



HAL
open science

Structure et fonction de la couche S chez *Bacillus cereus* AH187

Cécile Boutonnet

► **To cite this version:**

Cécile Boutonnet. Structure et fonction de la couche S chez *Bacillus cereus* AH187. Sciences agricoles. Université d'Avignon, 2022. Français. NNT : 2022AVIG0368 . tel-04348087

HAL Id: tel-04348087

<https://theses.hal.science/tel-04348087v1>

Submitted on 16 Dec 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.

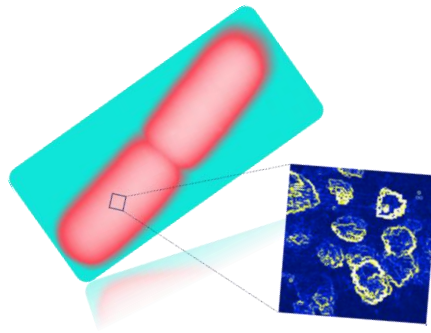
Thèse

Pour obtenir le grade de docteur

Délivrée par Avignon Université

Ecole Doctorale 536 « Sciences et Agro-sciences »

Structure et fonction de la couche S chez *Bacillus cereus* AH187



Préparée au sein de l'UMR408 Sécurité et qualité des produits d'origine
végétale, INRAE et Avignon Université

Présentée par **Cécile Boutonnet**

Soutenance prévue le 14 décembre 2022 devant le jury composé de :

Michel Gohar	Chargé de recherche à INRAE de Jouy-en-Josas	Rapporteur
Thomas Candela	Maitre de conférences à l'Université Paris-Saclay	Rapporteur
Jean Armengaud	Directeur de recherche au CEA de Marcoule	Examinateur
Michel Fons	Professeur à l'université d'Aix-Marseille	Examinateur
Emilie Camiade	Maître de conférences à l'Université de Tours	Invitée
Alice Château-Huyot	Maitre de conférences à l'Université d'Avignon	Co-encadrante
Catherine Duport	Professeur à l'Université d'Avignon	Directrice de thèse

Remerciements

Cette thèse a été une réelle expérience professionnelle et personnelle. Je profite donc pour remercier toutes les personnes qui ont contribué à l'aboutissement de ce travail.

Je tiens tout d'abord à remercier mon jury de thèse Messieurs Michel Gohar, Thomas Candela, Emilie Camiade, Jean Armengaud et Michel Fons d'avoir accepté de lire et de juger mon travail ainsi que de participer à ma soutenance de thèse.

Je remercie ensuite Frédéric Carlin de m'avoir accueilli dans cette unité, et d'avoir eu un regard attentif sur le déroulement de ma thèse.

Je remercie chaleureusement Véronique Broussolle pour son accueil dans l'équipe, pour sa gentillesse et son écoute. Merci d'avoir eu une oreille attentive et accueillante dans les moments les plus difficiles. Merci d'avoir été présente quand j'en ai eu besoin. Merci aussi pour tes conseils scientifiques qui m'ont bien aidé à avancer dans mes réflexions sur les couches S!!

Merci à Catherine Duport de m'avoir permis de réaliser cette thèse, et de m'avoir encadré. Je te remercie pour ton expertise scientifique qui a guidé ma thèse pendant ces trois années. Merci pour la relecture de mes travaux écrits et oraux.

Tous mes remerciements à Alice Château-Huyot. Alice, merci pour tout. Pour ton accueil, pour ton partage de la science (et des mendiants !), pour ta dévotion envers mon projet et mes manips. Merci pour ton aide, merci pour ton soutien envers et contre tout, pour ta bonne humeur et pour ta positivité à toute épreuve, toujours pleine d'espoir ! Tu m'as beaucoup appris. Je suis super fière que tu m'aies encadrée. Ta présence et nos discussions m'ont beaucoup aidé autant sur le plan scientifique qu'humain. Merci d'avoir corrigé mes travaux tout au long de ces trois ans. Je te souhaite de continuer de t'épanouir dans la science !

Je tiens à remercier Sébastien Lyonnais, AFMiste sur la plateforme CNRS de Montpellier d'avoir accepté de travailler avec moi sur mon projet de thèse. Merci pour ces longs moments passés au P3 derrière l'AFM à gratter le dos des bactéries, en musique (mais pas trop pour pas biaiser nos data). Merci pour ta confiance, merci de m'avoir fait découvrir le monde des microscopistes et plus particulièrement des AFMistes. J'espère que nos chemins se recroiseront.

Merci à Claire Dargaignaratz pour toutes les manips que tu as faites avec moi pour mon projet de thèse. Merci de m'avoir partagé tes connaissances en microbio ! J'ai adoré travailler avec toi. Surtout un grand merci pour tout ce que tu faisais, dans l'ombre, pour le labo. Merci aussi pour toutes ces petites attentions que tu nous apportais régulièrement fromages, pommes et gâteaux étaient au rendez-vous au bureau des docs pour notre plus grand bonheur. J'espère que tu profites amplement de la retraite, mais je ne me fais pas de soucis !

Mille remerciements à Stéphanie Chamot (Steph) ou plutôt Mary Poppins voilà, tout est dit ! Plus d'un tour dans son sac ! Un incroyable soutien durant ces 3 ans ! Merci mille fois pour ton aide pour les manips, pour m'avoir aidé à développer mon esprit scientifique, pour être la mémoire de ce labo ! Merci de m'avoir écouté pendant des heures. Merci d'avoir tendu une épaule pendant 3 ans, je sais que ce n'était pas non plus facile pour toi de nous soutenir mais tu as toujours été présente. Sans toi et ton écoute ces trois ans auraient été beaucoup plus amères. Merci de m'avoir pris sous ton aile pour mes premières sorties escalade. Merci d'avoir respecté ces temps en dehors du labo, où on s'évadait en haut d'un caillou. Merci pour le chocolaaaaat !

Je remercie tout particulièrement Sandrine Poncet (Cendrillon) pour son soutien inébranlable durant trois ans. Merci pour ta bonne humeur, toutes tes histoires à dormir debout qui nous ont bien fait rire. Merci de m'avoir aidé dans mon projet de thèse autant en microbiologie qu'en biochimie ! Merci pour tes nombreux conseils ! Et surtout un grand merci pour la relecture de mes écrits et de mes oraux tout au long de ma thèse, qui m'ont permis de prendre confiance en moi. Merci pour tout le temps et l'énergie que tu as mis dans cette thèse, surtout dans les derniers moments.

Je remercie toutes les personnes de sporAlim Bénédicte Doublet, Stéphanie Oriol, Thierry Clavel, Christophe Nguyen, Marie-Hélène Guinebretière, Luc Dedieu pour leur accueil au sein de l'équipe.

Merci à Christian Ginies (Chrichri) pour les manips de GCMS et les blagues nulles à toute épreuve. Béatrice Gleize pour ton honnêteté et ton soutien, pour ton humour, et bien sûr les repas chez ta sœur ! Merci à vous deux pour votre honnêteté, vos blagues, vos conseils, d'avoir gardé les yeux ouverts attentifs au cours des trois ans.

Je voudrais remercier spécialement Isabelle Bornard pour ses quelques mots qui ont résonné en moi, et qui m'ont donné du courage pour la fin de ma thèse. Merci pour cet acharnement à essayer de voir au MET quelque chose qui nous échappait (la couche S bien sûr) mais qui comptait beaucoup pour ma thèse.

Merci à Thierry Maylheuc pour les belles images au MEB que nous avons réalisées. Je tiens à te remercier particulièrement pour ta compréhension et pour tes encouragements. Les discussions que j'ai eues avec toi m'ont permis de reprendre espoir et de finir ma thèse.

Un grand merci à mes docs préférés ! Merci à Armand Lablaine (Armando), Fella Hamitouche (Mme Hamitouche !), Imed (Midou) Dorbani (Mohamed, Eddine ;)), et Charlène Sirvins (Charlènou) pour tous ces moments passés. Nous avons passés de beaux moments dans ce bureau des docs : beaucoup de blagues, de cache-cache, d'imitations (!!!), un peu de twerk, de rire, de fou rire, et surtout beaucoup de SUCRE ! Quelques TP oignons avec Fella, quelques sorties escalades avec Charlènou, beaucoup de repas et de jeu de société, un peu de rivière, un peu de mer. Charlène et Imed, un immense merci pour votre soutien ! Tolérance et bienveillance ont fait cet équilibre qui nous a permis de beaucoup rire pendant cette thèse. Merci à vous deux, mes plus précieux partenaires et soutiens de cette thèse. Je vous souhaite que du bonheur pour la suite !

Merci à tous les docs, postdoc et stagiaires avec qui j'ai partagé de bons moments : Thibault Soubrat, Miarka Sinkora, Sebastian Rincon, Emmanuelle Richard, Alienor Dutheil de la Rochère, Clarisse Breard pour les sorties à la rivière, les soirées jeux de sociétés ! Merci à ceux que j'ai oubliés aussi.

Un énorme merci à mes colocs : Melvin Mouret (Melvinos, Melvina), Morgane Sanchez (Momo), Lila Champion (Lilou), Jean Klein (Juan), Antoine Gimenez (Toto), Francois Giovanetti (Fanfan), Julie Piroard (Jujul), Sarah Klein (Sarouel). Merci pour tous les moments passés ensemble confinement compris. Merci à chacun de vous d'avoir partagé ma vie pendant trois ans. Quelques lasagnes et raclettes, beaucoup de cookies, pas mal d'alcool aussi, quelques pas de danse et acrobaties, des blobs, beaucoup, beaucoup d'eau, des baleines, mais surtout beaucoup d'amour. Vous avez aussi appris à aimer mes bactos. Mille merci aux roquilliens ! (*Roquillien, espèce très peu développée et assez féroce en temps de pénurie de crumble). Merci à tous pour votre soutien du quotidien sans quoi ma thèse aurait été incroyablement si peu amusante. Vous avez aiguayé mes soirées et mes week-ends. Un merci infini à Fanfan pour ton soutien acharné, sans toi ma thèse aurait été foncièrement différente et extrêmement plus difficile. Merci pour nos longues conversations sur mon projet de thèse, de m'avoir fait réfléchir, de m'avoir fait répéter ma présentation du BACT mille fois, de m'avoir parlé qu'anglais pendant 3 mois

avant ce congrès, et j'en passe. Merci de m'avoir plongé doucement mais sûrement dans la passion escalade. Hâte de découvrir les autres cailloux de France et de l'outre-mer avec toi !

Merci à mes copains prefs en or pour ces 6 ans d'amitié maintenant : Rozenn Gasnier (Roro), Magdalena Osowiecka (Magdo), Paul Huchedé (Polo), Pauline Lacaze (Cazio), Julie Couleaud (Julia), Pauline Darcel (Darcouille) et Thomas Schott (Omar Scho). Merci d'être vous. On a oublié mais tout a commencé au Marché bar. Merci pour votre soutien sans relâche tout au long de la thèse, merci pour ces week-ends à travers la France, merci pour ces vacances jusqu'en Martinique ! Vous êtes les petits êtres les plus funs de mon entourage, merci pour votre amour et votre écoute. J'espère que l'on roulera sur la vie tous ensemble encore de belles années. Hâte qu'on achète une maison en Polynésie tous ensemble (il faudra expliquer cette phrase à Magdo, et Darcouille et peut-être Toto, les autres vous vous en chargerez?) Croquons la vie tous ensemble-(QDL). Polo et Toto, on se n'est pas lâché, ça a été vital pour moi. Merci. Mille courages pour la fin de votre thèse, la dernière ligne droite. Vous êtes d'excellents scientifiques et de sublimes personnes, n'en doutez jamais !

Frère Raphaël, mon amica (c'est du latin), merci pour tout. Merci d'être le gars qui fait des blagues mi-drôles mi-raisisn tout le temps ! Merci, malgré ton confinement à vie (ou presque) tu as su être là, m'envoyer des photos de toi (!!!) avec ta robe gris moche (le gris hein pas la robe) au ski, à la plage, au bar ! Amare (latin again (anglais)) ami de toujours ! Grace à toi j'ai eu mon bac de math et me voilà ici aujourd'hui.

Mille mercis à Ariane et Diane mes amies de toujours pour m'avoir suivi de près (même de loin) durant trois ans. On avance ensemble depuis longtemps maintenant, et pour longtemps encore. Ariane, la meilleure de mes amies, merci pour ton amour, ton soutien, à chaque minute de nos vies. Je n'ai pas les mots, mais on sait à quel point cette amitié est extraordinaire et à quel point ton soutien quotidien a été important. Mille mercis à vous deux d'être mes amies.

Merci à tous mes amis d'Avignon et de Montpellier : Cyrille Clément (Crilou), Thibault Vanghelue Gottardo (thibthib), Maÿliss Girardon, Mathilde Rouvière, Louise Duclerc (Loul Duc), Emilien Rottier (Emiliano), Francois Perrudin (Francois premier), Camille Moret (Camomo) avec qui j'ai passé de bons moments pendant trois ans.

Merci à mes trois plus grands supporters : Paul Boutonnet (Polo), Marie-Jeanne Valony (Maman MJ) et Jean-Pierre Boutonnet (Papa JP). Polo, merci d'être mon piche préféré. Merci pour ton soutien et nos fous rires ! Merci de m'avoir compris et d'avoir partagé ma haine contre l'injustice avec moi. Merci pour nos incessantes discussions de la plus haute importance du style 'tu préfères le gaspacho avec ou sans pêches ?' ! Plein d'amour ! Papa, Maman (MJP). Merci d'avoir répondu à mes appels tous les soirs pendant 1 an et plus. Merci d'avoir toujours répondu présents pendant 3 ans de m'avoir accueilli malgré le travail et la fatigue pendant mes manip à Montpellier. Merci de m'avoir aidé à comprendre ce monde fou de la recherche et d'avoir investi du temps et du soutien pour m'encourager. J'imagine que cela n'a pas forcément été facile pour vous, mais vous avez toujours été présents durant ces trois ans. Merci Maman pour ton humour, parce qu'on ne te le dit pas assez, mais tu nous fais beaucoup rire. Merci Papa de m'avoir passé ton don de coupeur de feu, j'en ferai bon usage. Merci d'être des parent-scientifiques de qualité !

Enfin je remercie toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce projet.

Valorisation des travaux de thèse

Publications

1. **Boutonnet C**, Lyonnais S, Alpha-Bazin B, Armengaud J, Château A and Duport C (2022)
Dynamic Profile of S-Layer Proteins Controls Surface Properties of Emetic *Bacillus cereus* AH187 Strain. *Front. Microbiol.* 13 : 937862. Doi : 10.3389/fmicb.2022.937862
2. **Boutonnet C**, Ginies C, Alpha-Bazin B, Armengaud J, Château A, and Duport C,
S-layer is a key component of the starvation-survival response in *B. cereus* AH187 (*in preparation*)

Congrès

1. **Présentation orale lors du congrès national de la Société Française de Microbiologie du 22 au 24 septembre 2021 à Nantes**

Composition et contribution de la couche S aux propriétés de surface de *Bacillus cereus* AH187

2. **Présentation orale au congrès international *Bacillus Anthracis Cereus and Thuringiensis* du 24 au 28 avril 2022 à Paris**

Composition and contribution of the S-layer to the surface properties of *Bacillus cereus* AH187

3. **Présentation d'un poster congrès national de la Société Française de Microbiologie du 3 au 5 octobre 2022 à Montpellier**

Implication de la couche S dans les propriétés de surface de *B. cereus* AH187.

