Fig. 4A). At hour 24, all sporulating cells were labelled with MTG, including sporangia with the MCD pole of the forespore visibly distant from the distal pole of the mother-cell, sign of a complete engulfment (Fig. 4A, blue arrows). In contrast, FM4-64 dye does not label those cells (Fig. 4A, blue arrows) while it labels sporangia where the MCD forespore pole is not distinguishable from the mother cell pole (Fig. 4A, pink arrows). This result shows that the double labelling FM4-64/MTG can be used to determine sporangia with engulfment defect in *B. cereus* and is in agreement with a previous report indicating that *B. cereus* phase-bright sporangia and spores are not labelled with FM4-64 (28).

Then, we tested sporulating cells of *B. cereus* ATCC 10876 at 20°C (Fig. 4B). At hour 24, we observed engulfing cells and cells presenting a small bulge in the middle of the septa (Fig. 4B, pink and green arrows respectively). Both types of cells were labelled with both MTG and FM4-64 (Fig. 4B). At hour 28, the bulges were labelled by FM4-64 (Fig. 4B, green arrows), while the forespore of normal engulfing cells were not (Fig. 4B, blue arrows). In contrast, MTG labelled both types of cells (Fig. 4B). At hour 48, we observed by phase contrast a mix of phase-dark and phase-bright sporangia (Fig. 4B), with the phase-dark forespore labelled by FM4-64 (green arrows) while the phase-bright forespores were not (blue arrows). This result shows that sporulating ATCC 10876 sporangia exhibiting bulges did not complete engulfment and never became phase-bright. We also noticed that the bulges size was clearly larger at hours 28 and 48 than at hour 24. Strikingly, we noticed bright MTG signals surrounding the forespore labelled with the FM4-64 at hour 48 (Fig. 4B, yellow and cyan arrows). This MTG signal may represent the coat deposition indicating that the coat can be synthesized and partly assembled on the bulge, despite the absence of engulfment completion.

The bulge in the middle of the septa growing towards the mother-cell strongly looks like some *B. subtilis* mutants impaired in the degradation of the septal peptidoglycan (PG) (11, 31–34).

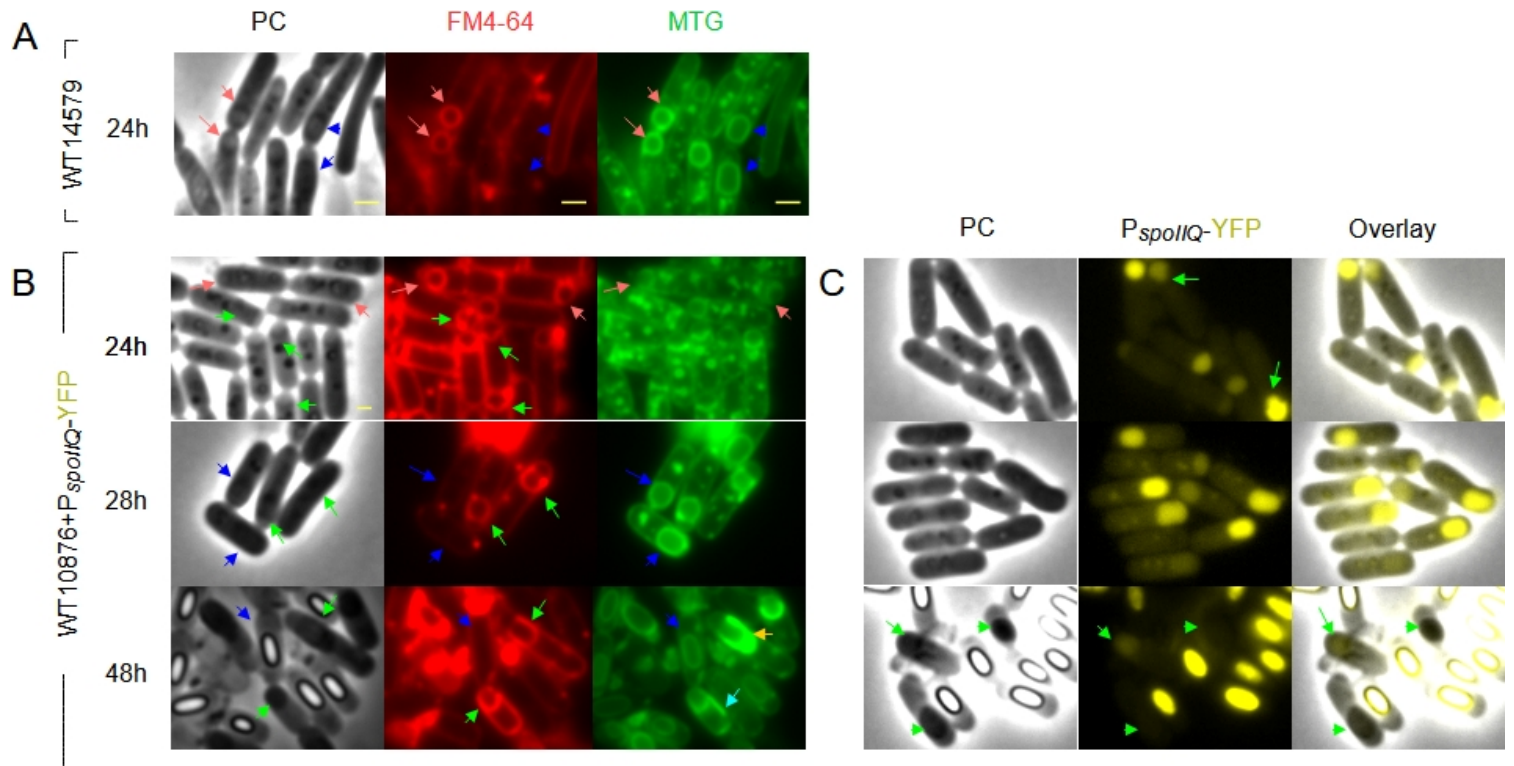


FIG 4. Engulfment abortive sporangia are detected in sporulating *B. cereus* ATCC10876 at 20°C. (A) ATCC14579 sporangia collected after hour 24 of sporulation at 20°C were labelled with the impermeable FM4-64 and with the permeable MTG dyes and imaged by fluorescent and phase contrast (PC) microscopy. Fully engulfed forespores are labelled by MTG only (blue arrows), while engulfing cells are labelled by both FM4-64 and MTG (pink arrows). (B-C) Samples were withdrawn at the indicated times from sporulating cultures at 20°C of a ATCC10876 strain expressing a transcriptional fusion P_{spoIIQ} -YFP. Cells (B) labelled with FM4-64 and MTG or (C) unlabelled, were imaged by PC and fluorescence microscopy. (B) Fraction of WT10876 sporulating cells at 20°C does not complete engulfment. Pink arrows point to engulfing cells labelled by both FM4-64 and MTG and green arrows indicate cells with a bulge of forespore growing towards the mother cell. After hour 48, cells with bulges are still labelled by FM4-64 indicating an incomplete engulfment, while forespores after engulfment are labelled only by the MTG (blue arrows). At hour 48, bright MTG signals surround the bulge (yellow arrow) or are present in the mother-cell cytoplasm (cyan arrow). Note that FM4-64 does not colocalized with those MTG signals. (C) Expression of *spoIIQ* promoter indicate the position of the forespore compartment. At hour 24, protrusions of YFP signal are observed (green arrows), showing that the bulges are an expansion of the forespore. After hour 48, *spoIIQ*-YFP signal turns off in cells with an engulfment defect (green arrows). Scale bars are indicated in (A) and represent 1 μ m.

This similarity suggests that the septal thinning can be affected in sporulation *B. cereus* ATCC 10876 cells at 20°C.

To confirm that the observed bulges correspond to forespore material, we used a *spoIIQ*-YFP transcriptional fusion (Fig. 4C). In *B. subtilis*, SpoIIQ is synthesized under the control of σ^F (35). The YFP-signal formed a small chamber at one pole of the mother-cell in sporangia collected at hour 24, when sporangia showed a curve septa or bulges (Fig. 4B-C). Importantly, part of these sporangia presented a small protrusion of YFP-signal (Fig. 4B, green arrows). Those results show that *spoIIQ* is expressed early during *B. cereus* sporulation, at the time of septum curvature. Moreover, sporulating cells at hour 24 showed a mix of normal curved septa and bulges but all cells exhibit a YFP-signal. Thus protrusions of YFP-signal most likely correspond to the bulges. Hence, the bulges correspond to a push of the forespore material through the septa. Altogether, our results demonstrate that the engulfment is not completed in cells with a bulge, corresponding to forespore material going through the septa, possibly relying on absence of PG septal degradation.

Coat are synthesized and partly assembled in absence of engulfment completion in *B. cereus*. We wondered if the engulfment defect we observed in sporangia with a bulge impacts coat and/or exosporium assembly. Consequently, we collected ATCC 10876 cells sporulating at 20°C along the kinetics, we labelled them with MTG and TMR and imaged by SR-SIM to identify the state of outerlayers formation. Representative images of the different patterns identified along the sporulation are presented (Fig. 5A, panel *a* to *h*).

In early sporulating cells the asymmetric flat septum appeared normal (panel *a*). In contrast, only few sporangia showed a curved septa or a normal engulfment (not shown). As suggested by conventional fluorescence analysis of sporangia with a bulge, by SR-SIM we clearly observed that the developing forespore pushed across the septum and bulged into the mother cell (Fig. 5A, panel *b* and *c*). At the time of phase-bright forespores detection, sporangia presented a typical bright-MTG and a TMR signal, revealing coat deposition (Fig. 5A, panels *d-h*, yellow arrows). In cells with a bulge, we noticed that the MTG bright signal strongly resembles to those observed with conventional microscopy at similar time (compare in Fig. 4B and 5A, yellow and cyan arrowheads). The detection of this fluorescent signal, corresponding to coat material deposition in bulged sporangia, show that coat synthesis in *B. cereus* does not depend on engulfment completion. Moreover, the fluorescent signal corresponding to coat appeared as

large fragments, up to 2 μm (yellow arrows) and presenting a significant degree of structuration, as curved segments were observed (Fig. 5A, panels *d-h*). Most of these coat fragments partly adhered to the OFM and covered the membrane of the forespore bulge. Strikingly, the curvature of these coat fragments matched to the bulging membranes architecture suggesting the partial assembly of the coat fragments (Fig. 5A, panels *d-h*). Hence, despite the engulfment completion, coat are synthesized and assembled on the membrane of the forespore bulge. The large size, the shape and the position relative to the forespore of the coat fragments signal, strongly look like the coat deposition, termed as “coat bearding”, in engulfment mutants of *C. difficile* (18). We also noticed bright MTG signals corresponding to smaller coat fragments in the mother cell cytoplasm (Fig. 5A, cyan arrows). In sporangia presenting these fluorescent signals, the membranes of the forespore bulge were already covered by coat fragments (Fig. 5A, panels *d-f*). This observation suggests that the level of coat proteins synthesis does not depend on the engulfment completion. Hence, since only a part of the forespore (the bulge) is present towards the mother cell cytoplasm, only a fraction of the synthesized coat material can assemble on the limited forespore membrane surface available in the mother-cell cytoplasm.

Finally, when imaged by transmitted light, the normally engulfed sporangia present in the sporulating population appeared “black”, corresponding to phase-bright sporangia when observed by phase contrast (Fig. 5B, blue arrows). In the opposite, the “bulged” sporangia were never black, showing that they did not complete sporulation (Fig. 5B, yellow arrows). Those results are in agreement with phase contrast analysis (Fig. 4B). As a result, at the time of spore release, we only observed normal looking spores, corresponding to cells which performed a normal engulfment (Fig. 5C, blue arrows), together with abundant polymerized coat fragments sprinkled in the media, released from bulged cells, (Fig. 5C, yellow arrows).

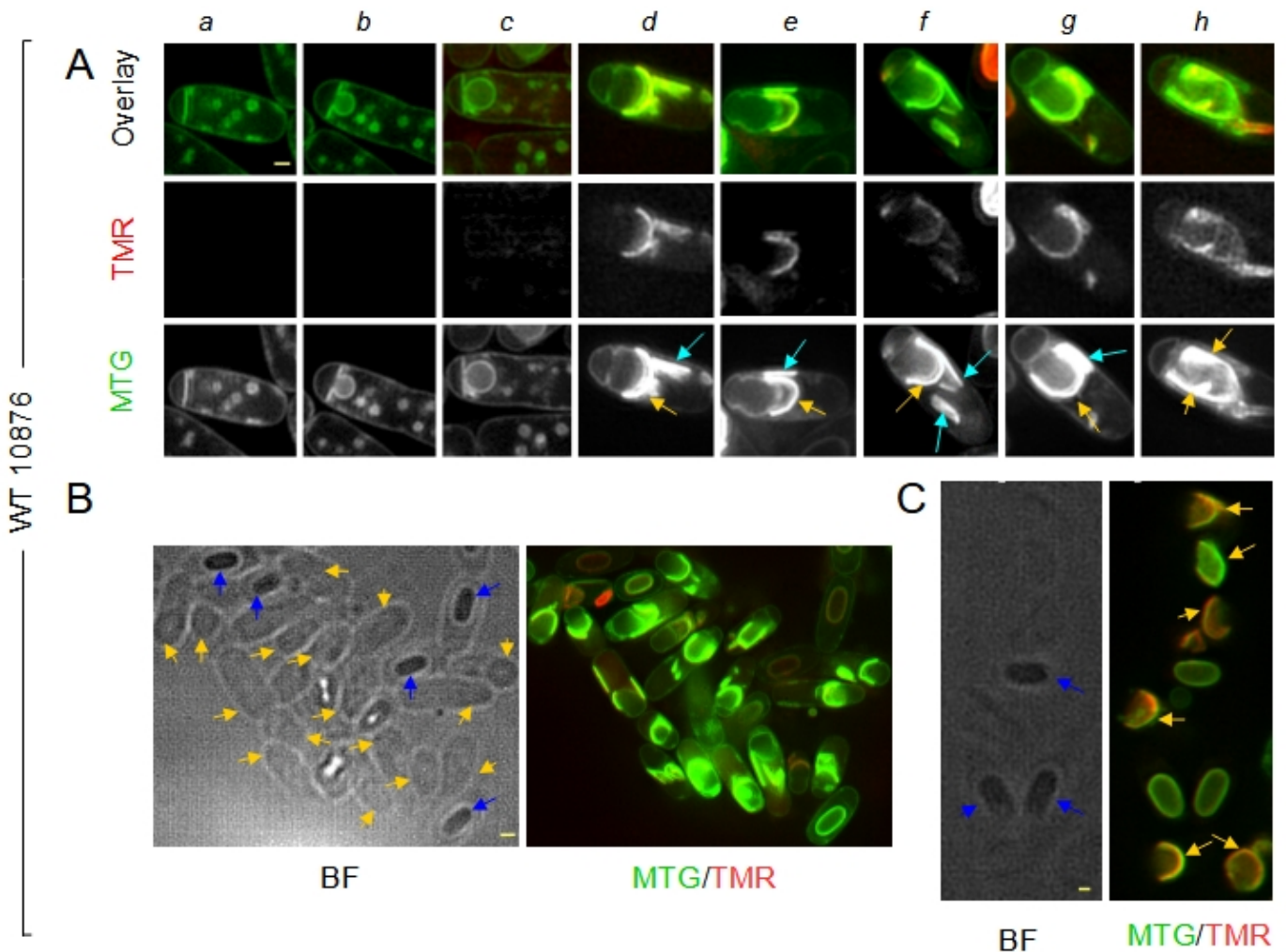


FIG 5. Coat synthesis and its partial assembly occurred in absence of engulfment completion in *B. cereus*. Sporulating *B. cereus* ATCC 10876 cells at 20°C were labelled with TMR and MTG and imaged by SR-SIM microscopy. (A) Images of a representative cell of each identified pattern of localization at different stages of sporulation are shown (a to h). Importantly, suboptimal sporulation leads to atypical bulges of the forespore through the flat septa. Bright MTG (yellow arrows) and TMR signals are detected in cells collected after hour 48 of sporulation and fill on the bulged membranes (d to h). Non adhered coat fragments are found in the mother cell cytoplasm (cyan arrows). Note the similarities of the bright MTG signals observed with SR-SIM and those observed previously with conventional fluorescence microscopy (Fig. 4B yellow and cyan arrows). (B) Bulged cells never become dark under brightfield (yellow arrowheads), as observed for the normally engulfing cells (blue arrowheads). (C) At time of spore release, fragments corresponding to synthesized coat are detected in the media (yellow arrowheads). Scale bars represent 0,5 μm in (A and C) and 0,75 μm in (B).

No cap structure or exosporium fragments were observed in the cells with a bulge. The assembly of exosporium cap proteins initiates on the curved septa (Lablaine et al 2021). Thus, the bulged septa may interfere with the localization of these exosporium cap proteins. It is also possible that the assembly of the exosporium can be hidden, on the images, by the large coat fragments partly assembled in the MCP pole region (Fig. 5A, panel *d-h*).

Altogether, our results show that coat are synthesized and partly assembled on the membranes of the forespore bulge, despite an incomplete engulfment completion. Thus, coat synthesis and assembly do not depend on engulfment completion in *B. cereus*. As coat detection by TEM depends of σ^k in the *B. cereus* group, as in *B. subtilis* (9, 24), this result suggest that the activation of σ^k is not coordinated with engulfment completion in *B. cereus*.

Encasement by CotE starts in absence of MCD pole. Since we failed to assess with SR-SIM the state of exosporium assembly in bulged cells where engulfment is incomplete, we used a C-terminal translational fusion of CotE to the SNAP-tag, which becomes fluorescent upon covalently binding of the TMR substrate (22). In *B. cereus*, CotE, CotY and ExsY concomitantly encased the forespore, just after engulfment completion and before coat formation (22). During this asymmetric encasement, CotE guides CotY and ExsY localization through direct interactions, establishing a morphogenetic scaffold (22). To determine the state of morphogenetic scaffold formation in bulged cells, we induced sporulation of *B. cereus* ATCC 10876 cells harboring the CotE-SNAP fusion at 20°C, and, after labeling with MTG and TMR, monitored with SR-SIM the localization of CotE-SNAP along the sporulation.

Sporangia exhibiting a bulge of forespore were observed in cells with CotE-SNAP fusion (Fig. 6A). In bulged cells without any coat signal (bright MTG signal), CotE-SNAP encased the bulge of the forespore (Fig. 6A, TMR signal in panel *a-c*). To confirm that the fluorescent CotE-SNAP signal on the bulge is not just a cap localization, we imaged CotY-SNAP, which follow the same dynamic than CotE in WT cells, in *exsY* cells, where CotY-SNAP assembly is blocked as a cap (22). In bulged sporangia, CotY-SNAP did not encased the bulge (Fig. 6B). This signal of CotY-SNAP, which corresponds to a cap localization, is clearly less extended than the CotE-SNAP localization observed in WT bulged cells (Fig. 6A). Together those results show that encasement by CotE-SNAP does not depend on engulfment completion. In bulged cells with a bright MTG coat signals, CotE-SNAP localized along the membranes of the forespore bulge and appeared clearly separated from the OFM in the MCP pole region (Fig. 6A, panel *d*). Superposed to this

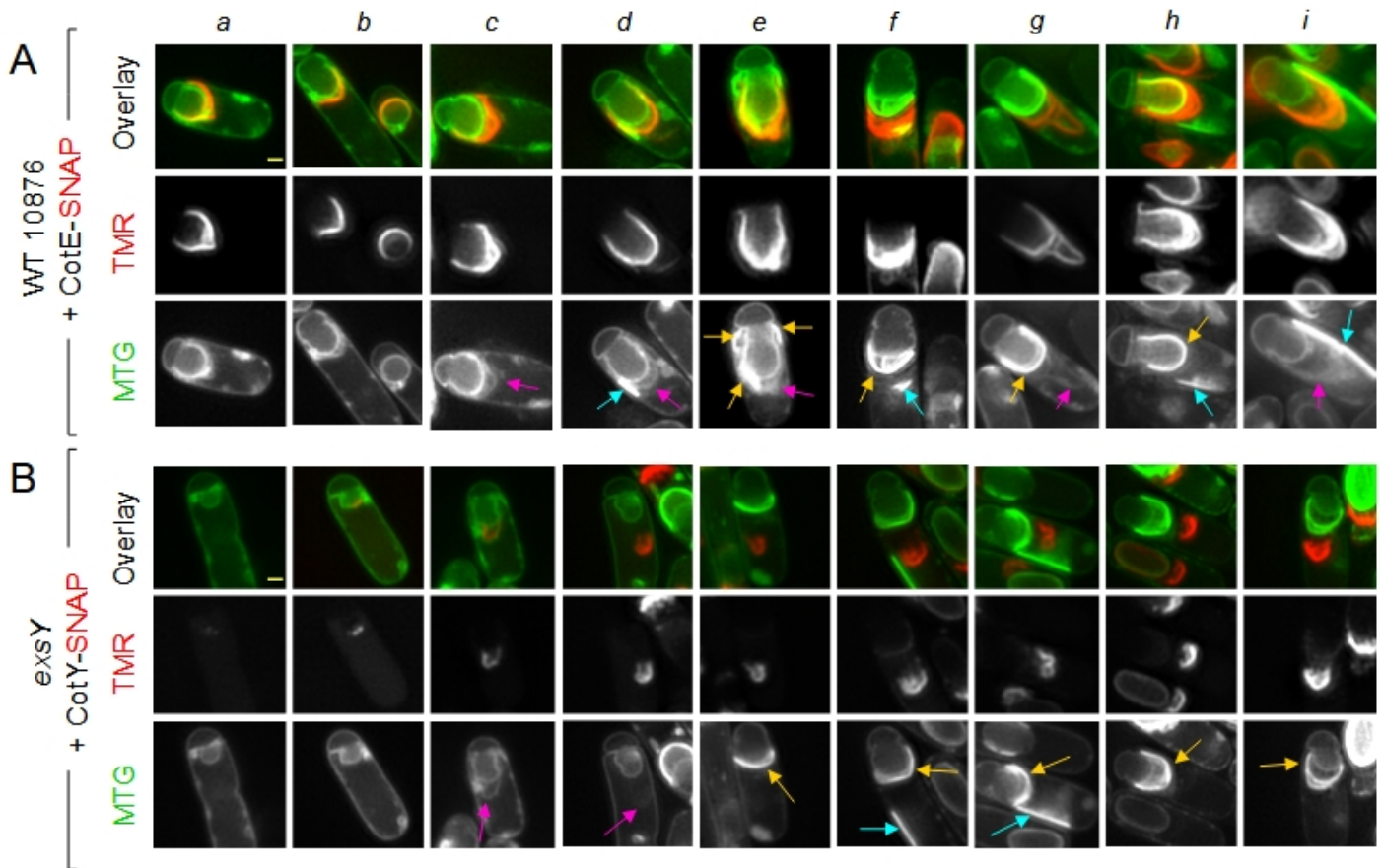


FIG 6. Encasement by CotE-SNAP does not depend on engulfment completion in *B. cereus*. Sporulating *B. cereus* WT ATCC10876 cells expressing CotE-SNAP or a congenic *exsY* mutant expressing CotY-SNAP at 20°C were labelled with the TMR and MTG and imaged by SR-SIM microscopy. Images of a representative cell of each identified pattern of localization at different stages of sporulation are shown (*a* to *i*). The characteristic forespore bulge and bright MTG signal (yellow and cyan arrows, respectively) are detected. (A) CotE-SNAP is present and engulfs the bulged membranes prior MTG bright signals detection. CotE-SNAP colocalizes with a layer labelled with MTG, possibly corresponding to exosporium material (pink arrows). (B) To compare, CotY-SNAP is blocked at a cap localization in *exsY* mutant sporangia with a bulge and does not engulf the bulge. CotY-SNAP colocalizes with a weak MTG signal, possibly corresponding to the exosporium cap (pink arrows). Scale bars represent 0,5 μm.

localization of CotE-SNAP, we noticed a faint layer labelled by MTG, which may correspond to exosporium material (Fig. 6A, panels *c-e* and *g*, pink arrows). With these results, we can not directly conclude about the state of exosporium assembly in bulged cells. However, our results show that the major exosporium morphogenetic protein CotE builds scaffold on the forespore bulged membranes for CotE-controlled proteins, such as CotY and ExsY, and that CotY can, at least form an exosporium cap (Fig. 6B, pink arrows).

DISCUSSION

Here, we examined the link existing between late events of spore proteinaceous layers assembly and engulfment completion in *B. cereus*. We showed, using SR-SIM, that MTG and TMR dyes label the coat at different stages of its formation. Intermediate patterns of coat deposition could be easily assess by a bright MTG signals appearing on the surface of the OFM. We also described the particular phenotype observed in *B. cereus* ATCC 10876 sporulating cells at 20°C, with part of cells exhibiting a forespore bulge pushing through the flat septum. These bulged cells are deficient in engulfment completion. Finally, combining the ability of SR-SIM to visualize *in vivo* the state of coat development and the particular phenotype observed in *B. cereus* ATCC 10876 at 20°C, we determined that the coat is synthesized and partly assembled on the membrane of the bulged forespore, despite the absence of engulfment completion. In addition, we showed that CotE is able to encase the bulge. Thus those events, normally occurring after engulfment completion, are in fact not dependent on the engulfment completion in *B. cereus*.

The phenotype of the forespore bulge indicates a defect in PG septal thinning. Indeed, the flat septum was normally observed among the sporulating population and the first mark of an abnormal phenotype, a small bulge, is detected in the middle of flat septa. Those observations show that the curvature of the septa does not occurred in cells with a bulge. Forespore bulges were often observed in *B. subtilis* and *C. difficile* mutants for engulfment proteins, such as SpoIID, SpoIIM, SpoIIP, which form the PG degradation machinery (32, 33, 36–40) or SpoIIQ, SpoIIIAA-AH, which are involved in formation of the feeding tube and in engulfment under certain conditions (17, 41–43). Importantly, in contrast to the *B. subtilis* mutants where coat are not visible by TEM, these *C. difficile* mutants present an atypical “coat bearding” in front of the bulge, when imaged by TEM (16, 17). Using SR-SIM, we observed similar deposition of coat fragments in *B. cereus* cells exhibiting a forespore bulge. Because of those similarities, it seems that proteins involved in the engulfment can be responsible of the phenotype observed in *B. cereus* ATCC 10876 cells at 20°C.

Two cold sensitive *spoIID* mutants, defective in engulfment, were isolated in *B. subtilis*, with one producing bulges similar to the one we reported here (Abanes 2002). SpoIID is widespread protein among spore-formers and presents highly conserved regions among *B. subtilis*, *B. cereus* and *C. difficile* (32, 38, 44). Alignment of *B. cereus* SpoIID amino-acid sequences revealed three substitutions in ATCC 10876; V55A, S134G and A324E (Fig. S1). Strikingly, the S134G substitution affects a region strictly conserved among *Firmicutes*, present between the alpha two and alpha three helix of SpoIID (44). Because of the strict conservation of the motif affected by the substitution, the similarities of *spoIID* mutants phenotypes and the existence of *spoIID* cold-sensitive mutants, we suggest that the S134G substitution of SpoIID may be at the origin of the phenotype we observed. In any case, this cold sensitive strain of *B. cereus* defective in engulfment, constitute a tools to future studies of the impact of engulfment on *B. cereus* sporulation.

In *B. subtilis*, but not in *C. difficile*, engulfment completion, with the exception of the membranes fission (14), is required for coat detection by TEM because the engulfment completion is coordinated with the activation of σ^G (16, 17). Here, in engulfment-abortive *B. cereus* sporulating cells, we detected coat fragments similarly to those observed by TEM (19, 22). Coat detection by TEM depends on *sigK* in strains of the *B. cereus* group (24). Thus, our results suggest that σ^K activation does not depend on engulfment completion in *B. cereus*. Two scenarios could explain σ^K activation in engulfment-defective *B. cereus* cells: (i) σ^G activation depends on engulfment completion, similarly to *B. subtilis*, which implies that σ^K activation does not depend on σ^G activation in *B. cereus*, similarly to the regulation described in *C. difficile* (16); (ii) similarly to *C. difficile*, σ^G can be activated without engulfment completion. Hence, in this second scenario, σ^K can be activated by σ^G similarly to the *B. subtilis* model. However, in the second scenario, we ignored how σ^G activation is controlled. In any case, since coat fragments are synthesized and assembled on the forespore bulge membranes, it appears that a fundamental mechanism affecting sigma factors activation differed between *B. cereus* and *B. subtilis*. Identification of the origin of this difference constitute an attractive scientific issue.

Recently, in *B. subtilis*, it was shown that particular features of the *sigG* coding and regulating sequences create a delay in *sigG* transcription and translation compared to other σ^F -controlled genes (10). Those features are a sub-optimal promoter, a particular start codon structure and a tertiary RNA structure interfering with ribosome binding (10). The *sigG* gene expression is auto-regulated and creates a feed-forward loop by turning down synthesis of

inhibitory factors under the control of σ^F (45). Thus, a threshold concentration of σ^G is primordial to circumvent the inhibition affecting *sigG* expression. However, since those features are intrinsic to *sigG*, they cannot explain the absence of σ^G activation in engulfment-defective *B. subtilis*. Thus, another factor seems required to coordinate this delay of σ^G synthesis with the engulfment completion. Moreover, the intrinsic features of *sigG* coding and regulating sequences are conserved among the *Bacillus*, including species of the *B. cereus* group, while the conservation is lower in the *Clostridia* species (10). Thus, as these intrinsic characteristics of *sigG* are conserved in *B. cereus* and *B. subtilis*, they cannot explain the activation of σ^K in *B. cereus* engulfment-defective cells.

In *B. subtilis*, σ^K activation relies on the cleavage of an inhibitory pro-sequence (6, 46), by σ^G -controlled proteases (16, 45). The pro-sequence of σ^K is absent in *C. difficile* and homologs of SpoIVFB, SpoIVFA and BofA, involved in σ^G signaling, are absent (15, 45). Consequently, in *C. difficile* σ^K is active upon synthesis and is not post-translationally modified for its activation (47). In contrast, in *B. cereus* a σ^K pro-sequence is present, as well as the membrane-associated machinery BofA-SpoIVFA-FB (48). Thus, it is likely that the interconnection existing between *B. subtilis* σ^G and σ^K activation occurs in *B. cereus* through the cleavage of the conserved σ^K pro-sequence.

Activation of σ^K in *B. subtilis* also depends on the excision, thanks to the recombinase SpoIVCA, of the *skin* element, a phage-like element, which interrupts the *sigK* coding sequence (49). In *C. difficile*, a *skin* element also interrupts *sigK* and requires an homologue of SpoIVCA for its excision (50). Excision of the *skin* element is a key element controlling σ^K activity in *C. difficile* (50). Strikingly, the *sigK* coding sequence is not interrupted by a *skin* element in *B. cereus* and no SpoIVCA homologue was found (data not shown). Thus, this missing control of σ^K activation is a promising clue to explain the difference observed in *B. cereus* σ^K activation. Moreover, how this difference in sigma factor activation pathway can affect outerlayers assembly in *B. cereus* constitute a stimulating issue.

The ancillary factor SpoIIID is also involved in σ^K activation in both *B. subtilis* and *C. difficile*, by mediating the *skin* excision and by controlling *sigK* expression (16, 50). Recently, it was shown that SpoIIID is also required for *sigK* expression in *B. anthracis* (51). Importantly, TEM analysis of a *spoIIID* mutant reveals that coat and exosporium are not detected in *B. anthracis*, while the engulfment can be completed and cortex is present (51). In absence of a *skin* element,

the level of SpoIIID can have a major function in regulating σ^K activation. Thus, SpoIIID constitute a major factor possibly involved in the activation of σ^K after engulfment in the *B. cereus* group.

In our study, we noticed the apparent assembly of large coat fragments on the membranes of the forespore bulge. Notably, those coats fragments fit well with the shape of the bulged membranes, suggesting that proteins involved in coat assembly are present on the surface of the forespore bulge membranes. In agreement, we observed the encasement of the forespore bulge membranes by CotE. CotE protein is part of a morphogenetic scaffold, which precedes coat deposition in *B. cereus* (22). Coat assembly is a largely unknown process in *B. cereus*, however coat formation is not impacted in both *B. cereus* and *B. anthracis cotE* mutants (20, 29). Thus, we conclude from those observations that, at least, other proteins of the morphogenetic scaffold are assembled on the bulges surface to allow coat partial assembly, as well as CotE assembly. The two proteins ExsA and SpoIVA are known to be involved in coat anchoring in endospores of the *B. cereus* group (20, 52). Both are homologues of *B. subtilis* morphogenetic coat proteins (53). Importantly, it was shown that GerP coat proteins failed to localize in a *B. cereus exsA* mutant but did not in a *cotE* mutant (54). This result suggests that ExsA may be present on the bulges to allow coat partial assembly.

The assembly of the two orthologues of ExsA and CotE (SafA and CotE) depends on SpoVM, SpoIVA and SpoVID in *B. subtilis* (3, 55). Strikingly, SpoVM possess a particular affinity for the highly convex membranes of the forespore bulge observed in small population of a triple mutant *spoIID-spoIIM-spoIIP B. subtilis* sporangia (56). We suggest that *B. cereus* SpoVM can similarly localize on the bulge and ensures the subsequent assembly of SpoIVA and SpoVID, which in turn, may be involved in CotE and ExsA recruitment on the bulged membranes.

In normal *B. cereus* sporulating cells, assembly of CotE and of the CotE-controlled CotY and ExsY is usually temporarily blocked as a cap and CotE encasement starts once engulfment is completed (22). Encasement by *B. cereus* CotE is concluded before the forespore turns phase-dark, thus earlier than the encasement described for *B. subtilis* CotE (2, 22). Here, in bulged sporangia, we demonstrate that CotE encasement begins while the engulfment is not completed. In *B. subtilis*, CotE encasement depends on mother cell transcription factors σ^E , SpoIIID and σ^K (2). As we observed CotE encasement in sporangia without coat fragments, which assembly depends on σ^K , CotE encasement in *B. cereus* does not seem to depend on σ^K . Hence, the encasement of the forespore bulges by CotE observed in absence of engulfment completion likely relies on SpoIIID. In line with this hypothesis, the level of *cotE* expression decreased in a *B. anthracis*

spoIIID mutant (51). This implies that the CotE encasement driven by SpoIIID, which may occur after engulfment in normal sporulating cells, may also take place without engulfment completion in *B. cereus* ATCC 10876. Thus, if CotE encasement is driven by SpoIIID in absence of engulfment completion, similarly, SpoIIID may activate σ^k in bulged cells, leading to the synthesis and coat bearding. Those hypothesis point a crucial function of SpoIIID in decoupling late events of proteinaceous layers assembly and engulfment completion.

ACKNOWLEDGMENTS

Authors are grateful to Dr Mariana Pinho for giving an access to the SR-SIM microscope and Dr Cécile Morlot for fruitful discussions. Authors also thank Pr Anne Moir for gift of *exsY* mutant strain and Dr Sandrine Poncet-Moutura for gift of *PspoIIQ*-YFP construction. AL Ph.D. thesis is funded by INRAE and PACA Region and partly supported by a grant of MICA division and a Perdiguier grant of Avignon University. This work was also supported by FCT, "Fundação para a Ciência e a Tecnologia", Portugal through grant PEst-OE/EQB/LA0004/2011 to AOH and by program IF (IF/00268/2013/CP1173/CT0006) to MS. This work was also financially supported by project LISBOA-01-0145-FEDER-007660 ("Microbiologia Molecular, Estrutural e Celular") funded by FEDER funds through COMPETE2020 – "Programa Operacional Competitividade e Internacionalização", and by project PPBI - Portuguese Platform of BioImaging (PPBI-POCI-01-0145-FEDER-022122) co-funded by national funds from OE - "Orçamento de Estado" and by european funds from FEDER - "Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional".

MATERIAL AND METHODS

Bacterial strains and growth conditions. Bacterial strains used in this study are *B. cereus* ATCC 14579 and congenic *cotE* mutant (22, 29) and the strain *B. cereus* ATCC 10876 and congenic *exsY* mutant (25). LB broth with orbital shaking (200 rpm) or LB agar plates were used for routine growth of *B. cereus* at 37°C. When needed, liquid cultures or plates were supplemented with erythromycin (Erm) at 5 µg.ml⁻¹.

SNAP and YFP fusions plasmids. The *cotE*-SNAP and *cotY*-SNAP fusions corresponds to the *B. cereus* ATCC 14579 sequence (BC3770 and BC1222 respectively) and were inserted in the low copy plasmid pHT304. Those fusions were previously tested in both *B. cereus* ATCC 14579 and ATCC 10876 together with congenic mutants (22). The *PspoIIQ*-YFP fusion inserted in the pHT304 was constructed using the *B. thuringiensis* sequence sharing 96% of identity with *B. cereus* SpoIIQ

sequence.

Sporulation kinetics. Sporulation was induced in liquid SMB medium at 20°C with orbital shaking at 180 rpm, as previously described (22). Cells were harvested at the desired time by centrifugation for 10 min at 10,000 x g before microscopy analysis.

SNAP labelling and fluorescence microscopy. Samples (5 to 10 ml) were withdrawn from cultures in SMB at selected times during sporulation. Cells were collected by centrifugation (10,000 x g for 10 min), suspended in 200 µL of phosphate saline buffer (PBS) and labeled with TMR-Star (New England Biolabs) for 30 min at 37°C in the dark at a final concentration of 250 nM. This TMR-probed suspension was centrifuged (12,000 x g, 3 min), then the cell sediment washed with 1 mL of PBS, suspended again in 1mL of PBS and labeled with Mitotracker Green (MTG, Thermofischer) and/or FM4-64 for 1 min at room temperature at a final concentration of 1µg/mL. Cells were then washed three times in PBS and suspended in 50µL to 200 µL PBS, depending on the concentration of sporulating cells. For phase contrast and fluorescence microscopy, a 3 µL volume of the labeled cells suspension was applied onto 1.7% agarose coated glass slides and observed with an epifluorescence microscope (BX-61; Olympus) equipped with an Orca Flash 4.0 LT camera (Hamamatsu). Images were acquired using the CellSens Olympus software and micrographs were processed using ImageJ software. Super Resolution Structured Illumination Microscopy (SR-SIM) images were acquired using an Elyra PS.1 Microscope (Zeiss) equipped with a Plan-Apochromat 63x/1.4 oil DIC M27 objective and a Pco. edge 5.5 camera, using 488 nm (100mW) or 561 nm (100 mW) laser lines, at 5–20% of total potency (27). The grid periods used were 23 nm, 28 nm or 34 nm for acquisitions with the 488 nm or 561 nm lasers respectively. For each SR-SIM acquisition, the corresponding grating was shifted and rotated five times, giving a total of 25 acquired frames. Final SR-SIM images were reconstructed using the ZEN software (black edition, 2012, version8, 1, 0, 484; Zeiss), using synthetic, channel-specific Optical Transfer Functions (OTFs). At least 100 sporangia/ 30 spores produced at 20°C were examined at each sampling times. The distance between cap and the forespore membranes was evaluated on at least 30 sporangia. All the kinetics were replicated at least two times using conventional fluorescence microscopy before being imaged once by SR-SIM.

REFERENCES

1. Driks A, Eichenberger P. 2016. The Spore Coat, p. 179–200. *In* The Bacterial Spore. John Wiley & Sons, Ltd.

2. McKenney PT, Eichenberger P. 2012. Dynamics of spore coat morphogenesis in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology* 83:245–260.
3. McKenney PT, Driks A, Eichenberger P. 2013. The *Bacillus subtilis* endospore: assembly and functions of the multilayered coat. 1. *Nature Reviews Microbiology* 11:33–44.
4. Errington J. 1993. *Bacillus subtilis* sporulation: regulation of gene expression and control of morphogenesis. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 57:1–33.
5. Lu S, Cutting S, Kroos L. 1995. Sporulation protein SpoIVFB from *Bacillus subtilis* enhances processing of the sigma factor precursor Pro-sigma K in the absence of other sporulation gene products. *Journal of Bacteriology* 177:1082–1085.
6. Cutting S, Oke V, Driks A, Losick R, Lu S, Kroos L. 1990. A forespore checkpoint for mother cell gene expression during development in *B. subtilis*. *Cell* 62:239–250.
7. Losick R, Stragier P. 1992. Crisscross regulation of cell-type-specific gene expression during development in *B. subtilis*. 6361. *Nature* 355:601–604.
8. Partridge SR, Errington J. 1993. The importance of morphological events and intercellular interactions in the regulation of prespore-specific gene expression during sporulation in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology* 8:945–955.
9. Errington J. 2003. Regulation of endospore formation in *Bacillus subtilis*. 2. *Nature Reviews Microbiology* 1:117–126.
10. Mearls EB, Jackter J, Colquhoun JM, Farmer V, Matthews AJ, Murphy LS, Fenton C, Camp AH. 2018. Transcription and translation of the *sigG* gene is tuned for proper execution of the switch from early to late gene expression in the developing *Bacillus subtilis* spore. *PLOS Genetics* 14:e1007350.
11. Frandsen N, Stragier P. 1995. Identification and characterization of the *Bacillus subtilis* *spoIIP* locus. *Journal of Bacteriology* 177:716–722.
12. Smith K, Bayer ME, Youngman P. 1993. Physical and functional characterization of the *Bacillus subtilis* *spoIIM* gene. *Journal of Bacteriology* 175:3607–3617.
13. Regan G, Itaya M, Piggot PJ. 2012. Coupling of σ G Activation to Completion of Engulfment during Sporulation of *Bacillus subtilis* Survives Large Perturbations to DNA Translocation and Replication. *Journal of Bacteriology* 194:6264–6271.
14. Doan T, Coleman J, Marquis KA, Meeske AJ, Burton BM, Karatekin E, Rudner DZ. 2013. FisB mediates membrane fission during sporulation in *Bacillus subtilis*. *Genes Dev* 27:322–334.
15. Saujet L, Pereira FC, Serrano M, Soutourina O, Monot M, Shelyakin PV, Gelfand MS, Dupuy B, Henriques AO, Martin-Verstraete I. 2013. Genome-Wide Analysis of Cell Type-Specific Gene Transcription during Spore Formation in *Clostridium difficile*. *PLOS Genetics* 9:e1003756.
16. Fimlaid KA, Shen A. 2015. Diverse mechanisms regulate sporulation sigma factor activity in the *Firmicutes*. *Current Opinion in Microbiology* 24:88–95.
17. Fimlaid KA, Jensen O, Donnelly ML, Siegrist MS, Shen A. 2015. Regulation of *Clostridium difficile* Spore Formation by the SpoIIQ and SpoIIIA Proteins. *PLOS Genetics* 11:e1005562.
18. Ribis JW, Ravichandran P, Putnam EE, Pishdadian K, Shen A. 2017. The Conserved Spore Coat Protein SpoVM Is Largely Dispensable in *Clostridium difficile* Spore Formation. *mSphere* 2.
19. Ohye DF, Murrell WG. 1973. Exosporium and Spore Coat Formation in *Bacillus cereus* T. *Journal of Bacteriology* 115:1179–1190.
20. Giorno R, Bozue J, Cote C, Wenzel T, Moody K-S, Mallozzi M, Ryan M, Wang R, Zielke R, Maddock JR, Friedlander A, Welkos S, Driks A. 2007. Morphogenesis of the *Bacillus anthracis* Spore. *Journal of Bacteriology* 189:691–705.
21. Boone TJ, Mallozzi M, Nelson A, Thompson B, Khemmani M, Lehmann D, Dunkle A, Hoepflich P, Rasley A, Stewart G, Driks A. 2018. Coordinated Assembly of the *Bacillus anthracis* Coat and Exosporium during Bacterial Spore Outer Layer Formation. *mBio* 9.
22. Lablaine A, Serrano M, Bressuire-Isoard C, Chamot S, Bornard I, Carlin F, Henriques AO, Broussolle V. 2021. The Morphogenetic Protein CotE Positions Exosporium Proteins CotY and ExsY during Sporulation of *Bacillus cereus*. *mSphere* 6.