Abréviations

5-HT3 : 5-hydroxytryptamine	LB : Luria-Bertani Broth
AcétylCoA : Acétyl-coenzyme A	L. acidophilus : <i>Lactobacillus acidophilus</i>
ADN : Acide désoxyribonucléique	L. brevis : <i>Lactobacillus brevis</i>
ADP : Adénosine di-phosphate	L. crispatus : <i>Lactobacillus crispatus</i>
AFLP : Polymorphisme de longueur des fragments amplifiés	L. helveticus : <i>Lactobacillus helveticus</i>
AFM : microscopie à force atomique	L. kefir : <i>Lactobacillus kefir</i>
AG : Acides gras	LC-MS/MS : Chromatographie en phase liquide spectrométrie de masse
Ala : Alanine	LE : Late exponentiel
ARN : Acide ribonucléique	LMW : Low molecular weight
ARNm : ARN messenger	Man : Mannose
ATP : Adénosine tri-phosphate	MLEE : Electrophorèse enzymatique multilocus
ATR : Acide tolerance resistance	MLST : Typage génomique multilocus
B. brevis : <i>Bacillus brevis</i>	MODG : Milieu MOD avec glucose
BCA : BiCinchoninic acid assay	NAc : N-acétyle
B. cereus : <i>Bacillus cereus</i>	NaCl : Chlorure de sodium
B. licheniformis : <i>Bacillus licheniformis</i>	NAD : Nicotinamide adénine dinucléotide
B. sphaericus : <i>Bacillus sphaericus</i>	NADPH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
B. subtilis : <i>Bacillus subtilis</i>	NSAF : Normalized Spectral Abundance Factor
BHI : Brain Heart Infusion	Nhe : Entérotoxine non-hémolytique
BSL : <i>Bacillus</i> S-layer protein associated	NRPS : Non ribosomal peptide synthetase
C. botulinum : <i>Clostridium botulinum</i>	PPP : Voie des pentoses phosphates
CBW2 : Cell-wall-binding 2	QI : Quantitative Image
CcpA : Catabolite control protein A	ROS : Reactive oxygen species
C. difficile : <i>Clostridium difficile</i>	RT : Room temperature
C. tetani : <i>Clostridium tetani</i>	S : Stationary
CV : Cristal Violet	SCWP : Secondary Cell Wall Polymers
Cwp : Cell wall proteins	sl : <i>sensu lato</i>
CytK : Cytokine K	SLAP : S-layer associated proteins
E. coli : <i>Escherichia coli</i>	SLH : S-layer homology
EE : Early exponential	SLP : S-layer proteins
ES : Early stationary Gal : Galactose	ss : <i>sensu stricto</i>
FAD : Flavine adénine dinucléotide	S. islandicus : <i>Sulfolobus islandicus</i>
Glc : Glucose	T. forsythia : <i>Tannerella forsythia</i>
G. stearothermophilus : <i>Geobacillus stearothermophilus</i>	TCA : Cycle de l'acide tricarboxylique
GTP : Guanosine-5'-triphosphate	TIAC : Toxi-infection alimentaire collective
HCT : Hydrolysats tryptique de caséine	TS : Tardive stationary
Hex : Hexose	UFC : Unité formant colonie
HMW : High molecular weight	UV : Ultra-violet
HRP : Peroxydase de raifort	WB : Western Blot
IPTG : Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside	WT : Wild type
kDa : kilo Dalton	

Sommaire

Valorisation des travaux de thèse	1
Abréviations	2
Sommaire	3
Liste des figures	7
Avant-propos	9
Chapitre 1 : Etat de l'art	13
I. Bacillus cereus : une bactérie ubiquitaire pathogène	13
1. De la découverte de <i>B. cereus</i> à aujourd'hui	13
2. Taxonomie et diversité phylogénique	14
3. L'enveloppe cellulaire : une entité dynamique	18
3.1. La paroi	18
3.2. La couche S	20
3.3. La capsule	20
4. Le cycle de vie, un avantage environnemental	21
II. Les mécanismes de survie et d'adaptation	22
1. La sporulation, mécanisme principal d'adaptation	22
2. Le métabolisme énergétique de <i>B. cereus</i>	23
2.1. Catabolisme du glucose	23
2.2. La transformation du pyruvate	24
2.3. Catabolisme des acides aminés	26
3. Adaptation aux stress environnementaux	28
3.1. Adaptation aux basses températures	28
3.2. Adaptation au stress salin	29
3.3. Adaptation aux stress survenant dès l'entrée en phase stationnaire	30
III. Les stratégies offensives et défensives	33
1. Le pouvoir pathogène de <i>B. cereus</i> ss	33
1.1. Les infections non gastro-intestinales	33

1.2.	Les infections gastro-intestinales _____	34
2.	Adhésion et biofilms : mécanismes invasifs cellulaires et de surface _____	39
1.1.	L'adhésion _____	39
1.2.	Les biofilms _____	40
IV.	<i>La couche S : une entité de surface conservée étonnante par sa diversité structurale et fonctionnelle.</i> _____	43
1.	Émergence de l'étude des couches S _____	43
2.	Origines évolutives diverses _____	44
3.	La couche S : de la protéine aux fonctions _____	44
3.1.	La sécrétion _____	44
3.2.	L'ancrage _____	46
3.3.	Les modifications post-traductionnelles _____	49
3.4.	L'auto-assemblage spontané formant réseau paracristallin _____	51
4.	Régulation des gènes de couche S _____	52
5.	Diversité Fonctionnelle _____	54
5.1.	Les couches S des archées : une véritable charpente cellulaire _____	54
5.2.	Les multiples fonctions de couches S bactériennes _____	55
	<i>Objectif de la thèse</i> _____	61
	<i>Chapitre 2 : La dynamique des protéines de la couche S contrôle les propriétés de surface de la souche B. cereus AH187</i> _____	65
I.	<i>Contexte</i> _____	65
II.	<i>Article</i> _____	70
III.	<i>Expériences complémentaires</i> _____	87
1.	Matériels et méthodes _____	87
1.1.	Construction de la souche mutante $\Delta s/2$ et conditions de croissance. _____	87
1.2.	Distribution de EA1 à la surface par microscopie à immunofluorescence _____	88
1.3.	Formation de biofilms _____	88
2.	Résultats _____	90
2.1.	Apparition précoce de la protéine EA1. _____	90
2.2.	Capacité des souches à former des biofilms _____	91

Chapitre 3 : La couche S est un élément clé de la réponse aux stress en phase stationnaire __ 97

I. Contexte	97
II. Article	98
1. Abstract	98
2. Introduction	99
3. Material and methods	99
3.1. Bacterial strains, growth conditions, and samples preparation.	99
3.2. Protein Identification by Liquide Chromatography with Tandem Mass spectrometry (nanoLC–MS/MS) and Label-Free Quantification.	100
3.3. Methylchloroformate (MCF) derivatization and Gaz Chromatography Mass Spectrophotometry (GC-MS) analysis.	101
3.4. Glucose, acetate and proteases titration	101
3.5. Autolytic activity.	102
3.6. Cold stress survival.	102
3.7. Salt stress.	102
3.8. Statistical analysis.	102
4. Results	103
4.1. Growth overview of <i>B. cereus</i> WT and $\Delta sl2\Delta eag$ mutant	103
4.2. Comprehensive analysis of cellular proteome remodelling in $\Delta sl2\Delta eag$ cells	104
4.3. Exoproteome dynamic analysis	109
4.4. Resistance to osmotic and cold stress	113
5. Discussion	114
6. Acknowledgment	117
7. References	117
8. Supplementary data	123
III. Expériences complémentaires	125
1. Matériels et méthodes	125
1.1. Croissances dans différents milieux et extraction de couche S	125
1.2. Immunoblot et analyse protéomique de l'extraction de couche S	126
2. Résultats	126
2.1. Croissance des souches dans les différents milieux.	126
2.2. Proportion de EA1 et SL2 en fonction du milieu par analyses protéomiques et biochimiques	127

Chapitre 4 : Discussion générale et conclusions	133
I. Contexte	133
II. Dynamique des SLP à la surface de la cellule végétative	133
1. Production différentielle de SL2 et EA1	133
2. Répartition des deux SLP	134
III. La couche S, élément clé de l'adaptation	135
1. Les propriétés de surfaces induites par la couche S semblent influencer sur la vitesse d'adhésion	135
2. La couche S, élément essentiel à l'adaptation générale à la phase stationnaire	137
3. Les protéines SL2 et EA1 sont-elles régulées de la même manière ?	138
3.1. SL2 dépendante du milieu	138
3.2. SL2 et EA1 dépendantes de la phase de croissance	138
3.3. La couche S est-elle impliquée dans la virulence des souches émétiques ?	140
Bibliographie	143

Liste des figures

Figure 1.1. Observation au microscope optique par contraste de phase des cellules végétatives (A) et des spores (B) de <i>B. cereus</i> AH187	14
Figure 1.2. Arbre phylogénétique classant les espèces de <i>B. cereus</i> sl	17
Figure 1.3. Modèle de la composition de la surface de <i>B. cereus</i>	18
Figure 1.4. Structure du polysaccharide neutre (SCWP) chez <i>B. cereus</i> sl	19
Figure 1.5. Cycle de sporulation et de germination	22
Figure 1.6. Différentes voies respiratoires et fermentaires chez <i>B. cereus</i>	25
Figure 1.7. Voies de dégradation des acides aminés.	27
Figure 1.8. Schéma récapitulatif des facteurs de virulence de <i>B. cereus</i>	35
Figure 1.9. Structure de la céréulide	37
Figure 1.10. Organisation génétique des gènes codant pour la peptide synthétase non-ribosomale	37
Figure 1.11. Isomères théoriques possibles de la céréulide	38
Figure 1.12. Les étapes de la formation de biofilm sur une surface abiotique (Guzmán-Soto et al., 2021)	41
Figure 1.13. Anneau et pellicule d'un biofilm flottant de <i>B. thuringiensis</i>	41
Figure 1.14. Cluster de gènes de couche S de <i>B. anthracis</i> Ames Ancestor	45
Figure 1.15. Mécanismes de sécrétion de SlpA et de Sap et EA1 chez <i>C. difficile</i> et <i>B. anthracis</i> respectivement	46
Figure 1.16. Mécanismes d'ancrage des couches S à la surface des Archées et Bactéries	47
Figure 1.17. Disposition et conformation des SlpA (LMW et HMW) à la surface cellulaire de <i>C. difficile</i>	50
Figure 1.18. Les différents types de symétries de la couche S	52
Figure 2.1. Principe de l'AFM	67
Figure 2.2. Principe des courbes force-distances	68
Figure 2.3. Localisation de EA1 à la surface des cellules mutantes de Δ sl2 et parentales <i>B. cereus</i> AH187 WT	91
Figure 2.4. Quantification de la formation de biofilms	92
Figure 2.5. Formation de biofilms en tube en verre chez <i>B. cereus</i> AH187	92
Figure 3.1. Growth curves of WT and Δ sl2 Δ eag strains.	103
Figure 3.2. Rate of the (A) glucose, (B) acide aspartic and (C) glycine intake	104
Figure 3.3. Dynamics of cellular proteins, which differentially accumulated (DAPs)	105
Figure 3.4. Clusters of orthologous groups (COG) distribution of cellular proteins	107
Figure 3.5. Dynamics of proteins of exoprotéome	111
Figure 3.6. Protease and autolytic activity	113
Figure 3.7. Resistance of stationary phase WT and Δ sl2 Δ eag cells to abiotic stresses	114
Figure S3.1. Rate of the acetate release by WT and Δ sl2 Δ eag cells	123
Figure S3.2 Principal component Analysis (PCA) of WT and Δ sl2 Δ eag intracellular proteome	124
Figure S3.3. Temporal-dynamics of EA1 (red) and SL2 (blue) abundance in the cellular proteome of WT cells	124
Figure 3.8. Paramètres de croissance en fonction des milieux	127
Figure 3.9. Proportion de SL2 et de EA1 au cours de la croissance de <i>B. cereus</i> AH187	128

<i>Figure 3.10. Extraction des deux SLP, SL2 et EA1, lors de la croissance en milieu MODG, LB, et BHI</i>	129
<i>Figure 4.1. Répartition de SL2 et EA1 à la surface au cours de la croissance dans le milieu MODG à 37°C</i>	135
<i>Figure 4.2. Proposition des voies de régulation de la synthèse des protéines de couche S de B. cereus AH187</i>	139

Avant-propos

Le travail présenté dans ce manuscrit porte sur l'étude des fonctions et de la structure de la couche S de la souche émétique *B. cereus* AH187. Les travaux précédents mon projet ont mis en évidence qu'en condition d'oligotrophie, *B. cereus* AH187 ne synthétise plus de couche S, de même qu'il perd sa capacité à sporuler. De plus, il a été vu que dans le groupe *B. cereus*, la couche S est essentiellement présente chez les souches pathogènes, à savoir les souches émétiques et toutes les souches de *B. anthracis*. Il était donc intéressant de s'interroger sur le rôle et la structure de la couche S. Le travail présenté dans ce manuscrit a été initié au laboratoire Sécurité et Qualité des Produits d'Origines Végétales (SQPOV) par le biais de mon travail de thèse. Aucun résultat préliminaire n'ayant été obtenu auparavant au sein de l'équipe, l'étude que j'ai menée durant ces trois ans est donc relativement exploratoire.

Nous avons montré que la couche S de *B. cereus* AH187 est composée de deux protéines de couche S (SLP), SL2 et EA1. Pour étudier le ou les rôles de la couche S et de chacune de ces protéines, nous avons envisagé de construire trois souches mutantes de *B. cereus* AH187 : la première ne synthétisant plus SL2 ($\Delta sl2$), la deuxième ne synthétisant plus EA1 (Δeag) et la dernière ne synthétisant plus les deux SLP ($\Delta sl2\Delta eag$). Malgré de multiples tentatives, nous n'avons pas réussi à obtenir le mutant délété de *eag*. Nous avons donc fait le choix de comparer uniquement la souche sauvage et le double mutant $\Delta sl2\Delta eag$. Il s'ensuivit une longue étude de comparaison de plusieurs phénotypes entre ces deux souches pour essayer de comprendre le rôle de la couche S chez *B. cereus* AH187.

Ce manuscrit est composé de quatre chapitres : le chapitre 1 présente l'état de l'art de mon étude, les chapitres 2 et 3 présentent les résultats obtenus, sous forme d'articles, agrémentés de résultats complémentaires, et le chapitre 4 présente une discussion générale des résultats obtenus et des perspectives. Le grand nombre de phénotypes étudiés a permis une compréhension systémique du rôle de la couche S. Par conséquent, l'état de l'art accorde une importance équivalente à tous les éléments pouvant avoir un impact sur le rôle de la couche S chez *B. cereus*. Il dépeint les caractéristiques principales de *B. cereus*, en s'appuyant principalement sur les phénotypes étudiés dans les chapitres suivants, ainsi que les nombreuses caractéristiques et fonctions des couches S chez les micro-organismes (archées et bactéries).

De plus, lors de cette étude, nous avons étudié les propriétés de surface *via* une technique innovante, la microscopie à force atomique (AFM). Cette technique microscopique s'est développée de plus en plus en biologie et plus particulièrement en microbiologie ces dernières années. Les particularités et le principe complexe de cette méthode sont décrits dans l'introduction du chapitre 2, ce qui facilitera la compréhension des résultats obtenus.

J'espère que le choix du plan proposé vous permettra de comprendre au mieux les résultats présentés dans de cette thèse. Je vous souhaite une bonne lecture.

Chapitre 1

Chapitre 1 : Etat de l'art

I. *Bacillus cereus* : une bactérie ubiquitaire pathogène

1. De la découverte de *B. cereus* à aujourd'hui

Bacillus cereus (*B. cereus*) est une bactérie pathogène en forme de bacille à coloration de Gram positive. *B. cereus* a été décrite pour la première fois en 1887 à partir d'un échantillon d'air prélevé dans une étable au Royaume-Uni. Elle est nommée ainsi pour l'aspect cireux des colonies isolées sur milieux gélosés (Frankland *et al.*, 1887).

B. cereus a été déclarée pathogène pour la première fois en 1937 suite au décès de cochons d'inde dans lesquels une suspension de *B. cereus* avait été injectée (Clark, 1937). Entre 1947 et 1949, en Norvège, 600 personnes ont été infectées par une crème à la vanille contaminée provoquant des épisodes diarrhéiques. Ce sont les premiers cas démontrés de toxi-infections alimentaires collectives (TIAC) dues à *B. cereus* (Hauge, 1955). Selon l'ANSES, les TIAC sont définies par l'apparition d'au moins deux cas similaires d'une symptomatologie, en général gastro-intestinale, dont on peut rapporter la cause à une même origine alimentaire (<https://www.anses.fr/fr/content/les-toxi-infections-alimentaires-collectives-tiac>). En 1971, il a été démontré pour la première fois que *B. cereus* pouvait également être responsable d'intoxinations alimentaires de type émétique provoquant des crises aiguës de nausées et de vomissements (Melling *et al.*, 1976). Depuis, de nombreux cas de TIAC dues à *B. cereus* ont été décrits avec des symptômes diarrhéiques et émétiques (Voir III.1).

Ainsi depuis 1987, le nombre de TIAC est en constante augmentation. Entre 1996 et 2005, *B. cereus* représentait la quatrième cause de TIAC en France, après *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* et *Clostridium difficile* (*C. difficile*). Le nombre de TIAC déclaré ne cesse d'augmenter depuis 2006. En 2012, *B. cereus* est déclarée comme deuxième agent causal de TIAC (Rapport Santé public France 2019).

B. cereus est aussi reconnue comme agent étiologique d'infections localisées ainsi que d'infections systémiques (voir III.2.) (Bottone, 2010; Kotiranta *et al.*, 2000; Mursalin *et al.*, 2020b). De plus, *B. cereus* peut être la cause d'infections nosocomiales (Bottone, 2010; Glasset *et al.*, 2018).

2. Taxonomie et diversité phylogénique

B. cereus sensu stricto (*B. cereus ss*) fait partie du grand groupe *B. cereus* (ou *B. cereus sensu lato*) appartenant à l'embranchement des *Firmicutes*, à la classe des *Bacilli*, à l'ordre des *Bacillales*, à la famille des *Bacillaceae*. Les souches de *B. cereus sl* sont des bacilles mobiles (Fig. 1.1) ou immobiles mesurant 4 à 8 μm de long et formant habituellement de courtes chainettes. Les colonies sont de forme circulaire peu régulière et de couleur crème. Leur taille est comprise entre 2 et 7 mm de diamètre. En plus de croître en présence d'oxygène, *B. cereus ss* est capable de croître en milieu anaérobie. *B. cereus* est ubiquitaire ; elle est donc retrouvée dans les sols, dans l'eau, dans l'air, dans les aliments et chez les mammifères. Sa capacité à former des spores lui permet de résister à des conditions extrêmes telles que des températures très élevées ou très basses, à l'acidité de l'estomac et à la pasteurisation (Ceuppens *et al.*, 2012a; Larsen and Jørgensen, 1997; Meer *et al.*, 1991).

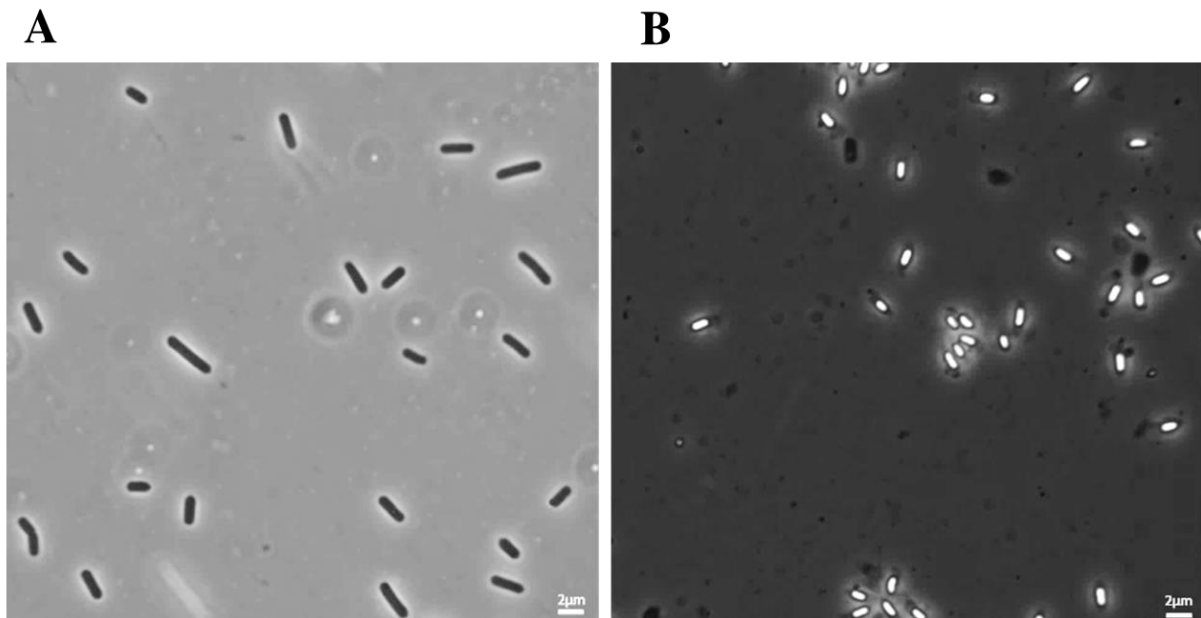


Figure 1.1. Observation au microscope optique par contraste de phase des cellules végétatives (A) et des spores (B) de *B. cereus* AH187 (Château, 2020).

B. cereus *sl* comprend huit espèces principales, qui sont génétiquement très proches (Guinebretière *et al.*, 2008). Initialement, les espèces du groupe ont été différenciées par des caractéristiques phénotypiques, physiologiques et de virulence :

- *B. anthracis* est l'agent responsable de la maladie du charbon (Koch, 1876; Mock and Fouet, 2001),
- *B. cereus* *ss* est associée à des infections alimentaires, oculaires et systémiques (Frankland *et al.*, 1887),
- *B. cytotoxicus* est une espèce psychrotolérante associée à des toxi-infections alimentaires (Guinebretière *et al.*, 2013),
- *B. thuringiensis*, produisant une inclusion cristalline toxique pour un grand nombre d'invertébrés, est largement utilisée comme biopesticide (Berliner, 1915; Raddadi *et al.*, 2009),
- *B. mycoïdes* et *B. pseudomycoïdes* sont capables de former des colonies rhizoïdes sur milieu gélosé (Lechner *et al.*, 1998; Nakamura, 1998),
- *B. weihenstephanensis* est une espèce psychrotrophe capable de se développer à des températures inférieures à 7°C (Lechner *et al.*, 1998).

Deux espèces ont été décrites plus récemment,

- *B. toyonensis*, ayant les propriétés d'un probiotique (Abdulmawjood *et al.*, 2019; Jiménez *et al.*, 2013),
- *B. wiedmanii*, isolée du lait, qui a la particularité d'être psychrotolérante et toxique (Miller *et al.*, 2016).

B. cereus, *B. anthracis* et *B. thuringiensis*, pouvant présenter chacune un pouvoir pathogène pour les humains ou les animaux, sont les trois espèces les plus étudiées. *B. anthracis*, a d'abord été observée par Davaine en 1850 (Davaine, 1863) avant d'être identifiée et caractérisée par Koch en 1876 (Koch, 1876). En 1879, Chamberland réussit à obtenir une souche possédant une virulence atténuée, permettant de réaliser des tests de vaccination sur les moutons par Pasteur en 1881 (Chamberland, 1883). La maladie du charbon se manifeste sous forme cutanée, intraveineuse (par injection), digestive ou respiratoire, pouvant conduire à la mort (Goossens, 2009; Hicks *et al.*, 2012). *B. anthracis* héberge deux plasmides de virulence, pXO1 et pXO2 (Okinaka *et al.*, 1999). pXO1 porte trois gènes *pagA*, *lef* et *cya*, responsables de la production de toxines tandis que pXO2 possède l'opéron *capBCADE* responsable de la synthèse de la capsule, facteur de virulence essentiel chez *B. anthracis* (Candela *et al.*, 2005).

B. thuringiensis a été isolée pour la première fois en 1901 au Japon, par Ishiwata, à partir de larves de vers à soie mortes. A cette époque, Ishiwata travaille sur la maladie de Sotto, responsable de la mort d'un grand nombre de vers à soie au Japon, et nomme cette bactérie *Bacillus sotto* (Milner, 1994). Mais ce n'est que dix ans plus tard, en 1911, que Berliner, un scientifique allemand, isole et identifie une souche de cette même espèce, provenant d'une larve de pyrale qu'il retrouve dans un moulin à farine, dans la région de Thuringe, en Allemagne (Berliner, 1915). Il nomme ainsi la bactérie isolée *B. thuringiensis*. Berliner caractérise ce bacille et y trouve des corps d'inclusions. Ces inclusions cristallines ou toxines Cry (pour crystal) ont une activité insecticide (Schnepf *et al.*, 1998). Certaines souches ont été sélectionnées spécifiquement et sont utilisées comme biopesticide. Des plantes ont été génétiquement modifiées par l'ajout d'un ou plusieurs gènes codants pour les toxines Cry (Estruch *et al.*, 1997; Rosas-Garcia, 2009), leur conférant une résistance aux insectes. La lignée de maïs MON810 est la seule PGM résistante aux insectes qui soit autorisée en Europe. Elle produit la protéine Bt Cry1Ab utile au contrôle de la pyrale et de la sésamie du maïs (Andreassen *et al.*, 2015).

Suite aux progrès de la biologie moléculaire, de nombreuses méthodes d'analyse et de classification du groupe *B. cereus* *sl* ont émergé tels que l'électrophorèse enzymatique multilocus (MLEE), le polymorphisme de longueur des fragments amplifiés (AFLP) et le typage génomique multilocus (MLST), qui est l'une des techniques de classification de référence (Helgason *et al.*, 2004; Tourasse *et al.*, 2011). En 2008, Guinebretière *et al.*, proposent une classification basée sur le séquençage du gène de ménage *panC* qui permet de distinguer les espèces du *B. cereus* *sl* en sept groupes phylogénétiques (Fig. 1.2). Chaque groupe est caractérisé par un thermotype propre, montrant la capacité des souches à se développer à plus haute ou plus basse température (Guinebretière *et al.*, 2008). Cette classification met en évidence quatre thermotypes distincts : les mésophiles, les psychrotolérants, les intermédiaires et les thermotolérants (Fig. 1.2).

Dans cette classification, les espèces n'appartiennent pas à un groupe phylogénétique propre. *B. cereus* *ss* et *B. thuringiensis* se retrouvent au sein des groupes II, III, IV, V. *B. thuringiensis* est retrouvé également dans le groupe VI avec *B. mycoïdes* et *B. weihenstephanensis*. *B. pseudomycoïdes* se retrouve uniquement dans le groupe I et *B. cytotoxicus* dans le groupe VII. Enfin *B. anthracis* est situé uniquement dans le groupe III, et le sous-groupe III-4. Cette classification relie également les souches à des phénotypes d'adaptation et de virulence. Tandis que le risque de virulence est moindre dans les groupes IV et II, et très faible pour les groupes V et VI (Guinebretière *et al.*, 2008), le groupe phylogénétique III comprend les souches les plus virulentes. Il a été suggéré

que l'affiliation d'une souche à un groupe phylogénétique serait plus précise que l'appartenance à une espèce du groupe *B. cereus* (Guinebretière *et al.*, 2010).

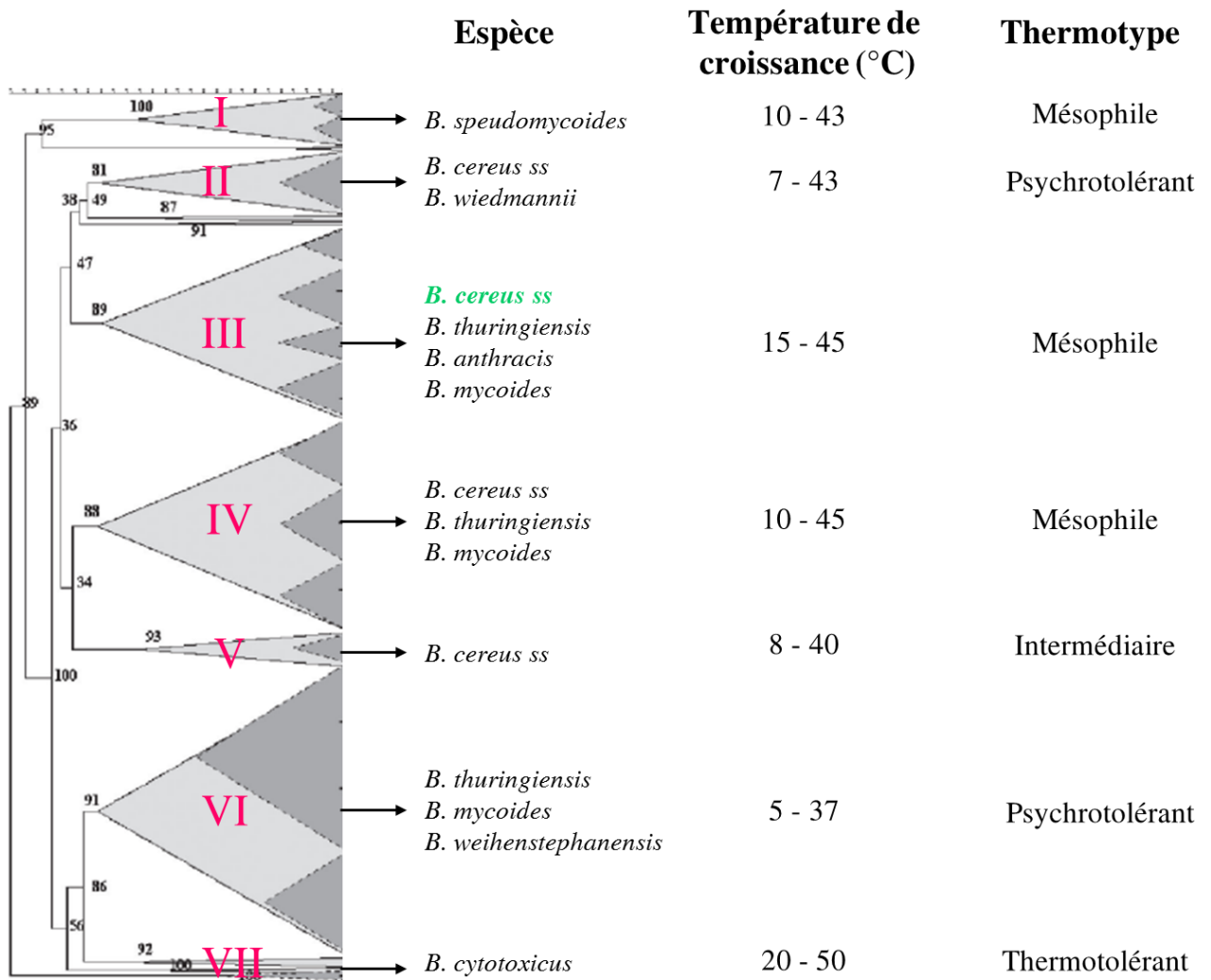


Figure 1.2. Arbre phylogénétique classant les espèces de *B. cereus* sl dans différents groupes basés sur l'analyse de séquence du gène *panC* et sept thermotypes. Le groupe phylogénétique III contient les souches émétiques (en vert) dont la souche AH187 étudiée dans cette thèse (adapté de Guinebretière *et al.*, 2008).

La grande majorité des souches du groupe III provient de mammifères, de cadavres d'insectes ou d'aliments contaminés et plus particulièrement le riz, les pommes de terre, les champignons et les produits laitiers. Les souches diarrhéiques sont présentes dans les cinq groupes qui contiennent *B. cereus ss*, tandis que les souches émétiques se situent uniquement dans le groupe III, dont la souche F4810/12, aussi nommée AH187, qui est une souche isolée du vomi d'une personne ayant mangé du riz, lors d'une épidémie en 1972 (Ehling-Schulz *et al.*, 2005a; Turnbull *et al.*, 1979). *B. cereus* AH187 est la souche émétique de référence et également la souche d'étude de ce projet.

3. L'enveloppe cellulaire : une entité dynamique

Chez les souches de *B. cereus sl*, l'enveloppe cellulaire est composée d'une paroi, et parfois d'une couche S et/ou d'une capsule (Fig. 1.3).