23. Boydston JA, Yue L, Kearney JF, Turnbough CL. 2006. The ExsY Protein Is Required for Complete Formation of the Exosporium of *Bacillus anthracis*. *Journal of Bacteriology* 188:7440–7448.
24. Bravo A, Agaisse H, Salamitou S, Lereclus D. 1996. Analysis of *cryIAa* expression in *sigE* and *sigK* mutants of *Bacillus thuringiensis*. *Mol Gen Genet* 250:734–741.
25. Johnson MJ, Todd SJ, Ball DA, Shepherd AM, Sylvestre P, Moir A. 2006. ExsY and CotY Are Required for the Correct Assembly of the Exosporium and Spore Coat of *Bacillus cereus*. *Journal of Bacteriology* 188:7905–7913.
26. Gustafsson MGL. 2000. Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy. *Journal of Microscopy* 198:82–87.
27. Magge A, Setlow B, Cowan AE, Setlow P. 2009. Analysis of dye binding by and membrane potential in spores of *Bacillus* species. *Journal of Applied Microbiology* 106:814–824.
28. Pereira FC, Saujet L, Tomé AR, Serrano M, Monot M, Couture-Tosi E, Martin-Verstraete I, Dupuy B, Henriques AO. 2013. The Spore Differentiation Pathway in the Enteric Pathogen *Clostridium difficile*. *PLOS Genetics* 9:e1003782.
29. Bressuire-Isoard C, Bornard I, Henriques AO, Carlin F, Broussolle V. 2016. Sporulation Temperature Reveals a Requirement for CotE in the Assembly of both the Coat and Exosporium Layers of *Bacillus cereus* Spores. *Appl Environ Microbiol* 82:232–243.
30. Sharp MD, Pogliano K. 1999. An in vivo membrane fusion assay implicates SpoIIIE in the final stages of engulfment during *Bacillus subtilis* sporulation. *PNAS* 96:14553–14558.
31. Blaylock B, Jiang X, Rubio A, Moran CP, Pogliano K. 2004. Zipper-like interaction between proteins in adjacent daughter cells mediates protein localization. *Genes Dev* 18:2916–2928.
32. Gutierrez J, Smith R, Pogliano K. 2010. SpoIID-Mediated Peptidoglycan Degradation Is Required throughout Engulfment during *Bacillus subtilis* Sporulation. *Journal of Bacteriology* 192:3174–3186.
33. Aung S, Shum J, Mello AA-D, Broder DH, Fredlund-Gutierrez J, Chiba S, Pogliano K. 2007. Dual localization pathways for the engulfment proteins during *Bacillus subtilis* sporulation. *Molecular Microbiology* 65:1534–1546.
34. Perez AR, Mello AA-D, Pogliano K. 2000. SpoIIB Localizes to Active Sites of Septal Biogenesis and Spatially Regulates Septal Thinning during Engulfment in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* 182:1096–1108.
35. Londoño-Vallejo J-A, Fréhel C, Stragier P. 1997. spoIIQ, a forespore-expressed gene required for engulfment in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology* 24:29–39.
36. Mello AA-D, Sun Y-L, Aung S, Pogliano K. 2002. A cytoskeleton-like role for the bacterial cell wall during engulfment of the *Bacillus subtilis* forespore. *Genes Dev* 16:3253–3264.
37. Chastanet A, Losick R. 2007. Engulfment during sporulation in *Bacillus subtilis* is governed by a multi-protein complex containing tandemly acting autolysins. *Molecular Microbiology* 64:139–152.
38. Morlot C, Uehara T, Marquis KA, Bernhardt TG, Rudner DZ. 2010. A highly coordinated cell wall degradation machine governs spore morphogenesis in *Bacillus subtilis*. *Genes Dev* 24:411–422.
39. Ribis JW, Fimlaid KA, Shen A. 2018. Differential requirements for conserved peptidoglycan remodeling enzymes during *Clostridioides difficile* spore formation. *Molecular Microbiology* 110:370–389.
40. Dembek M, Kelly A, Barwinska-Sendra A, Tarrant E, Stanley WA, Vollmer D, Biboy J, Gray J, Vollmer W, Salgado PS. 2018. Peptidoglycan degradation machinery in *Clostridium difficile* forespore engulfment. *Molecular Microbiology* 110:390–410.
41. Broder DH, Pogliano K. 2006. Forespore Engulfment Mediated by a Ratchet-Like Mechanism. *Cell* 126:917–928.
42. Sun Y-L, Sharp MD, Pogliano K. 2000. A Dispensable Role for Forespore-Specific Gene Expression in Engulfment of the Forespore during Sporulation of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* 182:2919–2927.

43. Serrano M, Crawshaw AD, Dembek M, Monteiro JM, Pereira FC, Pinho MG, Fairweather NF, Salgado PS, Henriques AO. 2016. The SpoIIQ-SpoIIIAH complex of *Clostridium difficile* controls forespore engulfment and late stages of gene expression and spore morphogenesis. *Molecular Microbiology* 100:204–228.
44. Nocadello S, Minasov G, Shuvalova LS, Dubrovskaya I, Sabini E, Anderson WF. 2016. Crystal Structures of the SpoIID Lytic Transglycosylases Essential for Bacterial Sporulation*. *Journal of Biological Chemistry* 291:14915–14926.
45. de Hoon MJL, Eichenberger P, Vitkup D. 2010. Hierarchical Evolution of the Bacterial Sporulation Network. *Current Biology* 20:R735–R745.
46. Lu S, Halberg R, Kroos L. 1990. Processing of the mother-cell sigma factor, sigma K, may depend on events occurring in the forespore during *Bacillus subtilis* development. *PNAS* 87:9722–9726.
47. Pishdadian K, Fimlaid KA, Shen A. 2015. SpoIIID-mediated regulation of σ K function during *Clostridium difficile* sporulation. *Molecular Microbiology* 95:189–208.
48. Galperin MY, Mekhedov SL, Puigbo P, Smirnov S, Wolf YI, Rigden DJ. 2012. Genomic determinants of sporulation in *Bacilli* and *Clostridia*: towards the minimal set of sporulation-specific genes. *Environmental Microbiology* 14:2870–2890.
49. Kunkel B, Kroos L, Poth H, Youngman P, Losick R. 1989. Temporal and spatial control of the mother-cell regulatory gene *spoIIID* of *Bacillus subtilis*. *Genes Dev* 3:1735–1744.
50. Serrano M, Kint N, Pereira FC, Saujet L, Boudry P, Dupuy B, Henriques AO, Martin-Verstraete I. 2016. A Recombination Directionality Factor Controls the Cell Type-Specific Activation of σ K and the Fidelity of Spore Development in *Clostridium difficile*. *PLOS Genetics* 12:e1006312.
51. Lyu Y, Gu M, Chen M, Feng E, Zhu L, Pan C, Wang D, Liu X, Wang H. 2019. Disruption of SpoIIID decreases sporulation, increases extracellular proteolytic activity and virulence in *Bacillus anthracis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 513:651–656.
52. Bailey-Smith K, Todd SJ, Southworth TW, Proctor J, Moir A. 2005. The ExsA Protein of *Bacillus cereus* Is Required for Assembly of Coat and Exosporium onto the Spore Surface. *Journal of Bacteriology* 187:3800–3806.
53. Henriques AO, Moran CP Jr. 2007. Structure, Assembly, and Function of the Spore Surface Layers. *Annual Review of Microbiology* 61:555–588.
54. Ghosh A, Manton JD, Mustafa AR, Gupta M, Ayuso-Garcia A, Rees EJ, Christie G. 2018. Proteins Encoded by the gerP Operon Are Localized to the Inner Coat in *Bacillus cereus* Spores and Are Dependent on GerPA and SafA for Assembly. *Appl Environ Microbiol* 84.
55. Wang KH, Isidro AL, Domingues L, Eskandarian HA, McKenney PT, Drew K, Grabowski P, Chua M-H, Barry SN, Guan M, Bonneau R, Henriques AO, Eichenberger P. 2009. The coat morphogenetic protein SpoVID is necessary for spore encasement in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology* 74:634–649.
56. Ramamurthi KS, Losick R. 2009. Negative membrane curvature as a cue for subcellular localization of a bacterial protein. *PNAS* 106:13541–13545.

SUPPLEMENT

Spore outerlayers assembly in engulfment defective *B. cereus*

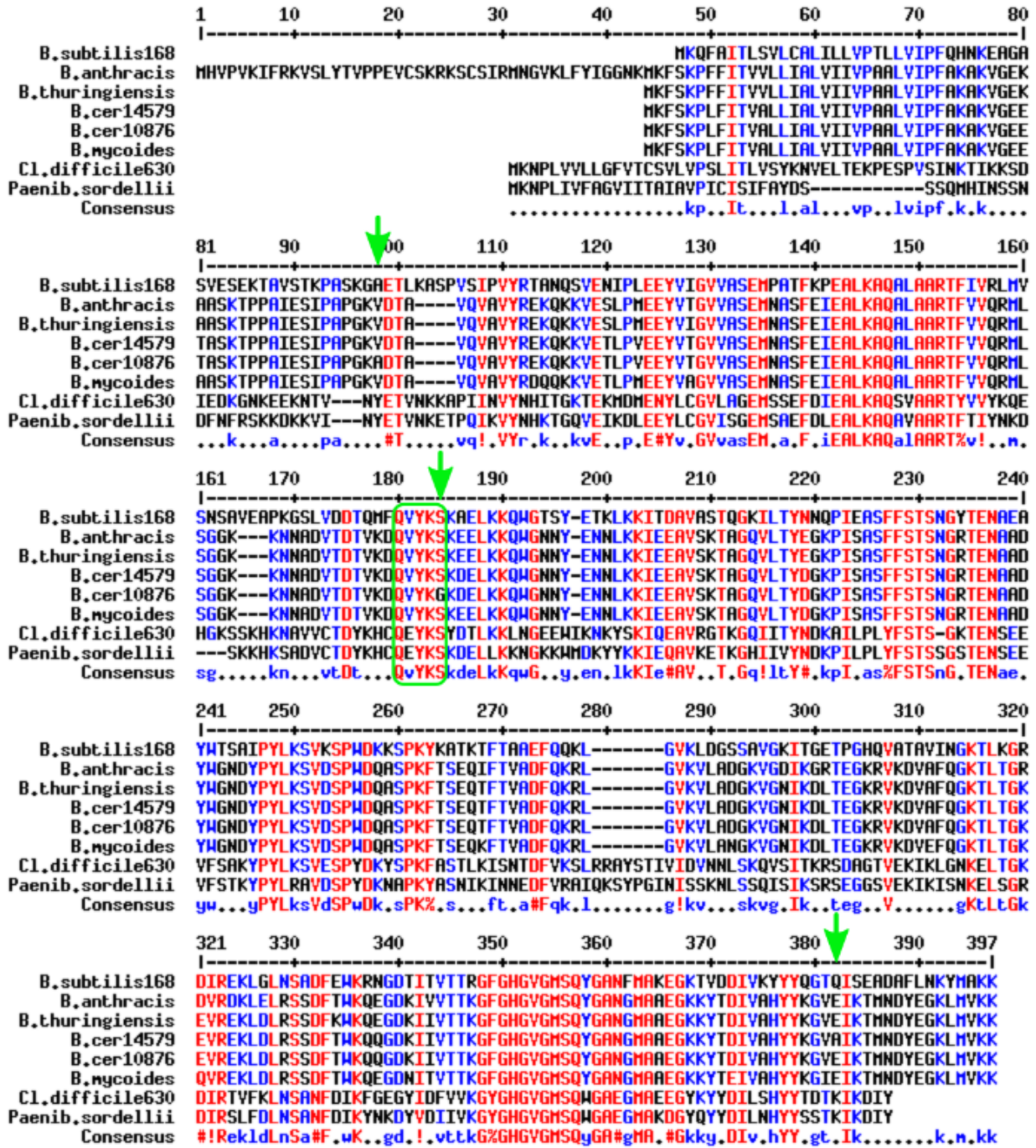


FIG S1. Amino acid sequence alignment of SpoIID homologs from representative species of the Firmicutes. Conserved residues (red) and similar AA (blue) are highlighted. The consensus sequence is indicated on the bottom. Green arrows point to the substitution differentiating *B. cereus* 14579 and 10876. Note that the substitution positioned on AA 184 of this alignment affect a very conserved region. Alignment were realized using MultiAlin (multalin.toulouse.inra.fr)

3) Identification des protéines formant l'échafaudage morphogénétique des endospores de *B. cereus* par analyse protéomique

soumission prévue dans le journal Molecular Microbiology

Dans notre publication présentée en section II-1, nous avons mis en évidence que CotE, CotY et ExsY forment une matrice immature dans la région non-cap de la préspore, car ces protéines sont positionnées alors qu'aucune structure n'est visible dans cette région en microscopie électronique à transmission (MET). Nous avons nommé cette matrice protéique le « morphogenetic scaffold » (MS). Nous avons également montré l'existence de nombreuses similitudes dans le mécanisme d'assemblage de ces protéines de *B. cereus* avec leurs homologues de *B. subtilis*. Ces résultats nous ont amenés à proposer qu'un mécanisme commun est à l'origine de la formation des couches protéiques externes des spores de *Bacillaceae*. Cependant, nous avons également observé un changement dans la dynamique d'encapsulation de CotY et de ExsY par rapport à leur homologue CotZ. Durant la sporulation de *B. cereus*, ces deux protéines suivent la même dynamique d'encapsulation que celle de CotE alors que l'homologue CotZ de *B. subtilis* encapsule la préspore avec un retard, comparativement à CotE. Dans *B. subtilis*, cette différence d'encapsulation entre CotE et CotZ est liée au contrôle par GerE, alors que l'encapsulation de la préspore par CotE est indépendante de GerE. Ces observations montrent que, malgré des principes communs, il existe des différences dans la mise en place des feuilletts protéiques externes des spores qui pourraient être à l'origine des particularités des couches protéiques externes (CPE) (comme l'interspace ou la présence du cap de l'exosporium pendant l'engulfment) des spores du groupe *B. cereus*.

Pour poursuivre nos travaux sur l'élucidation de l'étude de l'assemblage des CPE, nous avons décidé d'employer une approche non ciblée pour déterminer quels orthologues de protéines des coats de *B. subtilis* font partie du MS de *B. cereus*. Pour ce faire, nous avons réalisé des sporulations de souches de *B. cereus* à température de sporulation sous-optimale, ce qui permet d'obtenir une population de cellules sporulantes très homogène, tout au long de la

cinétique de formation des spores. Ainsi, nous avons obtenu des échantillons dans lesquels l'assemblage de l'exosporium et du MS a débuté alors qu'aucun fragment de coat n'est encore assemblé au sein de la population. Ainsi, une analyse protéomique de ces échantillons nous a permis de déterminer que les homologues de SpoIVA, SpoVID, YhaX, ExsA, YisY, SleL et YwdL sont présents dans le MS de *B. cereus*, alors d'autres protéines telles que CotB1, CotB2, CotH, ExsB (Cot γ), YwrJ, Cot α , CotX1, CotX2, YjcA, YhjR, CotP, YabP, YabG, YloB1 semblent s'assembler plus tardivement et seraient impliquées dans la maturation des couches protéiques externes des spores. De nombreuses protéines, précédemment caractérisées comme étant positionnées dans l'exosporium, sont détectées uniquement tardivement durant la sporulation de *B. cereus*. Nous avons également déterminé que SpoIIID et GerR présentent une abondance maximale lors de l'encapsulation par les protéines du MS, alors que GerE et SpoVT sont spécifiquement présents lorsque le cœur se déshydrate, et quand le cortex, le coat et la partie non-cap de l'exosporium sont détectés par MET. Ce résultat renforce l'hypothèse que GerE ne serait pas impliqué dans l'encapsulation de l'endospore par CotE, CotY, ExsY et possiblement par d'autres protéines du MS. Nous avons également mis en évidence que les enzymes encodées par l'opéron de glycosylation *rml* sont présentes au moment de la formation du MS, alors que de nombreux opérons de glycosylation semblent actifs spécifiquement au moment de la maturation du MS. Nos résultats indiquent également l'association des protéines SpoVR et SpoVD, précurseurs de la synthèse du cortex, avec le MS.

Enfin, l'accumulation des orthologues de protéines du plancher des coats de *B. subtilis* durant la sporulation de *B. cereus* s'est avéré tout à fait particulière. La recherche de protéines spécifiques de *B. cereus* partageant le même profil d'accumulation a permis d'identifier deux protéines BC2745 et BC3578, dont BC2745 préalablement détectée dans des fractions d'exosporium. Ces protéines constituent les premières protéines spécifiques du groupe *B. cereus* possiblement impliquées dans la genèse précoce des CPE des spores et associées au MS. L'ensemble de ces données qui constituent la première étude complète des protéines présentes aux différentes étapes de la sporulation de *B. cereus*, qui apporte de nouvelles connaissances sur l'assemblage des CPE et leur maturation au cours de la formation des spores du groupe *B. cereus*.

Deciphering the proteins forming the morphogenetic scaffold of *B. cereus* endospores by proteomic analysis

Lablaine Armand^a, Stéphanie Chamot^a, Isabelle Bornard^b, Jean Armengaud^c, Frédéric Carlin^a,
Véronique Broussolle^{a*}

^a INRAE, Avignon Université, UMR 408 SQPOV, F-84000 Avignon, France

^b INRAE, Pathologie végétale, F-84143 Montfavet, France

^c Université Paris-Saclay, CEA, INRAE, Département Médicaments et Technologies pour la Santé (DMTS), SPI, Bagnols-sur-Cèze, 30200, France.

* Address correspondence to Veronique Broussolle: veronique.broussolle@inrae.fr

Running title: The morphogenetic scaffold of *B. cereus*

Keywords: Coat, exosporium, proteomic, morphogenetic scaffold

Abstract

Spores of the *Firmicutes* are encased in proteinaceous layers, which are essential to face the environmental challenging conditions that induced their formation. The morphogenesis of the proteinaceous multilayered coats of the model organism *Bacillus subtilis* was deeply investigated. Knowledge of the underlying molecular mechanism allows the development of new biotechnologies, such as the spore display vaccine. In the *Bacillus cereus* group, the proteinaceous layers are divided in a coat and a balloon-like exosporium, separated by an interspace. This original design grants particular properties to these spores and is in particular involved in pathogenicity of *Bacillus anthracis* and *B. cereus*. However, despite this crucial function, knowledge on the molecular determinants of the proteinaceous layers assembly in the *B. cereus* group remains limited. Recently, we demonstrated that exosporium assembly relies on the formation of a morphogenetic scaffold composed of *B. subtilis* orthologues involved in coat assembly. In this study, we used a proteomic approach combined to a microscopy analysis to discriminate *B. subtilis* orthologues present in the morphogenetic scaffold of *B. cereus* from those mostly involved in maturation of the proteinaceous layers. We also identified transcriptional factors specifically present during the morphogenetic scaffold formation from those present at the time of layers maturation. Finally, by defining specific

patterns for accumulation of *B. subtilis* orthologues during sporulation, we identified new *B. cereus* specific proteins, possibly involved in the different steps of proteinaceous layers development. Those results constitute the first overview of the precise proteins content present at the different stages of *B. cereus* sporulation.

Introduction

Bacteria have developed an arsenal of molecular mechanisms to deal with the changing, stressing and sometimes unfavorable environmental conditions encountered during their life cycle. Such mechanisms include biofilm formation, cannibalism or differentiation of a subpopulation, as persisters cells (González-Pastor *et al.*, 2003; Dubnau and Losick, 2006). However, the members of the *Firmicutes* phyla possess a more radical, fully committing process, the sporulation (Errington, 2003). Unlike mechanisms leading to a variant cell by activation of a limited number of genes, sporulation consists in a complete differentiation pathway. During sporulation, the genetic expression is fully overturned, finally leading to the lysis of the mother cell and the release in the environment of the spore, a highly differentiated dormant cell (de Hoon *et al.*, 2010). The architecture of the spore, completely different from that of a vegetative cell, includes supra-molecular structures. From the most internal to the most external side, the released spore is composed of, a dehydrated core comprising the bacterial DNA, a thin germ cell-wall surrounded by the cortex, a layer of modified peptidoglycan, which is in turn wrapped in a complex proteinaceous coat. While the internal structures appear well conserved within the members of the *Firmicutes*, a great diversity of external proteinaceous coat layers are described (Driks and Eichenberger, 2016; Cavalcante *et al.*, 2019). This includes the multilayered, thick coat of *B. subtilis*, which is composed of a basement layer, a lamellar inner coat, an electron dense outer coat and a thin crust, or the asymmetric canoe-shaped body extending from the coat of *Brevibacillus agri* (Cavalcante *et al.*, 2019). However, one of the most unusual external proteinaceous layer is the irregular balloon-shaped exosporium, which encases spores of several pathogen species, such as *B. anthracis* and *B. cereus sensu stricto* and other *Bacillus* from the *Bacillus cereus* group, as well as some *Clostridia* species (Stewart, 2015).

The exosporium is a glycoproteic structure formed by a crystalline basal layer supporting a hairy nap composed of glycoproteins. Strikingly, the exosporium is separated from spore underlayers by an interspace of unknown composition, giving the irregular balloon-shape of the exosporium. The

basal layer is mainly formed by ExsY, a cystein-rich protein with strong self-interacting properties, which forms a large crystalline net, when expressed in *E. coli* (Terry *et al.*, 2017). Other proteins are also present in the basal layer, such as CotY, the paralog of ExsY, and CotE, ExsM or ExsK (Stewart, 2015)). The hairy nap is mainly composed by the collagen-like protein BclA. However, some other collagen-like proteins are present in the hairy nap, such as BclB, or associated with the exosporium, such as BetA/BclF (Stewart, 2015). Finally, proteins forming the hairy nap are inserted into the basal layer through BxpB, which forms protrusions at the surface of the basal layer (Ball *et al.*, 2008; Rodenburg *et al.*, 2014).

The exact function of the exosporium remains unknown. However, as the most external layer, it may be implicated in the interaction of the spore with its environment, including host tissue and immune system (Stewart, 2015). Hence, exosporium seems to constitute a semi-permeable barrier allowing the passage of small molecules, such as spore germinants but avoiding passage of largest molecules, such as degradative enzymes or antibodies (Stewart, 2015). Enzymes are also associated with the exosporium. The alanine racemase Alr is associated with the exosporium and may avoid early germination events by converting the L-alanine germinant in D-alanine, an inhibitor of germination (Redmond *et al.*, 2004). The metalloprotease InhA is also detected in exosporium fraction and allows spores to escape from macrophages (Ramarao and Lereclus, 2005).

Most of what we know regarding the molecular mechanism of *Bacillus* proteinaceous layers assembly and more generally about the sporulation of *Bacillus*, is largely inferred from the pioneer genetic studies done in *B. subtilis* (Errington, 1993). The first visible hallmark of sporulation is the formation of a polar septum, which separates the cell in two compartments, *i.e.* the large mother cell and the small forespore. During the developmental process, the mother cell engulfs the forespore in a phagocytosis-like mechanism, leading to the forespore release as a protoplast inside the mother cell (Errington, 2003). Coat assembly is a process directed by the mother cell and conducted by a succession of transcription waves under the control of alternative RNA polymerase sigma (σ) factors and transcriptional regulators σ^E , SpoIIID, GerR, σ^K , GerE, respectively (de Hoon *et al.*, 2010; McKenney *et al.*, 2013). More than eighty proteins are implicated in the assembly of the multilayered *B. subtilis* spore coat, which is one of the most complex macromolecular structure formed by bacteria (Driks and Eichenberger, 2016).

The correct setting and the coordination needed to build such a complex structure appears to rely on two principal mechanisms, (i) the auto-assembly properties of morphogenetic proteins and (ii) a complex net of hierarchical protein-protein interactions (McKenney *et al.*, 2010; McKenney

and Eichenberger, 2012; McKenney *et al.*, 2013; Jiang *et al.*, 2015; Driks and Eichenberger, 2016; Liu *et al.*, 2016b; Liu *et al.*, 2016a; Krajčiková *et al.*, 2017). Assembly of the *B. subtilis* coat starts with the localization of SpoIVA at the onset of engulfment, on the curved septum, the future mother cell proximal (MCP) pole of the forespore. The positioning of SpoIVA allows the recruitment of the morphogenetic proteins SpoVM, SpoVID, SafA, CotE, CotY and CotZ (Wang *et al.*, 2009; McKenney *et al.*, 2013). This step is named "the targeting" and creates an organizational center on the MCP pole. Then SpoVM, progressively encased the developing forespore following the progression of the engulfment by recognizing specifically positively curved membranes (Ramamurthi 200X). SpoVM encasement directs SpoVID encasement, which in turn allows SpoIVA encasement (Wang *et al.*, 2009). The encasement by SpoVM, SpoIVA and SpoVID is completed at the end of the engulfment, at the site of membranes fusion, corresponding to the new formed mother cell distal pole (MCD) of the forespore (Wang *et al.*, 2009; McKenney and Eichenberger, 2012; McKenney *et al.*, 2013). This particular kinetic of localization defines the kinetic class I-proteins, which is also shared by other σ^E -controlled proteins (McKenney and Eichenberger, 2012). Proteins of the class II and III, including SafA, CotE, CotY and CotZ, are present in the organizational center on the MCP pole but begin their encasement after engulfment completion. Class II- and class III-proteins fully encase the forespore respectively before and after it clearly appears phase-dark. Encasement by class II-proteins depends on SpoIIID but not on GerE, while class III-proteins encasement depends on GerE (McKenney and Eichenberger, 2012). Insertion of a second group of late-expressed proteins after engulfment completion, not present in the organizational center, will complete this scaffold to constitute the mature multilayered coat (McKenney and Eichenberger, 2012; McKenney *et al.*, 2013).

The assembly of the *B. cereus* exosporium was historically studied by transmission electronic microscopy (TEM) and is firstly detected as a small layer adjacent to the curved septa. Then, after engulfment completion, the exosporium is separated from the outer forespore membrane (OFM) by the interspace formation (Ohye and Murrell, 1973; Giorno *et al.*, 2007; Boone *et al.*, 2018; Lablaine *et al.*, 2021). Since only this cap was observed in an *exsY* mutant and because exosporium expansion is detected concomitantly to the coat deposition on the longitudinal sides of the forespore, it was postulated that the exosporium assembly is a unidirectional process, starting by the MCP cap and progressing towards the MCD forespore pole (Steichen *et al.*, 2007; Stewart, 2015; Stewart, 2017; Terry *et al.*, 2017). However, we recently showed by super-resolution structured illumination microscopy (SR-SIM) (Gustafsson, 2000) that the exosporium

morphogenetic proteins CotE, CotY and ExsY localize as a second cap after engulfment completion, which also gives rise to a smaller, less connected MCD cap in *exsY* mutant (Lablaine *et al.*, 2021). Thus, the exosporium assembly relies on a bidirectional, asymmetric, assembly of a scaffold, which is reminiscent of the assembly of *B. subtilis* orthologues CotE, CotY and CotZ (McKenney and Eichenberger, 2012; Lablaine *et al.*, 2021). Moreover, CotE, CotY and ExsY fully surround the developing spore before any coat, cortex or non-cap part of the exosporium are detected by TEM (Lablaine *et al.*, 2021). This so-called morphogenetic scaffold (MS) of *B. cereus* may also include other orthologues of *B. subtilis* morphogenetic proteins, such as SpoIVA, CotO and the SafA ortholog ExsA, which are described to be important for proteinaceous layers assembly in the *B. cereus* group (Bailey-Smith *et al.*, 2005; Giorno *et al.*, 2007; Boone *et al.*, 2018; Lablaine *et al.*, 2021). Importantly, CotY and ExsY, orthologues of the *B. subtilis* class III-CotZ proteins, are described as class II-proteins in *B. cereus* (Lablaine *et al.*, 2021). This is in line with the absence of GerE-binding on *exsY* promoter in *B. thuringiensis*, while GerE is required for encasement by *B. subtilis* CotZ (McKenney and Eichenberger, 2012; Peng *et al.*, 2016).

In the *B. cereus* group, coat formation is detected by TEM as a series of large fragments firstly deposited on the lateral side of the forespore (Ohye and Murrell, 1973; Boone *et al.*, 2018; Lablaine *et al.*, 2021). This observation contrasts with the model of coat assembly of *B. subtilis*, which relies on the formation of the organizational center at the MCP pole (McKenney and Eichenberger, 2012). Hence, the mechanism of the proteinaceous *B. cereus* layers assembly shares similarities to the one described for *B. subtilis* but also present singularities. However, the molecular basis explaining these singularities remains mysterious. Hence, in the *B. cereus* group, we largely ignored which proteins assemble early, which proteins constitute the morphogenetic coat/exosporium scaffold, and which are the proteins synthesized later, allowing maturation of the scaffold to give the distinct coat, interspace and exosporium. We also do not know the transcriptional regulation controlling the *B. cereus* proteinaceous layers assembly. Defining such elements constitutes a crucial step in the path to understand the origin of *B. cereus* spores properties.

We previously determined, by TEM and SR-SIM analysis, the timing of formation of the coat, the exosporium and the kinetic of some morphogenetic exosporium proteins localization during *B. cereus* sporulation at 20°C (Lablaine *et al.*, 2021, Lablaine *et al.*, in prep). In this study, our aim was to differentiate proteins involved in the assembly of the MS from those involved in maturation of the MS into the Coat, the Interspace and the non-cap part of the exosporium. In

addition, we determined the relative timing of detection of transcriptional factors the stage of proteinaceous layers development. To achieve these goals, we performed an extensive proteomic analysis of *B. cereus* sporulating cells at a suboptimal sporulation temperature, which allows a good synchronization of the sporulating population.

Results and discussion

Suboptimal sporulation temperature as a set-up for a kinetic proteomic analysis of *Bacillus cereus* sporulation

Sporulation always includes a part of heterogeneity, which seems linked to the expression level of the phosphorelay involved in sporulation initiation (Dubnau and Losick, 2006; Jong *et al.*, 2010). Heterogeneity is one of the problem to face for proteomic studies, making difficult to determine the precise protein content of sporangia at a defined sporulation step. As a result, proteomic studies in the *B. cereus* group usually focused on the analysis of mature spores (Lai *et al.*, 2003; Abhyankar *et al.*, 2011; Abhyankar *et al.*, 2013; Stelder *et al.*, 2018) and consequently, the overview of the proteins involved in the different sporulation stages of *B. cereus* is limited. In a previous work, we noticed that sporulation at a suboptimal temperature increases the time between the different phases of sporulation (Lablaine *et al.*, 2021). Hence, engulfment started from hour 20 at 20°C in *B. cereus* ATCC 14579 and from hour 11 at 37°C in *B. cereus* ATCC 10876 (Fig. 1A and S1). In addition, phase-bright sporangia were mainly observed from hour 48 at 20°C and from hour 14 at 37°C (Fig. 1A and S1). At hour 13 at 37°C, a mixed population of engulfing and phase-bright sporangia was observed (Fig. S1). In contrast, the sporulating population was highly homogeneous at 20°C and no mix of engulfing cells (patterns *a-c*) and phase-bright sporangia (pattern *e*) was observed (Fig. 1A). At hour 20 of sporulation at 20°C, most of the cells were at an engulfment stage (pattern *a-c*), just completed engulfment at hour 24 (pattern *d*) and only phase-bright sporangia (pattern *e*) together with some free spores (pattern *f*) were observed at hour 48 (Fig. 1A). Importantly, TEM images showed that sporangia collected at hour 24 only presented a connected exosporium cap or an

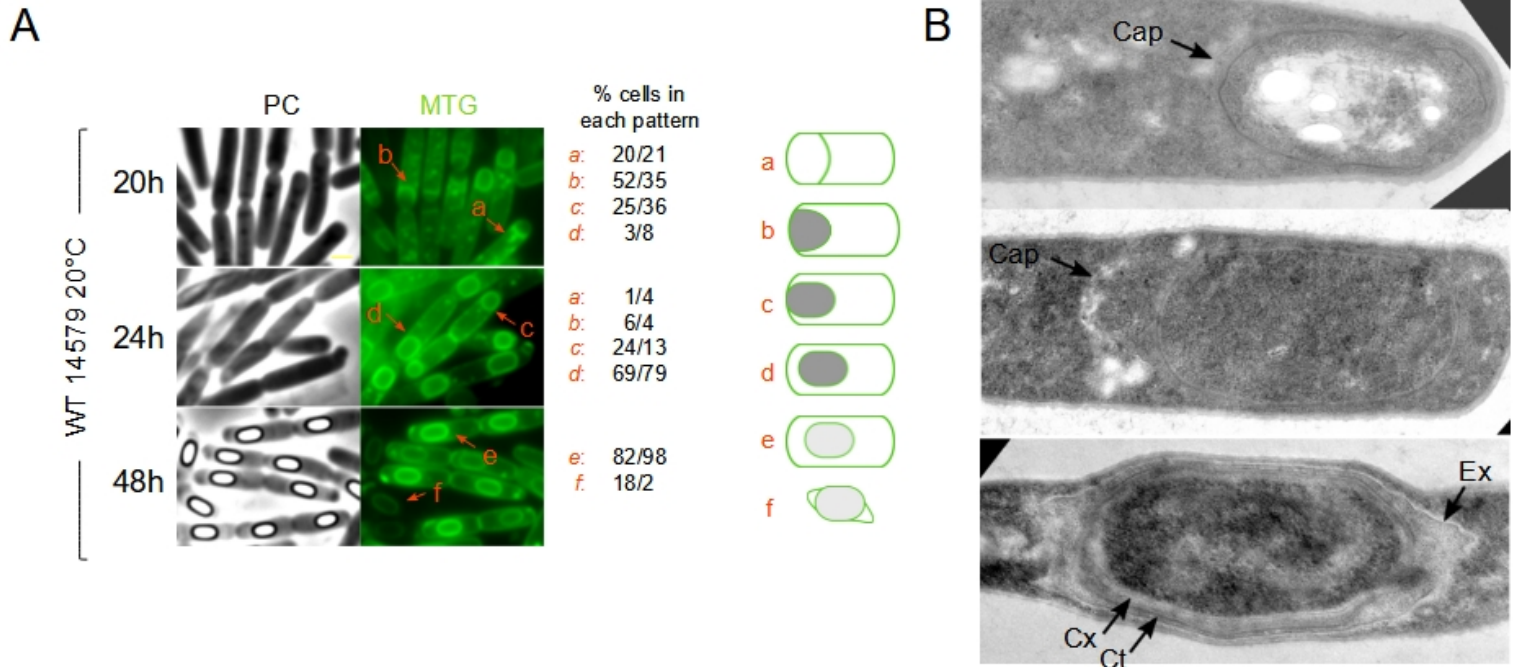


FIG 1. Sub-optimal sporulation temperature allows to collect cells at homogeneous sporulation stages (A) Sporulating cells of *Bacillus cereus* ATCC 14579 at 20°C were collected at the indicated times, labeled with the MTG membrane dye and analyzed by phase contrast (CP) and fluorescence microscopy. The different patterns of sporulation identified (*a* to *f*) were counted and a schematic representation is presented on the right of the panels. The counting corresponding to two independent biological replicates used for proteomic analysis are presented. Scale bars, 0.5 μ m. (B) Thin-sections of sporulating *B. cereus* ATCC 14579 cells, collected after hour 24 (top and middle panels) or hour 48 (bottom panel) of sporulation at 20°C and observed by TEM. At hour 24, engulfed sporangia only present a connected (top panel) or a separated exosporium (middle panel) while at hour 48, all the sporangia show coat (Ct), cortex (Cx), a dehydrated core (Cr) and a complete exosporium (Ex) (bottom panel). Scale bar, 250nm.

unconnected exosporium cap, but assembly of coat material, cortex or exosporium non-cap region were never observed (Fig. 1B, top and middle panels). In contrast, sporangia collected at hour 48 showed complete coat, cortex and exosporium and a dehydrated core (Fig. 1B, bottom panel). This strong homogeneity in sporulation stages and notably the absence of most of the spore structures at hour 24 was confirmed, as no heat-resistant endospores were counted (data not shown). Hence, time separating stages of sporulation at a suboptimal sporulation temperature made possible to collect cells at highly homogeneous sporulation stages. Notably, we previously showed that the MS encasement is completed at hour 24, just after engulfment completion when exosporium separates from the OFM and before coat are detected (Lablaine *et al.*, 2021). Thus, as we can discriminate cells with only a separated exosporium cap (hour 24) from cells with a complete exosporium and coat (hour 48), we can determine which proteins are involved in MS assembly from those assembling later, likely involved in maturation of the MS.

Importantly, the suboptimal sporulation temperature did not affect the localization sequence of CotE, CotY and ExsY assembly, nor the pattern of coat, cortex and exosporium assembly, as previously reported (Lablaine *et al.*, 2021). Furthermore, sporulation at 20°C of *B. cereus* ATCC 14579 cells allowed a better detection of CotE by immunoblot than at 37°C, and CotY and ExsY were detected without using highly denaturing conditions, which may be explained by a better accessibility of the proteins (Bressuire-Isoard *et al.*, 2016; Lablaine *et al.*, 2021). This high extractability of the exosporium proteins, together with homogeneous cell populations, constitute a perfect set-up for a kinetic proteomic analysis of the proteins implicated in *B. cereus* sporulation and notably proteins present in the MS.

Here, we performed a proteomic analysis on *B. cereus* ATCC 14579 sporulation extracts from two independent biological replicates collected at hours 20, 24 and 48 (Fig. 1A, Tables 1-9). Stages of sporulation were controlled by fluorescence microscopy using the MTG dye (Fig. 1A) (Lablaine *et al.*, 2021). To complete this analysis, we also performed a similar analysis on *B. cereus* ATCC 10876 sporulating cells at 37°C collected at hour 11, hour 13 and on purified spores (Fig. S1, Tables S1-S8). Analysis in this additional *B. cereus* strain allows expanding our results to another genetic background and at a different sporulation temperature.

SpoIID and GerR are present during MS assembly but not GerE and SpoVT

Sporulation is a differentiating process involving a fully overturning of genetic expression leading to the synthesis of a full set of sporulation specific proteins (Errington, 1993; Eichenberger *et al.*, 2004; de Hoon *et al.*, 2010). One from the many striking features of this process is the implementation of two different lines of gene expression, one in the forespore and one in the mother cell (Losick and Stragier, 1992). The switch of gene expression is governed at multiple levels. First, alternative sigma (σ) factors allow RNA polymerase to recognize specific gene promoters (Haldenwang and Losick, 1979; Haldenwang and Losick, 1980). Secondly, ancillary transcriptional factors, acting with specific σ factors, modify the RNA polymerase affinity for specific DNA motifs (Kroos *et al.*, 1989). Finally, signaling proteins synchronized the activation of the σ factors between the two compartments of the sporulating cell (Losick and Stragier, 1992; Partridge and Errington, 1993). Together those factors create a complex network, forming coherent and incoherent feed forward loops (Wang *et al.*, 2006; de Hoon *et al.*, 2010).

Genes coding for the proteins involved in the sporulation regulatory network are from the most conserved across *Firmicutes* (de Hoon *et al.*, 2010; Abecasis *et al.*, 2013; Ramos-Silva *et al.*, 2019). However, recent studies have shown existence of fundamental bifurcation in this network. In *Clostridia*, related species such as (*Pepto*)*clostridium difficile*, activation of the mother cell line of gene expression is independent from the forespore gene line (Fimlaid and Shen, 2015). As a result, activation of σ^K does not depend on engulfment completion and σ^G activation (Fimlaid and Shen, 2015). Similarly, σ^K activation in *B. cereus* appears independent of engulfment completion, since “coat bearding” is observed in engulfment defective cells (Lablaine *et al.*, in prep). However, origin of this distinction from the *B. subtilis* model remains unknown. Hence, we started by identifying the timing of detection of *B. subtilis* regulatory proteins homologs during *B. cereus* sporulation (Table 1 and Table S1). Our aim was to correlate the detection of such transient factors with the timing of the endospore layers assembly.

Homologs of all *B. subtilis* proteins of the regulatory sporulation network are present in *B. cereus* ATCC 14579 and ATCC 10876 but all were not detected in our proteomic analysis (Table 1 and Table S1). In our experiment on *B. cereus* ATCC 14579 cells sporulating at 20°C, we did not detect peptides corresponding to σ^F (BC4072), the first sporulation σ factor detected both in *B. subtilis* and *B. anthracis* (Liu *et al.*, 2004; de Hoon *et al.*, 2010). However, in *B. cereus* ATCC 10876 cells sporulating at 37°C, which were less synchronized (Fig. S1A), σ^F was the most abundant sporulation σ factor detected (Table S1). Moreover, we noticed the presence of SpoIIAA (BC4074), at both hours 20 and 24 during sporulation of *B. cereus* ATCC 14579 at 20°C. SpoIIAA is an anti-

anti σ factor releasing σ^F from SpoIIAB inhibition (Schmidt *et al.*, 1990). A recent study showed that degradation of SpoIIAB by the protease ClpC is crucial for engulfment completion in *B. anthracis* (Kumar *et al.*, 2021). Thus, the presence of SpoIIAA over hours 20 and 24 may reflect the inhibition of SpoIIAB required for engulfment completion. SpoIIAA was no more detected at hour 48, which may reflect an absence of σ^F activity at later stages of sporulation.

The most abundant sporulation σ factor in our experiments was σ^E (BC3904). *B. subtilis* σ^E is responsible of the early synthesis in the mother cell of, (i) SpoIID-IIIIM-IIID, proteins driving the engulfment process (ii) GerM and SpoIIIAA-AH proteins involved in σ^G activation and (iii) SpoIVA, SpoVM, SpoVID, SafA, CotE, CotY-Z proteins, building up the spore coat organizational center (Eichenberger *et al.*, 2004; McKenney *et al.*, 2013; Steil *et al.*, 2005.). Peptides of σ^E were detected at hours 20 and 24 but no more at hour 48 (Table 1). Based on the sporulation stages observed by fluorescent microscopy at these times, this timing is fully consistent with an activity of σ^E taking place during the engulfment and stopped after engulfment completion, as reported in *B. subtilis* (Fig. 1A) (Zhang and Kroos, 1997; Zhang *et al.*, 1999). We failed to detect, in both ATCC 14579 and ATCC 10876 strains, SpoIIR and SpoIIIGA involved in *B. subtilis* σ^E activation (Stragier *et al.*, 1988; Londoño-Vallejo and Stragier, 1995; Karow *et al.*, 1995). However, σ^E activation is an early event, taking place at the time of asymmetric septa formation. Thus, absence of SpoIIR and SpoIIIGA likely reflects that the sporulating population is already ongoing engulfment at hour 20 (Fig. 1A).

Few peptides specific of σ^G (BC3903) were detected only at hour 24, *i.e.* in cells, which just completed engulfment (Fig. 1A, Table 1). However, GerM (BC4495), SpoIIQ (BC5283) and SpoIIIAH (BC4186) were specifically present at hours 20 and 24 (Table 1). Those proteins are involved in formation of the “feeding tube” required for σ^G activity in *B. subtilis* (Camp and Losick, 2009; Rodrigues *et al.*, 2016; Morlot and Rodrigues, 2018). Moreover, GerM, SpoIIQ and SpoIIIAH are detected at the maximal level at hour 24, in the samples corresponding to cells just completing engulfment, suggesting that σ^G was activated at this time. Finally, GerM, SpoIIQ and SpoIIIAH detection drastically decreased at hour 48, suggesting that those proteins are not required anymore for sporulation at hour 48 (Table 1).

Peptides corresponding to σ^K (BC4336) were detected in one replicate only, thus we cannot conclude regarding its timing of synthesis in *B. cereus* at 20°C. It is possible that the window of maximal σ^K detection occurs between two collecting time points. This hypothesis is in line with TEM observations (Fig. 1B), because sporangia were heat-sensitive and only the exosporium cap was detected at hour 24, while heat-resistant sporangia with a complete coat and cortex were detected

at hour 48 (Fig. 1B and not shown). Since coat detection by TEM depends on σ^k in the *B. cereus* group (Bravo *et al.*, 1996), σ^k activity must take place between hour 24 and 48. We detected an increase amount of CtpB (BC5184) throughout the sporulation (Table 1). In *B. subtilis*, CtpB is required for σ^k activation and is present in the mother cell under the control of σ^E and in the forespore under the control of σ^G (Campo and Rudner, 2007; Mastny *et al.*, 2013) Synthesis of CtpB in the forespore is sufficient for the proper timing of σ^k activation in *B. subtilis* (Campo and Rudner, 2007). The increase of CtpB peptides detection between hour 20 and 24 in *B. cereus* corresponds to an accumulation of CtpB consistent with a σ^E -controlled synthesis, whereas a σ^G -mediated synthesis can explain the second accumulation of CtpB, after engulfment completion, observed at hour 48 (Table 1). If CtpB synthesis in the forespore is sufficient for σ^k activation, activation of σ^k between hours 24 and 48 in *B. cereus* seems consistent. Moreover, in *B. cereus* ATCC 10876 sporulating at 37°C, we observed a shift between the maximal detection of peptides corresponding to σ^E at hour 11, when mainly phase-dark sporangia were present in the culture (Fig. S1A), and the maximal detection of σ^k peptides at hour 13 when the sample was mainly composed of phase-bright sporangia (Fig S1A, Table S1). Importantly, we observed some phase-dark and phase-grey sporangia at hour 13 (Fig. S1A, patterns *d* and *d** respectively) showing a bright MTG signal on the longitudinal side of the forespore (Fig. S1A, yellow arrow). Those signals MTG bright signals correspond to coat deposition, reported in *B. cereus* (Lablaine *et al.*, 2021, in prep). This observation suggests that the maximal activity, and therefore the maximal detection, of σ^k occur in phase-grey sporangia.

Finally, σ^A (BC4289) was the most abundant accessory σ factor, both in ATCC 14579 sporangia at 20°C and in ATCC 10876 sporangia at 37°C. σ^A was stable over the sporulation kinetic but increased in mature spores of *B. cereus* ATCC 10876 formed at 37°C (Table S1), as previously shown by in a proteomic study of *B. anthracis* (Lai *et al.*, 2003). However, what could be the function of σ^A during the sporulation in the *B. cereus* group and if σ^A has a particular function in the spore remain attractive questions.

We successfully detected homologues of all ancillary transcription factors known to regulate *B. subtilis* sporulation. These factors were present transiently and in high amount when sporulation took place at 20°C, reflecting the particular homogeneity of the sporulation population at this temperature. Importantly, almost no overlapping between the detection of early factors (RsfA, SpoIIIID and GerR, max at hours 20-24) and late factors (SpoVT and GerE at hour 48) was observed (Table 1). Few peptides corresponding to RsfA (BC5385) were detected in our

experiments. The role of RsfA is poorly documented in *B. subtilis*, here we observed that RsfA accumulated specifically during forespore engulfment, suggesting a role of this protein during this step in *B. cereus*. SpoIIID (BC5282) and GerR (BC3922), which turn-off a subset of σ^E -controlled genes in *B. subtilis*, *B. anthracis* and *B. thuringiensis* (Lv *et al.*, 2019; Lyu *et al.*, 2019) were detected at their maximum in *B. cereus* sporangia just having completed engulfment, *i.e.* at hour 24 (Table 1). The accumulation of SpoIIID and GerR may reflect the end of σ^E activity and the subsequent transition to σ^K activation, as observed in *B. subtilis*. A small amount of GerR was detected at hour 48 in ATCC 14579 cells (Table 1). Similarly, in ATCC 10876 cells, GerR accumulated more at hour 13 than at hour 11, while SpoIIID was stable over those times (Table S1). In *B. subtilis*, GerR is involved in the synthesis of late coat proteins (Cangiano *et al.*, 2010), which may also be the case in *B. cereus*.

The transcriptional factors GerE (BC4501) and SpoVT (BC0059) were detected only in phase-bright sporangia, *i.e.* at hour 48 (Table 1). GerE, which down-regulates *sigK* expression and regulates many σ^K -controlled genes in *B. subtilis*, up-regulates the exosporium genes *exsB*, *bclB*, *bxpB*, *cotB*, *iunH*, while it down-regulates *bxpA* in *B. cereus* (Eichenberger *et al.*, 2004; Stewart, 2015; Peng *et al.*, 2016). The high amount of GerE peptides detected at hour 48 and its absence at hours 20 and 24 strongly supports that GerE is not involved in early sporulation events, such as encasement by proteins of the MS or exosporium cap assembly in *B. cereus* (Fig. 2) (Peng *et al.*, 2016; Lablaine *et al.*, 2021). Hence, GerE is more likely required for proteinaceous spore layers maturation events such as the development of the hairy nap, which involves BclB and BxpB (Steichen *et al.*, 2005; Thompson *et al.*, 2012) and biosilication of the coat, which requires CotB and possibly ExsB (Motomura *et al.*, 2016).

Strikingly, the detection of SpoVT at hour 48 (Table 1) seems inconsistent with regulations by σ^F and σ^G , as reported in *B. subtilis* (Bagyan *et al.*, 1996). Additionally, in ATCC 10876 cells, the maximum of SpoVT peptides was detected after the ones of GerE, suggesting that SpoVT may be active after GerE (Table S1 and Fig. 2). A transcriptomic analysis of a *B. cereus spoVT* mutant showed that SpoVT down-regulates *sigK* and *gerE* expression and activates σ^K /GerE controlled-genes, such as *cotX1* and *cotX2* (Eijlander *et al.*, 2016). Hence, it seems that SpoVT acts differently in *B. cereus* and in *B. subtilis*, possibly because of a delayed synthesis (Fig. 2).

Altogether, our results support other studies performed in *B. anthracis* showing that the sequence of σ factor detection is similar in the *B. cereus* group and in *B. subtilis* (Liu *et al.*, 2004). Detection of ancillary transcriptional factors also matches with *B. subtilis*, except for SpoVT, which

may turn-off σ^k activity in *B. cereus*. Importantly, our results gives an overview of the timing of regulatory factors synthesis and consequently their possible implications in the assembly of *B. cereus* spore layers (Fig. 2). Considering the structures observed by TEM (Fig. 1B) and our previous description of the MS assembly by SR-SIM (Lablaine *et al.*, 2021), σ^E , RsfA, SpoIIID, GerR and possibly σ^G could be involved in the encasement by MS proteins and in the separation of the MCP exosporium cap from the OFM. In contrast, σ^k , GerE, SpoVT and possibly σ^G and GerR are the factors present during the assembly of coat, of cortex and of the non-cap region of the exosporium. Consequently, we deduced that σ^k , GerE and SpoVT are likely not implicated in the encasement by CotE, CotY and ExsY or other proteins forming the MS of *B. cereus* (Fig. 2). Finally, because of the particular increase of SpoIIID and GerR peptides at hour 24, when sporangia just complete forespore engulfment (Fig. 1A-B), those factors can have an important role in encasement by proteins of the MS and also in interspace formation in the cap region of the exosporium.

***B. subtilis* coat orthologues present in the morphogenetic scaffold of *B. cereus*.**

The dynamic of coat proteins assembly during sporulation has been thoroughly investigated in *B. subtilis* (Henriques and Moran, 2007; McKenney and Eichenberger, 2012; McKenney *et al.*, 2013; Driks and Eichenberger, 2016). Assembly of *B. subtilis* coat initiates by the localization of a group of early-synthesized proteins forming an organizational center at the forespore MCP (McKenney and Eichenberger, 2012; McKenney *et al.*, 2013; Driks and Eichenberger, 2016). During *B. cereus* sporulation, a similar scaffold is formed by assembly of CotE and CotE-controlled proteins CotY and ExsY, which is materialized as the exosporium cap (Lablaine *et al.*, 2021). Importantly, those scaffolding proteins rapidly encased the forespore, just after engulfment completion, before the forespore turns phase-dark or coat, cortex and non-cap part of the exosporium are detected (Lablaine *et al.*, 2021). The encasement by CotE, CotY and ExsY appears independent of σ^k and GerE, as suggested by the analysis of regulatory proteins detection during *B. cereus* sporulation

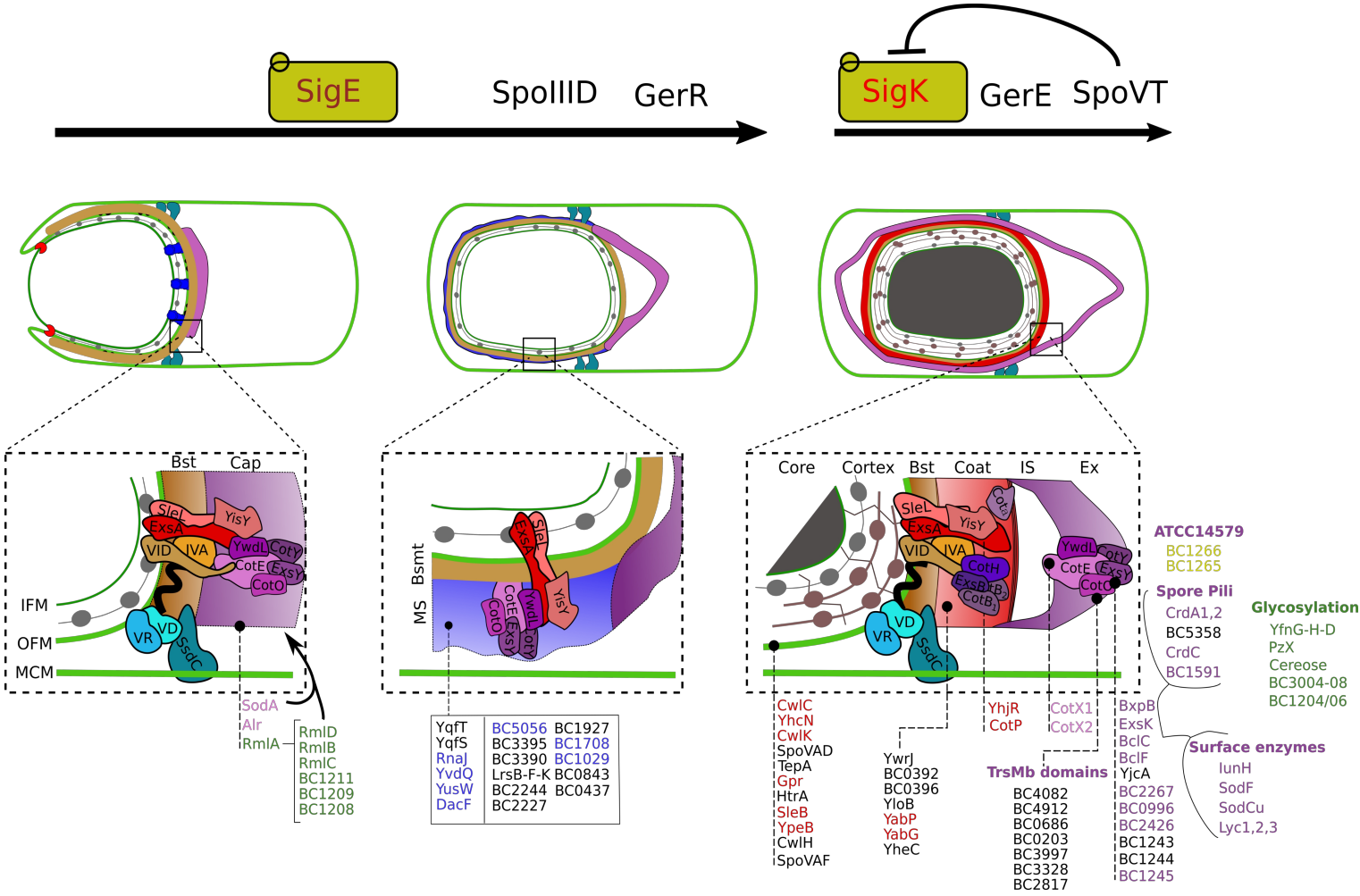


Fig 2. Timing of detection of *B. cereus* spore proteins and their possible localization inside the spore structures. On the top, the succession of the regulating factors from the mother cell compartment identified is shown. SpoVT which turns off the mother cell line expression is indicated. Sporangia representing of the most abundant sporulation stage identified in the different samples are shown. The different spores structures identified by fluorescence microscopy and TEM together with the proteins detected in our proteomic analysis and previous studies in the *B. cereus* group and *B. subtilis* are represented. A larger view showing the protein involved in the different layers is shown in the bottom. At the engulfment stage (panel a), only a connected cap of exosporium can be observed (pink layer), as SpoIVA, SpoVID and YhaX (not shown) peptides abundance specifically increases between hours 20 and 24, we infer that they assemble following engulfment as observed for *B. subtilis* orthologues, hence they can form a similar basement layer (Bst) in *B. cereus* (brown layer). As SpoIVA is highly conserved and SpoVM is present in *B. cereus*, SpoVM (black helix) may assemble similarly to SpoIVA and can allow association of SpoVD and possibly SpoVR with the morphogenetic scaffold (MS), creating a "link" between MS and cortex formation. In the cap, CotE, CotY, ExsY and CotO are present (Boone 2018, Lablaine 2021) as well as YwdL, ExsA, SleL and YisY. *Note that in B. subtilis YwdL localization depends on CotE and SafA, which orthologues are present early during B. cereus sporulation, thus, possibly B. cereus orthologues can creating a link between the forespore and the cap.* Glycosylation enzymes are specifically active at this stage and may be involved in MS assembly (in green). Enzymes involved in engulfment are represented by a red pacman, Blues tubes represent the feeding tubes formed by GerM and SpoIIAH. The grey pearls necklace represent the small layer of peptidoglycan detected after processing by engulfment complex in *B. subtilis*. Note that SpoVID, ExsA and SleL could be associated to the PG layer. After engulfment completion (panel b) and before coat assembly, proteins of the MS encase the forespore (blue matrix) (Lablaine et al 2021) and the cap is separated by the interspace (IS) formation. Later (panel c), the core is dehydrated, the cortex and coat are deposited and the exosporium is fully assembled. Late synthesized proteins are detected, notably orthologues of the CotGHB module assembled in the coat while different modules including surface enzymes, spore pili or hairy nap proteins are incorporated in the exosporium. Specific glycosylation proteins are detected at this time and may be associated with the glycosylated proteins of the exosporium. Other proteins detected are represented on the bottom. In blue are protein present at the time of MS assembly previously detected in *B. cereus* spore (Abhyankar et al 2013). Late proteins previously identified in spores are in red and late exosporium proteins previously found in exosporium fraction are in purple (Abhyankar et al 2013). In yellow are two proteins suspected to be surface exposed present only in *B. cereus* ATCC 14579.

(Table 1 and Fig. 2). However, other proteins present in the MS of *B. cereus* are still largely unknown. We then identified orthologues of *B. subtilis* coat proteins (Henriques and Moran, 2007; Abhyankar *et al.*, 2013; Driks and Eichenberger, 2016) present at hour 24, *i.e.* prior coat detection by TEM in *B. cereus*, and thus, likely to be present in the MS or involved in its assembly (Table 2 and S2).

Orthologues from all *B. subtilis* coat layers were detected early during *B. cereus* sporulation (Table 2 and S2). Most of them are known morphogenetic proteins, such as SpoIVA (BC1509), SpoVID (BC4467), ExsA (BC4420), GerQ/YwdL (BC5391), CotE (BC3770) and CotY (BC1222) (Bailey-Smith *et al.*, 2005; Boydston *et al.*, 2006; Johnson *et al.*, 2006; Giorno *et al.*, 2007; McKenney *et al.*, 2010; Terry *et al.*, 2011; McKenney and Eichenberger, 2012; McKenney *et al.*, 2013; Bressuire-Isoard *et al.*, 2016; Lablaine *et al.*, 2021). CotE, CotY and YwdL are exosporium basal layer proteins (Todd *et al.*, 2003; Terry *et al.*, 2011; Terry *et al.*, 2017; Lablaine *et al.*, 2021). In *B. subtilis*, similarly to the orthologues of CotY and ExsY, the localization of YwdL orthologue depends on CotE (Ragkousi and Setlow, 2004; McKenney *et al.*, 2010). Consequently, *B. cereus* YwdL might be a CotE-controlled protein assembled early during sporulation and later becoming an exosporium basal layer protein, similarly to CotY and ExsY (Fig. 2).

Among *B. subtilis* coat protein orthologues detected early during sporulation in *B. cereus*, we noticed a subgroup composed of SpoIVA, SpoVID and YhaX (BC0886) (Table 2). Those proteins, orthologues of basement layer proteins of *B. subtilis*, share a particular kinetic of accumulation during *B. cereus* sporulation. The detection of peptides corresponding to SpoIVA, SpoVID and YhaX increased between hours 20 and 24 and decreased at hour 48 (Table 2). In *B. subtilis*, they encase the forespore following the engulfment progression, defining the kinetic of class I-proteins (McKenney and Eichenberger, 2012). The encasement by coat proteins is driven by waves of gene transcription (McKenney and Eichenberger, 2012). Thus, the particular accumulation of SpoIVA, SpoVID and YhaX in *B. cereus* seems in line with their synthesis and assembly taking place during engulfment (Fig. 2A). The absence of SpoVID and YhaX at hour 48 is consistent with previous proteomic analysis of *B. cereus* spores (Abhyankar *et al.*, 2013; Stelder *et al.*, 2018). The decreasing abundance of SpoIVA at last stages of sporulation was also reported by immunoblotting in *B. anthracis* (Giorno *et al.*, 2007). A modified accessibility of SpoIVA is proposed to explain this observation (Giorno *et al.*, 2007). According to this, SpoVID was detected in *cotE* mutant spores, in which accessibility of some coat proteins appears increased (Stelder *et al.*, 2018). Another

possibility is that SpoIVA, SpoVID and YhaX are the target of post-translational degradation, such as the SpoIVA homologue, which is degraded by YabG in *B. subtilis* spores (Takamatsu *et al.*, 2000).

Together with ExsA, which is orthologue of the *B. subtilis* inner coat morphogenetic protein SafA, other proteins were detected, such as YaaH (BC3607), YisY (BC4774) and SsdC (previously YdcC) (BC0263), three orthologues of SafA-dependent proteins (McKenney *et al.*, 2010; Luhur *et al.*, 2020)(Table 2). *B. subtilis* YaaH, also known as SleL, was originally classified as a class I-protein (McKenney and Eichenberger, 2012). However, recent results support that SleL, like SafA, is in fact a class II-protein (Nunes *et al.*, 2018). SleL strongly accumulated between hours 24 and 48 in *B. cereus* (Table 2). This kinetic of SleL detection in *B. cereus* is similar to the one of ExsA and CotE, both orthologues of class II-proteins (Table 2), and consequently, SleL is likely a class II-protein in *B. cereus*. In *B. subtilis*, *yaaH* is repressed by SpoIIID (Eichenberger *et al.*, 2004) but the increase of SleL peptides observed between hours 24 and 48 did not match with a down-regulation of *sleL* controlled by SpoIIID in *B. cereus* (Table 2). Interestingly, in *B. cereus*, but not in *B. subtilis*, *sleL* is down-regulated by SpoVT (Eichenberger *et al.*, 2004; Eijlander *et al.*, 2016). Thus, the delayed down-regulation of *sleL* expression during *B. cereus* sporulation may represent a difference within the transcriptional control of the proteins forming the MS. YisY, classified as a class III-protein in *B. subtilis* (McKenney and Eichenberger, 2012), is similar to a chloride peroxidase and is one of the most widespread coat protein among *Firmicutes* (Abhyankar *et al.*, 2013). YisY was detected from hour 24 in *B. cereus* suggesting that this protein whose function is not known, may be part of the MS (Fig. 2).

The recently characterized SsdC protein also localizes early during *B. subtilis* sporulation, depending on SpoIVA, and on SpoVID/SafA (Luhur *et al.*, 2020). SsdC shared a kinetic of peptides detection similar to the one of the *B. subtilis* class I-orthologues, with a maximum of peptides detection at hour 24 in *B. cereus* (Table 2). Thus, our results support that SpoIVA and SpoVID may guide the assembly of the SsdC molecules synthesized during engulfment in *B. cereus*.

SsdC, SpoIVA and SpoVM are involved in cortex development in *B. subtilis* (Levin *et al.*, 1993; Catalano *et al.*, 2001; Luhur *et al.*, 2020). A recent study found an interaction between SpoVM and SpoVD, a protein involved in cortex synthesis (Popham and Bernhards, 2016; Krajčiková *et al.*, 2021). Additionally, a *B. anthracis* *spoIVA* mutant is also impaired in cortex assembly, suggesting that the connection existing between coat and cortex assembly is conserved among *Bacillus* species (Giorno *et al.*, 2007). However, no coat or cortex were visible by TEM in *B. cereus* at hour 24, time of maximal detection of SsdC and SpoIVA (Fig. 1B, top and middle panels). SpoIVA and SsdC

abundance importantly decreased at hour 48, suggesting that they can be involved in the assembly of cortex precursors at hours 20-24. Importantly, our analysis shows that a conserved SpoVD homologue (BC3915) was present early during *B. cereus* sporulation (Table 2). SpoVM, which is a small protein (26 amino acids), was not detected in our experiments. However, an intimate relationship links *B. subtilis* SpoVM and SpoIVA assembly, which was deeply investigated *in vivo* and *in vitro* (Kim *et al.*, 2017; Peluso *et al.*, 2019). Based on their role in *B. subtilis* and if conserved in *B. cereus*, SpoVM may assemble similarly to SpoIVA (Fig. 2A and 3A) and may allow SpoVD assembly around the forespore, inside the MS, creating a link with the cortex assembly (Fig. 2A). We also noticed the presence of a strongly conserved homologue of SpoVR (BC0787), which was shown to be involved in *B. subtilis* cortex synthesis but its function remains unclear (Beall and Moran, 1994). The early detection of SpoVR peptides and their abundance increasing similarly to that of SpoVD, suggest that SpoVR may be recruited similarly to SpoVD around the forespore, through an interaction with the proteins of the MS (Fig. 2A).

CotE, CotY, Alr and RmlA are orthologues of *B. subtilis* outercoat and crust proteins, detected early during *B. cereus* sporulation (Table 2). Importantly, all those proteins are known to be exosporium proteins or to be implicated in exosporium formation (Table 2). Hence, RmlA (BC1212), a glucose-1 thymidyl transferase necessary for the glycosylation of the exosporium BclA in *B. anthracis* (Daubenspeck *et al.*, 2004; Bozue *et al.*, 2005), was present at hour 24 and further accumulated at hour 48 (Table 2). Similarly, RmlC (BC1213), RmlB (BC1214) and RmlD (BC1215) were all detected following the same kinetic during *B. cereus* sporulation (Table 2). RmlACBD are orthologues to *B. subtilis* SpsIJKL, which are implicated in the biosynthesis of rhamnose, a sugar decorating the spore surface (Plata *et al.*, 2012; Arrieta-Ortiz *et al.*, 2015). Additionally, *B. subtilis* orthologues are important for the crust formation (Arrieta-Ortiz *et al.*, 2015; Shuster *et al.*, 2019a). Notably, SpsK localizes as a cap in the MCP forespore pole during *B. subtilis* sporulation (Arrieta-Ortiz *et al.*, 2015). Hence, the early detection of *B. cereus* RmlD, orthologue of SpsK, suggests that it can be associated to the exosporium cap (Fig. 2). The *B. cereus* *rmlACBD* operon is located in a genomic locus with the exosporium genes *cotY*, *cotO*, *exsY*, *bxpB*, *bclA*, suggesting that the Rml proteins may glycosylate exosporium proteins. Moreover, others glycosyl-transferases and methyltransferases BC1204, BC1205, BC1206, BC1208, BC1209, BC1210, BC1211 are also present in this genomic context and suspected to be implicated in exosporium formation (Stewart, 2015). Supporting this idea, we found that BC1208, BC1209 and BC1211 accumulated similarly to CotY and the different proteins encoded by *rmlACBD* operon (Table 2 and Fig. 2B).

We also detected peptides corresponding to Alr (BC0264), an alanine racemase present in the exosporium of *B. anthracis* and *B. cereus* (Steichen *et al.*, 2003; Todd *et al.*, 2003). In *B. anthracis* spores, Alr was defined as a “non-cap” protein (Steichen *et al.*, 2007); however, our early detection of Alr suggests that this protein may be associated to the exosporium cap in *B. cereus*, as only the cap of the exosporium was present at hour 20 (Fig. 1B and Fig. 2). The further accumulation of Alr at hours 24 and 48 suggests that Alr could expand together with the MS and can further be associated with the non-cap part of the exosporium, when detectable at hour 48 (Fig. 1B). The superoxide dismutase, SodA (BC4272), associated to *B. subtilis* coat and *B. anthracis* exosporium (Henriques *et al.*, 1998; Steichen *et al.*, 2003), was also detected early during *B. cereus* sporulation (Table 2). Alr and SodA proteins are proposed to deal with the environment, avoiding early germination events and protecting the spore from the oxidative stress, respectively (Stewart, 2015). However, those enzymes may have other functions, notably in the assembly of the exosporium cap and/or the MS of *B. cereus*, which can explain their early detection (Fig. 2). For example, in *B. subtilis*, SodA is implicated in the cross-linking of CotG (Henriques *et al.*, 1998), which is orthologue of ExsB in *B. cereus* (McPherson *et al.*, 2010; Aronson *et al.*, 2014).

Hence, when only the exosporium cap was present, and no coat or cortex were yet assembled, a core of *B. subtilis* coat orthologues was already present in *B. cereus* (Fig. 2A-B). Notably, a restricted group composed of SpoIVA, SpoVID and YhaX were already at their maximum abundance (Fig. 3A). The most likely explanation is that these proteins formed, similarly to their *B. subtilis* orthologues, a platform, which assembles after engulfment, requiring their constant synthesis during the engulfment (Fig. 2A-B and Fig. 3A). Importantly, we propose that this platform may allow assembly within the MS of SpoVD and SpoVR, two proteins later involved in cortex synthesis and SsdC, thus coordinating coat and cortex assembly (Fig. 2A). At the same time, the morphogenetic proteins ExsA, CotE and CotY were present, but not at their maximum abundance (Fig. 3A).

Surprisingly, we failed to detect CotO and ExsY in *B. cereus* 14579 sporulating at 20°C, which localized early during *B. anthracis* and *B. cereus* sporulation, respectively (Boone *et al.*, 2018; Lablaine *et al.*, 2021). In *B. cereus* 10876 sporulating at 37°C, ExsY and CotO were detected and accumulated similarly to CotY and CotE, strongly supporting that these proteins were also present in the MS of *B. cereus* (Table S2 and Fig. 2). Abundance of CotE, CotY, ExsY and CotO decreased in the spore formed at 37°C, which possibly reflects a lower accessibility than at 20°C, as previously reported (Bressuire-Isoard *et al.*, 2016).

In the *B. cereus* group, CotE guides the assembly of CotO, CotY and ExsY, similarly to *B. subtilis* orthologues (McKenney *et al.*, 2010; Boone *et al.*, 2018; Shuster *et al.*, 2019a; Lablaine *et al.*, 2021). In addition, it was recently shown that genes encoding morphogenetic proteins and coat proteins are under positive selection in *Bacillus* species (Secaira-Morocho *et al.*, 2020). Thus, based on genetic interactions existing among *B. subtilis* coat proteins, we hypothesized that SpoIVA and SpoVID may ensure the assembly of CotE and ExsA in *B. cereus* (Fig. 3A). Then, on one hand, ExsA may incorporate SleL, YisY and, together with CotE, YwdL. On the other hand, CotE may guide assembly of CotY, CotO, ExsY and possibly of Alr and RmlA (Fig. 3A). Altogether, these orthologues of *B. subtilis* coat proteins composed the protein core of the MS, common to *B. cereus* and *B. subtilis* (Fig. 2).

Importantly, while the amount of the basement layer orthologues SpoIVA, SpoVID and YhaX decreased after hour 24, the amount of all other orthologues of *B. subtilis* coat proteins detected early in *B. cereus* increased drastically after hour 24 (Table 2). This may correspond to a second wave of genes transcription after engulfment, possibly under the control of SpoIIID and/or GerR (Fig. 3B). Thus, the small amount of proteins detected at hour 24 likely represents the proteins inserted in the MS (Fig. 3A and Fig. 2). Which are the localization and the function of the MS proteins synthesized after formation of the scaffold is unknown (Fig. 3C, yellow colored).

In *B. subtilis*, the pre-engulfment expression of *cotE* is necessary and sufficient for the outer coat assembly, while the post-engulfment expression is not, but is sufficient for lysozyme resistance (Costa *et al.*, 2007). SafA is located at the inner coat/cortex interface (Ozin *et al.*, 2000; Ozin *et al.*, 2001) but was also recently detected in cortex fraction of *B. subtilis* spores (Fernandes *et al.*, 2018). In *B. cereus*, the cortex is detected concomitantly with the coat deposition (Fig. 1C) (Ohye and Murrell, 1973; Lablaine *et al.*, 2021). Importantly, we showed that CotE, a class II-protein in *B. cereus*, already encases the forespore before coat and cortex detection (Lablaine *et al.*, 2021). Thus, if the other orthologues of class II-proteins, such as ExsA, (orthologue of SafA), share the same dynamic as CotE in *B. cereus*, we can argue that ExsA encasement is likely completed before cortex assembly (Fig. 2 and Fig. 3B). Hence, if the localization features of ExsA and SafA are conserved, the accumulation of ExsA peptides observed between hours 24 and 48 may allow insertion of ExsA, lately in the cortex (Fig. 3C). Moreover, even if the encasement by class II-orthologues is completed before coat and non-cap exosporium are detected (Lablaine *et al.*, 2021), maturation of the MS as detectable structures by TEM or SR-SIM may require the insertion of late synthesized proteins of the MS (Fig. 3C). Thus, we proposed a model with two waves of synthesis allowing two different

Fig 3. Model of assembly of *B. subtilis* coat orthologues during *B. cereus* sporulation. SpoIVA is the most conserved coat protein we identified and SpoIVA may direct similar assembly of SpoIVA-dependent orthologues present early during *B. cereus* sporulation. Assembly of the MS starts by localization of SpoIVA which may allow targeting of SpoIVA-dependent orthologues (orange cloud in panel a). At the same time, CotE guides assembly of CotY and ExsY (Lablaine et al 2021), CotO (Boone 2018) but also YwdL, which is an exosporium basal layer protein in *B. cereus* (pink cloud). In a similar way, ExsA may direct assembly of SleL and can participate to YwdL targeting (red cloud). Infer from the timing of peptides detection, orthologues of basement layer proteins together with the new *B. cereus* specific candidates (in white) may encased the forespore, following engulfment progression. A specific insertion of SpoVID-LysM domain within the new formed PG (grey pearls necklace) from old PG (brown and red necklace) may create this particular dynamic. Infer from *B. subtilis* orthologues genetic dependency, SpoVID and SpoVM may guide encasement by other class I proteins (brown cloud). While encasement by class I-orthologues may require a continuous synthesis during the engulfment. Encasement by orthologues of class II and III-proteins starts only after engulfment completion (panel b) (Lablaine et al 2021). Hence a second expression wave must be required, possibly by SpoIIIID or GerR, which specifically increase at the end of engulfment. Encasement by class II and III-orthologues should be link to SpoVID and notably CotY required ExsY for its encasement (Lablaine et al 2021). Hence YwdL, also orthologue of a CotE-dependent protein present in the exosporium like CotY, may also required ExsY for its encasement. Finally, at the latest time of sporulation, when cortex and a dehydrated core is observed, the coat and the non-cap part of the exosporium are also formed (panel c). Formation of those different structures relies on the expression of late synthesized proteins, including Cota and notably the module formed by the orthologues of outercoat *B. subtilis* CotGHB which appears present in the coat of *B. cereus*. As the *B. cereus* coat assembly is independent of CotE, contrary to *B. subtilis* CotH may play the role of CotE in the coat assembly in *B. cereus*. Also, as a morphogenetic coat protein ExsA may allow CotH and Cota assembly. Finally, as we observed an increase between hours 24 and 48 for orthologues of class II and class III-proteins, a new synthesis of those proteins occurs, probably under SigK control. Late synthesized class II and III-orthologues (in yellow) may incorporate in the late assembling structure and can also participate to the maturation of the spore structures, such as maturation of the MS as the non-cap region of the exosporium. A schematic representation shows the sporangia aspect at the concerning time in the top of the panels.

localizations for the same protein, the first being implicated in the assembly in the MS and the second allowing maturation of the spore proteinaceous layers (Fig. 3).

Finally, there are particular features to mention. Firstly, SpoVID, ExsA and SleL possess at least one LysM peptidoglycan (PG)-binding domain which is important for encasement by *B. subtilis* orthologues (Pereira *et al.*, 2019). Engulfment by the mother cell membranes is driven by PG synthesis and degradation at the leading edge of the engulfing membranes (Ojkic *et al.*, 2016). Notably, a thin layer of PG persists between the mother cell and the forespore (Fig. 2 and Fig. 3) (Khanna *et al.*, 2019). Detection of a group of proteins containing LysM-domains, and notably SpoVID, which maximally accumulated at hour 24, when no cortex was visible (Fig. 1C), suggests that the assembly of those proteins may be primarily guided by SpoVID insertion in the remodeled PG at the leading edge of the engulfing membranes (Fig. 3A). Secondly, most of *B. subtilis* coat orthologues detected early during *B. cereus* sporulation are exosporium proteins (Table 2). As only the exosporium cap region was detectable by TEM and SR-SIM at hour 24, this suggests that YwdL, Alr and SodA could be cap proteins (Fig. 2), as already confirmed for CotY and CotE (Lablaine *et al.*, 2021). Finally, apart the morphogenetic CotE, structural outer coat proteins encoded by the *B. cereus* genome, such as CotH, CotB, CotG, CotX, CotV and CotW were not detected at hour 24 (Henriques and Moran, 2007; Secaira-Morocho *et al.*, 2020). The kinetic of CotH localization is unknown but the others are late proteins in *B. subtilis*, and may explain their absence at early time points of *B. cereus* sporulation.

Our analysis also reveals less characterized coat proteins orthologues to *B. subtilis*, which were present early during *B. cereus* sporulation (Table 2). We noticed YqfT/CotN (BC4281) which assembly is independent of CotE and CotH in *B. subtilis* (Kim *et al.*, 2006; Abhyankar *et al.*, 2011), and the endonuclease YqfS/Nfo (BC4282), which accumulated similarly to the class I-orthologues in *B. cereus*. Finally, some proteins previously detected in *B. cereus* coat fractions, such as YusW (BC0212), YvdQ (BC3090), RnjA (BC1613) and DacF (BC4075) (Abhyankar *et al.*, 2013), strongly accumulated between hours 24 and 48, with the exception of DacF which was stable (Table 2). Hence, those proteins could also be associated with the MS of *B. cereus* (Fig. 2).

Proteins accompanying the morphogenetic scaffold development.

Our analysis of *B. subtilis* coat orthologues detected during *B. cereus* sporulation revealed particular patterns of peptide accumulation (Table 2). Notably, the accumulation of class I-

orthologues is characterized by an increase in peptide abundance between hours 20 and 24, followed by an important decrease at hour 48 (Table 2). Thus, we searched for others proteins following a similar kinetic of peptides accumulation to identify new proteins potentially associated with orthologues of class I-proteins during *B. cereus* sporulation (Table 3 and S3). We restricted our search to proteins showing at least a number of peptides detected equivalent to SpoVID, the less abundant of known class I-protein.

Using this approach, we identified two abundant proteins (Table 3): BC2745, previously detected in *B. cereus* spore coat fractions (Abhyankar *et al.*, 2013; Stelder *et al.*, 2018) and BC3578, both annotated as ABC transporters. BC2745 contains an actin-like N-terminal domain and BC3578 a tubulin-like domain. It was recently shown that actin-like proteins track the engulfing membranes (Ojkic *et al.*, 2016). Thus, since BC2745 specifically accumulated during the engulfment and was not detected at later stages, we propose that BC2745 can be involved in the remodeling of the mother cell membranes during forespore engulfment of *B. cereus*. Engulfment is a universal process conserved across *Firmicutes* involving a conserved protein machinery (Galperin *et al.*, 2012). However, in *B. cereus*, the exosporium cap is already assembled and detectable by TEM on the curved septa at the onset of the engulfment (Ohye and Murrell, 1973; Giorno *et al.*, 2007; Boone *et al.*, 2018; Lablaine *et al.*, 2021). Therefore, specific proteins, conserved across the *B. cereus* group, may be required to accommodate the presence of the exosporium cap with engulfment. Hence, BC2745 and BC3578 constitute good candidates to be the first *B. cereus* group specific proteins involved in early sporulation events (Fig. 3A).

We similarly searched for proteins whose abundance increased throughout the sporulation, *i.e* similar to the orthologues of *B. subtilis* class II-III-proteins. We identified 13 proteins specific of the *B. cereus* group sharing this pattern of peptides accumulation (Table 3 and Fig. 2). Among these, LsrB (BC2960), LsrF (BC2967) and LsrK (BC2965) are among the most abundant at hour 48 (Table 3). Those proteins form an ABC-transporter for the autoinducer-2 uptake and processing which inhibits the biofilm formation in *B. cereus* (Auger *et al.*, 2006). We ignored the reason of these transporters accumulation during *B. cereus* sporulation. BC5056, a collagen-like adhesion protein, previously found in *B. cereus* spores and suspected to be involved in pathogenicity, also specifically accumulated between hour 24 and 48 (Abhyankar *et al.*, 2013; Stelder *et al.*, 2018). Some enzymes, such as BC1708 and BC1029 (Table 3), were previously identified in mature spores of *B. cereus*, strongly suggesting that these early assembling enzymes are associated to the MS or to the exosporium MCP cap (Abhyankar *et al.*, 2013; Stelder *et al.*, 2018).

Moreover, we identified *B. subtilis* sporulation orthologues not yet characterized (Table 2), such as YtzL (BC2612), YqeC (BC3372), YhfW (BC0399), YlaK (BC3951), YuaG (BC0558), YngK (BC2392) (Mäder *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2006; Nicolas *et al.*, 2012; Nagler *et al.*, 2016; Zhu and Stülke, 2018; Korza *et al.*, 2019). Moreover, two proteins GlnQ (BC0639) and GlnH (BC0640), forming an ABC- transporter involved in glutamine uptake during sporulation in *B. subtilis* (Steil *et al.*, 2005), strongly accumulated during *B. cereus* sporulation. Also identified in this group, were *B. subtilis* orthologues with no function known in sporulation (table 4 and S4).

Exosporium proteins likely absent from the morphogenetic scaffold.

We further identified proteins only present at hour 48 (or late proteins) and consequently, likely absent from the MS of *B. cereus* (Tables 5-9 and S5-S8). We already mentioned above that σ^E and SpoIIID were not detected at hour 48, while SpoVT and GerE were detected, and consequently σ^K and σ^G are likely the active σ factors at this step (Table 1, Fig. 2). At hour 48, the sporangia were drastically different from the ones observed at hour 24 presenting only the exosporium cap (Fig. 1B). The forespore turned phase-bright, the core was dehydrated, the coat, the cortex and the non-cap part of the exosporium were visible by TEM (Fig. 1A and Fig. 1B). Importantly, most of the known exosporium and coat proteins characterized in the *B. cereus* group assemble when the forespore turns phase-bright (Kim *et al.*, 2004; Severson *et al.*, 2009; McPherson *et al.*, 2010; Fazzini *et al.*, 2010; Thompson *et al.*, 2011a; Motomura *et al.*, 2016).

The superoxide dismutases SodF (BC1468) and SodCu (BC4907) and the inosine preferring hydrolase IunH (BC3552), previously associated to coat fractions of *B. subtilis* and detected in *B. anthracis* and/or *B. cereus* exosporium fractions (Lai *et al.*, 2003; Steichen *et al.*, 2003; Todd *et al.*, 2003; Henriques and Moran, 2007; Stewart, 2015; Redmond *et al.*, 2004) were detected only at hour 48 (Table 5 and S5). The superoxide dismutases may protect the spore from the environment, while the IunH protein can prevent early germination by hydrolyzing inosine. Large amount of peptides corresponding to BC3677, BC2823, and for BC2822 in a lower extend, were detected. Those proteins are paralogues of LytC, an amidase likely involved in PG degradation. Importantly, BC3677 and BC2822 were absent from *cotE* mutant spores, suggesting that these proteins can be associated with a complete exosporium (Stelder *et al.*, 2018). However, their function in exosporium remains unknown (Fig. 2).

The proteins BxpB (BC1221), BclC (BC3712), BclF (BC2569) and ExsK (BC2493) were also detected only at hour 48 in *B. cereus* (Table 5 and S5). Late detection of these proteins is in agreement with previous microscopy studies in *B. anthracis*, showing that BxpB and ExsK are exosporium proteins localizing only after the forespore turns phase-bright (Severson *et al.*, 2009; Thompson *et al.*, 2011b). A proteomic study revealed that BclF is missing in *B. cereus cotE* mutant spores (Stelder *et al.*, 2018), suggesting that BxpB, BclC and ExsK may remain associated to *cotE* mutant spore. In line with this observation, ExsK was still detected in *B. anthracis cotE* mutant spores by an immunofluorescence assay (Severson *et al.*, 2009). In addition, we evidenced BxpB in *B. cereus cotE* spores by immunoblotting and observed signal of BxpB-SNAP adhering to *cotE* spores by fluorescence microscopy (data not shown). However, those signals mostly reflect adhering exosporium fragments reporting in *B. cereus cotE* mutant (Bressuire-Isoard *et al.*, 2016) than a real coat localization of those proteins.

Some peptides corresponding to BC1219, the orthologue of *B. subtilis* YjcA, (whose encoding gene is located in the genomic cluster of *exsY*, *cotY* and *bxpB*), previously suspected to be an exosporium protein (Stewart, 2015), was detected only at hour 48. Two paralogues of CotX (BC2872 and BC2874), a *B. subtilis* crust protein (Shuster *et al.*, 2019a) were also present. Little is known about the function of CotX in the *B. cereus* group. In *B. megaterium*, CotX1 and CotX2 localized specifically in phase-bright sporangia and were required for exosporium attachment (Manetsberger *et al.*, 2018). The late detection of CotX1 and CotX2 in the present study support that these proteins are not associated with the MS of *B. cereus*. Notably, in *B. cereus* 10876, we observed that CotX1 and CotX2 were specifically detected in spores, while they were never detected in the earlier samples, confirming that these proteins assemble late around the forespore (Table S5).

The BC1243, BC1244 and BC1245 proteins were also detected lately at hour 48 specifically (Table 5). Little is known about these proteins, likely encoded by an operonic structure, except that BC1245 was previously detected in *B. cereus* exosporium fractions by immunoblotting (From 2014).

The *B. cereus* spores display appendages at their surface (DesRosier and Lara, 1981). However, few data are available regarding the assembly of these spore appendages, in contrast to appendages decorating vegetative cells, which involved a sortase and two LPXTG signal containing proteins (Budzik *et al.*, 2007). A similar system could be involved in the formation of the pili at the surface of the *B. cereus* spores. In *B. anthracis* three large genes, CrdA, CrdB and CrdC, containing multiple internal repetition of a DUF11 are important for sporulation (Reiter *et al.*, 2011). In

Clostridium taeniosporium, two DUF11 containing domains proteins, associated to collagen domain-containing proteins, form the appendages present at the spore surface (Walker *et al.*, 2007; Cambridge *et al.*, 2018).

Importantly, BC2639 and BC3547, related to CrdA and CrdC of *B. anthracis*, were detected in exosporium fraction of *B. cereus* (Abhyankar *et al.*, 2013). Here, we detected specifically at hour 48 the DUF11 containing domains CrdA (BC2639) and CrdC (BC3547) and a second copy of CrdA (BC1592) (Table 5). Additionally, both CrdA paralogues contain multiple LPXTG sorting signal motifs, which are present in the proteins forming the appendages decorating *B. cereus* vegetative cells (Budzik *et al.*, 2007). Moreover, the protein encoded by *bc1591*, directly upstream *crdA*, is the most abundant protein detected at only at hour 48 (Table 5). BC1591 is a pectate lyase domain-containing protein, which was also previously identified in the exosporium fraction of *B. cereus* spores (Abhyankar *et al.*, 2013). Finally, BC5358, annotated as a collagen-adhesion protein containing a LPXTG signal is also present only at hour 48. Altogether, the simultaneous detection of the multiple DUF11 containing proteins (BC1592, BC2639, BC3547), the collagen-like protein containing a LPXTG domain (BC5358) and the pectate-lyase BC1591 suggests that they can all be implicated in the formation of the pili found at the surface of the *B. cereus* exosporium (Fig. 2). To complete this view, a specific sortase remains to be identified; unfortunately, we failed to identify this enzyme only present at hour 48.

Finally, we identified in our analysis other less characterized proteins (Table 5 and S5), previously detected in exosporium fraction of *B. cereus*, such as BC2267, BC0996, BC2426 (Abhyankar *et al.*, 2013). BC2267 shares similarities with exosporium leader-peptide-containing proteins (Thompson and Stewart, 2008), BC2426 protein notably possesses a CsxC-domain, present in *Clostridium* exosporium proteins (Janganan *et al.*, 2020). Strikingly, we noticed that most of the proteins previously assigned as exosporium proteins, are annotated as membrane or cell surface proteins (Table 5). The exosporium is a thin structure, surface exposed, labeled with MTG membrane dye (Lablaine *et al.*, 2021). We therefore proposed that BC4082, BC0203, BC3997, BC3328, BC2817, BC4912, BC0686, BC1266 and BC2810, which are all annotated as membrane-associated proteins and only detected at hour 48, may be new exosporium or exosporium-associated proteins (Table 5). Additionally, we propose that BC1265, whose gene is next to *bc1266* can also be associated with the exosporium. Importantly, the genes encoding these two proteins together with those encoding BC2426, BclF and one of the CrdA paralogue BC2639 are not present in *B. cereus* 10876 genome. Since the exosporium is the external surface of the spore, and

collagen-like proteins together with appendages are directly exposed to the environment, these proteins can be the target of strong selective pressure.

Orthologues of *B. subtilis* coat proteins assembling lately in *B. cereus*

Together with the late exosporium proteins identified only in phase-bright *B. cereus* sporangia (Table 5 and S5), we also detected numerous orthologues of *B. subtilis* coat proteins, which accumulated at hour 48 only (Table 6 and S6). Because of previous characterization or based on their genetic proximity with known exosporium proteins, we assigned some as exosporium proteins, such as CotE, CotY, YjcA and CotX (Table 5).

Detected specifically at hour 48 are the orthologues of *B. subtilis* CotG-CotH-CotB, which form a phosphorylation module involved in *B. subtilis* outer coat development (Zilhão *et al.*, 2004; Freitas *et al.*, 2020). Hence, ExsB, analog of CotG (BC2030, renamed Cot γ) (Aronson *et al.*, 2014), two CotB paralogues (BC0389 and BC0390) and CotH (BC2031) were present (Table 6). In the *B. cereus* group, ExsB was detected in exosporium fractions but MET immunogold labelling showed it specific localization in the cortex/coat region (Todd *et al.*, 2003; McPherson *et al.*, 2010; Aronson *et al.*, 2014). Since CotB assembly in *B. anthracis* spores is CotE-independent, CotB paralogues are likely located in *B. cereus* coat (Giorno *et al.*, 2007; McPherson *et al.*, 2010; Motomura *et al.*, 2016). The localization of CotH remains unknown. The simultaneous detection of the homologue CotGHB module in *B. cereus* at hour 48 strongly suggests that those proteins may operate together in the assembly of *B. cereus* coat, as reported in *B. subtilis* (Zilhão *et al.*, 2004; Freitas *et al.*, 2020). Moreover, YwrJ (BC0391) whose gene is close to that encoding CotB in *B. subtilis* and *B. cereus*, and which was suspected to be part of the coat of *B. subtilis* (Driks and Eichenberger, 2016), was also detected only at hour 48 in *B. cereus* (Table 6). Conservation of the synteny of *ywrJ* and *cotB* genes in *B. cereus* and *B. subtilis* and their simultaneous detection in *B. cereus* suggest that YwrJ may be implicated in coat assembly of *B. cereus*. We also detected only at hour 48, BC0392 abundantly, and BC0396 (Table 6). Both are encoded by genes in proximity to *ywrJ*, *cotB1* and *cotB2*, suggesting that those proteins are associated to the coat.

Strikingly, *B. anthracis* CotB is synthesized in a *cotE* mutant, while the *B. subtilis* CotB assembly is CotE-dependent (Giorno *et al.*, 2007; McKenney *et al.*, 2010; Isticato *et al.*, 2013). This difference supports that the coat assembly of *B. subtilis* and *B. cereus* follow different rules. Additionally, *cotE* phenotypes in the two strains are contrasted, with the coat structure not affected in the *B. cereus*

group, while the dark-stained outer coat of *B. subtilis* was not visible by TEM (Zheng *et al.*, 1988; Giorno *et al.*, 2007; Bressuire-Isoard *et al.*, 2016; Lablaine *et al.*, 2021).

Few proteins, SpoIVA, ExsA and Cot α , are described as implicated in the coat morphogenesis of the *B. cereus* group (Kim *et al.*, 2004; Bailey-Smith *et al.*, 2005; Giorno *et al.*, 2007). While SpoIVA and ExsA are present at hour 24, few peptides corresponding to Cot α (BC4047) were specifically detected at hour 48 (Table 6). This is consistent with previous data showing that Cot α is synthesized under σ^k control (Kim *et al.*, 2004). Two orthologues of SafA-dependent proteins YhjR (BC3081) and CotP (BC2203) were detected specifically in *B. cereus* phase-bright sporangia. Strikingly, YhjR is the only orthologue of a class II-protein not detected early during *B. cereus* 14579 sporulating at 20°C (Table 6). YhjR is also specifically associated with late samples in *B. cereus* 10876 sporulating at 37°C (Table S6). Thus, in the *B. cereus* group, YhjR is possibly associated later with the sporangia than in *B. subtilis*.