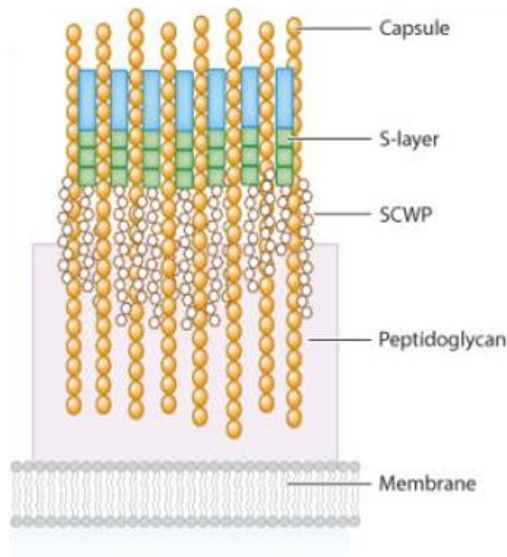


Figure 1.3. Modèle de la composition de la surface de *B. cereus* représentant l'agencement de la membrane plasmique, du peptidoglycane, de la paroi et de la couche S et la capsule (D'après Missiakas *et al.*, 2017).

3.1. La paroi

La paroi de *B. cereus sl* est composée du peptidoglycane auquel est associé le polysaccharide neutre. Le peptidoglycane est une couche résistante à la pression osmotique interne du cytoplasme. Il sert également à la fixation des de d'autres composants de la paroi cellulaire, tels que les polysaccharides et les protéines. Le peptidoglycane de *B. anthracis* est constitué d'un polymère du disaccharide acide N-acétylmuramique- (β -1,4) -N-acétylglucosamine (GlcNAc) et d'un peptide constitué de L-Ala, D-Glu, acide méso-diaminopimélique, D-Ala, D-Ala (Château *et al.*, 2020). C'est une structure épaisse et souple qui protège la bactérie des stress extérieurs et qui permet également l'ancrage d'importantes molécules telles que les protéines, les acides téichoïques et le polysaccharide neutre (SCWP) (Severin *et al.*, 2004).

Chez *B. cereus*, le SCWP est associé de manière covalente au peptidoglycane par une liaison phosphodiester. La composition du SCWP est très similaire entre les souches de *B. cereus* *sl*. Le SCWP de *B. anthracis* est un polysaccharide ayant la structure répétitive $[\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-ManNAc}\text{-}(1\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-GlcNAc}\text{-}(1\rightarrow 6)\text{-}\alpha\text{-GlcNAc}\text{-}(1\rightarrow)]_n$, où l' $\alpha\text{-GlcNAc}$ est substitué par l' $\alpha\text{-Gal}$ et le $\beta\text{-Gal}$ en O-3 et O-4, respectivement, et le $\beta\text{-GlcNAc}$ est substitué par l' $\alpha\text{-Gal}$ en O-3 (Fig. 1.4) (Choudhury *et al.*, 2006). Une structure de SCWP commune a pu être définie pour les autres souches du groupe *B. cereus* : $[\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-ManNAc}\text{-}(1\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-GlcNAc}\text{-}(1\rightarrow 6)\text{-}\alpha\text{-HexNAc}\text{-}(1\rightarrow)]_n$ (Leoff *et al.*, 2008). La décoration du SCWP varie selon les souches en O-3 et O-4 du $\alpha\text{-HexNAc}$, O-3 du $\beta\text{-GlcNAc}$ et O-3 du $\beta\text{-ManNAc}$. Cependant d'autres souches de *B. cereus* telles que *B. cereus* G9241, provoquant une maladie proche de celle du charbon, et d'autres isolats de *B. cereus* appelées *B. cereus biovar anthracis*, synthétisent des SCWP de taille et de structure similaires à celui de *B. anthracis* (Forsberg *et al.*, 2011; Leoff *et al.*, 2008; Missiakas and Schneewind, 2017). Malgré ces variations, il a été montré que l'unité terminale du SCWP des souches du groupe *B. cereus* contient un groupe cétal pyruvyle présent à la fois sur les groupes hydroxyle en C₄ et C₆ du résidu ManNAc terminal. Cette portion terminale du SCWP se lie aux protéines contenant des domaines SLH (pour S-layer homology), les ancrant ainsi de manière non covalente à la paroi cellulaire (Mesnage *et al.*, 2000; Sychantha *et al.*, 2018).

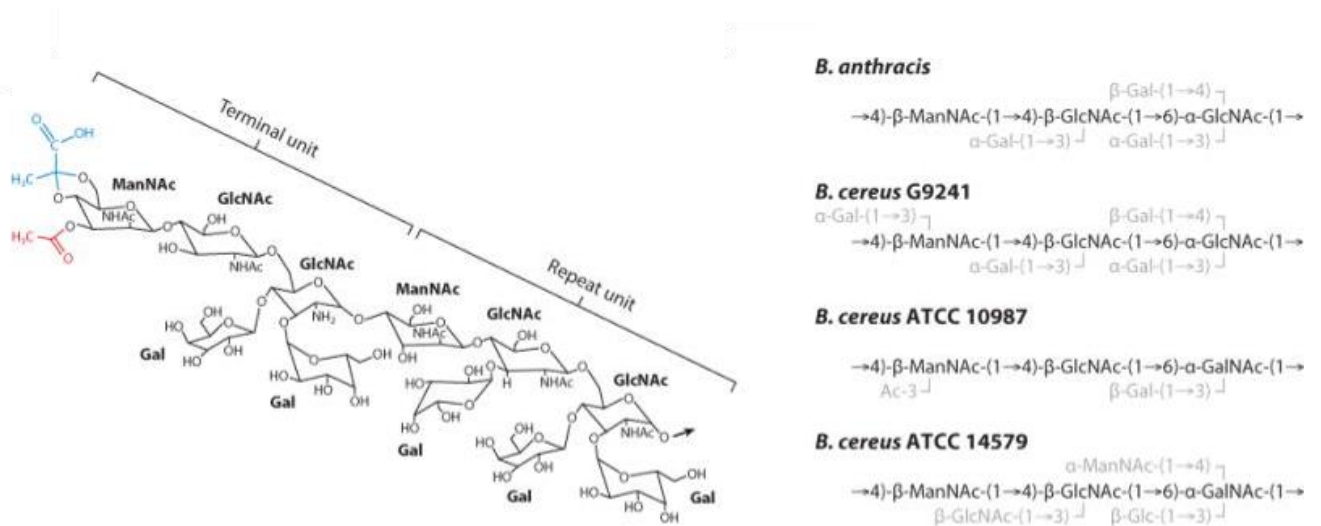


Figure 1.4. Structure du polysaccharide neutre (SCWP) chez *B. cereus* *sl* (d'après Missiakas *et al.*, 2017.)

Le SCWP serait essentiel pour la croissance, la forme et la division cellulaire des bactéries et serait aussi impliqué dans la pathogénicité des souches pathogènes telle que *B. anthracis* (Chateau *et al.*, 2018; Shockman and Barren, 1983). Il est aussi un ligand des endolysines de phage PlyG et PlyL (Chateau *et al.*, 2018; Geng *et al.*, 2017; Low *et al.*, 2005). Il a été montré que *B. cereus* ATCC

14579 peut synthétiser non seulement un SCWP constamment produit à la surface, comme chez les autres souches de *B. cereus sl*, mais également un second SCWP de composition différente, produit lors de la formation de biofilms (Candela *et al.*, 2011).

3.2. La couche S

Certaines souches de *B. cereus sl* sont entourées d'une couche S. La couche S est un réseau protéique qui constitue un maillage paracristallin à la surface. Elle joue un certain nombre de rôles chez *B. cereus sl* notamment dans la protection environnementale, l'adhésion aux cellules ou la virulence (Gerbino *et al.*, 2015). Les couches S font l'objet de cette thèse et seront décrites plus en détail dans la partie IV.

3.3. La capsule

La capsule forme la structure la plus externe identifiée chez *B. cereus sl*. Elle est généralement composée de polysaccharides fermement ancrés au peptidoglycane. La capsule n'est pas présente chez toutes les souches de *B. cereus sl* et sa composition dépend de la souche.

Une unique capsule saccharidique a été décrite chez certaines souches de *B. cereus ss* et *B. thuringiensis* (Sue *et al.*, 2006). L'opéron *bpsXABCDEFG* impliqué dans la synthèse de cette capsule est porté par un plasmide pXO1-like que l'on retrouve chez certaines souches, notamment les souches émétiques (plasmide pCER270). La matrice polysaccharidique chez *B. cereus ss* est plutôt impliquée dans des mécanismes d'adaptation comme la formation de biofilms et les phénomènes d'adhésion (Caro-Astorga *et al.*, 2020).

Chez *B. cereus* G9241, responsable d'une maladie proche de celle du charbon, une capsule polysaccharidique codée par l'opéron *bpsXABCDEFG* porté par le plasmide pBC210 a été identifiée (Oh *et al.*, 2011). Une capsule hyaluronique codée par l'opéron *hasACB* porté par le plasmide pBCXO1 est également produite par cette souche et elle entoure la capsule polysaccharidique. Ensemble, les deux capsules protègent la bactérie de la phagocytose et sont essentielles pour l'établissement de la maladie proche de celle du charbon. L'opéron *hasACB* est muté chez *B. anthracis* et par conséquent, il ne produit pas cette capsule hyaluronique (Missiakas and Schneewind, 2017; Oh *et al.*, 2011).

Contrairement à la capsule des souches de *B. cereus* *sl* décrites précédemment, celle de *B. anthracis* est polypeptidique. La biosynthèse de cette capsule est codée par l'opéron *capBCADE* qui est porté par le plasmide pXO2. CapB, CapC, CapA et CapE sont responsables de la production du polyglutamate constituant de la capsule (Candela *et al.*, 2005; Makino *et al.*, 1989). CapD est responsable de l'ancrage covalent du polymère poly- γ -D-glutamate au peptidoglycane (Candela and Fouet, 2005). Les souches non capsulées sont plus facilement phagocytées par les lignées cellulaires de macrophages que celles encapsulées. Donc la capsule serait impliquée dans la virulence de *B. anthracis* (Chateau *et al.*, 2020; Drysdale *et al.*, 2005).

4. Le cycle de vie, un avantage environnemental

Le sol constitue le principal réservoir environnemental des spores de *B. cereus* *sl*. Les espèces du groupe occupent divers habitats écologiques du sol dont la rhizosphère (Carlson *et al.*, 2018; Karthika *et al.*, 2020) et contaminent les organismes associés au sol tels que les insectes, les nématodes et les arthropodes (Jensen *et al.*, 2003; Raymond *et al.*, 2010; Ruan *et al.*, 2015; Swiecicka and Mahillon, 2006). Les spores de *B. cereus* *sl* sont capables de résister aux conditions environnementales défavorables comme le manque de nutriments, les radiations UV, les hautes températures et les bas pH. La résistance à ces conditions hostiles permet aux spores de survivre et ainsi de rester sous forme dormante dans le sol pendant des années (Gaillard *et al.*, 1998; Gauvry *et al.*, 2017; Germaine *et al.*, 1973; Mols and Abee, 2011a). Lorsque les conditions redeviennent à nouveau favorables, les spores de *B. cereus* *sl* germent et utilisent la matière organique décomposée du sol pour se développer jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de nutriments ou que les conditions soient une nouvelle fois défavorables ; les cellules végétatives sporulent alors à nouveau (voir II.1.). On parle de cycle saprophyte (Vilain *et al.*, 2006).

Les spores de *B. cereus* peuvent être ingérées aussi par les mammifères. Les excréments ou les cadavres de ces animaux hôtes permettent la libération des spores et des cellules végétatives dans le sol (Swiecicka, 2008). *B. cereus* peut, en outre, contaminer les eaux et les terres agricoles. C'est ainsi que les spores et les cellules végétatives peuvent facilement contaminer la chaîne alimentaire (Berthold-Pluta *et al.*, 2019; Brillard *et al.*, 2015; Rousset *et al.*, 2020). *B. cereus* est donc transmise à l'homme par les aliments crus tels que les légumes, le lait ou *via* des aliments cuits lorsque les règles de préparation de ces aliments ne sont pas respectées.

II. Les mécanismes de survie et d'adaptation

1. La sporulation, mécanisme principal d'adaptation

Comme énoncé précédemment, la sporulation est un mécanisme de différenciation cellulaire permettant à la bactérie de résister aux conditions environnementales hostiles tels que la carence nutritive, la chaleur, l'acidité, les rayons UV et les hautes pressions (Moeller *et al.*, 2011; Mols and Abee, 2011a; Nicholson *et al.*, 2005; Setlow, 2006). En effet, la spore protège le matériel génétique de la cellule. L'initiation de la sporulation entraîne, après complétion de la réplication du chromosome, la division asymétrique de la cellule végétative pour former deux compartiments séparés par un septum : la cellule mère et la pré-spore contenant chacune une copie du chromosome (Fig. 1.5). La pré-spore est englobée dans la cellule mère et évolue en endospore avant de devenir mature et d'être libérée dans l'environnement (McKenney *et al.*, 2013) (Fig. 1.5). Le génome est enfermé dans un cortex de peptidoglycane et de tuniques protéiques assurant la protection contre les conditions environnementales.

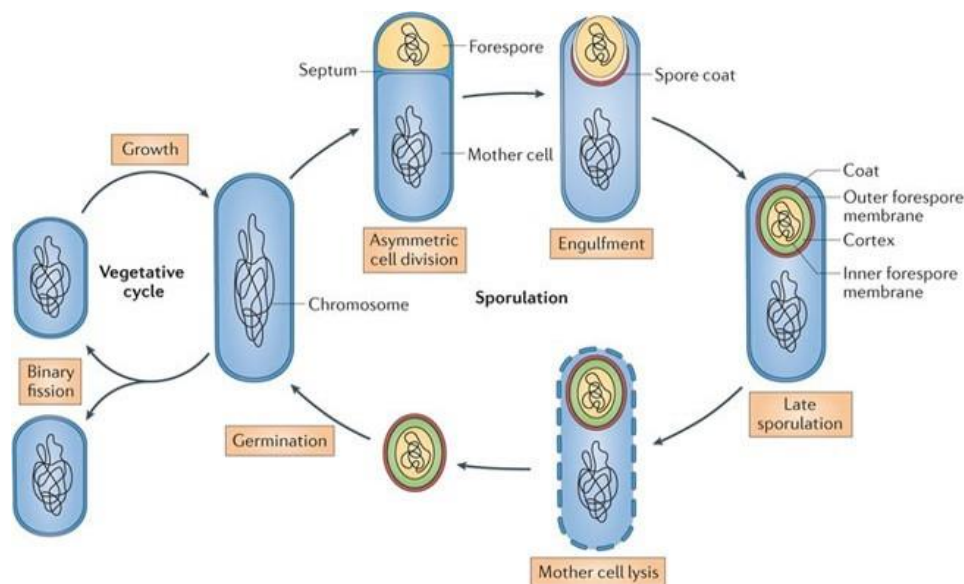


Figure 1.5. Cycle de sporulation et de germination (McKenney *et al.*, 2012).

Chez *B. cereus* *sl*, les spores possèdent également une couche externe particulière majoritairement protéique, l'exosporium, qui contribue à la fixation des spores sur les surfaces biotiques et abiotiques (Gerhardt and Ribi, 1964). Lorsque les conditions redeviennent favorables, sous l'influence d'un

stimulus chimique, physique et/ou mécanique, la germination est réactivée (Abee *et al.*, 2011; Moir, 2006). Récemment, il a été montré que le gène *eag* codant pour la protéine de couche S EA1 a été exprimée lors de la sporulation. La protéines de couche S de *B. anthracis*, EA1, jusqu'à maintenant considérée comme un contaminant, pourrait être finalement un composant réel de la spore mature (Durand-Heredia *et al.*, 2022; Williams and Turnbough, 2004).

2. Le métabolisme énergétique de *B. cereus*

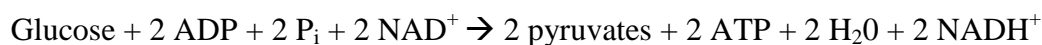
Comme la majorité des pathogènes, *B. cereus* catabolise différents substrats carbonés et azotés. La dégradation de ces substrats organiques génère l'énergie nécessaire à la cellule sous forme d'ATP (Fig. 1.6).

2.1. Catabolisme du glucose

Le glucose est la source de carbone privilégiée chez *B. cereus*. Deux voies de dégradation du glucose sont utilisées: la glycolyse est la voie principale, la voie des pentoses phosphates étant utilisée dans une moindre mesure (Duport *et al.*, 2016; Zigha *et al.*, 2006). Ces deux voies sont contrôlées en fonction des besoins cellulaires en ATP et en précurseurs biosynthétiques (Stinccone *et al.*, 2015). Les voies métaboliques du catabolisme du glucose sont illustrées dans la figure 1.6.