Other late proteins, previously detected in *B. cereus* coat fractions (Abhyankar *et al.*, 2013), such as YabP (BC0063), YabG (BC0047), YloB (BC0448) and YheC (BC0878) are specifically detected at hour 48 (Table 6 and Table S6). The function of YabP, YloB or YheC in the coat assembly is not known but YabG is implicated in modification of *B. subtilis* spore coat proteins, such as GerQ, SpoIVA or SafA (Takamatsu *et al.*, 2000; Kuwana *et al.*, 2006). Strikingly, homologues of all these YabG-modified proteins are detected during *B. cereus* sporulation (Table 2). In *B. subtilis*, YabG cooperates with the transglutaminase Tgl, in GerQ multimerization (Kuwana *et al.*, 2006). Importantly, we also detected a Tgl orthologue specifically at hour 48 (Table 6). Orthologues of GerQ, YabG and Tgl are present in phase-bright sporangia of *B. cereus*. Thus, it is likely that YabG and Tgl of *B. cereus* can be involved in YwdL (orthologue of GerQ) modification. Finally, a parallel can be made between the detection of YabG at hour 48 and SpoIVA peptides decrease at the same time (Table 2 and 6). Because SpoIVA is the most conserved coat-related protein detected during *B. cereus* sporulation, YabG can also target SpoIVA in *B. cereus*. It is also possible that other proteins sharing the particular class I peptide accumulation, such as SpoVID and YhaX, can be targets of YabG degradation in phase-bright sporangia.

In *B. subtilis*, the overexpression of *cotH* is able to bypass CotE-requirement for CotB and CotG assembly (Isticato *et al.*, 2013). In *B. anthracis*, CotB assembly does not depend on CotE and more generally, CotE is not required for coat formation (Giorno *et al.*, 2007; Bressuire-Isoard *et al.*, 2016). Hence, it is tempting to propose that CotH may be involved in the assembly of CotE-independent proteins of *B. cereus* coat, such as CotB1, CotB2 (Giorno *et al.*, 2007) and possibly Cot α (Kim *et al.*,

2004)(Fig. 2). Furthermore, the proteins of the MS required for CotH localization in *B. subtilis* and in *B. cereus* in absence of CotE, are unknown. Since CotH and CotE interact and share redundant functions in *B. subtilis* (Isticato *et al.*, 2013; Isticato *et al.*, 2015), we propose that SpoVID, which directly interacts with CotE and is required for its assembly (Wang *et al.*, 2009; de Francesco *et al.*, 2012; Qiao *et al.*, 2013), may be involved in CotH assembly in *B. cereus* (Fig. 3C). ExsA is another protein possibly involved in CotH assembly in *B. cereus* sporangia (or in *B. subtilis* *cotE* mutant overexpressing *cotH*) because; (i) the *exsA* mutation affects coat anchoring in *B. cereus* (Bailey smith *et al.*, 2005) and (ii) ExsA-dependent GerP proteins are independent of CotE (Ghosh *et al.*, 2018). Finally, Coty, CotB, CotH, YwrJ, Cot α , YabP, YabG and Tgl orthologues were all detected only at hour 48 in *B. cereus*, suggesting that they are not implicated in the MS assembly, but more likely, involved in its maturation.

Most of the glycosylation clusters were detected lately during *B. cereus* sporulation.

Polysaccharides (PS) decorate the crust and the exosporium and are important for spore adhesion (Faille *et al.*, 2010; Faille *et al.*, 2014; Shuster *et al.*, 2019b). In *B. subtilis*, multiple glycosylation operons are expressed during sporulation and encoded proteins are important for crust assembly (Arrieta-Ortiz *et al.*, 2015; Bartels *et al.*, 2019; Shuster *et al.*, 2019b; Dubois *et al.*, 2020). In the *B. cereus* group, rhamnose is associated with the main collagen-like protein BclA but additional glycans are associated to BclA, such as cereose and anthrose, which are specific of *B. cereus* and *B. anthracis*, spores, respectively (Maes *et al.*, 2016). While we found only proteins encoded by the rhamnose *rmIACBD* operon during early phase of *B. cereus* sporulation, numerous enzymes encoded by multiple glycosylation operons were specifically detected at hour 48 and are likely involved in glycosylation of the coat and/or exosporium proteins (Table 7, S7 and Fig. 2, green colored).

Firstly, BC1204 and BC1206, a glycosyl-transferase and a methyltransferase, respectively, whose genes are in the vicinity of *exsY-cotY-bxpB* cluster, were present only at hour 48 (Table 7). Secondly, three proteins BC5358-5360 encoded by an operon involved in synthesis of cereose, (Li *et al.*, 2017) together with BC3357, a glycosyl-transferase encoded by a gene located upstream this operon, were also detected (Table 7). A cluster of genes encoding a CDP-glucose dehydratase (BC3517), a glycosyl-transferase (BC3515) and a glucose-1 phosphate citydyltransferase also accumulated at hour 48 (Table 7). These genes are orthologues of *B. subtilis* *yfnH*, *yfnD* and *yfnG*,

which are σ^K -controlled genes involved in synthesis of crust polysaccharides (Eichenberger *et al.*, 2004; Anderson *et al.*, 2005; Arrieta-Ortiz *et al.*, 2015; Bartels *et al.*, 2019). Notably, it was reported that *B. subtilis yfnHDG* mutants abnormally accumulate rhamnose (Bartels *et al.*, 2019; Shuster *et al.*, 2019b). Hence, a similar function of this operon in *B. cereus* is possible.

The XNAC operon encoding BC0486, BC0487, BC0488 and BC0489 is unique to the *B. cereus* group. It allows synthesis of the pzx exopolysaccharide (EPS) which confers surfactant and adherence properties to spores (Li *et al.*, 2016). Interestingly, with the exception of BC0489, we detected all the proteins encoded by the XNAC operon, together with two uncharacterized proteins BC04885 and BC0484, which are encoded by genes located directly upstream of the operon (Table 7). As numerous exosporium proteins can be glycosylated, it may be possible that the pzx glycan adheres to glycosylated proteins allowing its specific association with the spore. Finally, two glycosyl-transferases BC3004 and BC3005 associated in a gene cluster with a sortillin (BC3006) and a catalase (BC3008) were detected at hour 48 but their possible functions are unknown.

Other late assembling proteins in *B. cereus*.

Numerous enzymes related to the germination were late assembling proteins in *B. cereus* (Fig. 2). Similar enzymes, such as the three LytC paralogues were detected by proteomics analysis in the exosporium and/or in the coat fractions of *B. cereus* spores (Abhyankar *et al.*, 2013; Stelder *et al.*, 2018). However, most of those enzymes are homologues to *B. subtilis* proteins located in the forespore membranes (Table 8 and S8)(Zheng *et al.*, 2016; Christie and Setlow, 2020). Thus, localization of these lytic enzymes in the *B. cereus* spores remains unclear.

CwlC (BC2207), YhcN (BC4419) and CwlK (BC2677) were previously associated with the *B. cereus* coat fraction (Abhyankar *et al.*, 2013). However, since these proteins are from the most abundant proteins detected at hour 48, it is likely that their detection in coat fractions in previous analysis results from underlayers contamination. Less abundant enzymes related to germination were detected such as SpoVAD (BC5148), TepA (BC3795), Gpr (BC4319), HtrA (BC5458), SleB (BC2753), YpeB (BC2752), CwlH (BC1494) and SpoVAF (BC4064). Among those, CwlH, Gpr, SleB and YpeB were found to be present in the coat fraction of *B. cereus* (Fig. 2, red colored)(Abhyankar *et al.*, 2013).

The cell-wall-hydrolase CwlJ is associated to *B. subtilis* coat in a GerQ-dependent manner (Ragkousi *et al.*, 2003). Strikingly, YwdL, the GerQ orthologue, is an exosporium protein in *B. cereus*

(Terry *et al.*, 2011), thus, it may be possible that some of those late detected lytic enzymes could be associated with the coat and/or exosporium.

Finally, our analysis also reveals a group of proteins specific of *B. cereus* detected only at hour 48 (Table 9), thus constituting candidates of new proteins involved in maturation of the forespore layers.

Conclusions

In this study, we followed the kinetic of proteins detection regarding the timing of *B. cereus* spore structures formation. Taking advantage of suboptimal sporulation temperature which allows to analyze homogeneous sporulating populations, we were able to discriminate three category of proteins; (i) early proteins, which abundance importantly increased during engulfment but decreased after engulfment and are mostly orthologues of basement layer proteins (ii) early proteins, which abundance increased throughout the sporulation, encompassing most of the class II-*B. subtilis* coat orthologues and (iii) late proteins, which were only detected when coat, cortex and a full exosporium are assembled, mostly involved in proteinaceous spore layers maturation.

Using this proteomic approach, we determined new members of the MS of *B. cereus*. Previous studies suggested that CotE, CotY, ExsY, CotO, ExsA and SpoIVA are proteins forming the MS of the *B. cereus* group (Boone 2018, Lablaine 2021). Here, we confirmed the early detection of CotE, CotY, ExsA and SpoIVA and we identified YhaX, SpoVID, YisY, SleL, YwdL as new component of the MS. These proteins constitute a minimal set, which is assembled early during Bacilli sporulation. One important finding is the early detection of cortex-relative proteins SsdC, SpoVR and SpoVD during sporulation. Those proteins create a connection between the cortex and the proteinaceous layers assembly.

In addition, our study gives a precise window of action of important ancillary transcription factors regarding timing of the spore's structures development. Hence, we deduced that GerE seems to be not involved in the MS encasement, as seen in *B. subtilis* sporulation (McKenney and Eichenberger, 2012). Moreover, we observed different timing for synthesis of glycosylation enzymes; some produced early during sporulation, which may be implicated in the MS formation and cap morphogenesis. Some others, only detected lately during sporulation, may have a possible role in exosporium and coat maturation. Importantly, by identifying particular accumulation of

proteins during sporulation, we deduced new proteins potentially involved specifically in proteinaceous layers assembly of *B. cereus*.

This kinetic study offers new challenging issues to discover the function of proteins, previously identified in spore proteomes and that we identified as accumulating early during *B. cereus* sporulation. Among those, BC2745 and BC3578 constitute the first proteins specific of the *B. cereus* group, which assembly is concomitant to the one of SpoIVA and SpoVID, two major morphogenetic proteins.

Material and methods

Bacterial strains and sporulation kinetics. The strains used in this study were *B. cereus* ATCC 14579 and ATCC 10876. Two independent biological sporulation kinetics were performed with each strains. Sporulation was induced in liquid SMB medium at either 20°C or 37°C with orbital shaking at 180 rpm, as previously described (Lablaine *et al.*, 2021). Cells were harvested at the desired time by centrifugation for 10 min at 10,000 g before microscopy and proteomic analysis. Spores of *B. cereus* 10876 were collected after hour 34 of sporulation and purified by successive centrifugations, and washed with cold water, as described (Lablaine *et al.*, 2021).

Fluorescence microscopy. Samples (5 to 10 ml) were withdrawn from cultures in SMB at selected times during sporulation. Cells were collected by centrifugation (10,000 g for 10 min) and labeled with Mitotracker Green (MTG, Thermofischer) for 1 min at room temperature at a final concentration of 1µg/mL. Cells were then washed three times in PBS and suspended in 50µL to 200 µL PBS, depending on the concentration of sporulating cells. For phase contrast and fluorescence microscopy, a 3 µL volume of the labeled cells suspension was applied onto 1.7% agarose coated glass slides and observed with an epifluorescence microscope (BX-61; Olympus) equipped with an Orca Flash 4.0 LT camera (Hamamatsu). Images were acquired using the CellSens Olympus software and micrographs were processed using ImageJ software. For quantification of sporulation stages, a minimum of 200 cells of each samples were counted and the different stage identified were randomly examined and scored.

Transmission electron microscopy. Sporulating cells were centrifuged at 3,500 g during 5 min and fixed for 1h at room temperature and overnight at 4°C with 5% glutaraldehyde (v/v) in a 0.1 M sodium cacodylate buffer (pH 7.2) containing 1 mg. ml⁻¹ ruthenium red. Cells suspended in 0.2 M

sodium cacodylate were washed by three successive centrifugations (5 min at 3,500 g) and supernatant elimination and post-fixed for 1 h at room temperature with 2% osmium tetroxide. Cells were observed by transmission electron microscopy (TEM; Hitachi HT7800). A minimum of 30 sporangia were examined at the different times of sampling.

Sporangia and spore lysis. Sporulating cells and purified spores were lysed by bead beating using a Fastprep II (MP Biomedical) for 6 cycles at speed 5 in buffer A [100mM NaCl, 10mM Tris-HCl (pH8.0), 10% glycerol, 1mM DTT]. Lysates were cleared by centrifugation for 10 min at 7,000 g. Protein concentration was determined using a Bradford assay.

Mass spectrometry and data interpretation. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) analysis of whole-cell proteomes was performed using a Q-Exactive HF mass spectrometer (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) coupled to an Ultimate 3000 nano-LC system and operated as described previously (Klein et al., 2016). Peptide samples (10 μ L, corresponding to approximately 200 ng of peptides) were loaded on a reverse-phase PepMap 100 C18 μ -precursor column (5 μ m, 100 \AA , 300 μ m i.d. x 5 mm, Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) and then resolved on ananoscale PepMap 100 C18 nanoLC column (3 μ m, 100 \AA , 75 μ m i.d. x 50 cm, Thermo Fisher) at a flow rate of 0.2 μ L.min⁻¹ using a 90 min gradient (4–25% B during the first 75 min, and 25–40% B during the last 15 min) with mobile phases A (0.1% HCOOH/100% H₂O) and B (0.1% HCOOH/80% CH₃CN/20%H₂O). The mass spectrometer was operated in data-dependant acquisition mode applying a Top20 strategy. The scan range for MS acquisition was from 350 to 1800 m/z at a resolution of 60,000. Successive selection of the 20 most abundant precursor ions for fragmentation was done using a 10 s dynamic exclusion time and with only ion precursors with a 2⁺ or 3⁺ charge. High-collisional dissociation fragmentation was performed using a 27 eV normalized collision energy. Secondary ions were isolated with a window of 1.6 m/z . The resolution of MS/MS spectra was 15,000.

MS/MS spectra were assigned with this database using the Mascot software version 2.5.1 (Matrix Science, London, UK), and the following parameters: 2⁺ or 3⁺ peptide charge, a maximum of two missed cleavages, carbamidomethylation of cysteine as fixed modification, oxidation of methionine as variable modification, and trypsin as proteolytic enzyme. The tolerance for the parent peptide was set at 5 ppm. The tolerance for the MS/MS fragments was 0.02 Da for the Q-Exactive HF files. Peptides identified at p-value \leq 0.05 in homology threshold mode and proteins identified with at least two distinct peptides were parsed using IRMa 1.31.1c software (Dupierris et al., 2009). The false-positive rate was estimated to be below 1% for protein identification with the MASCOT decoy

option search. Shared peptides were assigned with the most detected protein as assessed by specific peptides. Spectral counts, defined as the number of MS/MS spectra assigned per protein, were counted for all validated proteins using only non-ambiguous peptides as previously described.

Acknowledgements

AL Ph.D. thesis is funded by INRAE and PACA Region. This work also was supported by the microscopy facilities of the Platform 3A, funded by the European Regional Development Fund, the French Ministry of Research, Higher Education and Innovation, the PACA region, Vaucluse Departmental Council and Avignon Urban Community.

References

- Abecasis, A.B., Serrano, M., Alves, R., Quintais, L., Pereira-Leal, J.B., and Henriques, A.O.** (2013) A Genomic Signature and the Identification of New Sporulation Genes. *Journal of Bacteriology* **195**: 2101–2115.
- Abhyankar, W., Beek, A.T., Dekker, H., Kort, R., Brul, S., and Koster, C.G. de** (2011) Gel-free proteomic identification of the *Bacillus subtilis* insoluble spore coat protein fraction. *PROTEOMICS* **11**: 4541–4550.
- Abhyankar, W., Hossain, A.H., Djajasaputra, A., Permpoonpattana, P., Ter Beek, A., Dekker, H.L., et al.** (2013) In Pursuit of Protein Targets: Proteomic Characterization of Bacterial Spore Outer Layers. *J Proteome Res* **12**: 4507–4521.
- Anderson, I., Sorokin, A., Kapatral, V., Reznik, G., Bhattacharya, A., Mikhailova, N., et al.** (2005) Comparative genome analysis of *Bacillus cereus* group genomes with *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiology Letters* **250**: 175–184.
- Aronson, A., Goodman, B., and Smith, Z.** (2014) The regulated synthesis of a *Bacillus anthracis* spore coat protein that affects spore surface properties. *Journal of Applied Microbiology* **116**: 1241–1249.
- Arrieta-Ortiz, M.L., Hafemeister, C., Bate, A.R., Chu, T., Greenfield, A., Shuster, B., et al.** (2015) An experimentally supported model of the *Bacillus subtilis* global transcriptional regulatory network. *Molecular Systems Biology* **11**: 839.
- Auger, S., Krin, E., Aymerich, S., and Gohar, M.** (2006) Autoinducer 2 Affects Biofilm Formation by *Bacillus cereus*. *Appl Environ Microbiol* **72**: 937–941.
- Bagyan, I., Hobot, J., and Cutting, S.** (1996) A compartmentalized regulator of developmental gene expression in *Bacillus subtilis*. *Journal of bacteriology* **178**: 4500–4507.
- Bailey-Smith, K., Todd, S.J., Southworth, T.W., Proctor, J., and Moir, A.** (2005) The ExsA Protein of *Bacillus cereus* Is Required for Assembly of Coat and Exosporium onto the Spore Surface. *Journal of Bacteriology* **187**: 3800–3806.
- Ball, D.A., Taylor, R., Todd, S.J., Redmond, C., Couture-Tosi, E., Sylvestre, P., et al.** (2008) Structure of the exosporium and sublayers of spores of the *Bacillus cereus* family revealed by electron crystallography. *Molecular Microbiology* **68**: 947–958.

- Bartels, J., Blüher, A., Castellanos, S.L., Richter, M., Günther, M., and Mascher, T.** (2019) The *Bacillus subtilis* endospore crust: protein interaction network, architecture and glycosylation state of a potential glycoprotein layer. *Molecular Microbiology* **112**: 1576–1592.
- Beall, B., and Moran, C.P.** (1994) Cloning and characterization of spoVR, a gene from *Bacillus subtilis* involved in spore cortex formation. *Journal of Bacteriology* **176**: 2003–2012.
- Boone, T.J., Mallozzi, M., Nelson, A., Thompson, B., Khemmani, M., Lehmann, D., et al.** (2018) Coordinated Assembly of the *Bacillus anthracis* Coat and Exosporium during Bacterial Spore Outer Layer Formation. *mBio* **9** <https://mbio.asm.org/content/9/6/e01166-18>. Accessed September 25, 2020.
- Boydston, J.A., Yue, L., Kearney, J.F., and Turnbough, C.L.** (2006) The ExsY Protein Is Required for Complete Formation of the Exosporium of *Bacillus anthracis*. *Journal of Bacteriology* **188**: 7440–7448.
- Bozue, J.A., Parthasarathy, N., Phillips, L.R., Cote, C.K., Fellows, P.F., Mendelson, I., et al.** (2005) Construction of a rhamnose mutation in *Bacillus anthracis* affects adherence to macrophages but not virulence in guinea pigs. *Microbial Pathogenesis* **38**: 1–12.
- Bravo, A., Agaisse, H., Salamitou, S., and Lereclus, D.** (1996) Analysis of *cryIAa* expression in sigE and sigK mutants of *Bacillus thuringiensis*. *Mol Gen Genet* **250**: 734–741.
- Bressuire-Isoard, C., Bornard, I., Henriques, A.O., Carlin, F., and Broussolle, V.** (2016) Sporulation Temperature Reveals a Requirement for CotE in the Assembly of both the Coat and Exosporium Layers of *Bacillus cereus* Spores. *Appl Environ Microbiol* **82**: 232–243.
- Budzik, J.M., Marraffini, L.A., and Schneewind, O.** (2007) Assembly of pili on the surface of *Bacillus cereus* vegetative cells. *Molecular Microbiology* **66**: 495–510.
- Cambridge, J.M., Blinkova, A.L., Rocha, E.I.S., Hernández, A.B., Moreno, M., Ginés-Candelaria, E., et al.** (2018) Genomics of *Clostridium taeniosporum*, an organism which forms endospores with ribbon-like appendages. *PLOS ONE* **13**: e0189673.
- Camp, A.H., and Losick, R.** (2009) A feeding tube model for activation of a cell-specific transcription factor during sporulation in *Bacillus subtilis*. *Genes Dev* **23**: 1014–1024.
- Campo, N., and Rudner, D.Z.** (2007) SpoIVB and CtpB Are Both Forespore Signals in the Activation of the Sporulation Transcription Factor σ K in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* **189**: 6021–6027.
- Cangiano, G., Mazzone, A., Baccigalupi, L., Isticato, R., Eichenberger, P., De Felice, M., and Ricca, E.** (2010) Direct and indirect control of late sporulation genes by GerR of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **192**: 3406–3413.
- Catalano, F.A., Meador-Parton, J., Popham, D.L., and Driks, A.** (2001) Amino Acids in the *Bacillus subtilis* Morphogenetic Protein SpoIVA with Roles in Spore Coat and Cortex Formation. *Journal of Bacteriology* **183**: 1645–1654.
- Cavalcante, D. de A., De-Souza, M.T., Orem, J.C. de, Magalhães, M.I.A. de, Martins, P.H., Boone, T.J., et al.** (2019) Ultrastructural analysis of spores from diverse *Bacillales* species isolated from Brazilian soil. *Environmental Microbiology Reports* **11**: 155–164.
- Christie, G., and Setlow, P.** (2020) *Bacillus* spore germination: Knowns, unknowns and what we need to learn. *Cellular Signalling* **74**: 109729.
- Costa, T., Serrano, M., Steil, L., Völker, U., Moran, C.P., and Henriques, A.O.** (2007) The Timing of *cotE* Expression Affects *Bacillus subtilis* Spore Coat Morphology but Not Lysozyme Resistance. *Journal of Bacteriology* **189**: 2401–2410.

- Daubenspeck, J.M., Zeng, H., Chen, P., Dong, S., Steichen, C.T., Krishna, N.R., et al.** (2004) Novel Oligosaccharide Side Chains of the Collagen-like Region of BclA, the Major Glycoprotein of the *Bacillus anthracis* Exosporium*. *Journal of Biological Chemistry* **279**: 30945–30953.
- DesRosier, J.P., and Lara, J.C.** (1981) Isolation and properties of pili from spores of *Bacillus cereus*. *Journal of Bacteriology* **145**: 613–619.
- Driks, A., and Eichenberger, P.** (2016) The Spore Coat. In *The Bacterial Spore*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 179–200 <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1128/9781555819323.ch9>. Accessed May 24, 2021.
- Dubnau, D., and Losick, R.** (2006) Bistability in bacteria. *Molecular Microbiology* **61**: 564–572.
- Dubois, T., Krzewinski, F., Yamakawa, N., Lemy, C., Hamiot, A., Brunet, L., et al.** (2020) The *sps* Genes Encode an Original Legionaminic Acid Pathway Required for Crust Assembly in *Bacillus subtilis*. *mBio* **11** <https://mbio.asm.org/content/11/4/e01153-20>. Accessed May 25, 2021.
- Eichenberger, P., Fujita, M., Jensen, S.T., Conlon, E.M., Rudner, D.Z., Wang, S.T., et al.** (2004) The Program of Gene Transcription for a Single Differentiating Cell Type during Sporulation in *Bacillus subtilis*. *PLOS Biology* **2**: e328.
- Eijlander, R.T., Holsappel, S., Jong, A. de, Ghosh, A., Christie, G., and Kuipers, O.P.** (2016) SpoVT: From Fine-Tuning Regulator in *Bacillus subtilis* to Essential Sporulation Protein in *Bacillus cereus*. *Front Microbiol* **7** <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2016.01607/full>. Accessed May 25, 2021.
- Errington, J.** (1993) *Bacillus subtilis* sporulation: regulation of gene expression and control of morphogenesis. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **57**: 1–33.
- Errington, J.** (2003) Regulation of endospore formation in *Bacillus subtilis*. *Nature Reviews Microbiology* **1**: 117–126.
- Faille, C., Lequette, Y., Ronse, A., Slomianny, C., Garénaux, E., and Guerardel, Y.** (2010) Morphology and physico-chemical properties of *Bacillus* spores surrounded or not with an exosporium: Consequences on their ability to adhere to stainless steel. *International Journal of Food Microbiology* **143**: 125–135.
- Faille, C., Ronse, A., Dewailly, E., Slomianny, C., Maes, E., Krzewinski, F., and Guerardel, Y.** (2014) Presence and function of a thick mucous layer rich in polysaccharides around *Bacillus subtilis* spores. *Biofouling* **30**: 845–858.
- Fazzini, M.M., Schuch, R., and Fischetti, V.A.** (2010) A Novel Spore Protein, ExsM, Regulates Formation of the Exosporium in *Bacillus cereus* and *Bacillus anthracis* and Affects Spore Size and Shape. *Journal of Bacteriology* **192**: 4012–4021.
- Fernandes, C.G., Moran, C.P., and Henriques, A.O.** (2018) Autoregulation of SafA Assembly through Recruitment of a Protein Cross-Linking Enzyme. *Journal of Bacteriology* **200** <https://jb.asm.org/content/200/14/e00066-18>. Accessed May 25, 2021.
- Fimlaid, K.A., and Shen, A.** (2015) Diverse mechanisms regulate sporulation sigma factor activity in the *Firmicutes*. *Current Opinion in Microbiology* **24**: 88–95.
- Francesco, M. de, Jacobs, J.Z., Nunes, F., Serrano, M., McKenney, P.T., Chua, M.-H., et al.** (2012) Physical interaction between coat morphogenetic proteins SpoVID and CotE is necessary for spore encasement in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **194**: 4941–4950.
- Freitas, C., Plannic, J., Isticato, R., Pelosi, A., Zilhão, R., Serrano, M., et al.** (2020) A protein phosphorylation module patterns the *Bacillus subtilis* spore outer coat. *Molecular Microbiology* **114**: 934–951.

- Galperin, M.Y., Mekhedov, S.L., Puigbo, P., Smirnov, S., Wolf, Y.I., and Rigden, D.J.** (2012) Genomic determinants of sporulation in *Bacilli* and *Clostridia*: towards the minimal set of sporulation-specific genes. *Environmental Microbiology* **14**: 2870–2890.
- Ghosh, A., Manton, J.D., Mustafa, A.R., Gupta, M., Ayuso-Garcia, A., Rees, E.J., and Christie, G.** (2018) Proteins Encoded by the *gerP* Operon Are Localized to the Inner Coat in *Bacillus cereus* Spores and Are Dependent on GerPA and SafA for Assembly. *Appl Environ Microbiol* **84** <https://aem.asm.org/content/84/14/e00760-18>. Accessed September 25, 2020.
- Giorno, R., Bozue, J., Cote, C., Wenzel, T., Moody, K.-S., Mallozzi, M., et al.** (2007) Morphogenesis of the *Bacillus anthracis* Spore. *Journal of Bacteriology* **189**: 691–705.
- González-Pastor, J.E., Hobbs, E.C., and Losick, R.** (2003) Cannibalism by Sporulating Bacteria. *Science* **301**: 510–513.
- Gustafsson, M.G.L.** (2000) Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy. *Journal of Microscopy* **198**: 82–87.
- Haldenwang, W.G., and Losick, R.** (1979) A modified RNA polymerase transcribes a cloned gene under sporulation control in *Bacillus subtilis*. *Nature* **282**: 256–260.
- Haldenwang, W.G., and Losick, R.** (1980) Novel RNA polymerase sigma factor from *Bacillus subtilis*. *PNAS* **77**: 7000–7004.
- Henriques, A.O., Melsen, L.R., and Moran, C.P.** (1998) Involvement of Superoxide Dismutase in Spore Coat Assembly in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* **180**: 2285–2291.
- Henriques, A.O., and Moran, C.P., Jr.** (2007) Structure, Assembly, and Function of the Spore Surface Layers. *Annual Review of Microbiology* **61**: 555–588.
- Hoon, M.J.L. de, Eichenberger, P., and Vitkup, D.** (2010) Hierarchical Evolution of the Bacterial Sporulation Network. *Current Biology* **20**: R735–R745.
- Isticato, R., Sirec, T., Giglio, R., Baccigalupi, L., Rusciano, G., Pesce, G., et al.** (2013) Flexibility of the Programme of Spore Coat Formation in *Bacillus subtilis*: Bypass of CotE Requirement by Over-Production of CotH. *PLOS ONE* **8**: e74949.
- Isticato, R., Sirec, T., Vecchione, S., Crispino, A., Saggese, A., Baccigalupi, L., et al.** (2015) The Direct Interaction between Two Morphogenetic Proteins Is Essential for Spore Coat Formation in *Bacillus subtilis*. *PLOS ONE* **10**: e0141040.
- Janganan, T.K., Mullin, N., Dafis-Sagarmendi, A., Brunt, J., Tzokov, S.B., Stringer, S., et al.** (2020) Architecture and Self-Assembly of *Clostridium sporogenes* and *Clostridium botulinum* Spore Surfaces Illustrate a General Protective Strategy across Spore Formers. *mSphere* **5** <https://msphere.asm.org/content/5/4/e00424-20>. Accessed May 25, 2021.
- Jiang, S., Wan, Q., Krajcikova, D., Tang, J., Tzokov, S.B., Barak, I., and Bullough, P.A.** (2015) Diverse supramolecular structures formed by self-assembling proteins of the *Bacillus subtilis* spore coat. *Molecular Microbiology* **97**: 347–359.
- Johnson, M.J., Todd, S.J., Ball, D.A., Shepherd, A.M., Sylvestre, P., and Moir, A.** (2006) ExsY and CotY Are Required for the Correct Assembly of the Exosporium and Spore Coat of *Bacillus cereus*. *Journal of Bacteriology* **188**: 7905–7913.
- Jong, I.G. de, Veenig, J.-W., and Kuipers, O.P.** (2010) Heterochronic Phosphorelay Gene Expression as a Source of Heterogeneity in *Bacillus subtilis* Spore Formation. *Journal of Bacteriology* **192**: 2053–2067.
- Karow, M.L., Glaser, P., and Piggot, P.J.** (1995) Identification of a gene, *spoIIR*, that links the activation of sigma E to the transcriptional activity of sigma F during sporulation in *Bacillus subtilis*. *PNAS* **92**: 2012–2016.
- Khanna, K., Lopez-Garrido, J., Zhao, Z., Watanabe, R., Yuan, Y., Sugie, J., et al.** (2019) The molecular architecture of engulfment during *Bacillus subtilis* sporulation. *eLife* **8**: e45257.

- Kim, E.Y., Tyndall, E.R., Huang, K.C., Tian, F., and Ramamurthi, K.S.** (2017) Dash-and-Recruit Mechanism Drives Membrane Curvature Recognition by the Small Bacterial Protein SpoVM. *Cell Systems* **5**: 518–526.e3.
- Kim, H., Hahn, M., Grabowski, P., McPherson, D.C., Otte, M.M., Wang, R., et al.** (2006) The *Bacillus subtilis* spore coat protein interaction network. *Molecular Microbiology* **59**: 487–502.
- Kim, H.-S., Sherman, D., Johnson, F., and Aronson, A.I.** (2004) Characterization of a Major *Bacillus anthracis* Spore Coat Protein and Its Role in Spore Inactivation. *Journal of Bacteriology* **186**: 2413–2417.
- Korza, G., Camilleri, E., Green, J., Robinson, J., Nagler, K., Moeller, R., et al.** (2019) Analysis of the mRNAs in Spores of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* **201** <https://jlb.asm.org/content/201/9/e00007-19>. Accessed May 25, 2021.
- Krajčiková, D., Bugárová, V., and Barák, I.** (2021) Interactions of *Bacillus subtilis* Basement Spore Coat Layer Proteins. *Microorganisms* **9**: 285.
- Krajčiková, D., Forgáč, V., Szabo, A., and Barák, I.** (2017) Exploring the interaction network of the *Bacillus subtilis* outer coat and crust proteins. *Microbiological Research* **204**: 72–80.
- Kroos, L., Kunkel, B., and Losick, R.** (1989) Switch protein alters specificity of RNA polymerase containing a compartment-specific sigma factor. *Science* **243**: 526–529.
- Kumar, N., Gangwal, A., Sangwan, N., Dhasmana, N., Keshavam, C.C., Tyagi, E., and Singh, Y.** (2021) ClpC-Mediated Sporulation Regulation at Engulfment Stage in *Bacillus anthracis*. *Indian J Microbiol* **61**: 170–179.
- Kuwana, R., Okuda, N., Takamatsu, H., and Watabe, K.** (2006) Modification of GerQ Reveals a Functional Relationship between Tgl and YabG in the Coat of *Bacillus subtilis* Spores. *The Journal of Biochemistry* **139**: 887–901.
- Lablaine, A., Serrano, M., Bressuire-Isoard, C., Chamot, S., Bornard, I., Carlin, F., et al.** (2021) The Morphogenetic Protein CotE Positions Exosporium Proteins CotY and ExsY during Sporulation of *Bacillus cereus*. *mSphere* **6** <https://msphere.asm.org/content/6/2/e00007-21>. Accessed April 21, 2021.
- Lai, E.-M., Phadke, N.D., Kachman, M.T., Giorno, R., Vazquez, S., Vazquez, J.A., et al.** (2003) Proteomic Analysis of the Spore Coats of *Bacillus subtilis* and *Bacillus anthracis*. *Journal of Bacteriology* **185**: 1443–1454.
- Levin, P.A., Fan, N., Ricca, E., Driks, A., Losick, R., and Cutting, S.** (1993) An unusually small gene required for sporulation by *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology* **9**: 761–771.
- Li, Z., Hwang, S., and Bar-Peled, M.** (2016) Discovery of a Unique Extracellular Polysaccharide in Members of the Pathogenic *Bacillus* That Can Co-form with Spores*. *Journal of Biological Chemistry* **291**: 19051–19067.
- Li, Z., Mukherjee, T., Bowler, K., Namdari, S., Snow, Z., Prestridge, S., et al.** (2017) A four-gene operon in *Bacillus cereus* produces two rare spore-decorating sugars. *Journal of Biological Chemistry* **292**: 7636–7650.
- Liu, H., Bergman, N.H., Thomason, B., Shallom, S., Hazen, A., Crossno, J., et al.** (2004) Formation and Composition of the *Bacillus anthracis* Endospore. *Journal of Bacteriology* **186**: 164–178.
- Liu, H., Krajcikova, D., Wang, N., Zhang, Z., Wang, H., Barak, I., and Tang, J.** (2016a) Forces and Kinetics of the *Bacillus subtilis* Spore Coat Proteins CotY and CotX Binding to CotE Inspected by Single Molecule Force Spectroscopy. *J Phys Chem B* **120**: 1041–1047.
- Liu, H., Qiao, H., Krajcikova, D., Zhang, Z., Wang, H., Barak, I., and Tang, J.** (2016b) Physical interaction and assembly of *Bacillus subtilis* spore coat proteins CotE and CotZ studied by atomic force microscopy. *J Struct Biol* **195**: 245–251.
- Londoño-Vallejo, J.A., and Stragier, P.** (1995) Cell-cell signaling pathway activating a developmental transcription factor in *Bacillus subtilis*. *Genes Dev* **9**: 503–508.

- Losick, R., and Stragier, P.** (1992) Crisscross regulation of cell-type-specific gene expression during development in *B. subtilis*. *Nature* **355**: 601–604.
- Luhur, J., Chan, H., Kachappilly, B., Mohamed, A., Morlot, C., Awad, M., et al.** (2020) A dynamic, ring-forming MucB / RseB-like protein influences spore shape in *Bacillus subtilis*. *PLOS Genetics* **16**: e1009246.
- Lv, J., Zhang, X., Gao, T., Cui, T., Peng, Q., Zhang, J., and Song, F.** (2019) Effect of the *spoIIID* mutation on mother cell lysis in *Bacillus thuringiensis*. *Appl Microbiol Biotechnol* **103**: 4103–4112.
- Lyu, Y., Gu, M., Chen, M., Feng, E., Zhu, L., Pan, C., et al.** (2019) Disruption of SpoIIID decreases sporulation, increases extracellular proteolytic activity and virulence in *Bacillus anthracis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **513**: 651–656.
- Mäder, U., Homuth, G., Scharf, C., Büttner, K., Bode, R., and Hecker, M.** (2002) Transcriptome and Proteome Analysis of *Bacillus subtilis* Gene Expression Modulated by Amino Acid Availability. *Journal of Bacteriology* **184**: 4288–4295.
- Maes, E., Krzewinski, F., Garenaux, E., Lequette, Y., Coddeville, B., Trivelli, X., et al.** (2016) Glycosylation of BclA Glycoprotein from *Bacillus cereus* and *Bacillus anthracis* Exosporium Is Domain-specific*. *Journal of Biological Chemistry* **291**: 9666–9677.
- Manetsberger, J., Ghosh, A., Hall, E.A.H., and Christie, G.** (2018) Orthologues of *Bacillus subtilis* Spore Crust Proteins Have a Structural Role in the *Bacillus megaterium* QM B1551 Spore Exosporium. *Appl Environ Microbiol* **84** <https://aem.asm.org/content/84/20/e01734-18>. Accessed May 25, 2021.
- Mastny, M., Heuck, A., Kurzbauer, R., Heiduk, A., Boisguerin, P., Volkmer, R., et al.** (2013) CtpB Assembles a Gated Protease Tunnel Regulating Cell-Cell Signaling during Spore Formation in *Bacillus subtilis*. *Cell* **155**: 647–658.
- McKenney, P.T., Driks, A., and Eichenberger, P.** (2013) The *Bacillus subtilis* endospore: assembly and functions of the multilayered coat. *Nature Reviews Microbiology* **11**: 33–44.
- McKenney, P.T., Driks, A., Eskandarian, H.A., Grabowski, P., Guberman, J., Wang, K.H., et al.** (2010) A Distance-Weighted Interaction Map Reveals a Previously Uncharacterized Layer of the *Bacillus subtilis* Spore Coat. *Current Biology* **20**: 934–938.
- McKenney, P.T., and Eichenberger, P.** (2012) Dynamics of spore coat morphogenesis in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology* **83**: 245–260.
- McPherson, S.A., Li, M., Kearney, J.F., and Turnbough, C.L.** (2010) ExsB, an unusually highly phosphorylated protein required for the stable attachment of the exosporium of *Bacillus anthracis*. *Molecular Microbiology* **76**: 1527–1538.
- Morlot, C., and Rodrigues, C.D.A.** (2018) The New Kid on the Block: A Specialized Secretion System during Bacterial Sporulation. *Trends in Microbiology* **26**: 663–676.
- Motomura, K., Ikeda, T., Matsuyama, S., Abdelhamid, M.A.A., Tanaka, T., Ishida, T., et al.** (2016) The C-Terminal Zwitterionic Sequence of CotB1 Is Essential for Biosilicification of the *Bacillus cereus* Spore Coat. *Journal of Bacteriology* **198**: 276–282.
- Nagler, K., Krawczyk, A.O., De Jong, A., Madela, K., Hoffmann, T., Laue, M., et al.** (2016) Identification of Differentially Expressed Genes during *Bacillus subtilis* Spore Outgrowth in High-Salinity Environments Using RNA Sequencing. *Front Microbiol* **7** <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2016.01564/full>. Accessed May 25, 2021.
- Nicolas, P., Mäder, U., Dervyn, E., Rochat, T., Leduc, A., Pigeonneau, N., et al.** (2012) Condition-Dependent Transcriptome Reveals High-Level Regulatory Architecture in *Bacillus subtilis*. *Science* **335**: 1103–1106.

- Nunes, F., Fernandes, C., Freitas, C., Marini, E., Serrano, M., Moran, C.P., et al.** (2018) SpoVID functions as a non-competitive hub that connects the modules for assembly of the inner and outer spore coat layers in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology* **110**: 576–595.
- Ohye, D.F., and Murrell, W.G.** (1973) Exosporium and Spore Coat Formation in *Bacillus cereus* T. *Journal of Bacteriology* **115**: 1179–1190.
- Ojkic, N., López-Garrido, J., Pogliano, K., and Endres, R.G.** (2016) Cell-wall remodeling drives engulfment during *Bacillus subtilis* sporulation. *eLife* **5**: e18657.
- Ozin, A.J., Henriques, A.O., Yi, H., and Moran, C.P.** (2000) Morphogenetic Proteins SpoVID and SafA Form a Complex during Assembly of the *Bacillus subtilis* Spore Coat. *Journal of Bacteriology* **182**: 1828–1833.
- Ozin, A.J., Samford, C.S., Henriques, A.O., and Moran, C.P.** (2001) SpoVID Guides SafA to the Spore Coat in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* **183**: 3041–3049.
- Partridge, S.R., and Errington, J.** (1993) The importance of morphological events and intercellular interactions in the regulation of prespore-specific gene expression during sporulation in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology* **8**: 945–955.
- Peluso, E.A., Updegrove, T.B., Chen, J., Shroff, H., and Ramamurthi, K.S.** (2019) A 2-dimensional ratchet model describes assembly initiation of a specialized bacterial cell surface. *Proc Natl Acad Sci U S A* **116**: 21789–21799.
- Peng, Q., Kao, G., Qu, N., Zhang, J., Li, J., and Song, F.** (2016) The Regulation of Exosporium-Related Genes in *Bacillus thuringiensis*. *Scientific Reports* **6**: 19005.
- Pereira, F.C., Nunes, F., Cruz, F., Fernandes, C., Isidro, A.L., Lousa, D., et al.** (2019) A LysM Domain Intervenes in Sequential Protein-Protein and Protein-Peptidoglycan Interactions Important for Spore Coat Assembly in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* **201** <https://jlb.asm.org/content/201/4/e00642-18>. Accessed May 25, 2021.
- Plata, G., Fuhrer, T., Hsiao, T.-L., Sauer, U., and Vitkup, D.** (2012) Global probabilistic annotation of metabolic networks enables enzyme discovery. *Nat Chem Biol* **8**: 848–854.
- Popham, D.L., and Bernhards, C.B.** (2016) Spore Peptidoglycan. In *The Bacterial Spore*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 157–177 <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1128/9781555819323.ch8>. Accessed May 25, 2021.
- Qiao, H., Krajcikova, D., Xing, C., Lu, B., Hao, J., Ke, X., et al.** (2013) Study of the interactions between the key spore coat morphogenetic proteins CotE and SpoVID. *Journal of Structural Biology* **181**: 128–135.
- Ragkousi, K., Eichenberger, P., Ooij, C. van, and Setlow, P.** (2003) Identification of a New Gene Essential for Germination of *Bacillus subtilis* Spores with Ca²⁺-Dipicolinate. *Journal of Bacteriology* **185**: 2315–2329.
- Ragkousi, K., and Setlow, P.** (2004) Transglutaminase-Mediated Cross-Linking of GerQ in the Coats of *Bacillus subtilis* Spores. *Journal of Bacteriology* **186**: 5567–5575.
- Ramarao, N., and Lereclus, D.** (2005) The InhA1 metalloprotease allows spores of the *B. cereus* group to escape macrophages. *Cellular Microbiology* **7**: 1357–1364.
- Ramos-Silva, P., Serrano, M., and Henriques, A.O.** (2019) From Root to Tips: Sporulation Evolution and Specialization in *Bacillus subtilis* and the Intestinal Pathogen *Clostridioides difficile*. *Molecular Biology and Evolution* **36**: 2714–2736.
- Redmond, C., Baillie, L.W.J., Hibbs, S., Moir, A.J.G., and Moir, A.** 2004 Identification of proteins in the exosporium of *Bacillus anthracis*. *Microbiology* **150**: 355–363.

- Reiter, L., Tourasse, N.J., Fouet, A., Loll, R., Davison, S., Økstad, O.A., et al.** (2011) Evolutionary History and Functional Characterization of Three Large Genes Involved in Sporulation in *Bacillus cereus* Group Bacteria. *Journal of Bacteriology* **193**: 5420–5430.
- Rodenburg, C.M., McPherson, S.A., Turnbough, C.L., and Dokland, T.** (2014) Cryo-EM analysis of the organization of BclA and BxpB in the *Bacillus anthracis* exosporium. *Journal of Structural Biology* **186**: 181–187.
- Rodrigues, C.D.A., Ramírez-Guadiana, F.H., Meeske, A.J., Wang, X., and Rudner, D.Z.** (2016) GerM is required to assemble the basal platform of the SpoIIIA-SpoIIQ transenvelope complex during sporulation in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **102**: 260–273.
- Schmidt, R., Margolis, P., Duncan, L., Coppolecchia, R., Moran, C.P., and Losick, R.** (1990) Control of developmental transcription factor sigma F by sporulation regulatory proteins SpoIIAA and SpoIIAB in *Bacillus subtilis*. *PNAS* **87**: 9221–9225.
- Secaira-Morocho, H., Castillo, J.A., and Driks, A.** (2020) Diversity and evolutionary dynamics of spore-coat proteins in spore-forming species of *Bacillales*. *Microb Genom* **6** <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7725329/>. Accessed May 25, 2021.
- Severson, K.M., Mallozzi, M., Bozue, J., Welkos, S.L., Cote, C.K., Knight, K.L., and Driks, A.** (2009) Roles of the *Bacillus anthracis* Spore Protein ExsK in Exosporium Maturation and Germination. *Journal of Bacteriology* **191**: 7587–7596.
- Shuster, B., Khemmani, M., Abe, K., Huang, X., Nakaya, Y., Maryn, N., et al.** (2019a) Contributions of crust proteins to spore surface properties in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology* **111**: 825–843.
- Shuster, B., Khemmani, M., Nakaya, Y., Holland, G., Iwamoto, K., Abe, K., et al.** (2019b) Expansion of the Spore Surface Polysaccharide Layer in *Bacillus subtilis* by Deletion of Genes Encoding Glycosyltransferases and Glucose Modification Enzymes. *Journal of Bacteriology* **201** <https://jlb.asm.org/content/201/19/e00321-19>. Accessed May 25, 2021.
- Steichen, C., Chen, P., Kearney, J.F., and Charles L. Turnbough** (2003) Identification of the Immunodominant Protein and Other Proteins of the *Bacillus anthracis* Exosporium. *Journal of Bacteriology* **185**: 1903–1910.
- Steichen, C.T., Kearney, J.F., and Turnbough, C.L.** (2005) Characterization of the Exosporium Basal Layer Protein BxpB of *Bacillus anthracis*. *Journal of Bacteriology* **187**: 5868–5876.
- Steichen, C.T., Kearney, J.F., and Turnbough, C.L.** (2007) Non-uniform assembly of the *Bacillus anthracis* exosporium and a bottle cap model for spore germination and outgrowth. *Molecular Microbiology* **64**: 359–367.
- Steil, L., Serrano, M., Henriques, A.O., and Völker, U.** 2005 Genome-wide analysis of temporally regulated and compartment-specific gene expression in sporulating cells of *Bacillus subtilis*. *Microbiology* **151**: 399–420.
- Stelder, S.K., Benito de Moya, C., Hoefsloot, H.C.J., Koning, L.J. de, Brul, S., and Koster, C.G. de** (2018) Stoichiometry, Absolute Abundance, and Localization of Proteins in the *Bacillus cereus* Spore Coat Insoluble Fraction Determined Using a QconCAT Approach. *J Proteome Res* **17**: 903–917.
- Stewart, G.C.** (2015) The Exosporium Layer of Bacterial Spores: a Connection to the Environment and the Infected Host. *Microbiol Mol Biol Rev* **79**: 437–457.
- Stewart, G.C.** (2017) Assembly of the outermost spore layer: pieces of the puzzle are coming together. *Molecular Microbiology* **104**: 535–538.
- Stragier, P., Bonamy, C., and Karmazyn-Campelli, C.** (1988) Processing of a sporulation sigma factor in *Bacillus subtilis*. How morphological structure could control gene expression. *Cell* **52**: 697–704.

- Takamatsu, H., Imamura, A., Kodama, T., Asai, K., Ogasawara, N., and Watabe, K.** (2000) The *yabG* gene of *Bacillus subtilis* encodes a sporulation specific protease which is involved in the processing of several spore coat proteins. *FEMS Microbiol Lett* **192**: 33–38.
- Terry, C., Jiang, S., Radford, D.S., Wan, Q., Tzokov, S., Moir, A., and Bullough, P.A.** (2017) Molecular tiling on the surface of a bacterial spore – the exosporium of the *Bacillus anthracis/cereus/thuringiensis* group. *Molecular Microbiology* **104**: 539–552.
- Terry, C., Shepherd, A., Radford, D.S., Moir, A., and Bullough, P.A.** (2011) YwdL in *Bacillus cereus*. Its Role in Germination and Exosporium Structure. *PLOS ONE* **6**: e23801.
- Thompson, B.M., Hoelscher, B.C., Driks, A., and Stewart, G.C.** (2011a) Localization and Assembly of the Novel Exosporium Protein BetA of *Bacillus anthracis*. *Journal of Bacteriology* **193**: 5098–5104.
- Thompson, B.M., Hoelscher, B.C., Driks, A., and Stewart, G.C.** (2012) Assembly of the BclB glycoprotein into the exosporium and evidence for its role in the formation of the exosporium ‘cap’ structure in *Bacillus anthracis*. *Molecular Microbiology* **86**: 1073–1084.
- Thompson, B.M., Hsieh, H.-Y., Spreng, K.A., and Stewart, G.C.** (2011b) The co-dependence of BxpB/ExsFA and BclA for proper incorporation into the exosporium of *Bacillus anthracis*. *Molecular Microbiology* **79**: 799–813.
- Thompson, B.M., and Stewart, G.C.** (2008) Targeting of the BclA and BclB proteins to the *Bacillus anthracis* spore surface. *Molecular Microbiology* **70**: 421–434.
- Todd, S.J., Moir, A.J.G., Johnson, M.J., and Moir, A.** (2003) Genes of *Bacillus cereus* and *Bacillus anthracis* Encoding Proteins of the Exosporium. *Journal of Bacteriology* **185**: 3373–3378.
- Walker, J.R., Gnanam, A.J., Blinkova, A.L., Hermandson, M.J., Karymov, M.A., Lyubchenko, Y.L., et al.** (2007) *Clostridium taeniosporum* spore ribbon-like appendage structure, composition and genes. *Molecular Microbiology* **63**: 629–643.
- Wang, K.H., Isidro, A.L., Domingues, L., Eskandarian, H.A., McKenney, P.T., Drew, K., et al.** (2009) The coat morphogenetic protein SpoVID is necessary for spore encasement in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology* **74**: 634–649.
- Wang, S.T., Setlow, B., Conlon, E.M., Lyon, J.L., Imamura, D., Sato, T., et al.** (2006) The Forespore Line of Gene Expression in *Bacillus subtilis*. *Journal of Molecular Biology* **358**: 16–37.
- Zhang, B., and Kroos, L.** (1997) A feedback loop regulates the switch from one sigma factor to the next in the cascade controlling *Bacillus subtilis* mother cell gene expression. *Journal of Bacteriology* **179**: 6138–6144.
- Zhang, B., Struffi, P., and Kroos, L.** (1999) ζ K Can Negatively RegulatesigE Expression by Two Different Mechanisms during Sporulation of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* **181**: 4081–4088.
- Zheng, L., Abhyankar, W., Ouwering, N., Dekker, H.L., Veen, H. van, Wel, N.N. van der, et al.** (2016) *Bacillus subtilis* Spore Inner Membrane Proteome. *J Proteome Res* **15**: 585–594.
- Zheng, L.B., Donovan, W.P., Fitz-James, P.C., and Losick, R.** (1988) Gene encoding a morphogenic protein required in the assembly of the outer coat of the *Bacillus subtilis* endospore. *Genes Dev* **2**: 1047–1054.
- Zhu, B., and Stülke, J.** (2018) SubtiWiki in 2018: from genes and proteins to functional network annotation of the model organism *Bacillus subtilis*. *Nucleic Acids Research* **46**: D743–D748.
- Zilhão, R., Serrano, M., Istatico, R., Ricca, E., Moran, C.P., and Henriques, A.O.** (2004) Interactions among CotB, CotG, and CotH during Assembly of the *Bacillus subtilis* Spore Coat. *Journal of Bacteriology* **186**: 1110–1119.

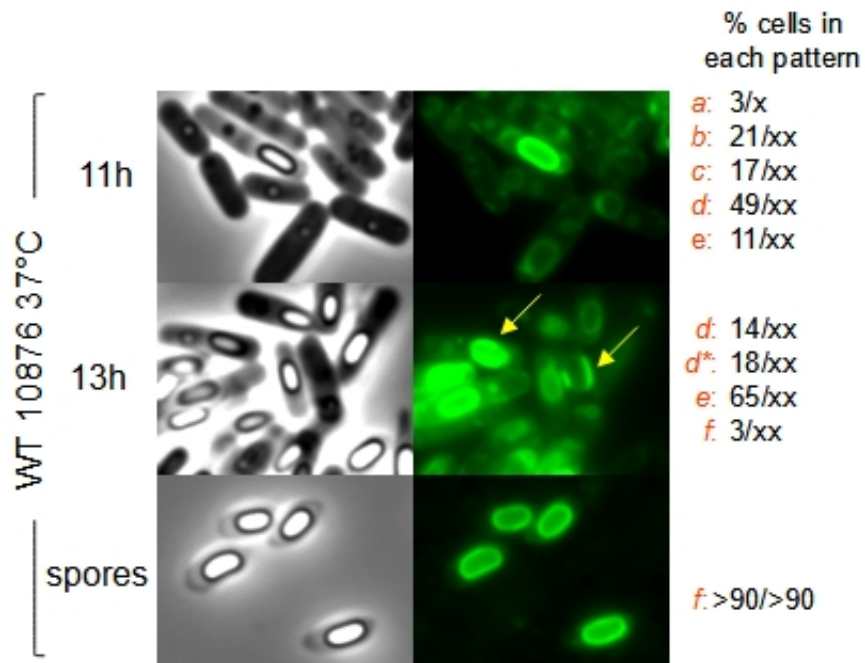


FIG S1. Sporulation of *B. cereus* ATCC 10876 at 37°C. Sporulating cells of *Bacillus cereus* ATCC 10876 at 37°C collected at the indicated times and spores purified at hour 34 were labeled with the MTG membrane dye and analyzed by phase contrast (CP) and fluorescence microscopy. The different patterns of sporulation identified (*a* to *f*) were counted. Pattern *d** corresponds to phase grey forespore not observed in our sample collected during *B. cereus* 14579 sporulating at 20°C. In some phase dark (pattern *d*) and phase grey (pattern *d**) sporangia we observed a bright MTG signal corresponding to coat deposition (yellow arrows)(Lablaine et al in prep). The counting corresponding to two independent biological replicates used for proteomic analysis are presented. Scale bars, 0.5 μ m.

TABLES

Table 1: Sigma factors, transcriptional factors and regulatory proteins of <i>B. cereus</i>											
Accession number	Protein name	Function	pI	Molecular mass	Spectral counts at 20h	Spectral counts at 24h	Spectral counts at 48h	% identity <i>B. subtilis</i>	% similarity <i>B. subtilis</i>	Sigma factor control	Transcription factor control
Sigma factors and regulatory proteins											
bc4072	SigF	DNA-directed RNA polymerase sigma-70 factor	5,31	29159	0	0	0	89,8	78,8	sigH sigF sigG	
bc4074	SpolIIA	anti-sigma F factor antagonist	5,94	12785	31	31	0	70,1	81,2	sigH sigF sigG	
bc4073	SpolIAB	anti-sigma F factor	4,54	16343	2	0	0	78,1	88,4	sigH sigF sigG	
bc3904	SigE	RNA polymerase sigma-35 factor	7,74	27619	9	11	0	94,6	87,9		
bc3903	SigG	DNA-directed RNA polymerase sigma-70 factor	6,10	29783	0	3	0	94,6	89,2	sigA sigF sigG	
bc5283	SpolIQ	stage II sporulation protein Q	8,78	32353	32	59	2	41,6	59	sigF	
bc4186	SpolIIAH	stage III sporulation protein AH	8,50	23604	5	7	0	42,5	61,5	sigE	IIID-
bc4495	GerM	sporulation protein	8,30	38671	3	25	0	50,9	70,9	sigE	IIID-
bc4336	SigK	DNA-directed RNA polymerase sigma-70 factor	6,28	27418	0	1	1	48,8	41,5		
bc4441	SpolVFA	stage IV sporulation protein FA	8,90	28307	1	1	0	39,6	54,9	sigE	IIID-
bc5184	CtpB	peptidase S41	8,49	52395	4	28	56	53,6	73	sigE sigG	
bc4289	SigA	RNA polymerase sigma factor RpoD	4,85	43259	20	21	26	94,4	88,8		
Transcriptional factors											
bc5385	RsfA	transcriptional regulator	5,38	26582	1	6	0	53,2	67,3	sigF sigG	RsfA-
bc5282	SpolIID	stage III sporulation protein D	9,62	10637	4	56	1	86	94,6	sigE	
bc3922	GerR	DNA-binding protein Prespore specific transcriptional activator	5,87	19885	0	16	4	42,3	59,7	sigE	IIID+
bc0059	SpoVT	stage V sporulation protein T (abrB paralog)	5,08	19680	0	0	15	77	90,4	sigF sigG	
bc4501	GerE	helix-turn-helix transcriptional regulator GerE	9,40	8511	0	0	83	95,9	97,3	sigK	IIID+

Table 2: *B. subtilis* orthologues detected early during *B. cereus* sporulation

Accession number ATCC14579	Protein name	Function	pI	Molecular mass	Spectral counts at 20h	Spectral counts at 24h	Spectral counts at 48h	% identity <i>B. subtilis</i>	% similarity <i>B. subtilis</i>	Sigma factor control	Transcription factor control	Protein class	Spore localisation
Orthologues of <i>B. subtilis</i> SpoIVA-dependent proteins													
bc1509	SpoIVA	stage IV sporulation protein A	4,69	55579	30	114	19	88,2	95,3	sigE	IIID-	I	Bsmt
bc4467	SpoVID	stage VI sporulation protein D	4,28	38496	1	10	0	24	36,6	sigE		I	Bsmt
bc0886	YhaX	haloacid dehalogenase	8,91	32913	0	15	0	48,5	72	sigE	IIID-	I	Bsmt
Orthologues of <i>B. subtilis</i> proteins involved in cortex assembly													
bc0787	SpoVR	stage V sporulation protein R	5,53	56048	4	18	31	79,7	90,3	sigE			Cx
bc3915	SpoVD	stage V sporulation protein D	9,04	70077	1	8	17	70,3	86,5	sigE	IIID-		Cx
Orthologues of <i>B. subtilis</i> SafA-dependent proteins													
bc4420	ExsA/ YrbA	peptidoglycan-binding protein LysM	8,66	65240	0	3	18	25	34,6	sigE		II	IC/Cx
bc0263	YdcC/SsdC	sporulation protein	9,22	38456	11	46	17	55	77,1	sigE			MB
bc3607	SleL/ YaaH	LysM glycosyl hydrolase	9,38	48167	0	13	88	47,6	69,1	sigE	IIID-	II	IC
bc4774	YisY	non-heme chloroperoxidase	6,50	30109	0	7	24	41	63,8	sigE sigK sigG	GerE-	III	IC
bc5391	GerQ/ YwdL	hypothetical protein	5,27	16090	5	22	62	41,2	51,1	sigE		II or III ?	IC
Orthologues of <i>B. subtilis</i> CotE-dependent proteins													
bc3770	CotE	Spore coat protein E	4,83	20342	10	111	657	58	75,7	sigE sigK	GerE-	II	OC
bc1222	CotY	Spore coat protein Y	5,24	16809	0	24	19	30,1	40,4	sigE sigK	GerE+ GerR+	III	Crst
bc1212	RmlA/ SpsI	glucose-1-phosphate thymidyltransferase	6,10	27444	0	10	17	51,6	69,8	sigE sigK	GerE+		OC
bc0264	Alr	alanine racemase	5,35	43732	12	34	86	49,9	66,7	sigE		II	OC

Table 2 (suite) : *B. subtilis* orthologue detected early during *B. cereus* sporulation

Accession number ATCC14579	Protein name	Function	pI	Molecular mass	Spectral counts at 20h	Spectral counts at 24h	Spectral counts at 48h	% identity <i>B. subtilis</i>	% similarity <i>B. subtilis</i>	Sigma factor control	Transcription factor control	Protein class	Spore localisation
Orthologues of <i>B. subtilis</i> coat proteins of unknown genetic dependency													
bc1208	YolJ/ SunS	beta 1,4 glucosyltransferase	5,14	42867	0	3	19	16,2	28,8				
bc1209	RfbC/ YodH/ Ubig1	SAM-dependent methyltransferase	5,57	26143	0	21	12	18,8	30,7	sigK			
bc1211	Strf	streptomycin biosynthesis protein	5,53	26412	0	7	27	no					
bc1213	RmlC/ RfbC/ SpsL	dTDP-4-dehydrorhamnose 3,5-epimerase	5,73	20783	1	23	50	25,1	38,7	sigE sigK	GerE+		
bc1214	RmlB/ RfbB/ SpsJ	dTDP-glucose 4,6-dehydratase	6,02	36855	0	5	38	48,5	64,4	sigE sigK	GerE+		
bc1215	RmlD/ RfbD/SpsK	NAD(P)-dependent oxidoreductase	6,76	32372	0	7	7	39,7	56,8	sigE sigK	GerE+	II or III ?	Coat
bc4272	SodA	Superoxide dismutase [Mn] 1	5,34	24738	113	122	162	69,1	78,2				
<i>B. subtilis</i> orthologues previously associated with <i>B. cereus</i> or <i>B. subtilis</i> coat													
bc0212	YusW	hypothetical protein	4,99	17668	0	3	38	29,8	48,4				
bc1613	RnjA/ YkqC	ribonuclease J	6,05	61719	0	9	78	50,2	72,4	sigA			
bc3090	YvdQ	membrane protein	5,50	18451	0	3	54	55,6	73,7	sigG			coat putative
bc4075	DacF	D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase	9,39	43918	0	6	5	61,9	78	sigF sigG			
bc4281	YqfT/CotN	tRNA methyltransferase	9,60	9631	0	4	2	44	70,2				
bc4282	YqfS/Nfo	endonuclease	6,11	32918	4	11	3	79,5	90,3	sigG ?			
Other <i>B. subtilis</i> orthologues involved in sporulation													
bc0399	YhfW PetC	oxidoreductase	5,86	57130	0	9	89	54,8	71,2	sigF			
bc0548	PrkA	protein prkA	5,75	73111	116	493	498	87,8	96,7	sigE			
bc0558	FloT YuaG YqjK	flotillin	5,53	57575	5	16	206	62,3	81,3				
bc0639	GlnQ ₂	amino acid ABC transporter ATP-binding protein	5,85	29493	0	9	34	69,5	84,4	sigE	tnrA+		
bc0640	GlnH	glutamine ABC transporter substrate-binding protein	8,95	30385	38	96	281	64,5	81,2	sigE	tnrA		
bc2392	FenI YngK YotA	newly identified spore protein	6,04	59772	3	43	183	62,1	73,8				
bc2612	YtzL	newly identified spore protein	6,04	8106	0	8	21	43,8	52,1	sigF sigG			
bc3372	Gnd YqeC	6-phosphogluconate dehydrogenase	4,99	32674	0	4	93	77,8	91,9				
bc3951	PhoH YlaK	newly identified spore protein	5,44	49941	5	16	82	78,1	88,9				

Table 3: New sporulation proteins of *B. cereus*

Accession number ATCC14579	Protein name	Function	pI	Molecular mass	Spectral counts at 20h	Spectral counts at 24h	Spectral counts at 48h	Protein class
bc2745		peptide ABC transporter substrate-binding protein	6,21	43232	12	67	1	I
bc3578		phosphonate ABC transporter permease	6,50	131612	3	35	0	I
bc0437	AlkP	phosphodiesterase	6,07	49429	1	6	8	II ou III
bc0843		hypothetical protein	5,94	40514	5	14	29	II ou III
bc1029		hypothetical protein	5,90	33295	0	19	97	II ou III
bc1708		hypothetical protein	5,30	24955	2	9	31	II ou III
bc1927		ABC transporter permease	8,63	44053	27	73	172	II ou III
bc2227		glycosyl transferase involved in cellwall biosynthesis	5,58	47473	4	21	75	II ou III
bc2244		hypothetical protein, partial	5,79	28183	0	12	20	II ou III
bc2960	LsrB	autoinducer	9,02	38055	0	16	106	II ou III
bc2965	LsrK	autoinducer-2 kinase	5,08	57396	6	23	45	II ou III
bc2967	LsrF	aldolase	5,16	27958	18	74	122	II ou III
bc3390		nitroreductase	5,20	22713	2	18	109	II ou III
bc3395		hypothetical protein	6,10	17903	11	55	86	II ou III
bc5056		adhesin	9,22	34600	0	3	18	II ou III

Table 4: *B. subtilis* orthologues not known to be related to sporulation and accumulating early during *B. cereus* sporulation

Accession number ATCC14579	Protein name	Function	pI	Molecular mass	Spectral counts at 20h	Spectral counts at 24h	Spectral counts at 48h	% identity <i>B. subtilis</i>	% similarity <i>B. subtilis</i>	Sigma factor control	Transcription factor control
bc0841	murQ yfeU ybbI	N-acetylmuramic acid 6-phosphate etherase	5,05	31929	23	62	71	48,4	65,5		murR
bc0842	murP ybbF	permease	9,05	47192	0	5	105	53,8	69		murR
bc4014	npIT mdxD	neopullulanase	5,19	68198	0	3	12	45,5	63,8		
bc4526	FadD lcfA	long-chain fatty acid--CoA ligase	5,45	56733	3	14	71	55,6	69,2	sigA	fadR ccpA
bc5209	celF licH	6-phospho-beta-glucosidase	5,44	49226	6	29	20	77,8	88,7	sigA	ccpA licR
bc5451	DbpA cshD	ATP-dependent RNA helicase DbpA	8,29	54140	0	3	13	73,4	85,4		

Table 5: Late detected exosporium proteins of <i>B. cereus</i>													
Accession number	Protein name	Function	pI	Molecular mass	Spectral counts at 20h	Spectral counts at 24h	Spectral counts at 48h	% identity <i>B. subtilis</i>	% similarity <i>B. subtilis</i>	Sigma factor control	Transcription factor control	Protein class	Spore localisation
Enzymes possibly associated with the exosporium													
bc1468	SodF	superoxide dismutase	5,95	26798	0	1	16	49,8	61,9	sigE			
bc2822	Lyc	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase	7,60	31413	0	0	25	no					
bc2823	LytC2 CwID	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase	6,29	26364	0	0	153	15,8	25,1	sigE sigG			
bc3552	RihA3 IunH	nucleoside hydrolase	8,62	34450	0	0	11	no					
bc3677	Lyc acm	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase	4,89	38194	0	0	114	no					
bc4907	SodC	superoxide dismutase	8,23	19110	0	0	5	35,2	50,3				
Exosporium proteins													
bc0996		hypothetical protein	6,50	15444	0	0	7	no					
bc1218	ExsY	spore coat protein Y	4,95	16077	1	1	100					III	Crust
bc1219	YjcA	membrane protein	6,25	13450	0	0	6	47,1	65,5	sigE			
bc1221	ExsF BxpB	membrane protein	4,29	17276	0	0	16	no			VT- (Bc)		
bc1243		hypothetical protein	6,81	27730	0	0	9	no					
bc1244	YvbJ	YARHG domain-containing protein	8,66	46748	0	0	6	16,4	30,8				
bc1245		spore specific protein	5,38	15230	0	0	5	no		sigK			
bc2267		hypothetical protein	8,15	21530	0	0	5	no					
bc2426		hypothetical protein	4,75	25922	0	0	11	no					
bc2493	ExsK	hypothetical protein	6,55	13042	0	0	14	no			VT+ (bc)		
bc2569	BclF	hypothetical protein	4,08	53291	0	0	5	no					
bc2872	CotX1	spore coat protein X	4,97	16288	0	0	10	34,5	48,6	sigE sigK	IIID+ gerE+ gerR+		Crust
bc2874	CotX2	spore coat protein X	4,84	21451	0	0	5	34,7	47,4	sigE sigK	IIID+ gerE+ gerR+		Crust
bc3712	BclC	Membrane Spanning protein	9,85	75610	0	0	6	no					

Table 5 (suite): Late detected exosporium proteins of <i>B. cereus</i>												
Accession number	Protein name	Function	pI	Molecular mass	Spectral counts at 20h	Spectral counts at 24h	Spectral counts at 48h	%identity <i>B. subtilis</i>	%similarity <i>B. subtilis</i>	Sigma factor control	Transcription factor control	Protein class
Proteins related to spores appendages												
bc1591		hypothetical protein	5,95	58280	0	0	108	no				
bc1592	CrdA	cell surface protein	4,06	523148	0	0	46	no				
bc2639	CrdA ArnA	cell surface protein	4,03	521582	0	0	50	no				
bc3547	CrdC	cell surface protein, partial	4,77	97799	0	0	48	no				
bc5358		collagen-binding protein, partial	5,57	220542	0	0	6	no			VT- (Bc)	
Potentially new exosporium proteins												
bc0203		hypothetical protein	8,85	64395	0	0	30	no				
bc0686		membrane protein	8,56	64454	0	1	17	no				
bc1265		hypothetical protein	6,48	36223	0	0	9	no				
bc1266		membrane protein	8,99	49087	0	0	9	no				
bc2817		hypothetical protein	8,40	30715	0	0	10	no				
bc3328		ABC transporter permease	9,48	62500	0	0	20	no				
bc3997		diguanylate cyclase	6,35	24876	0	0	12	no				
bc4082		membrane protein	6,22	24607	0	0	22	no				
bc4912		hypothetical protein	5,61	17447	0	0	19	no				

Table 6: Late detected coat proteins of *B. cereus*

Accession number	Protein name	Function	pI	Molecular mass	Spectral counts at 20h	Spectral counts at 24h	Spectral counts at 48h	% identity <i>B. subtilis</i>	% similarity <i>B. subtilis</i>	Sigma factor control	Transcription factor control	Protein class	Spore localisation
Outer coat orthologues													
bc0389	CotB1	spore coat protein B	5,3	19254	0	0	18	17,5	27,2	sigE sigK	gerE- gerR+ IIID+	V	OC
bc0390	CotB2	spore coat protein B	6,5	16769	0	0	13	14,8	21,5	sigE sigK	gerE- gerR+ IIID+	V	OC
bc0391	YwrJ	hypothetical protein	8,7	25426	0	0	70	40	61,3	sigE sigK	gerR+ gerE-IIID+		
bc0392		S-adenosylmethionine decarboxylase related protein	5,0	48895	0	0	125	no					
bc0396		hypothetical protein	6,3	41597	0	0	17	no					
bc2030	ExsB CotG	hypothetical protein	9,6	22872	0	0	13	20,5	34,9	sigE sigK	gerE+ gerR+	V	OC
bc2031	CotH YwrH	spore coat protein H	5,8	42660	0	0	32	55,4	74,4	sigE sigK	gerE- gerR+ IIID+		IC/OC
Inner coat orthologues													
bc2203	CotP Hsp20	molecular chaperone Hsp20	5,2	17980	0	0	13	23,5	42,6	sigK	gerE-	V	IC
bc3081	YhjR	hypothetical protein	5,0	17246	0	0	23	48,6	69,6	sigE sigK	gerE-	II	IC
Other coat associated proteins													
bc0047	YabG	sporulation specific peptidase	8,3	33048	0	0	5	58,9	76,4	sigK			OFM
bc0063	YabP	spore coat protein	5,8	11627	0	0	7	66,7	84,3	sigE	VT- (Bc)		OFM
bc0448	PacL YloB1	Calcium-transporting ATPase	5,4	97639	0	0	10	44,7	62,9				
bc0878	YheC	IG hypothetical 16724 histidine kinase ATP-binding	8,7	41234	0	0	5	27,3	45,2	sigE	IIID+		OFM
bc4047	Cot α	hypothetical protein	6,9	14059	0	0	8	no		sigK			

Table 7: late detected glycosylation related proteins of *B. cereus*

Accession number	Protein name	Function	pI	Molecular mass	Spectral counts at 20h	Spectral counts at 24h	Spectral counts at 48h	% identity <i>B. subtilis</i>	% similarity <i>B. subtilis</i>	Sigma factor control	Transcription factor control
Yfn operon											
bc3514	RfbF_2 yfnH	glucose-1-phosphate cytidyltransferase	5,47	28694	0	0	17	51,2	69,7	sigE sigK	gerE+
bc3515	YfnD	glycosyl transferase	6,39	81334	0	0	34	12,5	22,2	sigE sigK	gerE+
bc3517	RfbG2 YfnG	CDP-glucose 4,6-dehydratase	6,26	41505	0	0	121	29,1	46	sigE sigK	gerE
XNAC operon											
bc0484		hypothetical protein	8,47	15281	0	0	19	no			
bc0485		hypothetical protein	4,55	6884	0	0	19	no			
bc0486	ArnC YcdQ YfnE	glycosyl transferase	6,42	57270	0	0	7	14,4	25,5	sigE sigK	gerE+
bc0487	CapL WbpA TuaD YvhD	UDP-N-acetyl-D-mannosamine dehydrogenase	5,65	46044	0	0	15	25,2	40,4	SigF sigA	phoP
bc0488	ArnA1 GalE RfbB	UDP-glucose 4-epimerase	8,44	36151	0	0	22	30,8	48,3	sigE sigK	gerE+
Cereose operon											
bc3357		Glycosyl transferase family 2	7,27	30715	0	0	7	no			
bc3358	rfbF1 yfnH	glucose-1-phosphate cytidyltransferase	6,80	28822	0	0	42	45,7	65,2	sigE sigK	gerE+ VT-(Bc)
bc3359	rfbG1 yfnG spmG	CDP-glucose 4,6-dehydratase	6,87	39377	0	0	15	32,1	50,8	sigE sigK	gerE+
bc3360	novU	methyltransferase	8,07	46620	0	0	17	no			
Enzymes related to the Rhamnose Rml operon											
bc1204	tuaG yvhG	glycosyltransferase	5,93	35639	0	0	35	23,7	40,1	sigF sigA	phoP
bc1206	mycF	Macrocin-O-methyltransferase	5,07	32526	0	1	31	no			
Possible operon encoding glycoyl transferase											
bc3004		glycosyl transferase involved in cell wall biogenesis	6,04	73438	0	1	53	no			
bc3005	epsJ yveT	glycosyl transferase	6,01	57108	0	0	56	12,8	22,8	sigA	remA abrB sinR
bc3006		hypothetical protein	9,54	39397	0	0	41	no			
bc3008	KatA ₂ katE	catalase	6,14	52909	0	1	8	27,1	40,8	sigB	

Table 8: Late germination proteins of *B. cereus*

Accession number ATCC14579	Protein name	Function	pI	Molecular mass	Spectral counts at 20h	Spectral counts at 24h	Spectral counts at 48h	% identity <i>B. subtilis</i>	% similarity <i>B. subtilis</i>	Sigma factor control	Transcription factor control	Spore localisation
Enzymes possibly involved in germination												
bc1494	cwlH blyA	Autolysin N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase	5,7	17400	0	0	8	13,7	18			
bc2207	cwIC1	sporulation protein sporulation specific amidase	6,3	35924	0	0	264	28	38,5	sigK		
bc2677	cwlK ply	peptidase M15	9,0	31382	0	0	71	14,4	21,6			
bc2752	ypeB yzuA joeB	germination protein YpeB	6,5	50052	0	0	9	57	76,7	sigG		IFM
bc2753	sleB ypeA	spore cortex-lytic enzyme sleB	9,7	28240	0	0	13	53,4	66	sigG		IFM
bc3795	tepA ylxI ymfB clp	translocation-enhancing protein TepA germination protease	5,2	27228	0	0	23	75,6	87,2	sigG	spoVT-	IFM
bc4064	spoVAF GerAA	stage V sporulation protein AF	6,0	55034	0	0	6	61,9	78,5	sigG	spoVT+	IFM
bc4319	gpr	GPR endopeptidase germination protease	4,9	40336	0	0	20	68,3	84,3	sigF sigG	SpoVT-	IFM
bc4419	yhcN ylaJ	hypothetical protein YhcN/YlaJ family cortex sporulation lipoprotein	9,7	24469	0	0	163	23,2	38,8	sigF sigG		cortex
bc5148	spoVAD	stage V sporulation protein AD	5,7	36230	0	0	39	48,2	64,4	sigG	spoVT+	IFM
bc5458	htrA yyxA yycK	2-alkenal reductase htrA serine protease stress	6,1	41803	0	0	18	47,8	65,8	sigG		IFM

Table 9: Proteins of *B. cereus* with no homology

Accession number ATCC14579	Protein name	Function	pI	Molecular mass	Spectral counts at 20h	Spectral counts at 24h	Spectral counts at 48h	% identity <i>B. subtilis</i>
bc3254	acyll	beta-lactam antibiotic acylase	5,84	86270	0	0	30	no
bc1333		hypothetical protein	5,624	23647	0	1	19	no
bc4101		CopG family transcriptional regulator	6,20	18482	0	0	16	no
bc2228		DNA-binding protein coil coiled glycosyl trans	5,45	44963	0	0	13	no
bc0309		methyltransferase	5,563	33201	0	1	11	no
bc0913		hypothetical protein	5,42	30321	0	0	10	no
bc4500	hchA	thiazole biosynthesis protein ThiJ	9,08	24113	0	0	7	no
bc3968		hypothetical protein	8,61	14975	0	0	5	no
bc3059		cephalosporin hydroxylase	5,83	19037	0	0	5	no

Table S1: Sigma factors, transcriptional factors and regulatory proteins of *B. cereus* ATCC 10876

Protein name	Function	pI	Molecular mass	Spectral counts R1 11h	Spectral counts R2 11h	Spectral counts R1 13h	Spectral counts R2 13h	Spectral counts R1 spores	Spectral counts R2 spores
Sigma factors and regulatory proteins									
sigF	GFDABOED_04170 sigF RNA polymerase sigma-F factor	5,31	29159	12	8	1	7	1	2
spollAA	GFDABOED_04172 spollAA Anti-sigma F factor antagonist	5,94	12785	18	6	7	7	0	1
spollAB	GFDABOED_04171 spollAB Anti-sigma F factor	4,39	16250	6	3	0	2	0	0
sigG	GFDABOED_03934 sigG RNA polymerase sigma-G factor	6,10	29783	1	1	0	1	0	1
SigE	GFDABOED_03935 sigE_2 RNA polymerase sigma-35 factor	7,74	27619	11	4	4	5	0	0
SpollQ	GFDABOED_05375 spollQ Stage II sporulation protein Q	8,78	32353	85	19	12	18	0	3
SpollIAE	GFDABOED_04286 spollIAE Stage III sporulation protein AE	8,85	42295	1	0	0	0	0	0
SpollIAG	GFDABOED_04284 GFDABOED_04284 hypothetical protein SpollIAG	8,80	24755	7	0	0	3	2	7
SpollIAH	GFDABOED_04283 spollIAH Stage III sporulation protein AH	9,11	23644	27	2	1	2	0	0
GerM	GFDABOED_04576 gerM Spore germination protein GerM	8,30	38600	37	6	4	6	0	1
sigK	GFDABOED_04432 sigK RNA polymerase sigma-28 factor	6,06	27119	3	3	12	8	0	0
SpoIVFA	GFDABOED_04538 spoIVFA Stage IV sporulation protein FA	8,90	28307	2	0	0	0	0	0
ctpB	GFDABOED_05270 ctpB Carboxy-terminal processing protease CtpB	8,62	53939	15	0	12	5	0	1
prkA	GFDABOED_00555 GFDABOED_00555 hypothetical protein prkA	5,75	73111	305	347	715	446	3	106
sigA	GFDABOED_04387 sigA RNA polymerase sigma factor SigA	4,85	43273	21	26	32	23	47	60
Transcriptional factors									
RsfA	GFDABOED_05479 rsfA_2 Prespore-specific transcriptional regulatorRsfA	5,38	26582	10	2	2	1	0	0
SpollIID	GFDABOED_05374 GFDABOED_05374 hypothetical protein SpollIID	9,90	15598	11	10	12	7	0	3
gerR	GFDABOED_03953 GFDABOED_03953 hypothetical protein gerR	5,70	19862	14	23	51	23	0	5
spoVT	GFDABOED_00060 spoVT Stage V sporulation protein T	5,08	19680	0	2	12	4	22	33
gerE	GFDABOED_04579 gerE Spore germination protein GerE	9,40	8511	2	9	29	25	0	3
<i>R1 and R2: replicates 1 and 2, respectively in all Supp tables</i>									

Table S2: *B. subtilis* orthologues detected early during *B. cereus* ATCC 10876 sporulation

Protein name	Function	pI	Molecular mass	Spectral counts R1 11h	Spectral counts R2 11h	Spectral counts R1 13h	Spectral counts R2 13h	Spectral counts R1 spores	Spectral counts R2 spores
Orthologues of <i>B. subtilis</i> SpoIVA-dependent proteins									
SpoIVA	GFDABOED_01532 spoIVA Stage IV sporulation protein A	4,69	55579	102	89	120	93	0	41
SpoVID	GFDABOED_04550 GFDABOED_04550 hypothetical protein SpoVID	4,28	38526	9	8	12	11	0	3
YhaX	GFDABOED_00890 yhaX Stress response protein YhaX	8,91	32899	11	10	5	10	0	1
Orthologues of <i>B. subtilis</i> proteins involved in cortex assembly									
SpoVE	GFDABOED_00793 GFDABOED_00793 hypothetical protein SpoVR	5,65	55969	15	24	67	26	0	7
SpoVD	GFDABOED_03946 spoVD Stage V sporulation protein D	9,04	70063	11	5	8	6	0	0
Orthologues of <i>B. subtilis</i> SafA-dependent proteins									
ExsA/ YrbA	GFDABOED_04517 exsA Spore coat assembly protein ExsA	6,44	69956	4	15	24	20	25	24
YdcC/SsdC	GFDABOED_00262 ydcC Sporulation protein YdcC	9,04	36042	47	22	43	24	1	6
SleL/YaaH	GFDABOED_03587 yaaH Spore germination protein YaaH	9,27	48120	13	20	48	29	89	122
YisY	GFDABOED_04877 GFDABOED_04877 Arylesterase YisY	6,05	30131	6	5	10	6	31	40
GerQ/ YwdL	GFDABOED_05485 GFDABOED_05485 hypothetical protein GerQ	5,27	16090	11	15	16	19	67	79
Orthologues of <i>B. subtilis</i> CotE-dependent proteins									
CotE	CotE	4,83	39671	49	91	186	156	56	86
Alr	GFDABOED_00263 alr Alanine racemase	5,35	43746	2	2	15	5	47	47
RmlA/ Spsl	GFDABOED_01252 rmlA Glucose-1-phosphate thymidyltransferase	6,10	27417	11	8	35	17	0	0
CotO	GFDABOED_01257 GFDABOED_01257 hypothetical protein CotO	5,15	20034	1	2	6	4	0	0
ExsY	GFDABOED_01258 cotZ_1 Spore coat protein Z	4,99	16408	3	19	27	32	10	11
CotY	GFDABOED_01261 cotZ_2 Spore coat protein Z	4,46	16676	8	8	12	13	0	1

Table S2 (suite) : *B. subtilis* orthologues detected early during *B. cereus* ATCC 10876 sporulation

Protein name	Function	pI	Molecular mass	Spectral counts R1 11h	Spectral counts R2 11h	Spectral counts R1 13h	Spectral counts R2 13h	Spectral counts R1 spores	Spectral counts R2 spores
Orthologues of <i>B. subtilis</i> coat proteins of unknown genetic dependency									
YolJ/ SunS	GFDABOED_01248 GFDABOED_01248 hypothetical protein SunS	5,13	42581	5	6	15	8	0	1
RfbC/ YodH/ Ubig1	GFDABOED_01249 ubiG_1 Ubiquinone biosynthesis O-methyltransferase	5,57	26155	16	14	33	19	1	2
Strf	GFDABOED_01251 GFDABOED_01251 hypothetical protein StrF	5,73	26442	1	0	6	2	0	0
RmlC/ RfbC/ SpsL	GFDABOED_01253 rfbC dTDP-4-dehydrorhamnose 3,5-epimerase	5,51	20755	8	6	22	14	0	0
RmlB/ RfbB/ SpsJ	GFDABOED_01254 rffG dTDP-glucose 4,6-dehydratase 2	6,02	36870	23	19	55	29	0	2
RmlD/ RfbD/SpsK	GFDABOED_01255 rmlD dTDP-4-dehydrorhamnose reductase	6,51	32323	11	9	17	8	0	0
SodA	GFDABOED_04370 soda1 Superoxide dismutase [Mn] 1	5,31	22650	42	35	50	38	47	31
Other orthologues previously associated with <i>B. cereus</i> or <i>B. subtilis</i> coat									
YusW	GFDABOED_00207 GFDABOED_00207 hypothetical protein YusW	5,09	17641	2	6	22	13	23	31
RnjA/ YkqC	GFDABOED_01634 rnjA_1 Ribonuclease J1	5,98	61565	5	22	54	36	83	149
YvdQ	GFDABOED_03110 GFDABOED_03110 hypothetical protein YvdQ	5,50	18451	0	2	14	6	19	31
DacF	GFDABOED_04173 dacF D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase DacF	9,39	44016	5	2	5	3	2	0
YqfT/CotN	GFDABOED_04379 GFDABOED_04379 hypothetical protein YqfT	9,60	9631	3	0	3	2	0	0
YqfS/Nfo	GFDABOED_04380 nfo putative endonuclease 4 yqfS/nfo	6,11	32918	3	4	2	4	1	4
<i>B. subtilis</i> spore orthologues detected concomitantly with MS assembly									
YhfW PetC	GFDABOED_00406 petC_1 Cytochrome b6-f complex iron-sulfur subunit	5,64	57064	3	3	30	8	59	78
PrkA	GFDABOED_00555 GFDABOED_00555 hypothetical protein prkA	5,75	73111	305	347	715	446	3	106
FloT YuaG YqiK	GFDABOED_00562 yqiK Inner membrane protein YqiK	5,41	57634	17	41	68	65	0	1
GlnQ ₂	GFDABOED_00643 glnQ_2 Glutamine transport ATP-binding protein GlnQ	6,10	27312	13	6	16	9	0	0
GlnH	GFDABOED_00644 glnH ABC transporter glutamine-binding protein GlnH	9,12	30286	68	50	103	80	32	73
FenI YngK YotA	GFDABOED_02328 GFDABOED_02328 hypothetical protein FenI	6,34	59734	0	1	3	1	0	0
YtzL	GFDABOED_02629 GFDABOED_02629 hypothetical protein YtzL	5,08	5647	0	0	3	0	10	10
Gnd YqeC	GFDABOED_03341 GFDABOED_03341 6-phosphogluconate dehydrogenase, NAD(+)-dependent, decarboxylating YqeC	5,11	32643	1	4	15	5	39	64
PhoH YlaK	GFDABOED_04045 GFDABOED_04045 hypothetical protein phoH	5,44	49941	16	11	30	21	1	2

Table S3: New *B. cereus* ATCC 10876 sporulation proteins

Protein name in <i>B. cereus</i> ATCC 14579	Function	pI	Molecular mass	Spectral counts R1 11h	Spectral counts R2 11h	Spectral counts R1 13h	Spectral counts R2 13h	Spectral counts R1 spores	Spectral counts R2 spores
potential new class I relative proteins									
bc2745	GFDABOED_02739 GFDABOED_02739 hypothetical protein	6,04	43304	61	54	86	65	0	18
bc3578	GFDABOED_03560 GFDABOED_03560 hypothetical protein tubulin-like doman-containing abc transporter	6,55	131603	33	8	1	4	0	4
potentially new coat/exosporium relative proteins									
bc0437	GFDABOED_00443 GFDABOED_00443 hypothetical protein alkP	5,98	49300	4	2	3	5	1	2
bc0843	GFDABOED_00848 GFDABOED_00848 hypothetical protein	5,89	40212	0	0	0	0	0	0
bc1029	GFDABOED_01070 GFDABOED_01070 hypothetical protein	5,90	33295	18	9	57	27	134	195
bc1708	GFDABOED_01735 GFDABOED_01735 hypothetical protein	5,11	25046	4	4	14	7	0	0
bc1927	GFDABOED_01872 GFDABOED_01872 hypothetical protein	8,77	43982	19	10	62	33	1	2
bc2227	GFDABOED_02173 GFDABOED_02173 hypothetical protein	5,66	47415	24	18	60	31	1	3
bc2244	GFDABOED_02190 GFDABOED_02190 hypothetical protein	5,79	28183	6	7	6	10	18	33
bc2960	GFDABOED_02964 LsrB Autoinducer 2-binding protein LsrB	9,02	38098	1	4	46	20	1	1
bc2965	GFDABOED_02969 LsrK Autoinducer-2 kinase	5,18	57208	23	15	47	21	0	0
bc2967	GFDABOED_02971 LsrF 3-hydroxy-5-phosphonoxy-pentane-2,4-dione-thiolase	5,28	27985	33	19	55	30	3	13
bc3390	GFDABOED_03353 GFDABOED_03353 hypothetical protein	5,30	22673	1	7	16	10	35	56
bc3395	GFDABOED_03354 GFDABOED_03354 hypothetical protein	6,44	18074	8	5	14	11	1	3
bc5056	GFDABOED_05176 GFDABOED_05176 hypothetical protein	9,15	34234	0	4	32	8	11	9

Table S4: *B. subtilis* orthologues not known to be related to sporulation accumulating early during *B. cereus* ATCC 10876

Protein name	Function	pI	Molecular mass	Spectral counts R1 11h	Spectral counts R2 11h	Spectral counts R1 13h	Spectral counts R2 13h	Spectral counts R1 spores	Spectral counts R2 spores	
<i>B. subtilis</i> orthologues not known to be involved in sporulation										
murQ yfeU ybb	GFDABOED_00846 murQ N-acetylmuramic acid 6-phosphate etherase	5,12	31883	9	21	36	26	3	2	
murP ybbF	GFDABOED_00847 GFDABOED_00847 PTS system EIIBC component murP	9,24	47936	0	2	10	7	0	0	
npIT mdxD	GFDABOED_04109 npIT_2 Neopullulanase	5,19	68208	0	0	0	0	1	0	
FadD lcfA	GFDABOED_04604 fadD Long-chain-fatty-acid--CoA ligase	5,45	63452	6	32	28	32	19	6	
celF lich	GFDABOED_05300 lich putative 6-phospho-beta-glucosidase	5,36	49227	40	36	74	45	2	6	
DbpA cshD	GFDABOED_05545 dbpA_2 ATP-dependent RNA helicase DbpA	8,03	54125	0	0	1	0	3	5	