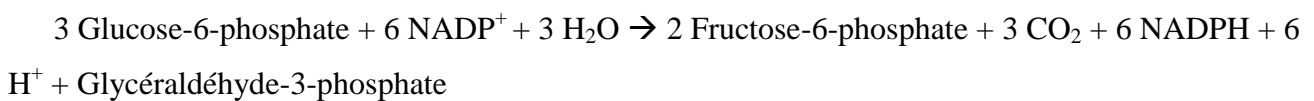
2.1.1. La glycolyse

La glycolyse est la voie prépondérante du catabolisme du glucose chez *B. cereus*. C'est une voie linéaire de dix réactions enzymatiques par laquelle le glucose est converti en pyruvate. La première étape implique le transport du glucose dans le cytoplasme et sa phosphorylation concomitante par le système phosphotransférase (Deutscher *et al.*, 2006; Warda *et al.*, 2016). Le glucose-6-phosphate est ensuite clivé en deux trioses phosphates. Puis, chaque molécule de triose phosphate est oxydée afin de former une molécule de pyruvate constituant le produit final de la réaction (Romeo and Snoep, 2005). La réaction bilan est la suivante :



2.1.2. La voie des pentoses phosphates

La voie des pentoses phosphates (PPP) est composée de deux phases. Au cours de la première phase, qui est oxydative et irréversible, le glucose-6-phosphate est transformé en ribulose-5-phosphate avec une production concomitante de 2 NADPH (Stincone *et al.*, 2015). Le ribulose-5-phosphate est un précurseur de la biosynthèse des nucléotides. Lors de la deuxième phase, non oxydative, le ribulose-5-phosphate est transformé en plusieurs intermédiaires dégradés par la glycolyse, ou impliqués dans la formation d'acides aminés aromatiques tels que la phénylalanine, le tryptophane, l'histidine et la tyrosine (Stincone *et al.*, 2015). La réaction bilan est la suivante :



2.2. La transformation du pyruvate

Le pyruvate est considéré comme le nœud central du catabolisme dirigeant le flux de carbone vers les directions appropriées (Sauer and Eikmanns, 2005). Les voies utilisées seront différentes en fonction de la disponibilité en oxygène.

En présence d'oxygène, le pyruvate est transformé en acétyl-coenzyme A (acétylCoA) par le biais d'une décarboxylation oxydative (Patel *et al.*, 2014) (Fig. 1.6). L'acétylCoA est ensuite oxydé en CO₂ dans le cycle de l'acide tricarboxylique (TCA). Le TCA est une voie métabolique cyclique de huit réactions enzymatiques, vecteur principal du métabolisme énergétique. Au cours du cycle, l'acétyl-CoA réagit avec l'oxaloacétate pour former du citrate. Le citrate subit ensuite deux réactions enzymatiques pour former du succinylCoA et libérer deux molécules de CO₂ et deux molécules de NADH (Alabduladhem and Bordoni, 2022). Au cours du TCA, des intermédiaires tels que le succinate et l'alpha-cétoglutarate sont produits. Ce sont des éléments de base pour un grand nombre de processus comme la biosynthèse des acides gras, des acides aminés et des acides nucléiques (Mailloux, 2015). Dans l'ensemble, le TCA génère une molécule de GTP et des coenzymes réduits, FADH₂ et NADH (Jurtschuk, 1996).

En condition aérobie, la ré-oxydation de ces coenzymes libère des électrons qui sont transférés par des transporteurs jusqu'à l'accepteur final, O₂ (Melo and Teixeira, 2016). Ces transporteurs

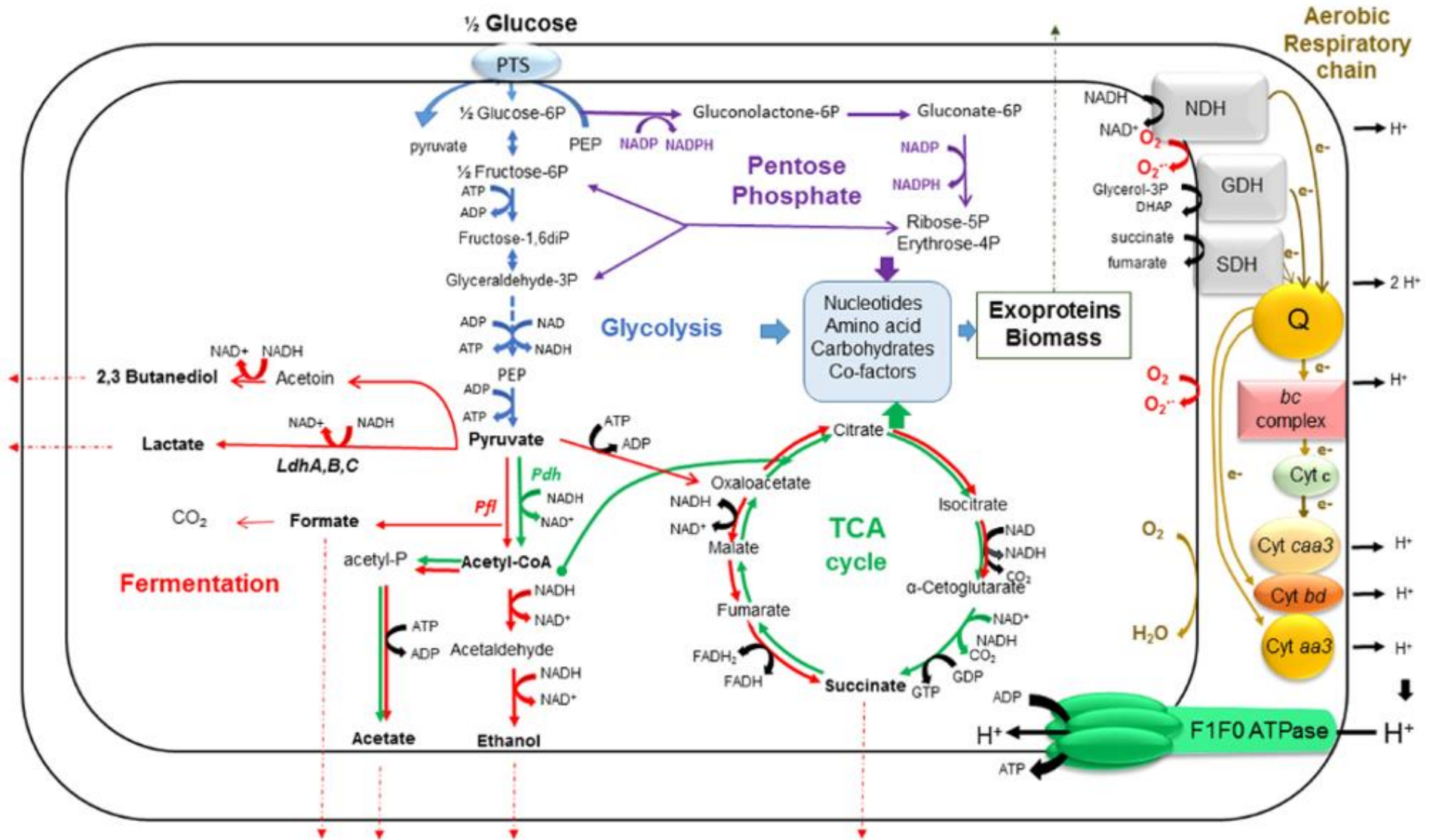


Figure 1.6. Différentes voies respiratoires et fermentaires chez *B. cereus* (Duport et al., 2016).

constituent la chaîne respiratoire de transfert d'électrons composée d'associations de complexes disposés dans la membrane plasmique. Cette chaîne rédox permet la réoxydation des coenzymes produits par la glycolyse et le TCA. Chez *B. cereus*, le transport des électrons à travers la chaîne respiratoire se réalise par deux voies principales : dans la première, les électrons transitent vers le complexe *bc*, le cytochrome *c* et la cytochrome oxydase *cca₃* ; dans la deuxième, les électrons sont dirigés vers les quinol oxydases (cytochromes *bd* ou *aa₃*) (Duport *et al.*, 2016; Rosenfeld *et al.*, 2005). La réaction finale est la réduction de la molécule O₂ en H₂O. Ainsi, le transfert d'électrons engendre un gradient de protons libérés à travers la membrane plasmique vers l'extérieur de la cellule. Le transfert des protons du milieu extérieur à l'intérieur de la cellule par l'ATP synthétase (F₁F₀-ATPase) permet la phosphorylation de l'ADP et génère de l'ATP ; c'est la phosphorylation oxydative (Cotter and Hill, 2003; Jurtshuk, 1996; Mols, 2009).

En absence d'oxygène, la réoxydation des coenzymes réduits produits lors de la glycolyse est assurée soit par le transport des électrons au travers de la chaîne respiratoire anaérobie (Duport *et al.*, 2016; Rosenfeld *et al.*, 2005), soit par la réduction du pyruvate ou de ses dérivés. On parle alors de fermentation de type acide mixte (Clair *et al.*, 2012; Duport *et al.*, 2021, 2016; Laouami *et al.*, 2011).

2.3. Catabolisme des acides aminés

La dégradation des acides aminés par les bactéries est source de carbone et d'azote. Deux études génomiques ont montré que le nombre de gènes impliqués dans le métabolisme des acides aminés est plus élevé que celui impliqué dans la dégradation du glucose, ce qui suggère que *B. cereus* trouve dans son environnement naturel plus d'acides aminés que de glucides (Han *et al.*, 2006; Ivanova *et al.*, 2003). La dégradation bactérienne des acides aminés fait intervenir une multitude de réactions enzymatiques telles que la transamination, la désamination, la décarboxylation ou la dégradation de chaînes latérales, ce qui permet la production d'énergie (Buono *et al.*, 1966; Fernández and Zúñiga, 2006). Plusieurs voies métaboliques existent pour métaboliser les acides aminés, dont celles qui génèrent les métabolites intermédiaires importants comme le pyruvate, le glutamate et l'acétylCoA (Fig. 1.7) (Buono *et al.*, 1966; Calvo and Matthews, 1994; Díaz-Pérez *et al.*, 2016; Itoh *et al.*, 2007; Laishley and Bernlohr, 1968; Li *et al.*, 2019; Moses *et al.*, 2012; Oikawa, 2007; Reitzer, 2005, 2005; Tang *et al.*, 1994, p. 199; Zaprasis *et al.*, 2015; Zinser and Kolter, 1999).

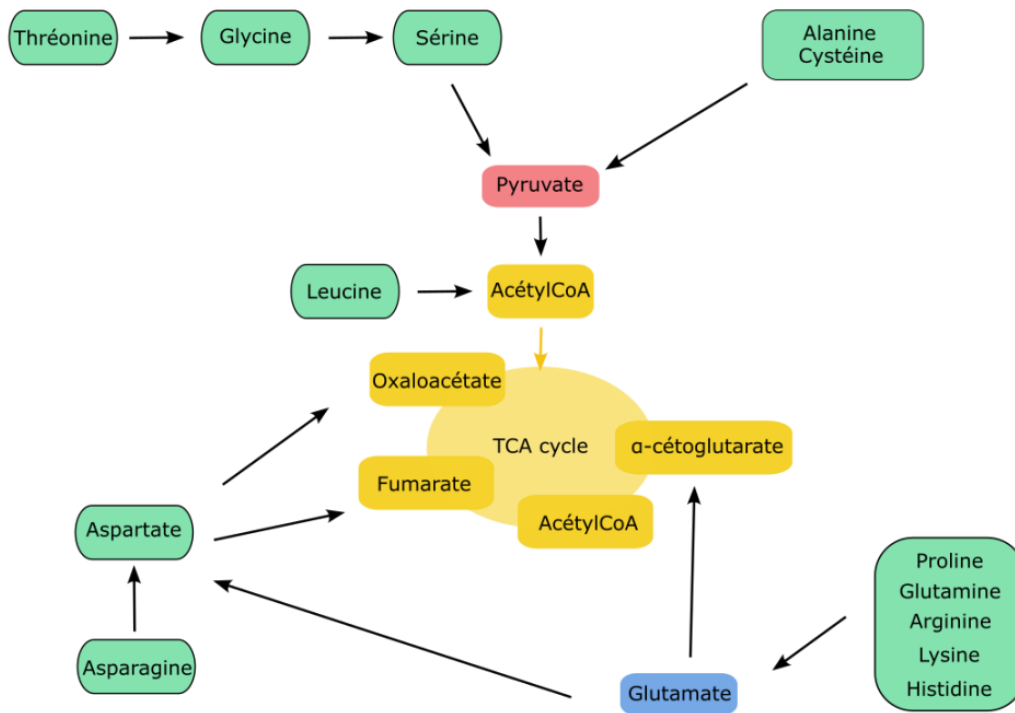


Figure 1.7. Voies de dégradation des acides aminés.

Une étude sur l'impact de 18 acides aminés sur la croissance de trois souches émétiques de *B. cereus* a révélé que chez ces souches, la valine, la thréonine et la leucine sont indispensables à la croissance, car sans ces trois acides aminés, les souches ne poussent pas (Agata *et al.*, 1999).

Récemment, une analyse exo-métabolomique chez *E. coli* a permis de mettre en évidence que les acides aminés à faible coût catabolique tels que la sérine, la glycine, la thréonine et l'aspartate fournissent la majeure partie du carbone (~40 %) et de l'azote (70-80%) nécessaires au cours de la phase exponentielle de croissance, réduisant ainsi potentiellement le besoin en glucose (Zampieri *et al.*, 2019). Cependant, le glucose demeure une source de carbone importante et privilégiée par rapport aux acides aminés par *B. cereus* ATCC 14579 (Mols *et al.*, 2007).

3. Adaptation aux stress environnementaux

La forme végétative de *B. cereus* est également capable de résister à différents stress environnementaux. Dans cette partie, seules les adaptations aux basses températures, au stress osmotique et aux stress rencontrés dès l'entrée en phase stationnaire sont développées car ce sont les stress examinés dans cette étude (Chapitre III).

3.1. Adaptation aux basses températures

Les basses températures sont considérées comme des facteurs de conservation des aliments. Cependant, les souches mésophiles et psychrotolérantes de *B. cereus* peuvent croître et survivre à des températures entre 5°C et 15°C (Guinebretière *et al.*, 2008; Stenfors and Granum, 2001).

L'adaptation de *B. cereus ss* aux basses températures repose sur plusieurs mécanismes. L'une des principales adaptations est la synthèse accrue de protéines de choc au froid Csp (Mayr *et al.*, 1996). L'étude de la souche *B. cereus* D2 isolée d'une mine de métaux lourds dans une zone à basse température en Chine, a permis de mettre en évidence quatre gènes *csp1*, *csp2*, *csp3*, *csp6* surexprimés dans les conditions de choc au froid. De plus, l'expression hétérologue des *csp* de *B. cereus* chez *Escherichia coli* (*E. coli*) a révélé que Csp2 avait une meilleure capacité à relancer la croissance de *E. coli* lorsque la température est de 10°C (Li *et al.*, 2021). Csp2 et Csp6 appartiennent respectivement aux familles de protéines CspB et CspC, protéines majeures induites par le choc au froid chez *B. subtilis* (Graumann and Marahiel, 1999).

La synthèse d'hélicases à ARN (CshA, CshB et CshC), qui permettent le dépliage de l'ARN nécessaire à la traduction et/ou à la dégradation de l'ARN, participe à l'adaptation de *B. cereus* lors de stress au froid. La délétion des gènes *csh* augmente le seuil de température minimale de croissance. Aux basses températures, les mutants Δcsh montrent des altérations marquées de leur morphologie. CshA aurait un rôle plus marqué dans l'adaptation au stress au froid, car la délétion de *cshA* modifie aussi la croissance de *B. cereus* à 30°C (Français *et al.*, 2019; Pandiani *et al.*, 2010).