Table S5: Late detected exosporium proteins in *B. cereus* ATCC 10876

Protein name	Function	pI	Molecular mass	Spectral counts R1 11h	Spectral counts R2 11h	Spectral counts R1 13h	Spectral counts R2 13h	Spectral counts R1 spores	Spectral counts R2 spores
Enzymes possibly associated with the exosporium									
SodF	GFDABOED_01491 GFDABOED_01491 hypothetical protein sodF	5,30	36426	1	7	11	10	20	26
RihA	GFDABOED_03533 rihA_3 Pyrimidine-specific ribonucleoside hydrolaseRihA	8,33	34477	0	1	3	4	5	11
SodCu	GFDABOED_05006 GFDABOED_05006 hypothetical protein SodCu	8,23	19110	0	0	2	1	5	8
Exosporium proteins									
bc0996	GFDABOED_01032 GFDABOED_01032 hypothetical protein BC0996	7,02	15370	0	0	0	0	5	3
YjcA	GFDABOED_01259 GFDABOED_01259 hypothetical protein YjcA	6,25	13450	0	1	2	1	0	1
BxpB	GFDABOED_01260 GFDABOED_01260 hypothetical protein bxpB	4,29	17363	0	1	1	8	14	14
	GFDABOED_02212 GFDABOED_02212 hypothetical protein	7,59	19881	0	0	0	1	9	7
ExsK	GFDABOED_02502 GFDABOED_02502 hypothetical protein ExsK	6,55	13014	0	0	0	7	23	18
CotX1	GFDABOED_02870 cotX_1 Spore coat protein X	5,15	16401	0	0	0	1	5	6
CotX2	GFDABOED_02872 cotX_2 Spore coat protein X	5,10	17937	0	0	0	0	5	3
BclC	GFDABOED_03697 GFDABOED_03697 hypothetical protein BclC	9,81	85458	0	2	4	3	10	8
Proteins related to spores appendages									
	GFDABOED_01612 GFDABOED_01612 hypothetical protein	6,13	57493	0	0	0	7	0	3
CrdA	GFDABOED_01613 GFDABOED_01613 hypothetical protein	4,09	521965	0	1	7	5	7	12
	GFDABOED_03528 GFDABOED_03528 hypothetical protein	4,14	258999	0	1	7	3	18	12
	GFDABOED_05451 GFDABOED_05451 hypothetical protein	5,40	314198	0	0	0	0	0	0
Potentially new exosporium proteins									
GFDABOE D_00695	GFDABOED_00695 GFDABOED_00695 hypothetical protein	8,93	65112	3	2	9	6	0	0
GFDABOE D_04180	GFDABOED_04180 GFDABOED_04180 26 kDa periplasmic immunogenic protein	6,22	24593	0	0	6	2	20	28
GFDABOE D_05011	GFDABOED_05011 GFDABOED_05011 hypothetical protein	5,61	17447	2	0	7	4	0	2

Table S6: Late detected coat proteins in *B. cereus* ATCC 10876

Protein name	Function	pI	Molecular mass	Spectral counts R1 11h	Spectral counts R2 11h	Spectral counts R1 13h	Spectral counts R2 13h	Spectral counts R1 spores	Spectral counts R2 spores
Outer coat orthologues									
CotB1	GFDABOED_00396 GFDABOED_00396 hypothetical protein cotB	6,00	19343	0	1	2	3	12	13
CotB2	GFDABOED_00397 GFDABOED_00397 hypothetical protein CotB2	5,46	16737	0	0	0	2	11	13
YwrJ	GFDABOED_00398 GFDABOED_00398 hypothetical protein YwrJ	8,67	25515	0	0	2	8	0	0
ExsB	GFDABOED_01977 GFDABOED_01977 hypothetical protein ExsB	9,64	22849	0	4	2	14	20	17
CotH	GFDABOED_01978 cotH Inner spore coat protein H	5,79	42689	0	1	6	3	0	0
inner coat orthologues									
CotP	GFDABOED_02150 GFDABOED_02150 hypothetical protein Hsp20/alpha crystallin family protein	5,23	17980	0	5	23	8	0	0
YhjR	GFDABOED_03098 GFDABOED_03098 hypothetical protein	5,05	17032	0	0	0	1	10	14
other coat associated proteins									
YabG	GFDABOED_00048 yabG Sporulation-specific protease YabG	8,31	33048	0	3	14	4	0	1
YabP	GFDABOED_00064 yabP Spore protein YabP	5,81	11627	1	0	2	0	1	1
PacL YloB1	GFDABOED_00454 GFDABOED_00454 Calcium-transporting ATPase 1	5,39	97684	1	3	4	3	2	7
YheC	GFDABOED_00882 GFDABOED_00882 hypothetical protein YheC	8,97	40935	1	5	17	16	0	1
Cot α	GFDABOED_04143 GFDABOED_04143 hypothetical protein cotalpha	6,58	13577	1	1	1	5	23	16

Table S7: Late detected glycosylation related proteins in *B. cereus* ATCC 10876

Protein name	Function	pI	Molecular mass	Spectral counts R1 11h	Spectral counts R2 11h	Spectral counts R1 13h	Spectral counts R2 13h	Spectral counts R1 spores	Spectral counts R2 spores
Yfn operon									
RfbF_2 yfnH	GFDABOED_03472 rfbF_2 Glucose-1-phosphate cytidyltransferase	8,44	17915	0	0	3	1	0	0
	GFDABOED_03474 GFDABOED_03474 hypothetical protein	7,46	41483	0	0	1	2	0	0
RfbG2 YfnG	GFDABOED_03477 rfbG_2 CDP-glucose 4,6-dehydratase	6,19	37967	0	0	5	4	0	0
Cereose operon									
bc3357	GFDABOED_03326 GFDABOED_03326 hypothetical protein	7,27	30715	0	0	0	1	0	0
rfbF1 yfnH	GFDABOED_03327 rfbF_1 Glucose-1-phosphate cytidyltransferase	6,80	28853	0	0	1	6	0	0
rfbG1 yfnG spmG	GFDABOED_03328 rfbG_1 CDP-glucose 4,6-dehydratase	7,71	39259	0	0	1	3	0	0
XNAC operon									
	GFDABOED_00489 GFDABOED_00489 hypothetical protein	6,58	15257	0	1	3	8	1	3
	GFDABOED_00490 GFDABOED_00490 hypothetical protein	4,55	6898	0	3	1	7	1	1
ArnC	GFDABOED_00491 arnC_1 Undecaprenyl-phosphate4-deoxy-4-formamido-L-arabinose transferase	6,56	57591	0	0	0	9	0	0
WbpA	GFDABOED_00492 wbpA UDP-N-acetyl-D-glucosamine 6-dehydrogenase	5,54	46092	0	3	0	17	0	0
ChmD	GFDABOED_00493 chmD dTDP-4-oxo-6-deoxy-D-allose reductase	8,14	36122	0	3	2	45	0	0
Enzymes related to the Rhamnose Rml operon									
GFDABOED_01244	GFDABOED_01244 GFDABOED_01244 hypothetical protein	5,93	35603	0	0	3	0	0	0
GFDABOED_01245	GFDABOED_01245 GFDABOED_01245 hypothetical protein	5,71	29070	1	1	6	2	0	0
GFDABOED_01246	GFDABOED_01246 mycF Mycinamicin III 3"-O-methyltransferase	5,07	32510	11	16	54	24	0	2
Possible operon encoding glycoyl transferase									
GFDABOED_03009	GFDABOED_03009 GFDABOED_03009 hypothetical protein	5,79	90444	0	0	0	6	0	0
GFDABOED_03010	GFDABOED_03010 GFDABOED_03010 hypothetical protein EpsJ	5,93	57280	0	1	3	6	0	2
GFDABOED_03011	GFDABOED_03011 GFDABOED_03011 hypothetical protein	9,51	39281	0	0	0	6	2	6
GFDABOED_03013	GFDABOED_03013 katA_2 Vegetative catalase KatA	6,00	52581	3	3	13	4	31	44

Table S8: Late germination proteins in *B. cereus* ATCC 10876

Protein name	Function	pI	Molecular mass	Spectral counts R1 11h	Spectral counts R2 11h	Spectral counts R1 13h	Spectral counts R2 13h	Spectral counts R1 spores	Spectral counts R2 spores
Enzymes possibly involved in germination									
CwlH	GFDABOED_01516 GFDABOED_01516 hypothetical protein CwlH	6,96	20099	0	0	1	0	6	6
CwIC	GFDABOED_02154 GFDABOED_02154 hypothetical protein CwIC	6,32	35892	1	1	0	29	0	9
CwlK	GFDABOED_02669 GFDABOED_02669 hypothetical protein cwlK	8,99	31347	0	0	1	22	0	2
YpeB	GFDABOED_02746 ypeB Sporulation protein YpeB	6,45	50052	0	0	8	1	21	34
SleB	GFDABOED_02747 sleB Spore cortex-lytic enzyme	9,67	28240	0	1	7	3	9	11
Lyc	GFDABOED_02817 GFDABOED_02817 hypothetical protein Lyc	7,57	31600	0	0	1	11	1	9
CwlD	GFDABOED_02818 GFDABOED_02818 hypothetical protein CwlD	6,30	26419	0	0	0	3	1	4
Lyc	GFDABOED_03661 GFDABOED_03661 hypothetical protein Lyc	4,89	38134	0	0	2	8	1	2
TepA	GFDABOED_03782 tepA Translocation-enhancing protein TepA	5,24	27256	0	3	6	6	23	28
GerAA	GFDABOED_04161 gerAA_3 Spore germination protein A1	6,04	55020	0	0	5	1	5	9
Gpr	GFDABOED_04414 gpr Germination protease	4,90	40311	0	1	5	1	14	22
YrbB	GFDABOED_04516 GFDABOED_04516 hypothetical protein yrbB	9,79	24312	3	30	85	54	153	222
SpoVAD	GFDABOED_05236 spoVAD_2 Stage V sporulation protein AD	5,66	36216	0	2	10	7	22	31
HtrA	GFDABOED_05553 htrA Serine protease Do-like HtrA	6,13	41776	0	3	26	6	31	50

III-Discussion générale

Partie 1 : L'apport de l'approche SR-SIM pour l'étude du positionnement des protéines de la sporulation

L'approche classique pour déterminer la localisation d'une protéine au sein des couches protéiques externes (CPE) des spores et évaluer son rôle potentiel dans l'assemblage des structures reposait sur une combinaison de microscopie de fluorescence et d'analyse d'images de microscopie électronique à transmission (MET). Avant le début de mon projet de thèse, des essais préliminaires réalisés en collaboration avec l'équipe du Dr. Adriano O. Henriques (ITQB, Lisbonne) avaient permis de visualiser l'exosporium de spores de *B. cereus* grâce au SR-SIM. Durant mes travaux de thèse, nous avons optimisé son utilisation pour déterminer précisément la localisation, au sein de l'exosporium, d'une protéine fusionnée au rapporteur SNAP. Ces observations nous ont permis de montrer que les protéines CotE, CotY et ExsY, sont présentes dans le feuillet basal de l'exosporium (Lablaine *et al.*, 2021). De plus, CotY n'est pas restreinte à la région cap et ExsY à la région non-cap comme proposé initialement (Stewart 2015, 2017, Terry *et al.*, 2017). Néanmoins, CotY est essentielle pour la formation des régions cap et ExsY est responsable de la formation de la région non-cap.

1-1) Le SR-SIM permet de visualiser à la fois l'exosporium et le coat pendant leur formation

En SR-SIM, nous avons observé que CotE, CotY et ExsY se positionnent avec la membrane externe de la préspore (OFM) au pôle MCP (mother cell proximal) de la préspore pendant l'engulfment. Lorsque l'engulfment est accompli, CotE, CotY et ExsY apparaissent détachées de l'OFM, à une distance d'environ 250 nm (Lablaine *et al.*, 2021). Cette migration de CotE, CotY et ExsY s'accompagne de la détection d'un fin feuillet marqué par un colorant spécifiques des membranes, le MTG. L'analyse de cellules en sporulation par SR-SIM dans un mutant *cotE* nous a permis de conclure que ce fin feuillet correspond au cap de l'exosporium séparé de l'OFM par la formation de l'interspace (IS) (Lablaine *et al.*, 2021). L'analyse en SR-SIM permet donc de suivre l'évolution de l'assemblage de l'exosporium dès lors que le cap est séparé de l'OFM par l'IS.

Au cours de ces travaux, nous avons également noté un dépôt du substrat TMR-Star de forme ovale et disposé de manière régulière dans les régions internes de la spore (Lablaine *et al.*, en préparation). Ce dépôt est aucunement lié aux fusions SNAP, car également observé dans les endospores de souches non transformées. L'apparition pendant la sporulation du signal fluorescent rouge dû au marquage de la préspore par le TMR est accompagnée d'un fort signal de fluorescence verte émis par le marqueur MTG (Chap III). Notamment, ce fort signal du MTG révèle parfaitement la séquence de dépôt des fragments de coat pendant la sporulation, telle qu'observée en MET (Lablaine *et al.*, 2021). L'analyse de l'assemblage des structures dans un mutant *cotE* de *B. cereus* nous a permis de confirmer que le marquage non spécifique du TMR et le fort signal du MTG proviennent d'une fixation de ces deux marqueurs sur les fragments de coat, lorsque ces deux marqueurs se déposent autour de la préspore au cours de la sporulation (Chap III).

Le MTG permet une reconnaissance simple des fragments de coat pendant un processus d'assemblage régulier, mais également lorsque l'assemblage du coat est perturbé. Dans ces deux cas, le signal émis par la fixation du MTG sur les fragments de coat tranche fortement avec le signal plus faible émis par la fixation du MTG sur l'OFM ou les autres membranes (Fig. 16, panels ii-iv). La technologie du SR-SIM utilise une reconstruction mathématique non linéaire permettant d'augmenter la résolution spatiale des signaux détectés. En d'autres termes, lors de cette reconstruction, les signaux perdent en partie leur aspect quantitatif. Ainsi, lorsque le coat est complètement assemblé, le signal émis par le MTG autour de la préspore est continu, comme il le serait dans le sporange d'une souche dépourvue de coat (Fig. 16, comparer les sporanges marqués d'un astérisque vert en i et iv). L'utilisation du TMR permet de différencier ces deux situations, car le TMR ne se fixe pas aux sporanges dépourvus d'un coat (Fig. 16, panel i), alors que le TMR émet un signal de forme ovale dans les sporanges présentant un coat complet (Fig. 16, panel iv). Ainsi, pour affirmer que le coat est continûment assemblé autour de la préspore, le MTG doit être utilisé en combinaison avec le TMR. Nous pouvons conclure que l'approche SR-SIM permet de visualiser, à la fois, l'exosporium et le coat de *B. cereus* pendant leur formation.

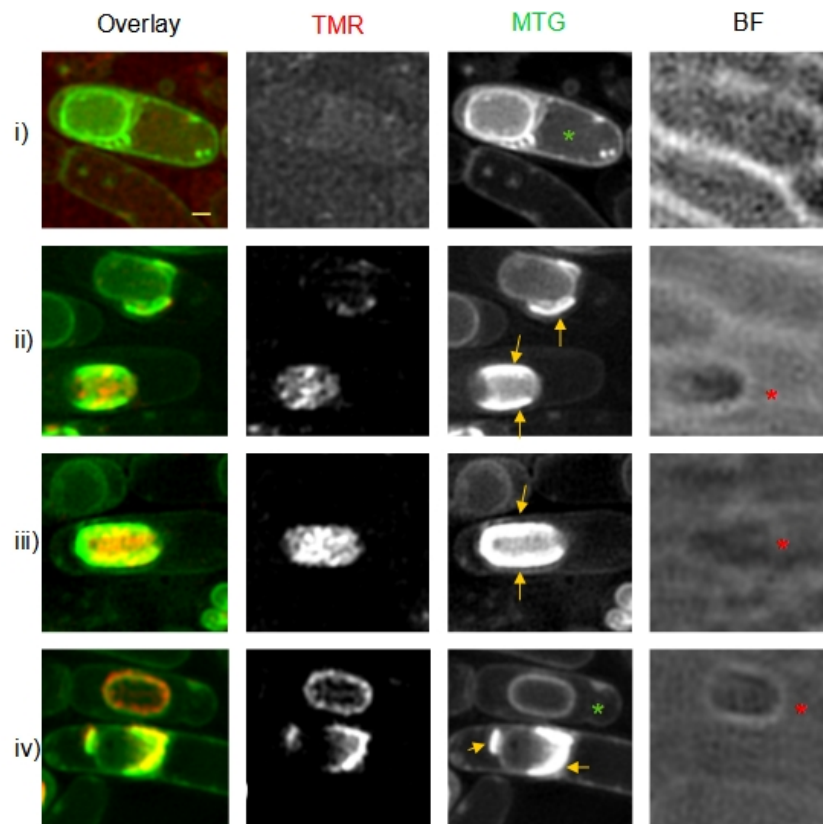


FIG 16. Le TMR doit être utilisé en combinaison avec le MTG pour déterminer si l'assemblage du coat est complet. Des cellules de *B. cereus* (WT) ATCC 14579 sporulant à 20 °C, ont été marquées avec le TMR-Star et le MTG puis imagées avec le SR-SIM. Un signal fort émis par le MTG correspond au dépôt des fragments de coat (flèches jaunes). Le signal émis par la fixation du MTG ne permet pas de distinguer, (iv) une cellule avec un assemblage de coat complet et (i) d'une cellule où le coat n'a pas débuté son assemblage (comparer les cellules présentant un astérisque vert). Cependant (i) le TMR ne se fixe pas aux sporanges où le coat n'est pas assemblé (le signal a été amplifié dans le champ TMR pour montrer l'absence de fixation spécifique à la préspore, alors que (iv) le TMR forme un ovale régulier sur les préspores où le coat est complètement assemblé. (ii et iii) dans les sporanges où le coat est en cours de formation, les signaux de fixation du MTG aux fragments de coat (flèche jaune) tranchent fortement des signaux provenant de la fixation du MTG sur la membrane de la préspore. (iv) le MTG permet également de visualiser directement les assemblages de coat incomplets comme visibles sur la cellule présentant un dépôt de coat anormal au MCP, alors que les bords longitudinaux ne sont pas couverts. Un astérisque rouge indique une cellule réfringente apparaissant sombre dans le champ brightfield (BF). La barre d'échelle représente 0,5 µm.

1-2) Les limites et avantages du SR-SIM pour l'analyse du positionnement des protéines de la sporulation

L'approche SR-SIM présente des avantages, mais aussi quelques limites pour l'analyse du positionnement des protéines pendant la sporulation. Le TMR se fixant non spécifiquement au coat, il est difficile de déterminer quel est la part de signal émis par le TMR dans la région du coat dûe à une protéine fusionnée à l'étiquette SNAP. L'utilisation du SR-SIM est donc plus particulièrement optimisée pour déterminer (i) le positionnement de protéines dont l'assemblage est précoce, avant le dépôt des fragments de coat et/ou (ii) si une protéine est présente au sein de l'exosporium.

Le SR-SIM possède l'immense avantage d'être une approche non destructive. Cette technique permet de visualiser les structures de la spore au plus près de leur état natif, ce qui est un atout par rapport à l'approche classique par MET qui peut générer des artefacts lors de la coupe des échantillons. Ainsi, grâce au SR-SIM, nous avons pu mettre en évidence la formation d'un second cap de l'exosporium dans un mutant *exsY* (Lablaine *et al.*, 2021). Ce cap formé au MCD pôle est plus petit et plus facilement dissocié de la spore que le cap formé au MCP. Ces caractéristiques peuvent expliquer que la présence de ce cap au pôle MCD dans un mutant *exsY* n'ait pas été observé en MET dans des études antérieures (Johnson *et al.*, 2006, Boydson *et al.*, 2006).

L'analyse SR-SIM combinée à la propriété du coat de *B. cereus* à fixer certaines sondes fluorescentes, constitue un nouvel outil pour étudier efficacement la formation des CPE des spores et la localisation des protéines au sein de ces feuillettes lors de sporulation.

1-3) La structure de l'exosporium affecte l'émission de fluorescence

Au cours des nombreuses analyses en microscopie de fluorescence de la sporulation de *B. cereus* réalisées dans le cadre de cette thèse, nous avons noté un certain nombre d'éléments dont je souhaiterais discuter ici. Certaines de ces observations nous ont intrigués et jettent un nouveau regard sur les données disponibles de la littérature.

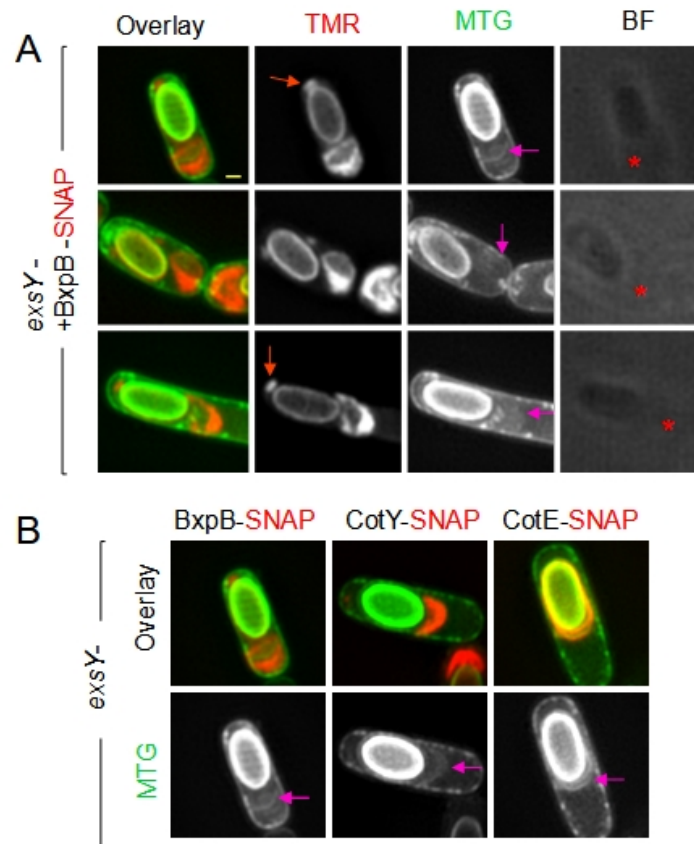


FIG 17. Association spécifique de BxpB-SNAP avec les caps du mutant *exsY*. (A) Des sporanges réfringents (astérisque rouge) du mutant *exsY* (fond génétique ATCC 10876) exprimant BxpB-SNAP ont été marqués avec le TMR-Star et le MTG puis imagés avec le SR-SIM. Dans le mutant *exsY*, deux caps sont assemblés (Lablaine *et al*, 2021). Le cap présent au pôle MCP de la préspore est marqué par MTG (flèche rose). BxpB-SNAP est associée avec le cap proximal. Un signal de BxpB-SNAP indique également son association avec le plus petit cap formé par un mutant *exsY* au MCD pôle de la préspore (flèche rouge). Dans un contexte sauvage ATCC 10876 ou 14579 aucun signal spécifique de BxpB-SNAP n'est visible par microscopie de fluorescence (données non montrées). Ainsi, dans *B. cereus*, BxpB est assemblée dans les régions cap de l'exosporium. Ce résultat contraste avec les données de positionnement de BxpB obtenues dans *B. anthracis* indiquant que BxpB n'est pas positionnée dans la région cap (Thompson *et al*, 2012). (B) Dans le mutant *exsY*, BxpB-SNAP est positionnée sur les faces externes du MCP cap en comparaison de CotY — et CotE-SNAP qui co-localisent avec le signal du feuillet basal du cap. Ce résultat indique qu'une bordure en brosse est assemblée dans le mutant *exsY*. La barre d'échelle en (A) représente 0,5 μ m.

Dans un mutant *exsY* de *B. cereus*, un signal TMR très reconnaissable et spécifique de CotY-SNAP est nettement visible pendant la sporulation et dans les spores (Lablaine *et al.*, 2021). De façon étonnante, nous ne sommes pas parvenus à visualiser de signaux spécifiques de CotY-SNAP dans la souche parentale (WT) ATCC 10876 (données non publiées). Cette construction CotY-SNAP permet pourtant de compléter le phénotype d'une souche congénique *cotY*, montrant sa fonctionnalité dans le fond génétique ATCC 10876 (Lablaine *et al.*, 2021). Dans la souche *B. cereus* (WT) ATCC 14579, CotY-SNAP émet un signal identifiable. Pourquoi CotY-SNAP n'est-il pas détectable dans la souche sauvage ATCC 10876 ? Nous avons obtenu des résultats similaires avec une construction BxpB-SNAP, une protéine de l'exosporium (Steichen *et al.*, 2005). Dans la souche WT ATCC 14579, le signal de BxpB-SNAP n'est pas détectable en SR-SIM, alors qu'un signal spécifique de BxpB-SNAP est détectable dans une souche congénique *cotE* ou dans un mutant *exsY* dans la souche ATCC 10876 (Fig. 17 et données non publiées). Ces résultats suggèrent que l'architecture des feuillettes de la spore, potentiellement modifiée dans des souches avec des fonds génétiques variés, affecte l'émission de fluorescence par certaines fusions traductionnelles. Seuls les caps de l'exosporium sont formés dans un mutant *exsY* de *B. cereus* ATCC 10876 (Boydson *et al.*, 2006, Lablaine *et al.*, 2021). Par ailleurs, bien que ExsY ne soit pas nécessaire à la mise en place du cap, il en est un constituant (Lablaine *et al.*, 2021) et il est donc possible que la structuration du cap soit perturbée en absence de ExsY. Dans ce cas, les fusions CotY-SNAP et BxpB-SNAP émettent des signaux fluorescents (Fig. 17). En comparaison avec celui d'autres souches, l'exosporium formé par *B. cereus* ATCC 14579 est réputé fragile, ayant tendance à se détacher de la spore (Faille *et al.*, 2007). Cette fragilité peut refléter une structure différente de l'exosporium de *B. cereus* ATCC 14579 et pourrait expliquer que CotY-SNAP émette un signal dans cette souche, et non dans la souche sauvage ATCC 10876. Similairement, l'émission de signaux par BxpB-SNAP dans le mutant *cotE* (qui est un constituant important de l'exosporium) pourrait être liée à une structuration particulière de l'exosporium.

1.4) Le modèle cap/non-cap peut-il être lié à un biais d'émission des constructions fluorescentes ?

Nos résultats revisitent le concept de protéines cap et non-cap, défini par des études précédentes (Stewart., 2015, 2017). Ainsi, ce modèle cap/non cap peut-il être lié à un biais d'émission des constructions fluorescentes utilisées ? Dans *B. anthracis*, certaines protéines sont

décrites comme positionnées exclusivement dans la région cap de l'exosporium, telles que CotY, ou uniquement dans la région non-cap, comme la protéine BclB (Thompson *et al.*, 2012). D'autres protéines, comme BxpB, sont décrites comme étant majoritairement présentes dans la région non-cap (Thompson *et al.*, 2011). Dans nos résultats, CotY ne semble pas positionnée uniquement au cap, mais se positionne dans l'ensemble d'un exosporium mature (Lablaine *et al.*, 2021). De même, dans nos travaux, BxpB semble positionnée sur les faces externes du MCP cap (Fig. 17 flèche rose) ainsi qu'au petit MCD cap (flèche rouge), en absence de ExsY.

Deux possibilités peuvent expliquer ces différences entre nos observations et les données de la littérature. Tout d'abord, bien qu'appartenant toutes deux au groupe *B. cereus sensu lato*, *B. cereus* et *B. anthracis* sont deux espèces différentes et l'assemblage de leur exosporium pourrait répondre à des déterminismes moléculaires différents. En faveur de cette hypothèse, CotE n'est pas détectée dans la fraction d'exosporium de *B. anthracis*, alors que CotE est détectée dans l'exosporium de *B. cereus* (Giorno *et al.*, 2007, Terry *et al.*, 2017, Lablaine *et al.*, 2021). Cependant, nos travaux montrent que les mutants *cotE* et *exsY* de *B. cereus* possèdent des phénotypes similaires à ceux rapportés pour ces mutants dans *B. anthracis* : le cap n'est pas formé en absence de CotE, la séquence de dépôt des fragments de coat autour de la préspore dans les souches mutantes est modifiée par rapport au WT, ainsi qu'un défaut d'attachement de l'exosporium aux spores (Giorno *et al.*, 2007, Bressuire *et al.*, 2016, Boone *et al.*, 2018, Lablaine *et al.*, 2021). De plus, un cap est bien formé dans la région MCP de la préspore mais la région non-cap de l'exosporium n'est pas assemblée dans un mutant *exsY* (Boydson *et al.*, 2006, Lablaine *et al.*, 2021). Enfin, le phénotype des spores d'une souche *cotY* est similaire dans ces deux organismes, avec un exosporium entourant totalement la spore (Johnson *et al.*, 2006, Boone *et al.*, 2018). Ces résultats suggèrent que les rôles de CotE, CotY et ExsY sont conservés entre *B. cereus* et *B. anthracis*.

Une deuxième possibilité pourrait expliquer ces différences, à savoir que la structure ou l'état de maturation du cap de *B. anthracis* serait différente de celle de la région non-cap sans que ce soit lié à une différence de composition protéique. En ce sens, une étude par immunofluorescence montre que BclB, qui possède une séquence d'insertion dans l'exosporium et des domaines « collagen-like » est positionnée dans la région non-cap (Thompson *et al.*, 2012). De façon étonnante, en absence de BclB, CotY émet un signal homogène autour de la spore de *B. anthracis*, signal qui rappelle le positionnement de CotY-SNAP, tel que nous l'avons observé par SR-SIM dans *B. cereus* ATCC 14579 (Thompson *et al.*, 2012, Lablaine *et al.*, 2021). De façon

similaire, alors qu'une fusion BxpB-mcherry semble positionnée dans la région non-cap dans une souche WT, BxpB-mcherry est positionnée dans la région cap dans une souche $\Delta bclB$ de *B. anthracis*, ce qui suggère que BclB est nécessaire à l'assemblage de CotY et BxpB (Thompson *et al.*, 2012). Une autre étude montre que BxpB est mise en évidence par immunomarquage en MET dans un mutant *bclA*, alors qu'elle l'est très peu dans une souche sauvage (Steichen *et al.*, 2005). Ces résultats suggèrent que la structuration ou la présence de certaines protéines de la bordure en brosse à la surface de l'exosporium peuvent interférer avec l'identification du positionnement des protéines au sein des feuillettes plus internes de la spore.

Une autre interprétation de ces résultats peut être formulée à la lumière de nos récentes observations. Le cap, décrit comme une structure fragile (Steichen *et al.*, 2007), est détectée très précocement pendant la sporulation contrairement à la région non-cap observée tardivement. Ainsi, la structure du cap ou l'état de maturité du cap pourrait différer de ceux de la région non-cap. Cette différence de structuration des régions de l'exosporium pourrait affecter l'émission de fluorescence de constructions positionnées dans ces régions. Ainsi, en absence de BclB, la structure générale de l'exosporium pourrait être modifiée, et le signal fluorescent de CotY-SNAP pourrait être visible dans toutes les régions de l'exosporium. Il est donc possible que les signaux de fluorescence montrant le positionnement des protéines BxpB et CotY observés dans les spores de *B. anthracis* soient, en réalité, issus d'un biais d'émission de signaux au sein de ces structures. L'absence de signal de CotY dans la région non-cap de spores de *B. anthracis* a été visualisée uniquement dans des spores matures, par microscopie de fluorescence (Thompson *et al.*, 2012). Il reste donc tout à fait possible que CotY soit, en réalité, également positionnée dans la région non-cap des spores de *B. anthracis* mais que la fusion CotY-mcherry n'émette pas de signal dans cette région, en raison de sa structuration particulière.

Partie 2 : Le « morphogenetic scaffold » de *B. cereus*.

Lorsque j'ai débuté ma thèse, on ne connaissait que peu de facteurs protéiques intervenant dans les étapes précoces de l'assemblage des CPE des spores du groupe *B. cereus*. Ces données se résumaient à : (i) SpoIVA et ExsA sont impliquées dans l'attachement du coat et de l'exosporium ; (ii) CotE, CotO et YwdL sont nécessaires à l'attachement de l'exosporium ; (iii) CotY est impliquée dans la formation du cap et (iv) ExsY est nécessaire à la formation de la partie non-cap (Fig. 15) (Boone *et al.*, 2018, Giorno *et al.*, 2007, Bressuire *et al.*, 2016, Bailey-Smith *et al.*,

2005, Johnson *et al.*, 2006, Boydson *et al.*, 2006, Terry *et al.*, 2011). Par ailleurs, on ignorait la dynamique d'assemblage de ces protéines au cours de la sporulation et seule une interaction entre CotE et CotO a récemment été mise en évidence (Boone *et al.*, 2018). Si l'on compare avec les connaissances disponibles sur l'assemblage des coats de *B. subtilis* (Fig 10-13) (Mckenney *et al.*, 2013, Driks and Eichenberger, 2016), peu de données étaient disponibles pour déterminer l'origine des singularités des CPE des spores du groupe *B. cereus*, ce que j'ai étudié au cours de mon projet de thèse.

2-1) Assemblage bidirectionnel et maturation unidirectionnelle de l'exosporium

Pour cela, nous avons étudié les relations existant entre CotE, CotY et ExsY, trois protéines liées à l'assemblage de l'exosporium, dont les homologues sont au cœur de la mise en place du crust des spores de *B. subtilis* (Mckenney *et al.*, 2010, Imamura *et al.*, 2011, Shuster *et al.*, 2019a). Nos résultats ont permis de démontrer que le mécanisme d'assemblage du feuillet basal, de l'exosporium et du crust repose sur des bases communes (Lablaine *et al.*, 2021), que nous pouvons résumer ainsi: (i) CotE de *B. cereus* peut interagir avec CotY et ExsY comme son homologue de *B. anthracis* interagit avec CotY et CotZ, (ii) CotE, CotY et ExsY s'assemblent autour de la préspore comme CotE de *B. subtilis*, (iii) le positionnement de CotY et ExsY nécessite l'assemblage préalable de CotE, (iv) l'assemblage de CotY dépend en partie de ExsY, et enfin (v) l'assemblage de CotE est indépendant de ExsY et donc de CotY. Toutes ces dépendances génétiques reflètent, dans l'ensemble, celles observées pour les protéines homologues de *B. subtilis* (Mckenney *et al.*, 2010, Shuster *et al.*, 2019a).

Nous avons également découvert que l'encapsulation par CotE, CotY et ExsY est achevée avant que le coat, le cortex, ou la partie non-cap de l'exosporium ne soient détectables par MET (Lablaine *et al.*, 2021). Par ailleurs, nous avons confirmé ce résultat grâce au marquage par le MTG du dépôt du coat, tel que décrit dans la section II-2. Ainsi, en analysant nos données relatives au positionnement de CotE, CotY et ExsY, nous avons observé que l'encapsulation par les protéines CotE, CotY et ExsY est terminée avant l'apparition des forts signaux de MTG autour de la préspore (Fig. 18, flèches jaunes). Ce résultat montre que CotE, CotY et ExsY forment une matrice immature dans la région non-cap de la préspore jusqu'à la formation du coat. Nous avons qualifié cette matrice de « morphogenetic scaffold » (ou MS) que l'on pourrait traduire par « armature formée

par les protéines morphogénétiques des CPE des spores ». Ainsi, la formation de l'exosporium repose sur un assemblage bidirectionnel de CotE, CotY et ExsY (Lablaine *et al.*, 2021) et s'oppose au modèle unidirectionnel de l'assemblage de l'exosporium décrit jusqu'alors (Terry *et al.*, 2017, Stewart, 2015, 2017).

La proposition du modèle d'assemblage unidirectionnel de l'exosporium reposait sur deux éléments : (i) l'assemblage de l'exosporium est stoppé à la formation d'un cap dans un mutant *exsY* (Boydson *et al.*, 2006) et (ii) la partie non-cap de l'exosporium est détectée de façon concomitante au dépôt du coat qui s'effectue d'abord dans les régions longitudinales, puis dans la région MCD de la présore (Ohye and Murrel 1973, Boone *et al.*, 2018). Grâce à l'analyse en SR-SIM, nous avons mis en évidence l'existence dans un mutant *exsY* d'un second cap qui avait échappé aux analyses par MET (Lablaine *et al.*, 2021). Néanmoins, nos analyses par SR-SIM confirment les observations par MET qui montrent que la partie non-cap de l'exosporium est détectée tardivement comparativement au cap présent au MCP de la présore (Lablaine *et al.*, 2021). La détection par MET et SR-SIM de la partie non-cap de l'exosporium, d'abord dans les régions longitudinales de la présore, puis au pôle MCD, suggère que la maturation du MS aurait lieu de façon unidirectionnelle. Cependant, grâce au marquage du développement du coat par le MTG, nous avons observé que la région MCD du MS est maturée avant que le coat ne se développe dans cette région (Fig. 18, tête de flèche rose).

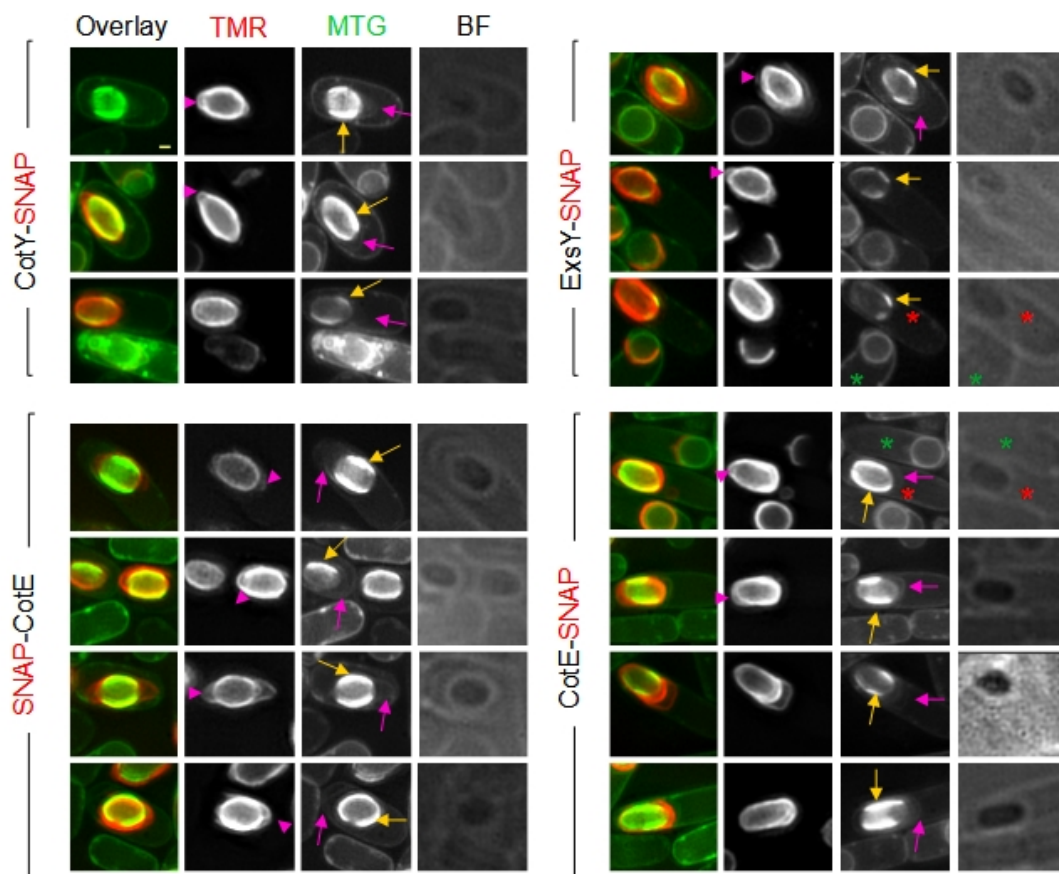


FIG 18. Positionnement des protéines du morphogenetic scaffold de *B. cereus* durant le dépôt des fragments de coat. Des cellules de *B. cereus* (WT) ATCC 14579 sporulant à 20 °C, exprimant les constructions fluorescentes indiquées ont été marquées avec le TMR-Star et le MTG puis imagées avec le SR-SIM. Un signal fort émis par le MTG correspond au dépôt des fragments de coat (flèches jaunes). Le cap de l'exosporium est indiqué par une flèche rose. Des têtes de flèche rose indiquent la migration des signaux provenant de CotE, CotY et ExsY dans la région opposée au cap. Notez que dans ces sporanges, le coat n'est assemblé que dans les régions latérales de la préspore. Cette observation indique que la maturation du MS dans la région opposée au cap n'a pas lieu de façon concomitante à l'assemblage du coat. On peut également voir que les sporanges avec un signal fort de MTG apparaissent noirs (astérisque rouge) dans le champ brightfield (BF) contrairement aux sporanges où aucun fragment de coat n'est détecté et/ou ExsY — et CotE-SNAP n'encapsulent pas le sporange (astérisque vert). Cette opacité représente la déshydratation du cœur qui est observée lorsque les fragments de coat se déposent autour de la préspore (Lablaine et al 2021). Ces images valident les observations réalisées en MET indiquant que l'encapsulation de CotE, CotY et ExsY est terminée avant le début de l'assemblage du coat (Lablaine et al 2021). Enfin, on peut noter que la structure de la préspore devient plus ovoïde lorsque le coat se développe. La barre d'échelle représente 0,5 µm.

2-2) Modèle de l'asymétrie de maturation du MS

Le cap de l'exosporium, positionné au pôle MCP de la préspore, est visible par MET dès le début de l'engulfment et reflète le positionnement de CotE, CotY et ExsY sous la forme d'un cap (Fig. 19A, feuillet noir). L'assemblage de CotE, CotY et ExsY est en attente pendant toute la durée de l'engulfment (Fig. 19A, feuillet violet). Ainsi une hypothèse et un modèle peuvent expliquer l'asymétrie de maturation du MS : la synthèse, uniquement pendant l'engulfment, d'un « facteur 1 », encore non identifié et impliqué dans la modification d'une ou des protéines du cap, permettrait la maturation spécifique de ces protéines dans la région cap (Fig. 19A, carré jaune). La synthèse du « facteur 1 » serait stoppée à la fin de l'engulfment, ne permettant alors pas la maturation de CotE, CotY et ExsY dans la région non-cap. Dans *B. subtilis*, les protéines de classe I, telles que YhaX et SpoIVA, sont synthétisées spécifiquement pendant l'engulfment et sont inhibées par SpoIIID dès la fin de l'engulfment (Mckenney and Eichenberger, 2012). Une régulation transcriptionnelle similaire pour le « facteur 1 » pourrait être envisagée (Fig. 19A).

Dès la fin de l'engulfment, le cap subit un second évènement de maturation qui le sépare de l'OFM, par la formation de l'IS (Fig. 19B, IS). Ce second évènement de maturation a lieu avant l'encapsulation par CotE, CotY et ExsY (Fig. 2B) (Lablaine *et al.*, 2021). Ici, deux hypothèses peuvent être proposées pour expliquer la séparation spécifique de CotE, CotY et ExsY de l'OFM dans la région MCP de la préspore : (i) un « facteur 2 » pourrait être synthétisé précisément à la fin de l'engulfment et serait rapidement dégradé, stoppant ainsi la maturation de CotE, CotY et ExsY dans la région non-cap de la préspore. Néanmoins la fenêtre temporelle existant entre la fin de l'engulfment et la mise en place du MS au second pôle semble trop courte pour permettre la synthèse, puis la dégradation, d'une protéine ; (ii) la maturation spécifique du MCP cap pendant l'engulfment par le « facteur 1 » constituerait un « marquage » (Fig. 19A-B carrés jaune) pour un second évènement de maturation par un « facteur 2 » (non identifié) qui permettrait la séparation des protéines du MS de l'OFM, uniquement dans la région MCP de la préspore (Fig. 19B). Le complexe CotE/CotY/ExsY, non mûré par le « facteur 1 » dans la région non-cap de la préspore ne pourrait ainsi pas être mûré par « le facteur 2 », pourtant présent (Fig. 19C). Dans *B. subtilis*, les protéines synthétisées spécifiquement à la fin de l'engulfment sont activées par SpoIIID (Mckenney *et al.*, 2012).

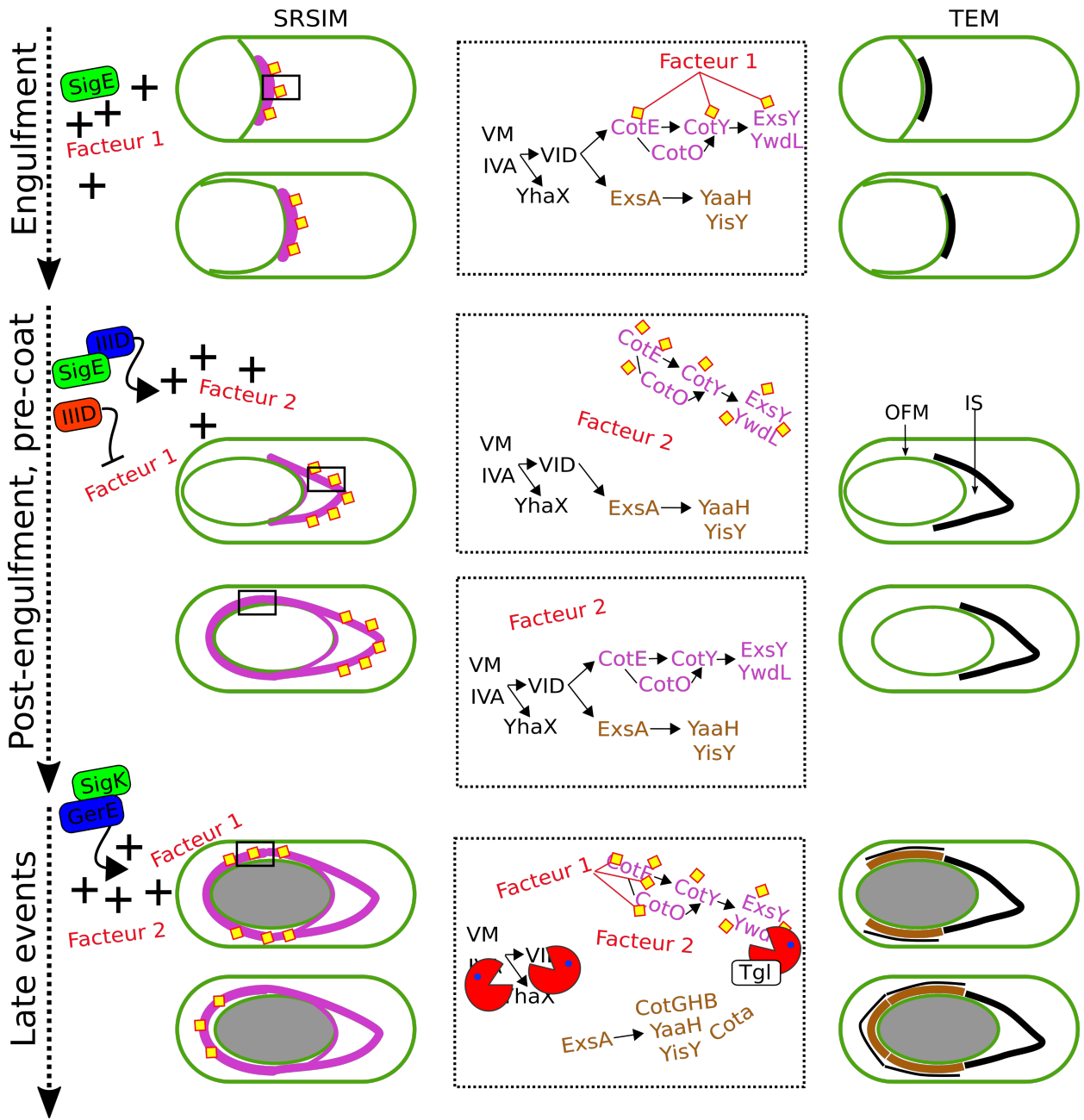


FIG 19. Modèle de la maturation différentielle de la région cap et non-cap de l'exosporium. (A-C) À gauche est représentée la dynamique d'assemblage du MS (en rose) comme visualisée par SR-SIM. À droite sont représentées les structures comme visualisées par MET. Au centre sont schématisées les possibles interactions entre les protéines des CPE dans la zone du sporange indiquée par un carré noir (SR-SIM). Au centre, les protéines du plancher du MS (en police noire) encapsulent la préspore avec la progression de l'engulfment (non montré). Les protéines possiblement présentes dans le coat (en marron) et celles du MS présentes dans l'exosporium des spores (en violet) sont indiquées. Des facteurs inconnus 1 et 2 permettent la maturation spécifique d'une partie seulement du scaffold. (A) Pendant l'engulfment, le cap est formé par les protéines du MS ensuite associées à l'exosporium (en violet). La synthèse sous le contrôle de σ^E du facteur 1 permet la maturation (carré jaune) des protéines du MS uniquement dans le cap. (B-C) Après l'engulfment, SpoIIIID (IIID) est synthétisée fortement et inhibe la production du facteur 1 et des protéines du plancher du MS. SpoIIIID induit également la synthèse du facteur 2. (B) Le facteur 2 permet de modifier les protéines du MS préalablement modifiées par le facteur 1. (C) Les protéines du MS encapsulent la préspore. Ainsi seules les protéines positionnées dans la région cap (en violet) sont marquées et sont modifiées par le facteur 2 ce qui entraîne la formation de l'interspace (IS) dans la région cap. (D) Lorsque σ^K devient active, le coat débute son assemblage. σ^K (et possiblement GerE) induit la synthèse du facteur 1 et maintient la synthèse du facteur 2. Le facteur 1 modifie les protéines du MS (en violet) d'abord dans les régions longitudinales de la préspore puis au pôle distal. À mesure que le facteur 1 mature les protéines du MS, elles sont modifiées par le facteur 2. Les protéines du plancher du MS sont dégradées par YabG (Pacman rouge). YwdL et possiblement d'autres protéines du MS, sont également modifiées par YabG et Tgl. Les protéines tardives comme CotGHB et CotA s'associent à ExsA et permettent la maturation du coat.

Dans *B. cereus*, la synthèse du « facteur 2 » pourrait aussi être activée par SpoIIID (Fig. 19B), dont la quantité augmente fortement à la fin de l'engulfment de *B. cereus*, comme le montrent nos données de protéomique (Chap IV). Par ailleurs, un pic de l'activité transcriptionnelle du promoteur de *spoIIID* est observé dès la fin de l'engulfment (données non préliminaires non montrées).

Dans la région non-cap, l'évènement de maturation du MS semble dépendre de σ^k , car il se produit de façon concomitante au dépôt des fragments de coat (Fig. 19D). On peut suggérer ici deux hypothèses pour expliquer cette temporalité particulière de la maturation de la partie non-cap du MS : (i) un « facteur 3 », synthétisé sous le contrôle de σ^k (et possiblement GerE) permettrait la maturation de la région non-cap du MS (non montré) ou (ii) la synthèse *de novo* « du facteur 1 » sous contrôle de σ^k (et possiblement de GerE) permettrait un premier évènement de maturation dans la région non-cap du MS, générant de ce fait le substrat pour le « facteur 2 » (Fig. 19D). L'identification des potentiels « facteurs » à l'origine de la maturation du MS constitue une perspective de recherche attrayante, car ils semblent être la clef pour expliquer deux singularités observées pendant l'assemblage des CPE des spores du groupe *B. cereus* : (i) un feuillet protéique (le cap de l'exosporium) est détectable par MET pendant l'engulfment et (ii) la formation de l'IS sépare une partie des CPE de la surface de la présore. D'autre part, la régulation transcriptionnelle par σ^E /SpoIIID- et σ^k /GerE+ envisagée pour le « facteur 1 » serait tout à fait originale et encore jamais observée pour une protéine de la sporulation (Fig. 19).

2-3) Quelle protéine du « Morphogenetic scaffold » serait la cible des maturations ?

Dans une souche exprimant CotE-SNAP, un blocage de la séparation du cap (avec une possible maturation par le « facteur 2 ») présent au pôle MCP de la présore est observé (Lablaine *et al.*, 2021). Néanmoins, lorsque les sporanges sont réfringents, ce blocage n'est pas visible. Ce résultat suggère que la formation de l'IS dans la région MCP de la présore peut être compensée par l'évènement de maturation dépendant de σ^k et affectant le MS dans la région non-cap (Fig. 19B). Ce résultat montre également que CotE est liée à la formation de l'IS et donc à l'évènement de maturation n° 2.

Les protéines CotE et CotO de *B. anthracis* interagissent et sont impliquées dans la

formation du cap (Boone *et al.*, 2018). L'interruption de l'interaction entre CotE et CotO serait à l'origine de la formation de l'IS. Ainsi, CotE resterait associée avec le coat et CotO migrerait avec le feuillet basal de l'exosporium (Boone *et al.*, 2018). Cependant, nos résultats montrent que CotE, dans *B. cereus*, fait partie du feuillet basal de l'exosporium, lorsque celui-ci se sépare de l'OFM (Lablaine *et al.*, 2021).

Notre démonstration de la migration de CotE avec la formation de l'IS est en accord avec deux études antérieures montrant que la partie N-terminale de CotE est identifiée parmi les composants de l'exosporium de *B. cereus* d'une part (Todd *et al.*, 2003) et que la protéine CotE est détectée en immunoblot dans des fractions d'exosporium d'autre part (Terry *et al.*, 2017). La présence de ce fragment de CotE suggère qu'un clivage de CotE permettrait la séparation de l'exosporium du coat sous-jacent (Henriques and Moran, 2007)

Afin de déterminer si un clivage de CotE a effectivement lieu, nous avons analysé les peptides de CotE détectés dans nos échantillons de protéomique pour déterminer si certains présentait seulement un site de coupure par la trypsine. Cette analyse a révélé la présence de deux peptides de CotE issus d'une coupure non trypsique, suggérant un possible clivage dans la région C-terminale de CotE (résultats non présentés). Ainsi on peut envisager que l'ajout de l'étiquette SNAP au domaine Cter de CotE puisse gêner un clivage dans cette région et interférer avec la formation de l'IS. Cependant, il faut noter que le clivage génère un fragment N-ter de CotE identifié par analyse protéomique bien plus important que le fragment de 8 kDa, rapporté dans la littérature (Todd *et al.*, 2003).

Le site de clivage putatif pourrait être modifié sur une construction plasmidique, qui introduite dans le mutant *cotE*, permettrait de déterminer si des défauts de formation de l'IS sont visualisés par MET et/ou SR-SIM. Par ailleurs, si l'on parvient à identifier le facteur 2 impliqué dans ce clivage, une reconstruction *in vitro* du clivage d'un allèle CotE sauvage et de l'allèle avec le site de clivage muté constituerait une belle démonstration.

2-4) Débarrasser le plancher (du coat)

Dans notre analyse protéomique, nous avons identifié la présence spécifique des enzymes YabG et Tgl dans les sporanges réfringents (Fig. 19D) (Chap IV). La protéine YwdL, homologue de

GerQ et dont la maturation dépend de YabG et Tgl dans *B. subtilis* (Kuwana *et al.*, 2006), est détectée dans le feuillet basal de l'exosporium (Terry *et al.*, 2011). Ainsi, des modifications par Tgl et YabG des protéines du feuillet basal de l'exosporium telles que YwdL pourraient avoir un rôle dans la maturation du MS (Fig. 19D). Dans *B. subtilis*, YabG est également impliquée dans la dégradation de SpoIVA et de SafA en fin de sporulation (Takamatsu *et al.*, 2000). Des homologues de ces deux protéines sont présents durant la sporulation de *B. cereus* (Chap IV). De plus, la détection de SpoIVA diminue en fin de sporulation dans *B. cereus* et *B. anthracis* (Giorno *et al.*, 2007, Chap IV) et est concomitante à la détection de YabG (Chap IV). Ce résultat suggère que SpoIVA pourrait être modifiée par YabG dans *B. cereus* (Fig. 19D). Dans le même temps, nous avons observé la diminution des peptides correspondant à SpoVID et YhaX, deux orthologues de protéines de classe I, qui forment le plancher des coats de *B. subtilis* (Mckenney *et al.*, 2010). Ainsi, des modifications post-traductionnelles (MPT) similaires pourraient modifier ces protéines en fin de sporulation entraînant la disparition du plancher du MS dans *B. cereus* (Fig. 19D).

Un parallèle entre la disparition des protéines du plancher des CPE des spores et un résultat surprenant concernant CotE pourrait se dessiner. Dans une souche WT et dans un mutant *exsY* de *B. cereus*, CotE est détectée par immunoblot tout au long de la sporulation (Giorno *et al.*, 2007, Lablaine *et al.*, 2021) Cependant, CotE n'est plus détectée par immunoblot et en microscopie de fluorescence dans les spores d'un mutant *exsY*, et également dans un mutant *cotY* (Lablaine *et al.*, 2021). De façon surprenante, les spores d'un mutant *cotY* sont encapsulées dans un exosporium complètement formé (Johnson *et al.*, 2006), suggérant que CotE n'est pas indispensable au maintien de l'architecture de l'exosporium dès lors que les protéines du feuillet basal ont été correctement positionnées dans les phases précoces de la sporulation (Lablaine *et al.*, 2021). Ainsi on peut suggérer que, similairement, la disparition de SpoIVA, SpoVID et YhaX en fin de sporulation pourrait indiquer que ces protéines sont uniquement nécessaires à la mise en place d'une plateforme d'assemblage formée de CotE et de ExsA (Fig. 19 A-C).

Enfin, il a été montré que CotE est détectée dans des spores formées à une température sous-optimale de 20 °C en plus grande quantité que dans des spores formées à 37 °C (Bressuire-Isoard *et al.*, 2016). Les auteurs proposent que CotE soit synthétisée en plus grande quantité ou bien que CotE soit extraite plus facilement des spores. Il est également possible que CotE subisse des modifications post-traductionnelles dépendantes de la température de sporulation, comme l'évoque la modification de l'activité de Tgl et YabG de *B. subtilis* par la température de

sporulation (Kuwana 2006). De même, la plus faible quantité de CotE extraite des spores produites à 20 °C pourrait être due à une modification, CotE ne semblant pas nécessaire pour maintenir la structure de l'exosporium lorsque celui-ci est formé (Lablaine *et al.*, 2021).

Partie 3 : un rôle particulier de SpoIIID dans l'assemblage des CPE des spores du groupe *B. cereus*

Dans les différentes études que nous avons réalisées dans le cadre de cette thèse, un ensemble d'observations suggère une fonction particulière de SpoIIID dans la mise en place des CPE des spores de *B. cereus*.

Le premier élément que nous avons noté est le déroulement particulier de l'encapsulation de la spore par les protéines du MS, ainsi que celui de la formation de l'IS durant la sporulation. Ces deux événements interviennent dès la fin de l'engulfment et avant que les fragments de coat ne se déposent sur le pourtour de la préspore (Lablaine *et al.*, 2021). Nos résultats de protéomique, ainsi que des résultats préliminaires de l'activité promotrice de *spoIIID* (données non présentées) montrent un pic de présence de SpoIIID en fin d'engulfment. Par ailleurs, nos résultats montrent que l'encapsulation de la préspore par CotE, CotY et ExsY démarre précisément à la fin de l'engulfment. Dans *B. subtilis*, CotE encapsule la préspore sous la dépendance de SpoIIID, mais pas de GerE, alors que l'encapsulation de la préspore par CotZ dépend, entre autre, de GerE (Mckneney and Eichenberger, 2012). Cette différence de contrôle transcriptionnel se traduit par un retard d'encapsulation de CotZ par rapport à CotE. Dans *B. cereus*, l'encapsulation de la préspore par CotY et ExsY est concomitante à l'encapsulation de la préspore par CotE et ne semble pas dépendre de GerE, comme notre analyse protéomique semble l'indiquer. Ainsi l'encapsulation de la préspore par CotY et ExsY semble dépendre, dans *B. cereus*, de SpoIIID et non de GerE. Notre analyse protéomique indique aussi d'autres changements possibles dans la régulation de protéines du MS. Ainsi, SleL, homologue de YaaH de *B. subtilis*, s'accumule tout au long de la sporulation de *B. cereus* (Chap IV). Ce résultat semble en désaccord avec le contrôle σ^E /SpoIIID- décrit pour YaaH chez *B. subtilis* (Eichenberger *et al.*, 2004, Mckneney and Eichenberger, 2012). De tels changements dans le contrôle de l'encapsulation de la préspore par les protéines du MS pourraient être à l'origine des particularités de l'organisation des CPE des spores du groupe *B. cereus*, comme la formation de l'interspace. Néanmoins, pour l'heure, aucun

changement de régulation des homologues de *B. subtilis* n'a été démontré dans le groupe *B. cereus*.

L'analyse de la dynamique d'encapsulation des protéines du MS de *B. cereus* en absence de SpoIIIID ou GerE nous apporterait des renseignements précieux sur le mécanisme d'encapsulation par les protéines du MS. L'expression de CotE sous le contrôle du promoteur des gènes *spoIVA* ou *spoVID*, qui semblent exprimés spécifiquement pendant l'engulfment, pourrait également nous éclairer sur le contrôle transcriptionnel de l'encapsulation par les protéines du MS. Ces résultats pourraient également être couplés à des observations par SR-SIM et/ou MET du mutant *cotE* complété par un allèle de *cotE* sous le contrôle du promoteur de *spoIVA* ou *spoVID*.

Le deuxième élément concerne l'activation de σ^k indépendamment de la fin de l'engulfment. Comme discuté dans la section II-2, la séquence de σ^k n'est pas interrompue dans *B. cereus* par un élément *skin* de type prophagique. En absence de *skin*, le contrôle du clivage de la proséquence de σ^k et la temporalité d'expression de *sigK* prennent une importance particulière. De façon frappante, chez *B. subtilis*, clivage et expression de *sigK* sont étroitement liés à SpoIIIID (Eichenberher *et al.*, 2004, Serrano *et al.*, 2016, Halberg *et al.*, 1994). Ainsi, chez *B. cereus*, SpoIIIID pourrait avoir un rôle clé dans l'activation de σ^k dans les cellules présentant un défaut d'engulfment. L'analyse de l'activité du promoteur *spoIIIID* dans les cellules *B. cereus* 10876 sporulant à 20 °C est actuellement en cours. Si dans les sporanges dont l'engulfment est perturbé on observe un pic d'activité du promoteur de *spoIIIID*, cela renforcera la possibilité que l'activation de σ^k dans ces cellules soit dûe à une activation par SpoIIIID.

Enfin, le modèle que nous avons établi pour expliquer la maturation unidirectionnelle du MS (Fig. 19) pointe également un rôle central de SpoIIIID. Ainsi, au sein du groupe *B. cereus*, des changements de contrôle lié à SpoIIIID pourraient être liés à :

- (i) l'encapsulation par les protéines du MS
- (ii) la formation de l'IS au MCP pôle de la présore
- (iii) l'indépendance de l'activation de σ^k de l'achèvement de l'engulfment
- (iv) le mécanisme de maturation unidirectionnel de l'exosporium.

Pour toutes ces raisons, l'étude des cibles de SpoIIIID et des mécanismes qui dirigent son expression constitue, de mon point de vue, la perspective la plus attrayante pour poursuivre les travaux que nous avons entrepris durant cette thèse.

IV-References

- A, Driks.** (1999) *Bacillus subtilis* spore coat. *Microbiol Mol Biol Rev* **63**: 1–20.
- Abe, K., Kawano, Y., Iwamoto, K., Arai, K., Maruyama, Y., Eichenberger, P., and Sato, T.** (2014) Developmentally-Regulated Excision of the SP β Prophage Reconstitutes a Gene Required for Spore Envelope Maturation in *Bacillus subtilis*. *PLoS Genetics* **10**: e1004636.
- Abhyankar, W., Hossain, A.H., Djajasaputra, A., Permpoonpattana, P., Ter Beek, A., Dekker, H.L., et al.** (2013) In Pursuit of Protein Targets: Proteomic Characterization of Bacterial Spore Outer Layers. *J Proteome Res* **12**: 4507–4521.
- Alekhova, T.A., Zakharchuk, L.M., Tatarinova, N.Yu., Kadnikov, V.V., Mardanov, A.V., Ravin, N.V., and Skryabin, K.G.** (2015) Diversity of bacteria of the genus *Bacillus* on board of international space station. *Dokl Biochem Biophys* **465**: 347–350.
- Aronson, A., Goodman, B., and Smith, Z.** (2014) The regulated synthesis of a *Bacillus anthracis* spore coat protein that affects spore surface properties. *Journal of Applied Microbiology* **116**: 1241–1249.
- Aronson, A.I., Angelo, N., and Holt, S.C.** (1971) Regulation of Extracellular Protease Production in *Bacillus cereus* T: Characterization of Mutants Producing Altered Amounts of Protease. *Journal of Bacteriology* **106**: 1016–1025.
- Aronson, A.I., and Fitz-James, P.C.** (1975) Properties of *Bacillus cereus* spore coat mutants. *Journal of Bacteriology* **123**: 354–365.
- Arrieta-Ortiz, M.L., Hafemeister, C., Bate, A.R., Chu, T., Greenfield, A., Shuster, B., et al.** (2015) An experimentally supported model of the *Bacillus subtilis* global transcriptional regulatory network. *Molecular Systems Biology* **11**: 839.
- Baccigalupi, L., Castaldo, G., Cangiano, G., Isticato, R., Marasco, R., De Felice, M., and Ricca, E.** (2004) GerE-independent expression of *cotH* leads to CotC accumulation in the mother cell compartment during *Bacillus subtilis* sporulation. *Microbiology (Reading)* **150**: 3441–3449.
- Bailey-Smith, K., Todd, S.J., Southworth, T.W., Proctor, J., and Moir, A.** (2005) The ExsA Protein of *Bacillus cereus* Is Required for Assembly of Coat and Exosporium onto the Spore Surface. *Journal of Bacteriology* **187**: 3800–3806.
- Baillie, L., Hibbs, S., Tsai, P., Cao, G.-L., and Rosen, G.M.** (2005) Role of superoxide in the germination of *Bacillus anthracis* endospores. *FEMS Microbiology Letters* **245**: 33–38.
- Balassa, G.** (1969) Biochemical genetics of bacterial sporulation. *Molec Gen Genet* **104**: 73–103.
- Ball, D.A., Taylor, R., Todd, S.J., Redmond, C., Couture-Tosi, E., Sylvestre, P., et al.** (2008) Structure of the exosporium and sublayers of spores of the *Bacillus cereus* family revealed by electron crystallography. *Molecular Microbiology* **68**: 947–958.
- Barre, F.-X.** (2007) FtsK and SpoIII ϵ : the tale of the conserved tails. *Molecular Microbiology* **66**: 1051–1055.
- Bartels, J., Blüher, A., Castellanos, S.L., Richter, M., Günther, M., and Mascher, T.** (2019) The *Bacillus subtilis*

endospore crust: protein interaction network, architecture and glycosylation state of a potential glycoprotein layer. *Molecular Microbiology* **112**: 1576–1592.

Battistuzzi, F.U., Feijao, A., and Hedges, S.B. (2004) A genomic timescale of prokaryote evolution: insights into the origin of methanogenesis, phototrophy, and the colonization of land. *BMC Evol Biol* **4**: 44.

Beall, B., and Moran, C.P. (1994) Cloning and characterization of spoVR, a gene from *Bacillus subtilis* involved in spore cortex formation. *Journal of Bacteriology* **176**: 2003–2012.

Bigot, S., Saleh, O.A., Cornet, F., Allemand, J.-F., and Barre, F.-X. (2006) Oriented loading of FtsK on KOPS. *Nature Structural & Molecular Biology* **13**: 1026–1028.

Bigot, S., Sivanathan, V., Possoz, C., Barre, F.-X., and Cornet, F. (2007) FtsK, a literate chromosome segregation machine. *Molecular Microbiology* **64**: 1434–1441.

Blaylock, B., Jiang, X., Rubio, A., Moran, C.P., and Pogliano, K. (2004) Zipper-like interaction between proteins in adjacent daughter cells mediates protein localization. *Genes Dev* **18**: 2916–2928.

Boone, T.J., Mallozzi, M., Nelson, A., Thompson, B., Khemmani, M., Lehmann, D., et al. (2018) Coordinated Assembly of the *Bacillus anthracis* Coat and Exosporium during Bacterial Spore Outer Layer Formation. *mBio* **9** <https://mbio.asm.org/content/9/6/e01166-18>. Accessed September 25, 2020.

Boydston, J.A., Yue, L., Kearney, J.F., and Turnbough, C.L. (2006) The ExsY Protein Is Required for Complete Formation of the Exosporium of *Bacillus anthracis*. *Journal of Bacteriology* **188**: 7440–7448.

Bozue, J., Moody, K.L., Cote, C.K., Stiles, B.G., Friedlander, A.M., Welkos, S.L., and Hale, M.L. (2007) *Bacillus anthracis* Spores of the *bclA* Mutant Exhibit Increased Adherence to Epithelial Cells, Fibroblasts, and Endothelial Cells but Not to Macrophages. *Infection and Immunity* **75**: 4498–4505.

Bradshaw, N., and Losick, R. (2015) Asymmetric division triggers cell-specific gene expression through coupled capture and stabilization of a phosphatase. *Elife* **4**.

Bressuire-Isoard, C., Bornard, I., Henriques, A.O., Carlin, F., and Broussolle, V. (2016) Sporulation Temperature Reveals a Requirement for CotE in the Assembly of both the Coat and Exosporium Layers of *Bacillus cereus* Spores. *Appl Environ Microbiol* **82**: 232–243.

Broder, D.H., and Pogliano, K. (2006) Forespore Engulfment Mediated by a Ratchet-Like Mechanism. *Cell* **126**: 917–928.

Browne, H.P., Forster, S.C., Anonye, B.O., Kumar, N., Neville, B.A., Stares, M.D., et al. (2016) Culturing of ‘unculturable’ human microbiota reveals novel taxa and extensive sporulation. *Nature* **533**: 543–546.

Burgess, R.R., Travers, A.A., Dunn, J.J., and Bautz, E.K.F. (1969) Factor Stimulating Transcription by RNA Polymerase. *Nature* **221**: 43–46.

Camp, A.H., and Losick, R. (2009) A feeding tube model for activation of a cell-specific transcription factor during sporulation in *Bacillus subtilis*. *Genes Dev* **23**: 1014–1024.

Camp, A.H., Wang, A.F., and Losick, R. (2011) A Small Protein Required for the Switch from σ^F to σ^G during Sporulation in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* **193**: 116–124.

Campo, N., and Rudner, D.Z. (2006) A Branched Pathway Governing the Activation of a Developmental Transcription Factor by Regulated Intramembrane Proteolysis. *Molecular Cell* **23**: 25–35.

- Cangiano, G., Sirec, T., Panarella, C., Isticato, R., Baccigalupi, L., Felice, M.D., and Ricca, E.** (2014) The *sps* Gene Products Affect the Germination, Hydrophobicity, and Protein Adsorption of *Bacillus subtilis* Spores. *Appl Environ Microbiol* **80**: 7293–7302.
- Castaing, J.-P., Nagy, A., Anantharaman, V., Aravind, L., and Ramamurthi, K.S.** (2013) ATP hydrolysis by a domain related to translation factor GTPases drives polymerization of a static bacterial morphogenetic protein. *PNAS* **110**: E151–E160.
- Chastanet, A., and Losick, R.** (2007) Engulfment during sporulation in *Bacillus subtilis* is governed by a multi-protein complex containing tandemly acting autolysins. *Molecular Microbiology* **64**: 139–152.
- Chesnokova, O.N., McPherson, S.A., Steichen, C.T., and Turnbough, C.L.** (2009) The Spore-Specific Alanine Racemase of *Bacillus anthracis* and Its Role in Suppressing Germination during Spore Development. *Journal of Bacteriology* **191**: 1303–1310.
- Costa, T., Isidro, A.L., Moran, C.P., and Henriques, A.O.** (2006) Interaction between Coat Morphogenetic Proteins SafA and SpoVID. *Journal of Bacteriology* **188**: 7731–7741.
- Cruz, F. de la, and Davies, J.** (2000) Horizontal gene transfer and the origin of species: lessons from bacteria. *Trends in Microbiology* **8**: 128–133.
- Cutting, S., Driks, A., Schmidt, R., Kunkel, B., and Losick, R.** (1991) Forespore-specific transcription of a gene in the signal transduction pathway that governs Pro-sigma K processing in *Bacillus subtilis*. *Genes Dev* **5**: 456–466.
- Cutting, S., Oke, V., Driks, A., Losick, R., Lu, S., and Kroos, L.** (1990) A forespore checkpoint for mother cell gene expression during development in *B. subtilis*. *Cell* **62**: 239–250.
- Daniel, R.A., and Errington, J.** (1993) Cloning, DNA Sequence, Functional Analysis and Transcriptional Regulation of the Genes Encoding Dipicolinic Acid Synthetase Required for Sporulation in *Bacillus subtilis*. *Journal of Molecular Biology* **232**: 468–483.
- Diederich, B., Wilkinson, J.F., Magnin, T., Najafi, S.M.A., Errington, J., and Yudkin, M.D.** (1994) Role of interactions between SpoIIAA and SpoIIAB in regulating cell-specific transcription factor σ^F of *Bacillus subtilis*. *Genes Dev* **8**: 2653–2663.
- Diez, V., Schujman, G.E., Gueiros-Filho, F.J., and Mendoza, D. de** (2012) Vectorial signalling mechanism required for cell–cell communication during sporulation in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology* **83**: 261–274.
- Dixon, T.C., Fadl, A.A., Koehler, T.M., Swanson, J.A., and Hanna, P.C.** (2000) Early *Bacillus anthracis*–macrophage interactions: intracellular survival and escape. *Cellular Microbiology* **2**: 453–463.
- Doan, T., Coleman, J., Marquis, K.A., Meeske, A.J., Burton, B.M., Karatekin, E., and Rudner, D.Z.** (2013) FisB mediates membrane fission during sporulation in *Bacillus subtilis*. *Genes Dev* **27**: 322–334.
- Doan, T., Morlot, C., Meisner, J., Serrano, M., Henriques, A.O., Jr, C.P.M., and Rudner, D.Z.** (2009) Novel Secretion Apparatus Maintains Spore Integrity and Developmental Gene Expression in *Bacillus subtilis*. *PLOS Genetics* **5**: e1000566.
- Dong, T.C., and Cutting, S.M.** (2003) SpoIVB-mediated cleavage of SpoIVFA could provide the intercellular signal to activate processing of Pro- σ^K in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology* **49**: 1425–1434.
- Doudna, J.A., and Charpentier, E.** (2014) The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*

346 <https://science.sciencemag.org/content/346/6213/1258096>. Accessed May 25, 2021.

Driks, A., and Eichenberger, P. (2016) The Spore Coat. In *The Bacterial Spore*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 179–200 <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1128/9781555819323.ch9>. Accessed May 24, 2021.

Du, S., and Lutkenhaus, J. (2017) Assembly and activation of the *Escherichia coli* divisome. *Molecular Microbiology* **105**: 177–187.

Dubnau, D., Goldthwaite, C., Smith, I., and Marmur, J. (1967) Genetic mapping in *Bacillus subtilis*. *Journal of Molecular Biology* **27**: 163–185.

Dubois, T., Krzewinski, F., Yamakawa, N., Lemy, C., Hamiot, A., Brunet, L., et al. (2020) The *sps* Genes Encode an Original Legionaminic Acid Pathway Required for Crust Assembly in *Bacillus subtilis*. *mBio* **11** <https://mbio.asm.org/content/11/4/e01153-20>. Accessed May 25, 2021.

Duncan, L., Alper, S., Arigoni, F., Losick, R., and Stragier, P. (1995) Activation of Cell-Specific Transcription by a Serine Phosphatase at the Site of Asymmetric Division. *Science* **270**: 641–644.

Duncan, L., and Losick, R. (1993) SpoIIAB is an anti-sigma factor that binds to and inhibits transcription by regulatory protein sigma F from *Bacillus subtilis*. *PNAS* **90**: 2325–2329.

Dupouy, G. (1973) Performance and applications of the Toulouse 3 million volt electron microscope. *Journal of Microscopy* **97**: 3–27.

Dupouy, G., Perrier, F., and Durrieu, L. (1960) [The observation of living matter by means of an electron microscope operating under very high voltage]. *C R Hebd Seances Acad Sci* **251**: 2836–2841.

Ebmeier, S.E., Tan, I.S., Clapham, K.R., and Ramamurthi, K.S. (2012) Small proteins link coat and cortex assembly during sporulation in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology* **84**: 682–696.

Eichenberger, P., Fujita, M., Jensen, S.T., Conlon, E.M., Rudner, D.Z., Wang, S.T., et al. (2004) The Program of Gene Transcription for a Single Differentiating Cell Type during Sporulation in *Bacillus subtilis*. *PLOS Biology* **2**: e328.

Errington, J. (1993) *Bacillus subtilis* sporulation: regulation of gene expression and control of morphogenesis. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **57**: 1–33.

Errington, J. (2003) Regulation of endospore formation in *Bacillus subtilis*. *Nature Reviews Microbiology* **1**: 117–126.

Faille, C., Jullien, C., Fontaine, F., Bellon-Fontaine, M.-N., Slomianny, C., and Benezech, T. (2011) Adhesion of *Bacillus* spores and *Escherichia coli* cells to inert surfaces: role of surface hydrophobicity. *Canadian Journal of Microbiology* <https://cdnsiencepub.com/doi/abs/10.1139/w02-063>. Accessed May 25, 2021.

Faille, C., Lequette, Y., Ronse, A., Slomianny, C., Garénaux, E., and Guerardel, Y. (2010) Morphology and physico-chemical properties of *Bacillus* spores surrounded or not with an exosporium: Consequences on their ability to adhere to stainless steel. *International Journal of Food Microbiology* **143**: 125–135.

Faille, C., Ronse, A., Dewailly, E., Slomianny, C., Maes, E., Krzewinski, F., and Guerardel, Y. (2014) Presence and function of a thick mucous layer rich in polysaccharides around *Bacillus subtilis* spores. *Biofouling* **30**: 845–858.

Fay, A., Meyer, P., and Dworkin, J. (2010) Interactions between late acting proteins required for peptidoglycan

synthesis during sporulation. *J Mol Biol* **399**: 547–561.

Fazzini, M.M., Schuch, R., and Fischetti, V.A. (2010) A Novel Spore Protein, ExsM, Regulates Formation of the Exosporium in *Bacillus cereus* and *Bacillus anthracis* and Affects Spore Size and Shape. *Journal of Bacteriology* **192**: 4012–4021.

Fernandes, C.G., Martins, D., Hernandez, G., Sousa, A.L., Freitas, C., Tranfield, E.M., et al. (2019) Temporal and spatial regulation of protein cross-linking by the pre-assembled substrates of a *Bacillus subtilis* spore coat transglutaminase. *PLoS Genetics* **15**: e1007912.

Fernandes, C.G., Moran, C.P., and Henriques, A.O. (2018) Autoregulation of SafA Assembly through Recruitment of a Protein Cross-Linking Enzyme. *Journal of Bacteriology* **200** <https://jb.asm.org/content/200/14/e00066-18>. Accessed May 25, 2021.

Feucht, A., Magnin, T., Yudkin, M.D., and Errington, J. (1996) Bifunctional protein required for asymmetric cell division and cell-specific transcription in *Bacillus subtilis*. *Genes Dev* **10**: 794–803.

Fournes, F., Crozat, E., Pages, C., Tardin, C., Salomé, L., Cornet, F., and Rousseau, P. (2016) FtsK translocation permits discrimination between an endogenous and an imported Xer/dif recombination complex. *PNAS* **113**: 7882–7887.

Francesco, M. de, Jacobs, J.Z., Nunes, F., Serrano, M., McKenney, P.T., Chua, M.-H., et al. (2012) Physical interaction between coat morphogenetic proteins SpoVID and CotE is necessary for spore encasement in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **194**: 4941–4950.

Frandsen, N., Barák, I., Karmazyn-Campelli, C., and Stragier, P. (1999) Transient gene asymmetry during sporulation and establishment of cell specificity in *Bacillus subtilis*. *Genes Dev* **13**: 394–399.

Frandsen, N., and Stragier, P. (1995) Identification and characterization of the *Bacillus subtilis* spoIIP locus. *Journal of Bacteriology* **177**: 716–722.

Freitas, C., Plannic, J., Isticato, R., Pelosi, A., Zilhão, R., Serrano, M., et al. (2020) A protein phosphorylation module patterns the *Bacillus subtilis* spore outer coat. *Molecular Microbiology* **114**: 934–951.

Galperin, M.Y., Mekhedov, S.L., Puigbo, P., Smirnov, S., Wolf, Y.I., and Rigden, D.J. (2012) Genomic determinants of sporulation in *Bacilli* and *Clostridia*: towards the minimal set of sporulation-specific genes. *Environmental Microbiology* **14**: 2870–2890.

Gholamhoseinian, A., and Piggot, P.J. (1989) Timing of spoII gene expression relative to septum formation during sporulation of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* **171**: 5747–5749.

Ghosh, A., Manton, J.D., Mustafa, A.R., Gupta, M., Ayuso-Garcia, A., Rees, E.J., and Christie, G. (2018) Proteins Encoded by the *gerP* Operon Are Localized to the Inner Coat in *Bacillus cereus* Spores and Are Dependent on GerPA and SafA for Assembly. *Appl Environ Microbiol* **84** <https://aem.asm.org/content/84/14/e00760-18>. Accessed September 25, 2020.

Gill, R.L., Castaing, J.-P., Hsin, J., Tan, I.S., Wang, X., Huang, K.C., et al. (2015) Structural basis for the geometry-driven localization of a small protein. *PNAS* **112**: E1908–E1915.

Giorno, R., Bozue, J., Cote, C., Wenzel, T., Moody, K.-S., Mallozzi, M., et al. (2007) Morphogenesis of the *Bacillus anthracis* Spore. *Journal of Bacteriology* **189**: 691–705.

- Giorno, R., Mallozzi, M., Bozue, J., Moody, K.-S., Slack, A., Qiu, D., et al.** (2009) Localization and assembly of proteins comprising the outer structures of the *Bacillus anthracis* spore. *Microbiology (Reading)* **155**: 1133–1145.
- Glauert, A.M.** (1974) THE HIGH VOLTAGE ELECTRON MICROSCOPE IN BIOLOGY. *J Cell Biol* **63**: 717–748.
- Guinebretière, M.-H., Thompson, F.L., Sorokin, A., Normand, P., Dawyndt, P., Ehling-Schulz, M., et al.** (2008) Ecological diversification in the *Bacillus cereus* Group. *Environmental Microbiology* **10**: 851–865.
- Gustafsson, M.G.L.** (2000) Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy. *Journal of Microscopy* **198**: 82–87.
- Gutierrez, J., Smith, R., and Pogliano, K.** (2010) SpoIID-Mediated Peptidoglycan Degradation Is Required throughout Engulfment during *Bacillus subtilis* Sporulation. *Journal of Bacteriology* **192**: 3174–3186.
- H, B., C, F., A, R., and M, S.** (1967) [Cytologic study of sporulation in *Clostridium histolyticum*. Sporogenous strain and sporulation mutants]. *Ann Inst Pasteur (Paris)* **113**: 163–173.
- Halberg, R., and Kroos, L.** (1994) Sporulation Regulatory Protein SpoIIID from *Bacillus subtilis* Activates and Represses Transcription by Both Mother-cell-specific Forms of RNA Polymerase. *Journal of Molecular Biology* **243**: 425–436.
- Haldenwang, W.G., Lang, N., and Losick, R.** (1981) A sporulation-induced sigma-like regulatory protein from *B. subtilis*. *Cell* **23**: 615–624.
- Haldenwang, W.G., and Losick, R.** (1979) A modified RNA polymerase transcribes a cloned gene under sporulation control in *Bacillus subtilis*. *Nature* **282**: 256–260.
- Haldenwang, W.G., and Losick, R.** (1980) Novel RNA polymerase sigma factor from *Bacillus subtilis*. *PNAS* **77**: 7000–7004.
- Hama, K.** (1973) High Voltage Electron Microscopy. In *Advanced Techniques in Biological Electron Microscopy*. **Koehler, J.K.** (ed.). Springer, Berlin, Heidelberg. pp. 275–297 https://doi.org/10.1007/978-3-642-65492-3_7. Accessed May 25, 2021.
- Henriques, A.O., Beall, B.W., Roland, K., and Moran, C.P.** (1995) Characterization of cotJ, a sigma E-controlled operon affecting the polypeptide composition of the coat of *Bacillus subtilis* spores. *Journal of Bacteriology* **177**: 3394–3406.
- Henriques, A.O., Melsen, L.R., and Moran, C.P.** (1998) Involvement of Superoxide Dismutase in Spore Coat Assembly in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* **180**: 2285–2291.
- Henriques, A.O., and Moran, C.P., Jr.** (2007) Structure, Assembly, and Function of the Spore Surface Layers. *Annual Review of Microbiology* **61**: 555–588.
- Hirota, R., Hata, Y., Ikeda, T., Ishida, T., and Kuroda, A.** (2010) The Silicon Layer Supports Acid Resistance of *Bacillus cereus* Spores. *Journal of Bacteriology* **192**: 111–116.
- Hirota, Y., Ricard, M., and Shapiro, B.** (1971) The Use of Thermosensitive Mutants of *E.coli* in the Analysis of Cell Division. In *Biomembranes: Volume 2*. Manson, L.A. (ed.). Springer US, Boston, MA. pp. 13–31 https://doi.org/10.1007/978-1-4684-3330-2_5. Accessed May 25, 2021.
- Hirota, Y., Ryter, A., and Jacob, F.** (1968) Thermosensitive Mutants of *E. coli* Affected in the Processes of DNA Synthesis and Cellular Division. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **33**: 677–693.

- Hoon, M.J.L. de, Eichenberger, P., and Vitkup, D.** (2010) Hierarchical Evolution of the Bacterial Sporulation Network. *Current Biology* 20: R735–R745.
- Hsu, P.D., Lander, E.S., and Zhang, F.** (2014) Development and Applications of CRISPR-Cas9 for Genome Engineering. *Cell* 157: 1262–1278.
- Hug, L.A., Baker, B.J., Anantharaman, K., Brown, C.T., Probst, A.J., Castelle, C.J., et al.** (2016) A new view of the tree of life. *Nat Microbiol* 1: 16048.
- Illing, N., and Errington, J.** (1991a) The spoIII_A operon of *Bacillus subtilis* defines a new temporal class of mother-cell-specific sporulation genes under the control of the σ E form of RNA polymerase. *Molecular Microbiology* 5: 1927–1940.
- Illing, N., and Errington, J.** (1991b) Genetic regulation of morphogenesis in *Bacillus subtilis*: roles of sigma E and sigma F in prespore engulfment. *Journal of Bacteriology* 173: 3159–3169.
- Imamura, D., Kuwana, R., Takamatsu, H., and Watabe, K.** (2010) Localization of Proteins to Different Layers and Regions of *Bacillus subtilis* Spore Coats. *Journal of Bacteriology* 192: 518–524.
- Imamura, D., Kuwana, R., Takamatsu, H., and Watabe, K.** (2011) Proteins Involved in Formation of the Outermost Layer of *Bacillus subtilis* Spores. *Journal of Bacteriology* 193: 4075–4080.
- Imlay, J.A.** (2019) Where in the world do bacteria experience oxidative stress? *Environmental Microbiology* 21: 521–530.
- Ionesco, H.** (1967) [Quantitative study of transformation in sporulation mutants of *Bacillus subtilis*]. *Ann Inst Pasteur (Paris)* 113: 157–162.
- Ionesco, H., Michel, J., Cami, B., and Schaeffer, P.** (1970) (Symposium on Bacterial Spores: Paper II). Genetics of Sporulation in *Bacillus subtilis* Marburg. *Journal of Applied Bacteriology* 33: 13–24.
- Ionesco, H., and Schaeffer, P.** (1968) CHROMOSOMAL LOCALIZATION OF CERTAIN ASPOROGENIC MUTANTS OF *BACILLUS SUBTILIS* MARBURG. *Ann Inst Pasteur*, 114: 1-9(Jan 1968) <https://www.osti.gov/biblio/4490267>. Accessed May 25, 2021.
- Isticato, R., Cangiano, G., Tran, H.T., Ciabattini, A., Medaglini, D., Oggioni, M.R., et al.** (2001) Surface Display of Recombinant Proteins on *Bacillus subtilis* Spores. *Journal of Bacteriology* 183: 6294–6301.
- Isticato, R., Pelosi, A., De Felice, M., and Ricca, E.** (2010) CotE binds to CotC and CotU and mediates their interaction during spore coat formation in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 192: 949–954.
- Isticato, R., Pelosi, A., Zilhão, R., Baccigalupi, L., Henriques, A.O., De Felice, M., and Ricca, E.** (2008) CotC-CotU heterodimerization during assembly of the *Bacillus subtilis* spore coat. *J Bacteriol* 190: 1267–1275.
- Isticato, R., Sirec, T., Giglio, R., Baccigalupi, L., Rusciano, G., Pesce, G., et al.** (2013) Flexibility of the Programme of Spore Coat Formation in *Bacillus subtilis*: Bypass of CotE Requirement by Over-Production of Coth. *PLOS ONE* 8: e74949.
- Isticato, R., Sirec, T., Vecchione, S., Crispino, A., Saggese, A., Baccigalupi, L., et al.** (2015) The Direct Interaction between Two Morphogenetic Proteins Is Essential for Spore Coat Formation in *Bacillus subtilis*. *PLOS ONE* 10: e0141040.
- Jacob, F., and Monod, J.** (1961) Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *Journal of Molecular Biology* 3: 318–356.

Jf, M., B, C., and P, S. (1968) [Selection of *Bacillus subtilis* mutants blocked at the beginning of sporulation. I. Asporogenous pleotrophic mutants selected by growth in a nitrate medium]. *Ann Inst Pasteur (Paris)* 114: 11–20.

Jf, R., H, I., and P, S. (1967) [Genetic classification of certain sporulation mutants of *Bacillus subtilis*, Marburg]. *Ann Inst Pasteur (Paris)* 113: 675–683.

Jiang, S., Wan, Q., Krajcikova, D., Tang, J., Tzokov, S.B., Barak, I., and Bullough, P.A. (2015) Diverse supramolecular structures formed by self-assembling proteins of the *Bacillus subtilis* spore coat. *Molecular Microbiology* 97: 347–359.

Johnson, M.J., Todd, S.J., Ball, D.A., Shepherd, A.M., Sylvestre, P., and Moir, A. (2006) ExsY and CotY Are Required for the Correct Assembly of the Exosporium and Spore Coat of *Bacillus cereus*. *Journal of Bacteriology* 188: 7905–7913.

Jr, R.W.S., Henriques, A.O., Ozin, A.J., and Jr, C.P.M. (1997) Assembly and interactions of *cotJ*-encoded proteins, constituents of the inner layers of the *Bacillus subtilis* spore coat. *Molecular Microbiology* 25: 955–966.

Kailas, L., Terry, C., Abbott, N., Taylor, R., Mullin, N., Tzokov, S.B., et al. (2011) Surface architecture of endospores of the *Bacillus cereus/anthracis/thuringiensis* family at the subnanometer scale. *PNAS* 108: 16014–16019.

Karmazyn-Campelli, C., Rhyat, L., Carballido-López, R., Duperrier, S., Frandsen, N., and Stragier, P. (2008) How the early sporulation sigma factor σ^F delays the switch to late development in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology* 67: 1169–1180.

Karow, M.L., Glaser, P., and Piggot, P.J. (1995) Identification of a gene, *spoIIR*, that links the activation of sigma E to the transcriptional activity of sigma F during sporulation in *Bacillus subtilis*. *PNAS* 92: 2012–2016.

Kellner, E.M., Decatur, A., and Jr, C.P.M. (1996) Two-stage regulation of an anti-sigma factor determines developmental fate during bacterial endospore formation. *Molecular Microbiology* 21: 913–924.

Khanna, K., Lopez-Garrido, J., and Pogliano, K. (2020) Shaping an Endospore: Architectural Transformations During *Bacillus subtilis* Sporulation. *Annu Rev Microbiol* 74: 361–386.

Khanna, K., Lopez-Garrido, J., Zhao, Z., Watanabe, R., Yuan, Y., Sugie, J., et al. (2019) The molecular architecture of engulfment during *Bacillus subtilis* sporulation. *eLife* 8: e45257.

Kim, E.Y., Tyndall, E.R., Huang, K.C., Tian, F., and Ramamurthi, K.S. (2017) Dash-and-Recruit Mechanism Drives Membrane Curvature Recognition by the Small Bacterial Protein SpoVM. *Cell Systems* 5: 518–526.e3.

Kim, H., Hahn, M., Grabowski, P., McPherson, D.C., Otte, M.M., Wang, R., et al. (2006) The *Bacillus subtilis* spore coat protein interaction network. *Molecular Microbiology* 59: 487–502.