L'adaptation au froid se manifeste par la modification des AG dans la membrane au cours de la croissance (Brillard *et al.*, 2010; Haque and Russell, 2004). Lors de croissances à basse température (10-12°C), il a été montré qu'en phase de latence il y a une augmentation des AG à courtes chaînes,

puis de l'insaturation des AG à partir de la phase exponentielle (Français *et al.*, 2021). Le système à deux composants CasKR a été identifié comme impliqué dans la croissance et la survie au froid de *B. cereus* (10 et 12°C) (Diomandé *et al.*, 2014). Plusieurs gènes impliqués dans le métabolisme des AG sont régulés à la baisse dans le mutant $\Delta casKR$, notamment *desA* et *desB*. Ces deux gènes sont responsables de la production d'AG insaturés et jouent un rôle dans l'adaptation aux basses températures (Diomandé *et al.*, 2015). En effet, CasKR active l'expression de *desA* pendant la croissance, permettant l'insaturation des AG (Diomandé *et al.*, 2016).

Plus récemment, une étude comparant les réponses de survie entre une souche mésophile et une souche psychrotolérante a montré différents changements morphologiques et génotypiques. La souche mésophile présente un taux de croissance plus bas que la souche psychrotolérante à 7°C et à 10°C. De plus, des observations microscopiques montrent que contrairement aux souches psychrotolérantes, les bacilles des souches mésophiles sont plus allongés lors de croissance à 10°C. L'augmentation de la biosynthèse du peptidoglycane de la souche psychrotolérante participe à protéger la forme des cellules à basse température. L'étude indique que lorsque les souches croient à 10 °C, les gènes impliqués dans la biosynthèse du peptidoglycane et de la paroi cellulaire sont régulés positivement par rapport à des croissances à 30°C. A l'inverse, les gènes impliqués dans la glycolyse, le TCA, la biosynthèse des métabolites secondaires et des antibiotiques est régulée à la baisse (Park *et al.*, 2021).

3.2. Adaptation au stress salin

L'adaptation de la bactérie au stress salin ou osmotique est un autre facteur dont il faut tenir compte dans la protection des produits contre l'altération et les agents pathogènes. Une étude réalisée sur 41 souches de *B. cereus* a montré que certaines souches peuvent croître jusqu'à une concentration de 10% de chlorure de sodium (NaCl) dans le milieu utilisé (Carlin *et al.*, 2013). De plus, cette étude a mis en évidence que les souches émétiques de *B. cereus ss* (groupe phylogénétique III) présenteraient une plus grande tolérance (jusqu'à 10 %) au sel que les autres souches. Cependant, le stress salin altère la croissance des cellules. Den Besten et ses collaborateurs ont aussi montré en 2007 que l'addition de sel (2,5% et 5%) réduit la croissance cellulaire et augmente la phase de latence de *B. cereus* (den Besten *et al.*, 2007). Deux ans plus tard, ils ont révélé que lors d'un stress salin, les bacilles adoptent un phénotype filamenteux, diminuent leur chimiotaxisme et augmentent leur activité catalase suggérant une réponse à un stress oxydant (den Besten *et al.*, 2009). En réalisant

une analyse transcriptomique, les auteurs ont remarqué que la réponse au stress salin implique l'activation de gènes codant pour des osmoprotecteurs, des transporteurs de Na^+/H^+ , de di- et tri-peptides et également une réponse au stress oxydant. Ces données révèlent que l'activation d'une réponse au stress salin peut contribuer à une protection croisée au stress oxydant. De plus, l'analyse protéique lors d'un choc salin révèle l'induction d'enzymes glycolytiques (Browne and Dowds, 2001). Ces résultats suggèrent que la cellule a un besoin accru d'énergie pour se protéger contre le stress salin. Plus récemment, une analyse transcriptomique réalisée sur des souches extraites de sauce soja industrielle a montré, en réponse à un stress osmotique, une importante augmentation de l'expression du gène BC2114 codant pour une glutathion peroxydase, ce qui suggère que le stress osmotique déclenche des réponses antioxydantes (Xu *et al.*, 2017). Par ailleurs, à l'instar du stress au froid, les cellules de *B. cereus* augmentent la fluidité de leur membrane en modifiant la composition des acides gras de la membrane en réponse au stress salin (Haque and Russell, 2004).

3.3. Adaptation aux stress survenant dès l'entrée en phase stationnaire

Lorsqu'une bactérie a consommé tous les nutriments présents dans son milieu, sa croissance ralentie, puis s'arrête. Elle rentre en phase stationnaire et peut y rester un certain temps. En phase stationnaire, les bactéries restent métaboliquement actives. La majorité des microorganismes qui sont dans l'environnement sont dans un état physiologique qui correspond à celui de la phase stationnaire de croissance (Gefen *et al.*, 2014). Lorsque le milieu s'appauvrit en nutriments au cours de la croissance, il s'acidifie et il s'enrichit en sous-produits du métabolisme, et en particulier en espèces réactives d'oxygène (ROS). De nombreux changements métaboliques s'opèrent pour faire face à ces conditions de stress dès l'entrée en phase stationnaire.

3.3.1. Stress nutritionnel

B. cereus, du fait de sa flexibilité métabolique, sélectionne la source d'énergie la plus favorable pour sa croissance. Le glucose est la source de carbone et d'énergie privilégiée par *B. cereus* et la plupart des autres bactéries. Chez *B. subtilis* et *B. cereus* la réponse adaptative générale au stress est en partie régie par le facteur de transcription σB (Boylan *et al.*, 1993; Carlin *et al.*, 2010). L'induction de gènes dépendant de σB confère aux cellules une résistance préventive aux stress multiples qu'elles peuvent rencontrer (Hecker and Völker, 1998). Chez *B. cereus*, comme chez *B. subtilis*, σB est activé en réponse à diverses conditions de stress, à savoir le stress nutritionnel, le

stress thermique, le stress acide, le stress osmotique et l'exposition à l'éthanol (Gao *et al.*, 2021; Hecker and Völker, 2001).

D'autres régulateurs sont impliqués dans la réponse au stress nutritionnel tels que CodY et Spo0A et le facteur de transcription σ H. CodY est un régulateur pléiotrope impliqué dans l'expression des gènes de la phase stationnaire et de l'initiation de la sporulation (Ratnayake-Lecamwasam *et al.*, 2004). CodY détecte l'état nutritionnel et énergétique en réponse à la disponibilité du GTP et des acides aminés branchés (isoleucine, leucine et valine) (Sonenshein, 2005). Chez *B. cereus* et *B. anthracis*, CodY est également impliqué dans la virulence (Château *et al.*, 2011; Frenzel *et al.*, 2012). L'activation du régulateur de l'entrée en phase stationnaire Spo0A nécessaire à la sporulation et initiée par σ H commence à la fin de la phase exponentielle et au début de la phase de stationnaire, est associé entre autres au stress nutritionnel (Piggot and Hilbert, 2004). Il a été observé dans un milieu oligotrophe (eau de nappe), l'apparition de variants de *B. cereus* qui ne synthétisaient plus Spo0A, et par conséquent perdaient leur capacité à sporuler mais continuaient de survivre (Rousset *et al.*, 2020). Les cellules végétatives de *B. subtilis* sont aussi capables de survivre une centaine de jours sans sporuler (Gray *et al.*, 2019). En plus d'être impliqué dans l'initiation à la sporulation, Spo0A serait impliqué dans la virulence (Lücking *et al.*, 2009).

3.3.2. Stress oxydant

Au cours de la croissance aérobie de *B. cereus*, le transport des électrons dans la chaîne respiratoire génère des ROS qui s'accumulent : leur concentration maximale est atteinte en phase stationnaire (Hamitouche *et al.*, 2021; Lemire *et al.*, 2017). Ces molécules hautement réactives peuvent oxyder les acides nucléiques, les lipides et les protéines et donc engendrer des dommages cellulaires (Baatout *et al.*, 2006). Les bactéries ont développé des mécanismes pour contrer la production de ROS et minimiser leurs conséquences néfastes. Ces mécanismes constituent un réseau complexe de systèmes de détoxification enzymatique et non enzymatique (Mols and Abee, 2011b). La détoxification enzymatique est réalisée par le biais des superoxydes dismutases, les alkyl hydroperoxides réductases, les thioredoxines, et les catalases notamment KatE et KatG. La détoxification non-enzymatique implique les systèmes NAD^+/NADH et $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ ainsi que les thiols à faible poids moléculaire. Il a été montré que les protéines chaperonnes GroES et CspB sont aussi synthétisées dès l'entrée en phase stationnaire (Graumann and Marahiel, 1999; Susin *et al.*, 2006). Elles sont impliquées dans le repliement des protéines pendant et après la traduction. Elles contribueraient à la réparation des protéines endommagées ou mal repliées suite à un stress oxydant.

Ces protéines de réparation pourraient être induites à la suite d'un stress nutritionnel ou énergétique (Raheb *et al.*, 2008)

3.3.3. Stress acide

Au cours de la croissance de *B. cereus*, le milieu de culture s'acidifie par le biais des métabolites générés et libérés dans le surnageant (Le Lay *et al.*, 2015). *B. cereus*, comme d'autres bactéries, s'adaptent aux faibles pH par l'induction d'une réponse de tolérance à l'acide (ATR) (Jobin *et al.*, 2002; Thomassin *et al.*, 2006). Ces mécanismes ATR impliquent le maintien de l'homéostasie du pH interne, l'alcalinisation du milieu extérieur, des modifications métaboliques et la production de protéines telles que les chaperonnes ou de facteurs de régulation comme σB (Cotter and Hill, 2003; Mols and Abee, 2011a).

Par ailleurs, certains pathogènes alimentaires réduisent la fluidité de leur membrane en condition de stress acide (Yoon *et al.*, 2015). Chez *B. cereus*, cela n'a pas encore été montré mais il a été rapporté que la fluidité de la membrane est modifiée en réponse à d'autres stress (de Sarrau *et al.*, 2012; Français *et al.*, 2021). En outre, l'adaptation à un pH acide induit une protection thermique, une résistance à l'éthanol, et au choc osmotique (Browne and Dowds, 2002). Cette protection croisée montre comment certains mécanismes d'adaptation sont communs à différents stress.

III. Les stratégies offensives et défensives

1. Le pouvoir pathogène de *B. cereus* ss

Les infections dues aux membres du groupe *B. cereus* sont largement décrites, en particulier les infections par *B. anthracis* et *B. cereus* ss chez les mammifères et celles de *B. thuringiensis* chez les insectes. Outre le rôle bien connu des toxi-infections intestinales de *B. cereus* ss, ces organismes peuvent également provoquer diverses infections locales cutanées et intraveineuses, systémiques ou respiratoires.

1.1. Les infections non gastro-intestinales

Les infections non gastro-intestinales sont diagnostiquées principalement chez des personnes immunodéprimées (Cotton *et al.*, 1987). Les facteurs de risques les plus fréquents chez ces patients sont généralement l'abus de drogue intraveineuse, l'installation prolongée de cathéters, les plaies traumatiques et chirurgicales et les leucémies (Bottone, 2010). Les infections à *B. cereus* sont également fréquentes chez les nouveau-nés prématurés (Lequin *et al.*, 2005). Un grand spectre de symptômes est lié aux infections non-gastrointestinales, mais les mécanismes d'actions sont peu étudiés. Si l'on s'intéresse aux infections des dix dernières années, on peut les regrouper en différentes catégories (Messelhäuser and Ehling-Schulz, 2018) :

- les infections de la région oculaire, la panophtalmie et l'endophtalmie (Callegan *et al.*, 2006; Sohngen *et al.*, 2012),
- les infections buccales telles que la parodontite (Kotiranta *et al.*, 1998),
- les infections de la zone cérébrale telles que les abcès cérébraux et des méningo-encéphalites (Brouland *et al.*, 2018).
- les infections cardiaques telles que les endocardites (Gopinathan *et al.*, 2018; Steen *et al.*, 1992),
- les infections systémiques telles que les bactériémies et les septicémies ont été reportées (Uchino *et al.*, 2012).

Les infections non gastro-intestinales sont nombreuses et souvent opportunistes mais *B. cereus* infecte plus généralement le tractus gastro-intestinal.

1.2. Les infections gastro-intestinales

Lors d'une infection gastro-intestinale, il existe deux types de syndromes causés par *B. cereus*, le syndrome diarrhéique et le syndrome émétique. Les souches à l'origine de ces syndromes sont nommées respectivement « souches diarrhéiques » et « souches émétiques ».

1.2.1. Le syndrome diarrhéique

Le syndrome diarrhéique, identifié par Hauge en 1950 à la suite d'une intoxication de 600 personnes en Norvège, est caractérisé par des douleurs abdominales et des diarrhées (Hauge, 1955). Les symptômes apparaissent 8 h à 16 h après l'ingestion d'aliments contaminés contenant de 10^4 à 10^9 UFC (Unité Formant Colonie) par gramme d'aliments (Granum and Lund, 1997). L'intoxication est causée par l'ingestion de cellules végétatives et/ou de spores (Ceuppens *et al.*, 2012a). Les spores de *B. cereus* traversent l'estomac, atteignent la couche de mucus intestinal, adhèrent aux cellules épithéliales et germent. Les cellules végétatives produisent alors des entérotoxines et autres facteurs de virulence au cours de leur multiplication, ce qui provoque le symptôme diarrhéique (Dietrich *et al.*, 2021).

Trois entérotoxines jouent un rôle majeur dans les toxi-infections alimentaires diarrhéiques provoquées par *B. cereus* : l'hémolysine BL (HBL) (Beecher and Macmillan, 1991), l'entérotoxine non-hémolytique (Nhe) (Lund and Granum, 1996) et la cytotoxine K (CytK) (Lund *et al.*, 2000) (Fig. 1.8). HBL est constituée de trois composants, L2 et L1, HblB ou HblB', codés respectivement par les gènes *hblC*, *hblD*, *hblA* et *hblB* (Jessberger *et al.*, 2022, 2020; Ryan *et al.*, 1997). Nhe est également une entérotoxine tripartite et est codée par l'opéron *nheABC* (Granum *et al.*, 1999; Lindbäck *et al.*, 2004). La cytotoxine K est monopartite et codée par *cytK*. Il existe deux variants de *cytK*, nommés *cytK1* et *cytK2*. La protéine CytK1 est très toxique et exclusivement retrouvée chez des souches très particulières de *B. cereus*, nommées *B. cytotoxicus*. CytK2 est retrouvée plus fréquemment mais retient 20 % de la toxicité. Ainsi la distinction des deux variants est nécessaire pour une indication correcte de la virulence éventuelle d'une souche (Fagerlund *et al.*, 2004; Guinebretiere *et al.*, 2006; Guinebretière *et al.*, 2013). Ces entérotoxines CytK1 et CytK2 endommagent les cellules épithéliales en formant des pores, créant des lésions au niveau de microvillosités. Une lyse osmotique des cellules épithéliales s'ensuit, provoquant des diarrhées fulgurantes (Fagerlund *et al.*, 2004).

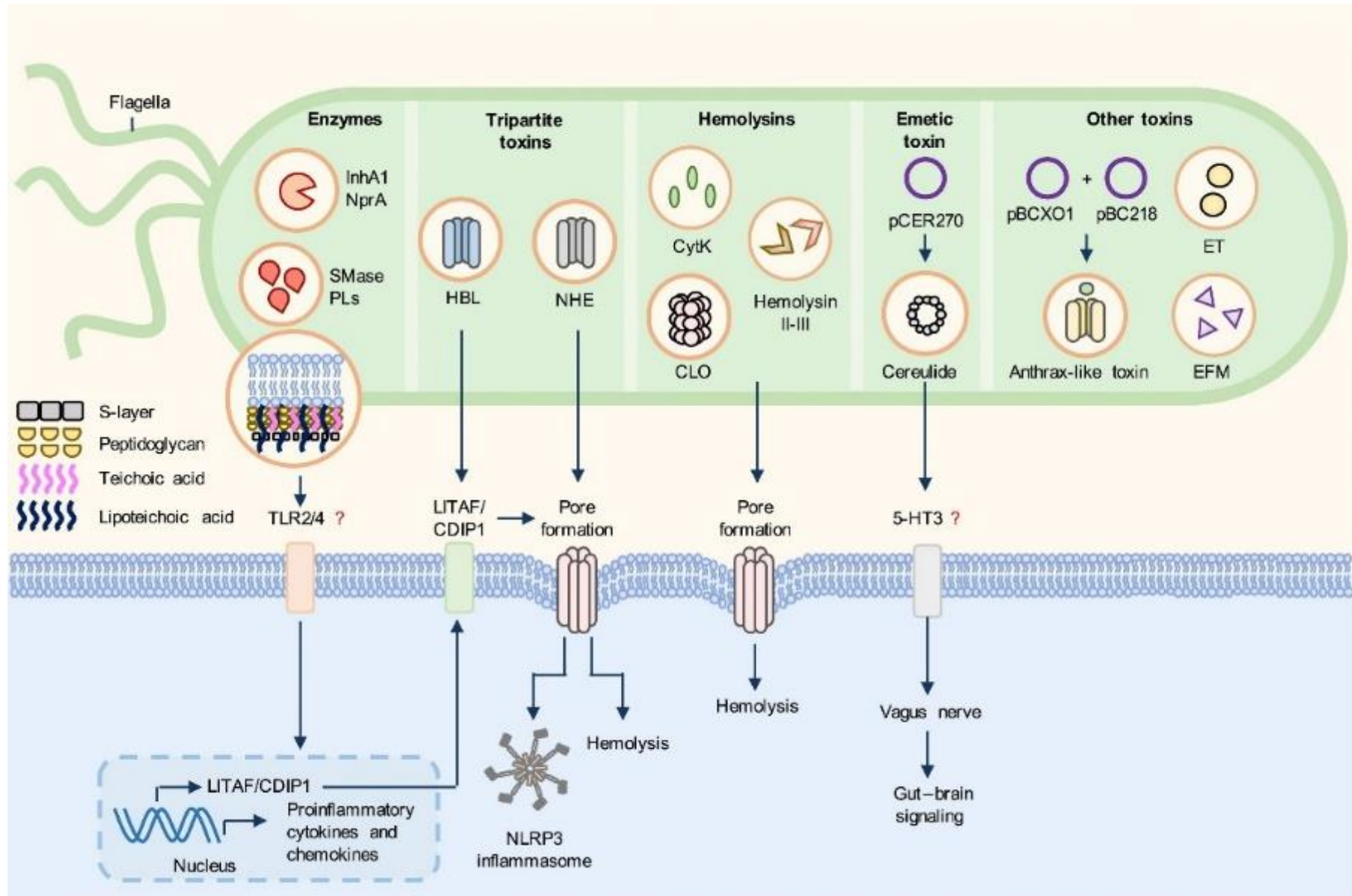


Figure 1.8. Schéma récapitulatif des facteurs de virulence de *B. cereus* (Tuipulotu et al., 2020).

D'autres facteurs de virulence peuvent caractériser les syndromes diarrhéiques ; tout particulièrement les phospholipases C et les sphingomyélinases induisant une activité hémolytique (Beecher and Wong, 2000; Lyu *et al.*, 2016; Pomerantsev *et al.*, 2003). *B. cereus* synthétise également les hémolysines I, II, III. L'hémolysine II induit l'apoptose des monocytes humains et des macrophages de souris (Tran *et al.*, 2011). *B. cereus* synthétise en outre de nombreuses protéases, dont les metalloprotéases à zinc InhA1 et NprA, qui lui permettent d'échapper à la réponse immunitaire de l'hôte, causant l'altération des macrophages et favorisant ainsi la propagation de l'infection dans les cellules hôtes (Guillemet *et al.*, 2010; Haydar *et al.*, 2018; Ramarao and Lereclus, 2005) (Fig. 1.8).

1.2.2. Le syndrome émétique

Le syndrome émétique a été décrit pour la première fois en 1971, en Angleterre, lors d'une épidémie au cours de laquelle treize personnes ont été atteintes de vomissement suite à l'ingestion de riz cuisiné, contaminé à *B. cereus ss* (Mortimer and Mccann, 1974). Les toxi-infections émétiques sont dues à la céréulide (Agata *et al.*, 1995), une toxine émétique produite dans les aliments avant ingestion. Le syndrome émétique se caractérise par une courte période d'incubation (30 min à 5 h) provoquant des nausées et des vomissements après l'ingestion de 10^5 à 10^8 UFC par gramme d'aliments (Ehling-Schulz *et al.*, 2004). De rares cas d'insuffisance hépatique ont été rapportés, menant les patients à la mort (Dierick *et al.*, 2005; Schreiber *et al.*, 2022). Les souches émétiques peuvent également produire des toxines diarrhéiques (Kim *et al.*, 2010).

La céréulide est davantage produite en phase stationnaire de croissance des cellules planctoniques et dans les biofilms (Huang *et al.*, 2022). La toxine émétique est principalement retrouvée dans les produits à base d'amidon tels que le riz et les pâtes mais également les champignons et les produits laitiers, plus rarement dans des plats préparés (Messelhäusser *et al.*, 2014). La prévalence des souches émétiques dans ces niches écologiques particulières peut être expliquée de plusieurs manières. Les souches émétiques sont susceptibles de coloniser les racines et les tubercules des plantes, soit comme symbiote endophyte, soit sous forme de biofilms. En effet, les souches émétiques contrairement aux autres souches de *B. cereus*, ne sont pas capables de dégrader l'amidon (Ehling-Schulz *et al.*, 2005b). Elles adoptent un mode de vie endophyte avec ces racines de pomme de terre, de plants de riz et de blé (Ehling-Schulz *et al.*, 2015). Il a également été suggéré que la céréulide, en tant qu'inophore à potassium, pourrait être un avantage sélectif en piégeant le

potassium dans les environnements où il est rare (Ekman *et al.*, 2012; Hoornstra *et al.*, 2013). De plus, grâce à son activité antifongique, la céréulide protégerait les plantes des attaques de champignons pathogènes (Ladeuze *et al.*, 2011). Les parties aériennes des plantes peuvent être aussi contaminées par les souches émétiques lors de leur récolte ou par des petits animaux se nourrissant des parties souterraines des plantes. Lorsqu'elles sont utilisées comme fourrage, les parties aériennes des plantes peuvent également contaminer les pis des vaches et donc le lait (Ehling-Schulz *et al.*, 2015). Les spores des souches émétiques étant plus thermorésistantes que celles des autres souches, les aliments cuits sont enrichis en souches émétiques (Carlin *et al.*, 2006).

La céréulide, préformée directement dans les aliments par les souches émétiques, est un dodécadepsipeptide cyclique de 1,2 kDa. Sa structure [D-O-Leu, D-Ala, L-O-Val et L-Val]₃ est très proche de la valinimycine, connue pour être un ionophore à l'ion potassium (Fig. 1.9). Cette toxine est thermiquement stable, résistante à une large gamme de pH et aux enzymes protéolytiques (Agata *et al.*, 1995).

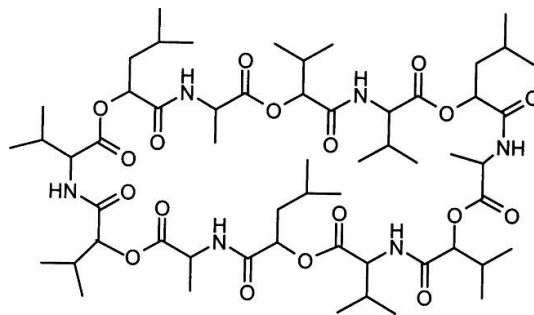


Figure 1.9. Structure de la céréulide (Agata *et al.*, 1994).

Contrairement aux entérotoxines, qui sont produites par la machinerie ribosomale, la céréulide est produite par une peptide synthétase non-ribosomale (NRPS, un complexe multienzymatique) (Ehling-Schulz *et al.*, 2005b). NRPS est codée par l'opéron *cesPTABCD* (Fig. 1.10) et le gène *cesH*, portés par un méga plasmide, pCER270, apparenté au plasmide pXO1 de *B. anthracis* (Hoton *et al.*, 2005; Rasko *et al.*, 2007).

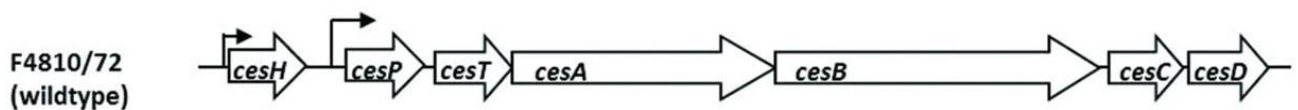


Figure 1.10. Organisation génétique des gènes codant pour la peptide synthétase non-ribosomale de la souche émétique de référence *B. cereus* AH187 (F4810/72) (Lücking, *et al.*, 2015).

Le locus *ces* de 24 kpb comprend *cesP* codant pour une 4'-phosphopantéthéinyl-transférase, essentielle pour l'amorçage des peptides non ribosomaux, *cesT* impliqué dans l'élimination des monomères mal amorcés ainsi que *cesA* et *cesB* qui codent les protéines responsables de l'assemblage de la NPRS. *cesC* et *cesD* codent pour un ABC transporteur, potentiellement impliqué dans l'export de la toxine (Ehling-Schulz *et al.*, 2006; Lücking *et al.*, 2015). Enfin, le gène *cesH*, codant pour une hydrolase, est impliqué dans la synchronisation de la transcription des gènes *ces* (Lücking *et al.*, 2015; Tian *et al.*, 2019) (Fig. 1.10). La transcription de l'opéron *cesPTABCD* est régulée par plusieurs régulateurs : CodY, qui agit comme un capteur interne de l'état nutritionnel, le régulateur de l'entrée en sporulation Spo0A et le régulateur de l'état de transition AbrB (Frenzel *et al.*, 2012; Lücking *et al.*, 2009).

Plus récemment, Marxen et ses collaborateurs ont démontré que NRPS est capable de synthétiser non seulement la céréulide mais également 18 isoformes de la céréulide (Fig. 1.11) (Marxen *et al.*, 2015a). Ces isoformes présentent des toxicités différentes. En comparant la toxicité de la céréulide à ses isoformes, il a été montré que l'isocéréulide A est plus toxique pour les cellules Hep2 que la céréulide (Marxen *et al.*, 2015b; Walser *et al.*, 2022, 2021). La production des isoformes est dépendante de la température (Kranzler *et al.*, 2016). L'évaluation du potentiel toxique de toutes les isocéréulides synthétisées par les souches émétiques contribue à la compréhension élargie de la toxicité des aliments contaminés par *B. cereus ss.*

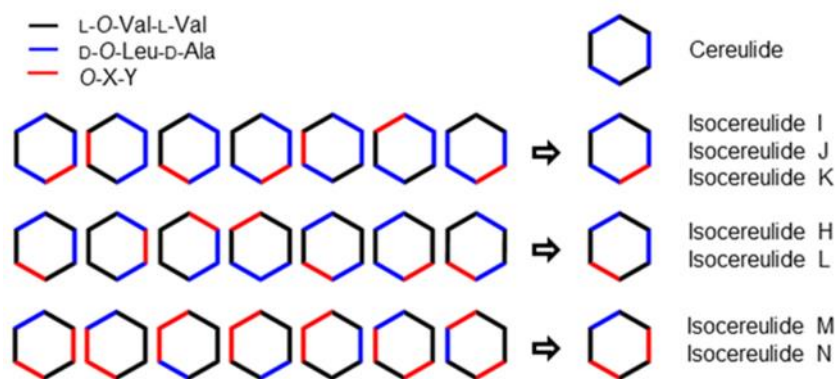


Figure 1.11. Isomères théoriques possibles de la céréulide (Walser *et al.*, 2022).

Le mécanisme d'action de la céréulide n'a pas encore été totalement élucidé chez l'Homme. Après ingestion, la toxine est absorbée par l'intestin, s'accumule dans le foie, les reins, les tissus musculaires et les graisses (Bauer *et al.*, 2018). L'effet émétique de la céréulide proviendrait de son interaction avec les récepteurs à la 5-hydroxytryptamine 3 (5-HT3), présents notamment au niveau

des terminaisons vagues du tube digestif (Fig. 1.8). Cette fixation entraînerait une signalisation entre l'intestin et le cerveau *via* le nerf vague et provoquerait les vomissements des personnes contaminées (Agata *et al.*, 1995). Il a également été montré que la cérulide peut causer des dommages cellulaires en inhibant l'activité de cellules impliquées dans la réponse immunitaire (Paananen *et al.*, 2002).

2. Adhésion et biofilms : mécanismes invasifs cellulaires et de surface

1.1. L'adhésion

L'adhésion aux surfaces biotiques et abiotiques joue un rôle capital dans la (sur)vie des bactéries. L'adhésion bactérienne de surface comprend deux étapes principales successives: l'adhésion réversible et l'adhésion irréversible (An and Friedman, 2000).

L'adhésion réversible : Tout d'abord, les bactéries se rapprochent d'une surface sur laquelle elles peuvent adhérer par différents processus : par sédimentation due aux forces de gravité (auto-agrégation), par mouvements browniens dus à l'agitation thermique, de façon dirigée quand les bactéries possèdent des flagelles. Cet attachement aux surfaces dépend de plusieurs facteurs, notamment des interactions physico-chimiques entre la paroi bactérienne et la surface biotique ou abiotique sur laquelle elles adhèrent, mais également du milieu dans lequel se trouvent la surface et les bactéries. Lorsque les bactéries atteignent une distance inférieure à 1 nm de la surface, des forces physico-chimiques entrent en jeu : les interactions de Van der Waals connues pour être attractives, les interactions acide-base de Lewis, les répulsions électrostatiques et les forces hydrodynamiques (Bellon-Fontaine *et al.*, 1996; Berne *et al.*, 2018; Van Loosdrecht *et al.*, 1990). Cette étape est réversible car les bactéries peuvent se détacher de la surface par force hydrodynamique ou grâce à des changements de pH et de température du milieu (Berne *et al.*, 2018; Bunt *et al.*, 1993; Zeraik and Nitschke, 2012).

L'adhésion irréversible : Cette deuxième étape est moins instantanée et est davantage liée à la physiologie de la bactérie. A ce stade, les bactéries consolident leur attachement à la surface par le biais de composants tels que les pili, les fimbriae, les appendices et la sécrétion d'adhésine et/ou

d'exopolysaccharides exportés à la surface (Donlan, 2002; Klemm and Schembri, 2000). Ainsi, les bactéries forment une couche consolidée très difficile à détacher.

L'adhésion est la première étape de la formation des biofilms (Achinas *et al.*, 2019). Les propriétés d'adhésion de *B. cereus* à des surfaces biotiques et abiotiques dépendent de la souche et du type de surface. Il a été montré que certaines souches de *B. cereus* avaient la capacité d'adhérer à des cellules humaines tumorales HeLa et Caco-2 et à des protéines de la matrice extracellulaire des tissus conjonctifs (Auger *et al.*, 2009; Kotiranta *et al.*, 1998; Sanchez *et al.*, 2009). De plus, chez *B. cereus*, les protéines ancrées à la surface telles que les flagellines, les protéines de couche S et l'adhésine CalY auraient un rôle important dans l'adhésion (Sanchez *et al.*, 2009). Enfin, il a été montré que *B. cereus* est capable d'adhérer à des surfaces abiotiques comme l'acier inoxydable ou le plastique sous forme de spores ou de cellules végétatives (Park *et al.*, 2019; Peng *et al.*, 2001). Récemment, il a été montré que les bacilles acquièrent un fort pouvoir pathogène en adhérant aux cellules humaines et produisant d'un large panel de toxines (Caro-Astorga *et al.*, 2020).