Kim, H.-S., Sherman, D., Johnson, F., and Aronson, A.I. (2004) Characterization of a Major *Bacillus anthracis* Spore Coat Protein and Its Role in Spore Inactivation. *Journal of Bacteriology* 186: 2413–2417.

Korza, G., Camilleri, E., Green, J., Robinson, J., Nagler, K., Moeller, R., et al. (2019) Analysis of the mRNAs in Spores of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* 201 <https://jlb.asm.org/content/201/9/e00007-19>. Accessed May 25, 2021.

Koshikawa, T., Yamazaki, M., Yoshimi, M., Ogawa, S., Yamada, A., Watabe, K., and Torii, M. 1989 Surface Hydrophobicity of Spores of *Bacillus spp.* *Microbiology* 135: 2717–2722.

- Krajčíková, D., Bugárová, V., and Barák, I.** (2021) Interactions of *Bacillus subtilis* Basement Spore Coat Layer Proteins. *Microorganisms* **9**: 285.
- Krajčíková, D., Forgáč, V., Szabo, A., and Barák, I.** (2017) Exploring the interaction network of the *Bacillus subtilis* outer coat and crust proteins. *Microbiological Research* **204**: 72–80.
- Krajčíková, D., Lukáčová, M., Müllerová, D., Cutting, S.M., and Barák, I.** (2009) Searching for Protein-Protein Interactions within the *Bacillus subtilis* Spore Coat. *Journal of Bacteriology* **191**: 3212–3219.
- Król, E., Sousa Borges, A. de, Kopacz, M., and Scheffers, D.-J.** (2017) Metal-dependent SpoIIE oligomerization stabilizes FtsZ during asymmetric division in *Bacillus subtilis*. *PLoS One* **12** <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5373596/>. Accessed April 6, 2021.
- Kroos, L., Kunkel, B., and Losick, R.** (1989) Switch protein alters specificity of RNA polymerase containing a compartment-specific sigma factor. *Science* **243**: 526–529.
- Kunkel, B., Kroos, L., Poth, H., Youngman, P., and Losick, R.** (1989) Temporal and spatial control of the mother-cell regulatory gene spoIIID of *Bacillus subtilis*. *Genes Dev* **3**: 1735–1744.
- Kunkel, B., Losick, R., and Stragier, P.** (1990) The *Bacillus subtilis* gene for the development transcription factor sigma K is generated by excision of a dispensable DNA element containing a sporulation recombinase gene. *Genes Dev* **4**: 525–535.
- Kuwana, R., Okuda, N., Takamatsu, H., and Watabe, K.** (2006) Modification of GerQ Reveals a Functional Relationship between Tgl and YabG in the Coat of *Bacillus subtilis* Spores. *The Journal of Biochemistry* **139**: 887–901.
- LaBell, T.L., Trempy, J.E., and Haldenwang, W.G.** (1987) Sporulation-specific sigma factor sigma 29 of *Bacillus subtilis* is synthesized from a precursor protein, P31. *PNAS* **84**: 1784–1788.
- Landajuela, A., Braun, M., Rodrigues, C.D.A., Martínez-Calvo, A., Doan, T., Horenkamp, F., et al.** (2021) FisB relies on homo-oligomerization and lipid-binding to catalyze membrane fission in bacteria. *bioRxiv* 2020.09.25.313023.
- Lepesant-Kejzlarová, J., Lepesant, J.A., Walle, J., Billault, A., and Dedonder, R.** (1975) Revision of the linkage map of *Bacillus subtilis* 168: indications for circularity of the chromosome. *Journal of Bacteriology* **121**: 823–834.
- Lequette, Y., Garénaux, E., Combrouse, T., Dias, T.D.L., Ronse, A., Slomianny, C., et al.** (2011a) Domains of BclA, the major surface glycoprotein of the *B. cereus* exosporium: glycosylation patterns and role in spore surface properties. *Biofouling* **27**: 751–761.
- Lequette, Y., Garénaux, E., Tauveron, G., Dumez, S., Perchat, S., Slomianny, C., et al.** (2011b) Role Played by Exosporium Glycoproteins in the Surface Properties of *Bacillus cereus* Spores and in Their Adhesion to Stainless Steel. *Appl Environ Microbiol* **77**: 4905–4911.
- Levin, P.A., Fan, N., Ricca, E., Driks, A., Losick, R., and Cutting, S.** (1993) An unusually small gene required for sporulation by *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology* **9**: 761–771.
- Levisohn, S., and Aronson, A.I.** (1967) Regulation of Extracellular Protease Production in *Bacillus cereus*. *Journal of Bacteriology* **93**: 1023–1030.
- Lin, P., Yuan, H., Du, J., Liu, K., Liu, H., and Wang, T.** (2020) Progress in research and application development

of surface display technology using *Bacillus subtilis* spores. *Appl Microbiol Biotechnol* **104**: 2319–2331.

Linn, T., Greenleaf, A., and Losick, R. (1975) RNA polymerase from sporulating *Bacillus subtilis*. Purification and properties of a modified form of the enzyme containing two sporulation polypeptides. *Journal of Biological Chemistry* **250**: 9256–9261.

Liu, H., Krajcikova, D., Wang, N., Zhang, Z., Wang, H., Barak, I., and Tang, J. (2016a) Forces and Kinetics of the *Bacillus subtilis* Spore Coat Proteins CotY and CotX Binding to CotE Inspected by Single Molecule Force Spectroscopy. *J Phys Chem B* **120**: 1041–1047.

Liu, H., Qiao, H., Krajcikova, D., Zhang, Z., Wang, H., Barak, I., and Tang, J. (2016b) Physical interaction and assembly of *Bacillus subtilis* spore coat proteins CotE and CotZ studied by atomic force microscopy. *J Struct Biol* **195**: 245–251.

Londoño-Vallejo, J.A., and Stragier, P. (1995) Cell-cell signaling pathway activating a developmental transcription factor in *Bacillus subtilis*. *Genes Dev* **9**: 503–508.

Lopez-Garrido, J., Ojkic, N., Khanna, K., Wagner, F.R., Villa, E., Endres, R.G., and Pogliano, K. (2018) Chromosome Translocation Inflates *Bacillus* Forespores and Impacts Cellular Morphology. *Cell* **172**: 758–770.e14.

Losick, R., and Sonenshein, A.L. (1969) Change in the Template Specificity of RNA Polymerase during Sporulation of *Bacillus subtilis*. *Nature* **224**: 35–37.

Losick, R., and Stragier, P. (1992) Crisscross regulation of cell-type-specific gene expression during development in *B. subtilis*. *Nature* **355**: 601–604.

Losick, R., Youngman, P., and Piggot, P.J. (1986) Genetics of Endospore Formation in *Bacillus Subtilis*. *Annual Review of Genetics* **20**: 625–669.

Lu, S., Halberg, R., and Kroos, L. (1990) Processing of the mother-cell sigma factor, sigma K, may depend on events occurring in the forespore during *Bacillus subtilis* development. *PNAS* **87**: 9722–9726.

Luhur, J., Chan, H., Kachappilly, B., Mohamed, A., Morlot, C., Awad, M., et al. (2020) A dynamic, ring-forming MucB / RseB-like protein influences spore shape in *Bacillus subtilis*. *PLOS Genetics* **16**: e1009246.

Macheboeuf, P., Contreras-Martel, C., Job, V., Dideberg, O., and Dessen, A. (2006) Penicillin Binding Proteins: key players in bacterial cell cycle and drug resistance processes. *FEMS Microbiology Reviews* **30**: 673–691.

Mallozzi, M., Viswanathan, V., and Vedantam, G. (2010) Spore-forming *Bacilli* and *Clostridia* in human disease. *Future Microbiology* **5**: 1109–1123.

Margolis, P., Driks, A., and Losick, R. (1991) Differentiation and the establishment of cell type during sporulation in *Bacillus subtilis*. *Current Opinion in Genetics & Development* **1**: 330–335.

MASAYAMA, A., KATO, S., TERASHIMA, T., MØLGAARD, A., HEMMI, H., YOSHIMURA, T., and MORIYAMA, R. (2010) *Bacillus subtilis* Spore Coat Protein LipC Is a Phospholipase B. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **74**: 24–30.

Masayama, A., Kuwana, R., Takamatsu, H., Hemmi, H., Yoshimura, T., Watabe, K., and Moriyama, R. (2007) A novel lipolytic enzyme, YcsK (LipC), located in the spore coat of *Bacillus subtilis*, is involved in spore germination. *J Bacteriol* **189**: 2369–2375.

Mastny, M., Heuck, A., Kurzbauer, R., Heiduk, A., Boisguerin, P., Volkmer, R., et al. (2013) CtpB Assembles a

- Gated Protease Tunnel Regulating Cell-Cell Signaling during Spore Formation in *Bacillus subtilis*. *Cell* **155**: 647–658.
- Matz, L.L., Beaman, T.C., and Gerhardt, P.** (1970) Chemical Composition of Exosporium from Spores of *Bacillus cereus*. *Journal of Bacteriology* **101**: 196–201.
- McKenney, P.T., Driks, A., and Eichenberger, P.** (2013) The *Bacillus subtilis* endospore: assembly and functions of the multilayered coat. *Nature Reviews Microbiology* **11**: 33–44.
- McKenney, P.T., Driks, A., Eskandarian, H.A., Grabowski, P., Guberman, J., Wang, K.H., et al.** (2010) A Distance-Weighted Interaction Map Reveals a Previously Uncharacterized Layer of the *Bacillus subtilis* Spore Coat. *Current Biology* **20**: 934–938.
- McKenney, P.T., and Eichenberger, P.** (2012) Dynamics of spore coat morphogenesis in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology* **83**: 245–260.
- McPherson, D.C., Driks, A., and Popham, D.L.** (2001) Two Class A High-Molecular-Weight Penicillin-Binding Proteins of *Bacillus subtilis* Play Redundant Roles in Sporulation. *Journal of Bacteriology* **183**: 6046–6053.
- McPherson, D.C., Kim, H., Hahn, M., Wang, R., Grabowski, P., Eichenberger, P., and Driks, A.** (2005) Characterization of the *Bacillus subtilis* spore morphogenetic coat protein CotO. *J Bacteriol* **187**: 8278–8290.
- McPherson, S.A., Li, M., Kearney, J.F., and Turnbough, C.L.** (2010) ExsB, an unusually highly phosphorylated protein required for the stable attachment of the exosporium of *Bacillus anthracis*. *Molecular Microbiology* **76**: 1527–1538.
- Mearls, E.B., Jackter, J., Colquhoun, J.M., Farmer, V., Matthews, A.J., Murphy, L.S., et al.** (2018) Transcription and translation of the sigG gene is tuned for proper execution of the switch from early to late gene expression in the developing *Bacillus subtilis* spore. *PLOS Genetics* **14**: e1007350.
- Meeske, A.J., Sham, L.-T., Kimsey, H., Koo, B.-M., Gross, C.A., Bernhardt, T.G., and Rudner, D.Z.** (2015) Murl and a novel lipid II flippase are required for cell wall biogenesis in *Bacillus subtilis*. *PNAS* **112**: 6437–6442.
- Mello, A.A.-D., Sun, Y.-L., Aung, S., and Pogliano, K.** (2002) A cytoskeleton-like role for the bacterial cell wall during engulfment of the *Bacillus subtilis* forespore. *Genes Dev* **16**: 3253–3264.
- Meselson, M., and Stahl, F.W.** (1958) The replication of DNA in *Escherichia coli*. *PNAS* **44**: 671–682.
- Michel, J.F., and Cami, B.** (1969) [Selection of mutants of *Bacillus subtilis* blocked at the beginning of sporulation. Nature of selected mutations]. *Ann Inst Pasteur (Paris)* **116**: 3–18.
- Millet, J., and Ryter, A.** (1972) [Mutants of *Bacillus subtilis* Marburg with late blockage in their sporulation]. *Ann Inst Pasteur (Paris)* **122**: 395–406.
- Min, K.-T., Hilditch, C.M., Diederich, B., Errington, J., and Yudkin, M.D.** (1993) σ^F , the first compartment-specific transcription factor of *B. subtilis*, is regulated by an anti- σ factor that is also a protein kinase. *Cell* **74**: 735–742.
- Mj, B., A, K., Ir, L., and Es, S.** (1956) Enzymic synthesis of deoxyribonucleic acid. *Biochim Biophys Acta* **21**: 197–198.
- Mohamed, A.M.T., Chan, H., Luhur, J., Bauda, E., Gallet, B., Morlot, C., et al.** (2021) Chromosome Segregation and Peptidoglycan Remodeling Are Coordinated at a Highly Stabilized Septal Pore to Maintain Bacterial Spore

Development. *Developmental Cell* **56**: 36–51.e5.

Monroe, A., and Setlow, P. (2006) Localization of the Transglutaminase Cross-Linking Sites in the *Bacillus subtilis* Spore Coat Protein GerQ. *Journal of Bacteriology* **188**: 7609–7616.

Moody, K.L., Driks, A., Rother, G.L., Cote, C.K., Brueggemann, E.E., Hines, H.B., et al. Processing, assembly and localization of a *Bacillus anthracis* spore protein. *Microbiology* **156**: 174–183.

Morlot, C., and Rodrigues, C.D.A. (2018) The New Kid on the Block: A Specialized Secretion System during Bacterial Sporulation. *Trends in Microbiology* **26**: 663–676.

Morlot, C., Uehara, T., Marquis, K.A., Bernhardt, T.G., and Rudner, D.Z. (2010) A highly coordinated cell wall degradation machine governs spore morphogenesis in *Bacillus subtilis*. *Genes Dev* **24**: 411–422.

Motomura, K., Ikeda, T., Matsuyama, S., Abdelhamid, M.A.A., Tanaka, T., Ishida, T., et al. (2016) The C-Terminal Zwitterionic Sequence of CotB1 Is Essential for Biosilicification of the *Bacillus cereus* Spore Coat. *Journal of Bacteriology* **198**: 276–282.

Müllerová, D., Krajčiková, D., and Barák, I. (2009) Interactions between *Bacillus subtilis* early spore coat morphogenetic proteins. *FEMS Microbiology Letters* **299**: 74–85.

Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., and Erlich, H. (1986) Specific Enzymatic Amplification of DNA *In Vitro*: The Polymerase Chain Reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **51**: 263–273.

Mullis, K.B., and Faloona, F.A. (1987) [21] Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. In *Methods in Enzymology*. Academic Press, pp. 335–350 <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0076687987550236>. Accessed April 26, 2021.

Murrell, W.G. (1967) The Biochemistry of the Bacterial Endospore. In *Advances in Microbial Physiology*. Rose, A.H., and Wilkinson, J.F. (eds). Academic Press, pp. 133–251 <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0065291108602520>. Accessed May 25, 2021.

Nakayama, T., Williamson, V., Burtis, K., and Doi, R.H. (1978) Purification and Properties of Two RNA Polymerases from Sporulating Cells of *Bacillus subtilis*. *European Journal of Biochemistry* **88**: 155–164.

Nguyen, K.B., Sreelatha, A., Durrant, E.S., Lopez-Garrido, J., Muszewska, A., Dudkiewicz, M., et al. (2016) Phosphorylation of spore coat proteins by a family of atypical protein kinases. *PNAS* **113**: E3482–E3491.

Nunes, F., Fernandes, C., Freitas, C., Marini, E., Serrano, M., Moran, C.P., et al. (2018) SpoVID functions as a non-competitive hub that connects the modules for assembly of the inner and outer spore coat layers in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology* **110**: 576–595.

Ohye, D.F., and Murrell, W.G. (1962) FORMATION AND STRUCTURE OF THE SPORE OF *BACILLUS COAGULANS*. *Journal of Cell Biology* **14**: 111–123.

Ohye, D.F., and Murrell, W.G. (1973) Exosporium and Spore Coat Formation in *Bacillus cereus* T. *Journal of Bacteriology* **115**: 1179–1190.

Ojkic, N., López-Garrido, J., Pogliano, K., and Endres, R.G. (2016) Cell-wall remodeling drives engulfment during *Bacillus subtilis* sporulation. *eLife* **5**: e18657.

Oliva, C.R., Swiecki, M.K., Griguer, C.E., Lisanby, M.W., Bullard, D.C., Turnbough, C.L., and Kearney, J.F. (2008) The integrin Mac-1 (CR3) mediates internalization and directs *Bacillus anthracis* spores into professional

phagocytes. *PNAS* **105**: 1261–1266.

Ozin, A.J., Henriques, A.O., Yi, H., and Moran, C.P. (2000) Morphogenetic Proteins SpoVID and SafA Form a Complex during Assembly of the *Bacillus subtilis* Spore Coat. *Journal of Bacteriology* **182**: 1828–1833.

Ozin, A.J., Samford, C.S., Henriques, A.O., and Moran, C.P. (2001) SpoVID Guides SafA to the Spore Coat in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* **183**: 3041–3049.

Pan, Q., Garsin, D.A., and Losick, R. (2001) Self-Reinforcing Activation of a Cell-Specific Transcription Factor by Proteolysis of an Anti- σ Factor in *B. subtilis*. *Molecular Cell* **8**: 873–883.

Pan, Q., and Losick, R. (2003) Unique Degradation Signal for ClpCP in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* **185**: 5275–5278.

Partridge, S.R., and Errington, J. (1993) The importance of morphological events and intercellular interactions in the regulation of prespore-specific gene expression during sporulation in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology* **8**: 945–955.

Partridge, S.R., Foulger, D., and Errington, J. (1991) The role of σ F in prespore-specific transcription in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology* **5**: 757–767.

Peck, M.W., Stringer, S.C., and Carter, A.T. (2011) *Clostridium botulinum* in the post-genomic era. *Food Microbiology* **28**: 183–191.

Peluso, E.A., Updegrove, T.B., Chen, J., Shroff, H., and Ramamurthi, K.S. (2019) A 2-dimensional ratchet model describes assembly initiation of a specialized bacterial cell surface. *Proc Natl Acad Sci U S A* **116**: 21789–21799.

Peng, Q., Kao, G., Qu, N., Zhang, J., Li, J., and Song, F. (2016) The Regulation of Exosporium-Related Genes in *Bacillus thuringiensis*. *Scientific Reports* **6**: 19005.

Piggot, P.J., and Coote, J.G. (1976) Genetic aspects of bacterial endospore formation. *Bacteriol Rev* **40**: 908–962.

Plata, G., Fuhrer, T., Hsiao, T.-L., Sauer, U., and Vitkup, D. (2012) Global probabilistic annotation of metabolic networks enables enzyme discovery. *Nat Chem Biol* **8**: 848–854.

Popham, D.L., and Bernhards, C.B. (2016) Spore Peptidoglycan. In *The Bacterial Spore*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 157–177 <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1128/9781555819323.ch8>. Accessed May 25, 2021.

Qiao, H., Krajcikova, D., Xing, C., Lu, B., Hao, J., Ke, X., et al. (2013) Study of the interactions between the key spore coat morphogenetic proteins CotE and SpoVID. *Journal of Structural Biology* **181**: 128–135.

Ragkousi, K., and Setlow, P. (2004) Transglutaminase-Mediated Cross-Linking of GerQ in the Coats of *Bacillus subtilis* Spores. *Journal of Bacteriology* **186**: 5567–5575.

Ramamurthi, K.S., Clapham, K.R., and Losick, R. (2006) Peptide anchoring spore coat assembly to the outer forespore membrane in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology* **62**: 1547–1557.

Ramamurthi, K.S., and Losick, R. (2008) ATP-Driven Self-Assembly of a Morphogenetic Protein in *Bacillus subtilis*. *Molecular Cell* **31**: 406–414.

Ramamurthi, K.S., and Losick, R. (2009) Negative membrane curvature as a cue for subcellular localization of a bacterial protein. *PNAS* **106**: 13541–13545.

Ramarao, N., and Lereclus, D. (2005) The InhA1 metalloprotease allows spores of the *B. cereus* group to escape macrophages. *Cellular Microbiology* **7**: 1357–1364.

- Ramírez-Guadiana, F.H., Rodrigues, C.D.A., Marquis, K.A., Campo, N., Barajas-Ornelas, R. del C., Brock, K., et al.** (2018) Evidence that regulation of intramembrane proteolysis is mediated by substrate gating during sporulation in *Bacillus subtilis*. *PLOS Genetics* **14**: e1007753.
- Ramos-Silva, P., Serrano, M., and Henriques, A.O.** (2019) From Root to Tips: Sporulation Evolution and Specialization in *Bacillus subtilis* and the Intestinal Pathogen *Clostridioides difficile*. *Molecular Biology and Evolution* **36**: 2714–2736.
- Rhayat, L., Duperrier, S., Carballido-López, R., Pellegrini, O., and Stragier, P.** (2009) Genetic Dissection of an Inhibitor of the Sporulation Sigma Factor σ_G . *Journal of Molecular Biology* **390**: 835–844.
- Ricca, E., Cutting, S., and Losick, R.** (1992) Characterization of *bofA*, a gene involved in intercompartmental regulation of pro-sigma K processing during sporulation in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* **174**: 3177–3184.
- Rinke, C., Schwientek, P., Sczyrba, A., Ivanova, N.N., Anderson, I.J., Cheng, J.-F., et al.** (2013) Insights into the phylogeny and coding potential of microbial dark matter. *Nature* **499**: 431–437.
- Rodenburg, C.M., McPherson, S.A., Turnbough, C.L., and Dokland, T.** (2014) Cryo-EM analysis of the organization of BclA and BxpB in the *Bacillus anthracis* exosporium. *Journal of Structural Biology* **186**: 181–187.
- Rodrigues, C.D.A., Ramírez-Guadiana, F.H., Meeske, A.J., Wang, X., and Rudner, D.Z.** (2016) GerM is required to assemble the basal platform of the SpoIII_A-SpoII_Q transenvelope complex during sporulation in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **102**: 260–273.
- Roels, S., and Losick, R.** (1995) Adjacent and divergently oriented operons under the control of the sporulation regulatory protein GerE in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **177**: 6263–6275.
- Rubio, A., and Pogliano, K.** (2004) Septal localization of forespore membrane proteins during engulfment in *Bacillus subtilis*. *The EMBO Journal* **23**: 1636–1646.
- Rudner, D.Z., and Losick, R.** (2002) A sporulation membrane protein tethers the pro- σ_K processing enzyme to its inhibitor and dictates its subcellular localization. *Genes Dev* **16**: 1007–1018.
- Ryter, A.** (1965) [MORPHOLOGIC STUDY OF THE SPORULATION OF *BACILLUS SUBTILIS*]. *Ann Inst Pasteur (Paris)* **108**: 40–60.
- Saggese, A., Scamardella, V., Sirec, T., Cangiano, G., Istatico, R., Pane, F., et al.** (2014) Antagonistic Role of CotG and CotH on Spore Germination and Coat Formation in *Bacillus subtilis*. *PLOS ONE* **9**: e104900.
- Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A., and Arnheim, N.** (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**: 1350–1354.
- Schaeffer, P.** (1967) Asporogenous mutants of *Bacillus subtilis* marburg. *Folia Microbiol* **12**: 291–296.
- Schaeffer, P., and Ionesco, H.** (1960) A contribution to the genetic study of bacterial sporogenesis. *Compte Rendu Hebdomadaire des Seances de l'Academie des Sciences* **251**: 3125–27.
- Scheeff, E.D., Axelrod, H.L., Miller, M.D., Chiu, H.-J., Deacon, A.M., Wilson, I.A., and Manning, G.** (2010) Genomics, evolution, and crystal structure of a new family of bacterial spore kinases. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* **78**: 1470–1482.

- Schmidt, R., Margolis, P., Duncan, L., Coppolecchia, R., Moran, C.P., and Losick, R.** (1990) Control of developmental transcription factor sigma F by sporulation regulatory proteins SpoIIAA and SpoIIAB in *Bacillus subtilis*. *PNAS* **87**: 9221–9225.
- Secaira-Morocho, H., Castillo, J.A., and Driks, A.** (2020) Diversity and evolutionary dynamics of spore-coat proteins in spore-forming species of *Bacillales*. *Microb Genom* **6** <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7725329/>. Accessed April 14, 2021.
- Segall, J., and Losick, R.** (1977) Cloned bacillus subtilis DNA containing a gene that is activated early during sporulation. *Cell* **11**: 751–761.
- Serrano, M., Gao, J., Bota, J., Bate, A.R., Meisner, J., Eichenberger, P., et al.** (2015) Dual-Specificity Anti-sigma Factor Reinforces Control of Cell-Type Specific Gene Expression in *Bacillus subtilis*. *PLOS Genetics* **11**: e1005104.
- Serrano, M., Neves, A., Soares, C.M., Moran, C.P., and Henriques, A.O.** (2004) Role of the Anti-Sigma Factor SpoIIAB in Regulation of σ_G during *Bacillus subtilis* Sporulation. *Journal of Bacteriology* **186**: 4000–4013.
- Serrano, M., Real, G., Santos, J., Carneiro, J., Jr, C.P.M., and Henriques, A.O.** (2011) A Negative Feedback Loop That Limits the Ectopic Activation of a Cell Type-Specific Sporulation Sigma Factor of *Bacillus subtilis*. *PLOS Genetics* **7**: e1002220.
- Setlow, B., Atluri, S., Kitchel, R., Koziol-Dube, K., and Setlow, P.** (2006) Role of Dipicolinic Acid in Resistance and Stability of Spores of *Bacillus subtilis* with or without DNA-Protective α/β -Type Small Acid-Soluble Proteins. *Journal of Bacteriology* **188**: 3740–3747.
- Setlow, B., McGinnis, K.A., Ragkousi, K., and Setlow, P.** (2000) Effects of Major Spore-Specific DNA Binding Proteins on *Bacillus subtilis* Sporulation and Spore Properties. *Journal of Bacteriology* **182**: 6906–6912.
- Setlow, P.** (2016) Spore Resistance Properties. In *The Bacterial Spore*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 201–215 <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1128/9781555819323.ch10>. Accessed November 18, 2020.
- Severson, K.M., Mallozzi, M., Bozue, J., Welkos, S.L., Cote, C.K., Knight, K.L., and Driks, A.** (2009) Roles of the *Bacillus anthracis* Spore Protein ExsK in Exosporium Maturation and Germination. *Journal of Bacteriology* **191**: 7587–7596.
- Sharp, M.D., and Pogliano, K.** (1999) An *in vivo* membrane fusion assay implicates SpoIIIE in the final stages of engulfment during *Bacillus subtilis* sporulation. *PNAS* **96**: 14553–14558.
- Sharp, M.D., and Pogliano, K.** (2003) The Membrane Domain of SpoIIIE Is Required for Membrane Fusion during *Bacillus subtilis* Sporulation. *Journal of Bacteriology* **185**: 2005–2008.
- Shuster, B., Khemmani, M., Abe, K., Huang, X., Nakaya, Y., Maryn, N., et al.** (2019a) Contributions of crust proteins to spore surface properties in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology* **111**: 825–843.
- Shuster, B., Khemmani, M., Nakaya, Y., Holland, G., Iwamoto, K., Abe, K., et al.** (2019b) Expansion of the Spore Surface Polysaccharide Layer in *Bacillus subtilis* by Deletion of Genes Encoding Glycosyltransferases and Glucose Modification Enzymes. *Journal of Bacteriology* **201** <https://jb.asm.org/content/201/19/e00321-19>. Accessed May 25, 2021.
- Sjodt, M., Rohs, P.D.A., Gilman, M.S.A., Erlandson, S.C., Zheng, S., Green, A.G., et al.** (2020) Structural coordination of polymerization and crosslinking by a SEDS-bPBP peptidoglycan synthase complex. *Nat Microbiol*

5: 813–820.

- Sleep, N.H., and Bird, D.K.** (2008) Evolutionary ecology during the rise of dioxygen in the Earth's atmosphere. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **363**: 2651–2664.
- Smith, H.O., and Welcox, K.W.** (1970) A Restriction enzyme from *Hemophilus influenzae*: I. Purification and general properties. *Journal of Molecular Biology* **51**: 379–391.
- Smith, K., Bayer, M.E., and Youngman, P.** (1993) Physical and functional characterization of the *Bacillus subtilis* spoIIIM gene. *Journal of Bacteriology* **175**: 3607–3617.
- Soto-Avila, L., Merce, R.C., Santos, W., Castañeda, N., and Gutierrez-Ríos, R.-M.** (2021) Distribution and preservation of the components of the engulfment. What is beyond representative genomes? *PLoS One* **16**: e0246651.
- Spizizen, J.** (1958) TRANSFORMATION OF BIOCHEMICALLY DEFICIENT STRAINS OF *BACILLUS SUBTILIS* BY DEOXYRIBONUCLEATE. *Proc Natl Acad Sci U S A* **44**: 1072–1078.
- Steichen, C.T., Kearney, J.F., and Turnbough, C.L.** (2005) Characterization of the Exosporium Basal Layer Protein BxpB of *Bacillus anthracis*. *Journal of Bacteriology* **187**: 5868–5876.
- Steichen, C.T., Kearney, J.F., and Turnbough, C.L.** (2007) Non-uniform assembly of the *Bacillus anthracis* exosporium and a bottle cap model for spore germination and outgrowth. *Molecular Microbiology* **64**: 359–367.
- Steil, L., Serrano, M., Henriques, A.O., and Völker, U.** 2005 Genome-wide analysis of temporally regulated and compartment-specific gene expression in sporulating cells of *Bacillus subtilis*. *Microbiology* **151**: 399–420.
- Stelma, G.N., Aronson, A.I., and Fitz-James, P.** (1978) Properties of *Bacillus cereus* temperature-sensitive mutants altered in spore coat formation. *Journal of Bacteriology* **134**: 1157–1170.
- Stelma, G.N., Aronson, A.I., and Fitz-James, P.C.Y.** 1980 A *Bacillus cereus* Mutant Defective in Spore Coat Deposition. *Microbiology* **116**: 173–185.
- Stewart, G.C.** (2015) The Exosporium Layer of Bacterial Spores: a Connection to the Environment and the Infected Host. *Microbiol Mol Biol Rev* **79**: 437–457.
- Stewart, G.C.** (2017) Assembly of the outermost spore layer: pieces of the puzzle are coming together. *Molecular Microbiology* **104**: 535–538.
- Stouf, M., Meile, J.-C., and Cornet, F.** (2013) FtsK actively segregates sister chromosomes in *Escherichia coli*. *PNAS* **110**: 11157–11162.
- Stragier, P., Bonamy, C., and Karmazyn-Campelli, C.** (1988) Processing of a sporulation sigma factor in *Bacillus subtilis*: How morphological structure could control gene expression. *Cell* **52**: 697–704.
- Stragier, P., Kunkel, B., Kroos, L., and Losick, R.** (1989) Chromosomal rearrangement generating a composite gene for a developmental transcription factor. *Science* **243**: 507–512.
- Sun, D.X., Cabrera-Martinez, R.M., and Setlow, P.** (1991) Control of transcription of the *Bacillus subtilis* spoIIIG gene, which codes for the forespore-specific transcription factor sigma G. *Journal of Bacteriology* **173**: 2977–2984.
- Sun, D.X., Stragier, P., and Setlow, P.** (1989) Identification of a new sigma-factor involved in compartmentalized gene expression during sporulation of *Bacillus subtilis*. *Genes Dev* **3**: 141–149.
- Sun, Y.-L., Sharp, M.D., and Pogliano, K.** (2000) A Dispensable Role for Forespore-Specific Gene Expression in

Engulfment of the Forespore during Sporulation of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* **182**: 2919–2927.

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

Sylvestre, P., Couture-Tosi, E., and Mock, M. (2003) Polymorphism in the Collagen-Like Region of the *Bacillus anthracis* BclA Protein Leads to Variation in Exosporium Filament Length. *Journal of Bacteriology* **185**: 1555–1563.

Sylvestre, P., Couture-Tosi, E., and Mock, M. (2005) Contribution of ExsFA and ExsFB Proteins to the Localization of BclA on the Spore Surface and to the Stability of the *Bacillus anthracis* Exosporium. *Journal of Bacteriology* **187**: 5122–5128.

Takahashi, I. (1961) Genetic transduction in *Bacillus subtilis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **5**: 171–175.

Takahashi, I. (1965) Transduction of Sporogenesis in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* **89**: 294–298.

Takahashi, I.Y. 1963 Transducing Phages for *Bacillus subtilis*. *Microbiology* **31**: 211–217.

Takamatsu, H., Chikahiro, Y., Kodama, T., Koide, H., Kozuka, S., Tochikubo, K., and Watabe, K. (1998) A spore coat protein, CotS, of *Bacillus subtilis* is synthesized under the regulation of sigmaK and GerE during development and is located in the inner coat layer of spores. *J Bacteriol* **180**: 2968–2974.

Takamatsu, H., Imamura, A., Kodama, T., Asai, K., Ogasawara, N., and Watabe, K. (2000a) The *yabG* gene of *Bacillus subtilis* encodes a sporulation specific protease which is involved in the processing of several spore coat proteins. *FEMS Microbiol Lett* **192**: 33–38.

Takamatsu, H., Imamura, D., Kuwana, R., and Watabe, K. (2009) Expression of *yeeK* during *Bacillus subtilis* Sporulation and Localization of YeeK to the Inner Spore Coat using Fluorescence Microscopy. *Journal of Bacteriology* **191**: 1220–1229.

Takamatsu, H., Kodama, T., Imamura, A., Asai, K., Kobayashi, K., Nakayama, T., et al. (2000b) The *Bacillus subtilis yabG* Gene Is Transcribed by SigK RNA Polymerase during Sporulation, and *yabG* Mutant Spores Have Altered Coat Protein Composition. *Journal of Bacteriology* **182**: 1883–1888.

Takamatsu, H., Kodama, T., Nakayama, T., and Watabe, K. (1999) Characterization of the *yrbA* Gene of *Bacillus subtilis*, Involved in Resistance and Germination of Spores. *Journal of Bacteriology* **181**: 4986–4994.

Tan, I.S., and Ramamurthi, K.S. (2013) Membrane Remodeling: FisB Will Do In a Pinch. *Current Biology* **23**: R251–R253.

Tan, I.S., and Ramamurthi, K.S. (2014) Spore formation in *Bacillus subtilis*. *Environmental Microbiology Reports* **6**: 212–225.

Tan, I.S., Weiss, C.A., Popham, D.L., and Ramamurthi, K.S. (2015) A Quality-Control Mechanism Removes Unfit Cells from a Population of Sporulating Bacteria. *Developmental Cell* **34**: 682–693.

Terry, C., Jiang, S., Radford, D.S., Wan, Q., Tzokov, S., Moir, A., and Bullough, P.A. (2017) Molecular tiling on the surface of a bacterial spore – the exosporium of the *Bacillus anthracis/cereus/thuringiensis* group. *Molecular Microbiology* **104**: 539–552.

Terry, C., Shepherd, A., Radford, D.S., Moir, A., and Bullough, P.A. (2011) YwdL in *Bacillus cereus*: Its Role in Germination and Exosporium Structure. *PLOS ONE* **6**: e23801.

- Thompson, B.M., Hoelscher, B.C., Driks, A., and Stewart, G.C.** (2011a) Localization and Assembly of the Novel Exosporium Protein BetA of *Bacillus anthracis*. *Journal of Bacteriology* **193**: 5098–5104.
- Thompson, B.M., Hoelscher, B.C., Driks, A., and Stewart, G.C.** (2012) Assembly of the BclB glycoprotein into the exosporium and evidence for its role in the formation of the exosporium 'cap' structure in *Bacillus anthracis*. *Molecular Microbiology* **86**: 1073–1084.
- Thompson, B.M., Hsieh, H.-Y., Spreng, K.A., and Stewart, G.C.** (2011b) The co-dependence of BxpB/ExsFA and BclA for proper incorporation into the exosporium of *Bacillus anthracis*. *Molecular Microbiology* **79**: 799–813.
- Thompson, B.M., and Stewart, G.C.** (2008) Targeting of the BclA and BclB proteins to the *Bacillus anthracis* spore surface. *Molecular Microbiology* **70**: 421–434.
- Thompson, B.M., Waller, L.N., Fox, K.F., Fox, A., and Stewart, G.C.** (2007) The BclB Glycoprotein of *Bacillus anthracis* Is Involved in Exosporium Integrity. *Journal of Bacteriology* **189**: 6704–6713.
- Tocheva, E.I., López-Garrido, J., Hughes, H.V., Fredlund, J., Kuru, E., VanNieuwenhze, M.S., et al.** (2013) Peptidoglycan transformations during *Bacillus subtilis* sporulation. *Molecular Microbiology* **88**: 673–686.
- Todd, S.J., Moir, A.J.G., Johnson, M.J., and Moir, A.** (2003) Genes of *Bacillus cereus* and *Bacillus anthracis* Encoding Proteins of the Exosporium. *Journal of Bacteriology* **185**: 3373–3378.
- Tran, H.T., and Bonilla, C.Y.** (2021) SigB-regulated antioxidant functions in gram-positive bacteria. *World J Microbiol Biotechnol* **37**: 38.
- Travers, A.A., and Burgess, R.R.** (1969) Cyclic Re-use of the RNA Polymerase Sigma Factor. *Nature* **222**: 537–540.
- Trempey, J.E., Bonamy, C., Szulmajster, J., and Haldenwang, W.G.** (1985) *Bacillus subtilis* sigma factor sigma 29 is the product of the sporulation-essential gene spoIIG. *PNAS* **82**: 4189–4192.
- Ursem, R., Swarge, B., Abhyankar, W.R., Buncherd, H., Koning, L.J. de, Setlow, P., et al.** (2021) Identification of Native Cross-Links in *Bacillus subtilis* Spore Coat Proteins. *J Proteome Res* **20**: 1809–1816.
- Vasudevan, P., Weaver, A., Reichert, E.D., Linnstaedt, S.D., and Popham, D.L.** (2007) Spore cortex formation in *Bacillus subtilis* is regulated by accumulation of peptidoglycan precursors under the control of sigma K. *Molecular Microbiology* **65**: 1582–1594.
- Wakeley, P., Hoa, N.T., and Cutting, S.** (2000) BofC negatively regulates SpoIVB-mediated signalling in the *Bacillus subtilis* σ K-checkpoint. *Molecular Microbiology* **36**: 1415–1424.
- Walker, P.D.** (1970) (Symposium on Bacterial Spores: Paper I). Cytology of Spore Formation and Germination. *Journal of Applied Bacteriology* **33**: 1–12.
- Waller, L.N., Fox, N., Fox, K.F., Fox, A., and Price, R.L.** (2004) Ruthenium red staining for ultrastructural visualization of a glycoprotein layer surrounding the spore of *Bacillus anthracis* and *Bacillus subtilis*. *Journal of Microbiological Methods* **58**: 23–30.
- Wang, F., Song, T., Jiang, H., Pei, C., Huang, Q., and Xi, H.** (2019) *Bacillus subtilis* Spore Surface Display of Haloalkane Dehalogenase DhaA. *Curr Microbiol* **76**: 1161–1167.
- Wang, K.H., Isidro, A.L., Domingues, L., Eskandarian, H.A., McKenney, P.T., Drew, K., et al.** (2009) The coat morphogenetic protein SpoVID is necessary for spore encasement in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology* **74**: 634–649.

- Warth, A.D., Ohye, D.F., and Murrell, W.G.** (1963) THE COMPOSITION AND STRUCTURE OF BACTERIAL SPORES. *Journal of Cell Biology* **16**: 579–592.
- Watson, J.D., and Crick, F.H.C.** (1953) Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature* **171**: 737–738.
- Wu, I.-L., Narayan, K., Castaing, J.-P., Tian, F., Subramaniam, S., and Ramamurthi, K.S.** (2015) A versatile nano display platform from bacterial spore coat proteins. *Nature Communications* **6**: 6777.
- Wu, L.J., and Errington, J.** (1994) *Bacillus subtilis* spoIII^E protein required for DNA segregation during asymmetric cell division. *Science* **264**: 572–575.
- Wu, L.J., and Errington, J.** (1998) Use of asymmetric cell division and spoIII^E mutants to probe chromosome orientation and organization in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology* **27**: 777–786.
- Young, I.E., and Fitz-James, P.C.** (1959a) Chemical and Morphological Studies of Bacterial Spore Formation : I. The Formation of Spores in *Bacillus cereus*. *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology* **6**: 467–482.
- Young, I.E., and Fitz-James, P.C.** (1959b) Chemical and Morphological Studies of Bacterial Spore Formation : II. Spore and Parasporal Protein Formation in *Bacillus cereus* var. *Alesti*. *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology* **6**: 483–498.
- Young, I.E., and Fitz-James, P.C.** (1959c) Chemical and Morphological Studies of Bacterial Spore Formation : III. The Effect of 8-Azaguanine on Spore and Parasporal Protein Formation in *Bacillus cereus* var. *Alesti*. *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology* **6**: 499–506.
- Zhang, B., Hofmeister, A., and Kroos, L.** (1998) The Prosequence of Pro- σ K Promotes Membrane Association and Inhibits RNA Polymerase Core Binding. *Journal of Bacteriology* **180**: 2434–2441.
- Zhang, J., Fitz-James, P.C., and Aronson, A.I.** (1993) Cloning and characterization of a cluster of genes encoding polypeptides present in the insoluble fraction of the spore coat of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* **175**: 3757–3766.
- Zilhão, R., Isticato, R., Martins, L.O., Steil, L., Völker, U., Ricca, E., et al.** (2005) Assembly and Function of a Spore Coat-Associated Transglutaminase of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* **187**: 7753–7764.
- Zilhão, R., Serrano, M., Isticato, R., Ricca, E., Moran, C.P., and Henriques, A.O.** (2004) Interactions among CotB, CotG, and CotH during Assembly of the *Bacillus subtilis* Spore Coat. *Journal of Bacteriology* **186**: 1110–1119.
- Zuber, P., and Losick, R.** (1983) Use of a lacZ fusion to study the role of the spoO genes of *bacillus subtilis* in developmental regulation. *Cell* **35**: 275–283.

RESUME

Les spores formées par le groupe *Bacillus cereus sensu lato* sont d'un intérêt sanitaire et économique particulier. Les agents pathogènes *B. cereus* et *B. anthracis* sont notamment et respectivement responsables de toxi-infections alimentaires très fréquentes et, de l'anthrax, une maladie rare mais souvent mortelle pour les mammifères. Les spores formées par ces espèces sont enveloppées par un exosporium, un feuillet protéique, par ailleurs absent de la bactérie modèle *B. subtilis*. L'exosporium est important pour contrôler les molécules qui accèdent aux couches plus internes de la spore et la protège ainsi d'évènements de germination dans des conditions qui seraient impropres à soutenir l'émergence d'une population bactérienne. Dans le cadre de l'anthrax, le lieu de germination de la spore est critique pour l'établissement d'une infection. Malgré ces fonctions importantes pour la bactérie, la connaissance des mécanismes moléculaires de l'assemblage de l'exosporium et plus largement des couches protéiques externes des spores de *B. cereus* demeure parcellaire. Dans le cadre de cette thèse, nous avons utilisé pour la première fois une approche de microscopie de fluorescence super-résolution « Structure Illumination » (SR-SIM) pour étudier la cinétique de sporulation de cellules de *B. cereus*. Cette approche nous a permis d'observer le développement des couches protéiques externes des spores et de déterminer le positionnement relatif des protéines importantes pour la genèse de l'exosporium. Ainsi, nous avons mis en évidence l'existence d'une armature faite de protéines morphogénétiques présentes autour de la spore, avant que les couches protéiques externes ne soient visibles. Par ailleurs, l'étude d'une souche de *B. cereus* dans laquelle l'engulfment est inachevé a révélé une divergence importante entre *B. subtilis* et *B. cereus* dans le contrôle de l'activation des facteurs sigma de la sporulation. Enfin, en prenant avantage de l'homogénéité particulière induite par une température de sporulation sous-optimale, nous avons mis en évidence les protéines associées à l'armature des couches protéiques externes qui se distinguent des facteurs intervenant dans la maturation ultérieure de cette matrice en un coat, un interspace et un exosporium. L'ensemble de nos travaux pose de nouveaux jalons dans la compréhension des mécanismes moléculaires de l'assemblage des couches protéiques externes des spores de *B. cereus*.

MOTS CLEFS : Spores, *Bacillus cereus*, Protéines morphogénétiques, Exosporium, Coat, Interspace, SR-SIM

ABSTRACT

The spores formed by the *Bacillus cereus sensu lato* group are of particular sanitary and economic interest. The pathogens *B. cereus* and *B. anthracis* are respectively responsible for very frequent food poisoning and anthrax, a rare but often fatal disease for mammals. The spores formed by these species are enveloped by an exosporium, a proteinaceous layer, otherwise absent from the model bacteria *B. subtilis*. The exosporium is important for controlling the molecules that access the innermost layers of the spore and thus protects it from germination events under conditions ; that would be unsuitable to support the emergence of a bacterial population. In the context of anthrax, the germination site is crucial for the establishment of an infection. Despite these important functions for the bacteria, knowledge of the molecular mechanisms of exosporium assembly and more broadly of the outer protein layers of *B. cereus* spores remains mysterious.

In this thesis, we used for the first time a super-resolution Structure Illumination fluorescence microscopy (SR-SIM) approach to study the sporulation kinetics of *B. cereus* cells. This approach allowed us to observe the development of the outer protein layers of the spores and to determine the relative positioning of proteins important for the morphogenesis of the exosporium. Thus, we have demonstrated the existence of scaffold made of morphogenetic proteins present around the spore, before the external protein layers are visible. Furthermore, the study of a *B. cereus* strain in which the engulfment is incomplete revealed an important divergence between *B. subtilis* and *B. cereus* in the control of the activation of sigma factors of sporulation. Finally, taking advantage of the particular homogeneity induced by a suboptimal sporulation temperature, we highlighted proteins associated with the morphogenetic scaffold from those involved in the subsequent maturation of this matrix into a coat, interspace and exosporium. All our work sets new milestones in the understanding of the molecular mechanisms of the assembly of the outer protein layers of *B. cereus* spores.

MOTS CLEFS : Spores, *Bacillus cereus*, Morphogenetic protein, Exosporium, Coat, Interspace, SR-SIM