1.2. Les biofilms

Afin de persister dans des conditions environnementales variables, les bactéries adoptent plusieurs stratégies de survie dont la formation de biofilms. Les biofilms se forment en plusieurs étapes : une fois que les bactéries ont adhéré (Fig. 1.12, étape 1), elles se multiplient de façon exponentielle et forment une monocouche de micro-colonies (Fig. 1.12, étape 2). Puis, les micro-colonies recrutent d'autres bactéries (Fig. 12, étape 3) afin de former une macro-colonie. C'est l'étape de maturation (Fig. 1.12, étape 4). La structure du biofilm est consolidée par la matrice extracellulaire produite composée d'exopolysaccharides, de protéines et d'ADN (Majed *et al.*, 2016). La structure du biofilm varie en fonction de plusieurs conditions : la mobilité bactérienne, la signalisation cellulaire, le type de surface, le taux de bactéries, la production de polymères de la matrice extracellulaire (Branda *et al.*, 2005; Houry *et al.*, 2010; Solano *et al.*, 2014). Enfin vient l'essaimage (Fig. 1.12, étape 5), qui correspond au retour au monde planctonique. Lors de cette dernière étape du cycle du biofilm, les bactéries se détachent des macro-colonies pour revenir à l'état planctonique (McDougald *et al.*, 2012). La translocation de ces bactéries est supposée conduire vers de nouveaux sites de colonisation. La dispersion est induite par la perturbation de la concentration en ressources nutritives, en oxygène, en température. En effet, plus le biofilm s'agrandit, moins l'accès aux ressources est uniforme (Rumbaugh and Sauer, 2020). Il apparaît alors au sein du biofilm un gradient de

concentration des ressources nutritives et de l'oxygène. Les biofilms répondent à ces gradients en induisant diverses réponses aux stress. Elles se manifestent par l'expression des gènes liés à l'hypoxie, au stress nutritif et aux croissances lentes. En outre, la forte expression du gène *rpoS* témoigne d'un stress général (Serra and Hengge, 2014; Williamson *et al.*, 2012). La dispersion peut aussi provenir de production de surfactants extracellulaires comme les rhamnolipides diminuant l'adhésion cellule-matrice et cellule-cellule (Paraszkievicz *et al.*, 2021). Bien que le quorum sensing joue un rôle dans la formation des biofilms, il favorise également la dispersion (Solano *et al.*, 2014).

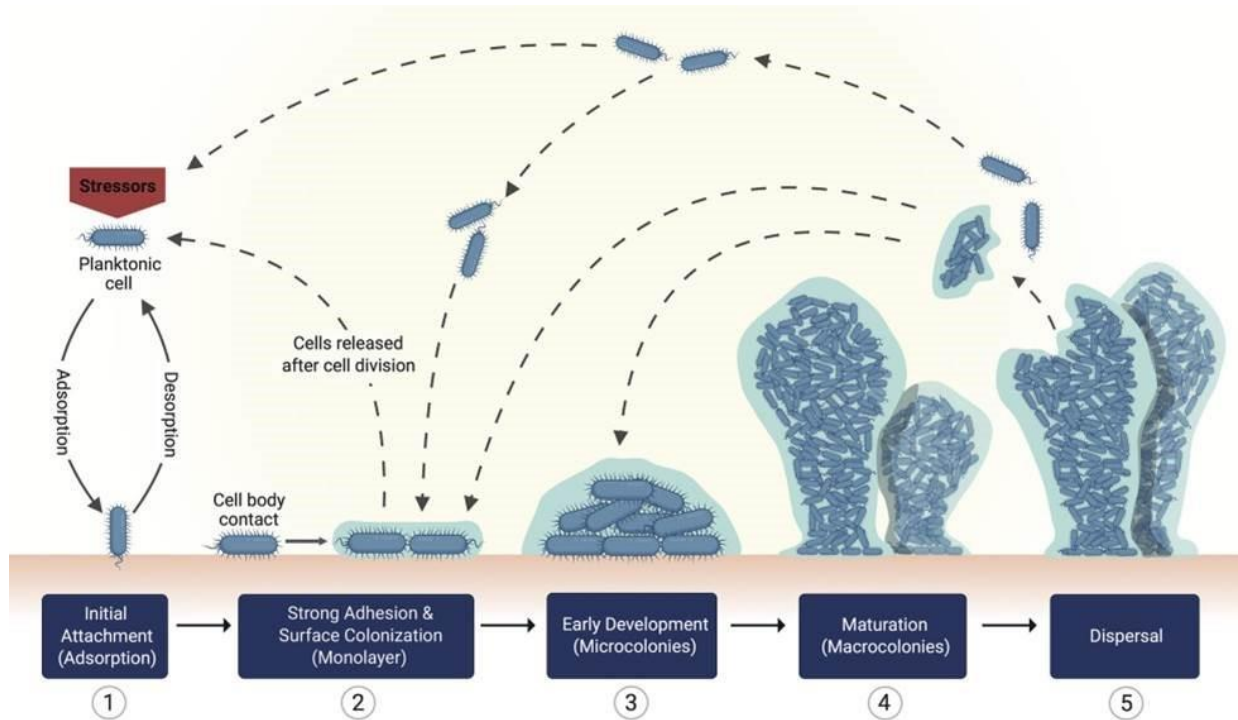


Figure 1.12. Les étapes de la formation de biofilm sur une surface abiotique (Guzmán-Soto *et al.*, 2021)

Dans la nature les bactéries sont capables de former des biofilms sur plusieurs interfaces : air-liquide et solide-liquide formant des biofilms en immersion. Lorsqu'ils se forment à l'interface air-liquide, les biofilms comprennent un anneau, structure épaisse adhérant fortement à la paroi solide du récipient et une pellicule à l'interface air/liquide qui s'étend sur toute la surface jusqu'à rejoindre l'anneau, décrit chez *B. thuringiensis* (El-Khoury *et al.*, 2021; Wijman *et al.*, 2007) (Fig. 1.13).

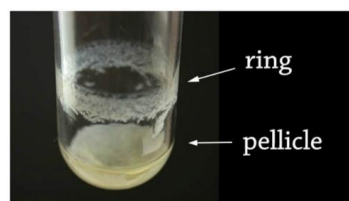


Figure 1.13. Anneau et pellicule d'un biofilm flottant de *B. thuringiensis* (El khoury *et al.*, 2016).

De plus, les biofilms contiennent fréquemment des spores. Pour les biofilms à l'interface air-liquide, la sporulation chez *B. thuringiensis* apparaît plus précocement dans l'anneau que dans les pellicules, ce qui contribuerait à la résistance et à la persistance des biofilms (El-Khoury *et al.*, 2016). Certaines souches de *B. cereus* sont capables de produire des biofilms sur des surfaces immergées (Ryu and Beuchat, 2005).

Les biofilms confèrent à la bactérie une protection contre les stress. Chez *B. anthracis*, les biofilms sont moins tolérants à deux antibiotiques testés (la ciprofloxacine et la doxycycline) que les cellules planctoniques (Lee *et al.*, 2007). Les biofilms permettent à *B. cereus* d'être plus résistante et persistante dans l'environnement. En effet, sous forme de biofilms, les bactéries sont davantage tolérantes aux antimicrobiens. Cependant, les biofilms seraient moins agressifs que les cellules planctoniques, qui produisent davantage de toxines. En effet, une étude sur la toxicité des cellules Hela montre que les biofilms tuent moins rapidement les cellules humaines que les cellules planctoniques (Caro-Astorga *et al.*, 2020). En outre, les biofilms multi-espèces seraient plus tolérants aux stress chimiques et mécaniques que les biofilms mono-espèce (Gomes *et al.*, 2021).

IV. La couche S : une entité de surface conservée étonnante par sa diversité structurale et fonctionnelle.

1. Émergence de l'étude des couches S

La couche S est une couche protéique composée d'une à deux protéines ou glycoprotéines qui s'auto-assemblent à la surface de la bactérie pour former un réseau paracristallin bidimensionnel. Les couches S ont été définies à l'origine comme « monocouches macromoléculaires périodiques ». Elles ont été observées pour la première fois en 1952 par micrographie électronique à la surface de la membrane cellulaire de la bactérie Gram négatif *Spirillum serpens* (Houwink, 1953). Au fur et à mesure des recherches, les microbiologistes ont constaté que les microorganismes porteurs de couches S sont très répandus dans la biosphère. A ce jour, les couches S ont été observées chez environ 400 espèces, dont un grand nombre de bactéries Gram positif, négatif et la majorité des archées (Albers and Meyer, 2011; Claus *et al.*, 2005; Hynönen *et al.*, 2002; Jakava-Viljanen *et al.*, 2002; Kinns *et al.*, 2010; Sára and Sleytr, 2000; Smit *et al.*, 2001).

Malgré l'intérêt croissant pour les couches S, aucun terme commun reconnu n'a existé pour décrire ces structures durant les vingt premières années. La couche S a été nommée avec divers termes : « couche paracristalline », « couche de surface », « couche cristalline plane », « couche à structure régulière » (Sleytr, 2016). C'est en 1976 que le terme de « couche S » a été introduit par Sleytr et adopté par la communauté scientifique (Sleytr *et al.*, 1996).

Les protéines de couche S (SLP) représenteraient 5 à 15 % de la production totale des protéines, et seraient les protéines les plus abondantes de la Terre (Pum *et al.*, 2013; Sára and Sleytr, 2000). Il semblerait que ces protéines doivent fournir aux organismes un avantage sélectif dans des conditions spécifiques.

2. Origines évolutives diverses

Les couches S sont présentes chez un grand nombre de bactéries et d'archées. Les analyses d'acides aminés chez différentes branches phylogénétiques ont montré que la composition globale des protéines de couche S est assez similaire. Hormis la lysine qui est basique et l'acide aminé prédominant, les couches S possèdent une majorité d'acides aminés hydrophobes et acides. Cependant, il est rare d'observer la présence d'arginine, de méthionine, d'histidine ou de cystéine (Sára and Sleytr, 1996). Les SLP ont une longueur de chaîne comprise entre 400 et 2500 résidus et une taille de 40 à 200 kDa (Sára and Sleytr, 1996; Zhu *et al.*, 2017). Malgré une composition globale en acides aminés proche, les SLP présentent une très grande diversité de séquence chez les archées comme chez les bactéries, ce qui suggère des origines évolutives multiples. Cependant, une grande similarité est généralement observée chez les organismes étroitement apparentés. Les SLP d'une même espèce partagent une grande homologie de séquence (Bharat *et al.*, 2021).

3. La couche S : de la protéine aux fonctions

3.1. La sécrétion

La sécrétion des protéines à travers la membrane cellulaire est un processus essentiel chez tous les micro-organismes. La translocation des SLP présente un challenge particulier pour les bactéries et les archées en raison de la grande quantité de protéines nécessaire à la formation du réseau paracrystallin. La sécrétion des SLP est maintenant étudiée chez un grand nombre d'espèces. Les SLPs possèdent généralement un peptide signal composé de 12 à 34 acides aminés permettant la translocation des SLP à la surface de la bactérie. Excepté pour les SLP des bactéries Gram négatif *Caulobacter crescentus* et *Campylobacter fetus*, pour lesquelles il se situe en C-terminal, le peptide signal est localisé à l'extrémité N-terminal (Awram and Smit, 1998; Thompson *et al.*, 1998; Zhu *et al.*, 2017). Chez les archées, il se situe majoritairement en C-terminal (Rodrigues-Oliveira *et al.*, 2017).

La sécrétion des SLP a amplement été étudiée chez deux bactéries Gram positif, *Clostridium difficile* et *B. anthracis*. Dans les deux cas, la sécrétion des SLP est dépendante du système Sec, étudié pour la première fois chez *Mycobacterium tuberculosis*, puis caractérisé dans un petit nombre de bactéries (Braunstein *et al.*, 2001; Fagan and Fairweather, 2014; Feltcher and Braunstein, 2012;

Green and Meccas, 2016). Les organismes qui exportent les SLP par le système Sec possèdent deux copies de l'ATPase SecA: SecA2 favorise le transport des SLP et SecA1 celui des autres protéines à travers la membrane. Une analyse génomique chez *B. anthracis* a conduit à l'identification de trois gènes situés juste en amont des gènes de la couche S : *secA2*, *slaP*, *slaQ*, codant pour des petites protéines (Fig. 1.14) nécessaires à la sécrétion efficace et à l'assemblage des protéines de la couche S, Sap et EA1 (Nguyen-Mau *et al.*, 2015, 2012).



Figure 1.14. Cluster de gènes de couche S de *B. anthracis* Ames Ancestor (adapté de Missiakas and Schneewind, 2017).

Alors que SecA2 et SlaP sont nécessaires à la sécrétion efficace des SLP, SlaQ serait impliquée dans l'assemblage des protéines à la surface. Il a été montré que SlaQ semble faciliter l'assemblage de Sap. Il est intéressant de noter qu'on retrouve les gènes *secA2*, *slaP*, *slaQ* uniquement chez les souches de *B. cereus* *sl* possédant une couche S. Chez *C. difficile*, le gène *secA2* est également immédiatement adjacent à *slpA*, qui code pour la protéine de couche SlpA. SecA2 est responsable de la translocation de SlpA (Fig. 1.15) (Fagan and Fairweather, 2014, 2011; Feltcher and Braunstein, 2012).

Chez les archées, le système de sécrétion est largement moins étudié. L'assemblage des SLP implique des systèmes de transport semblables aux systèmes de sécrétion bactérien de type II et IV, plus simplifiés, nommé SecYE β (Albers *et al.*, 2006; Ellen *et al.*, 2010).

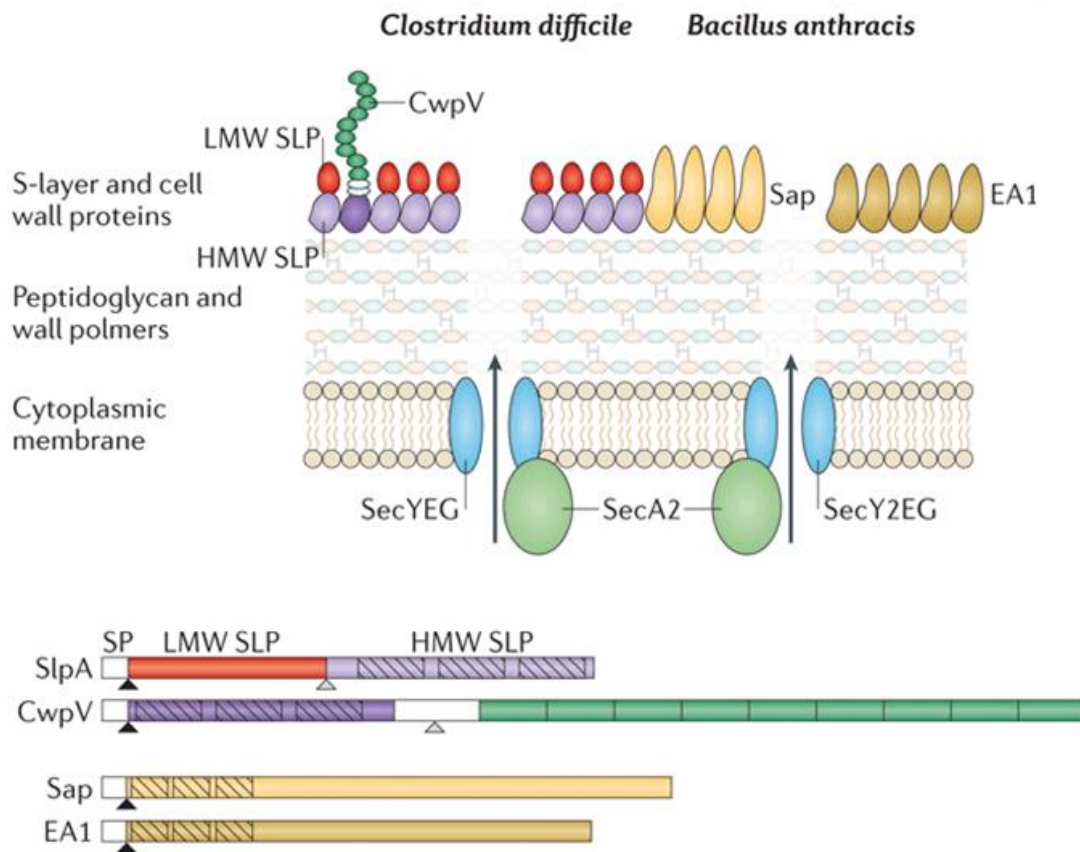


Figure 1.15. Mécanismes de sécrétion de SlpA et de Sap et EA1 chez *C. difficile* et *B. anthracis* respectivement . Les SLP contiennent un peptide signal (SP, en blanc) qui dirige le polypeptide vers l'appareil de sécrétion et est clivé lors de la translocation membranaire (flèche noire) nécessitant l'ATPase SecA2. Après reconnaissance par SecA2, le polypeptide naissant est transloqué à travers la membrane par un pore constitué de SecY, SecE et SecG pour *C. difficile* et SecY2, SecE et SecG pour *B. anthracis*. La protéine de surface CwpV chez *C. difficile* est dépendante du système de sécrétion Sec. Les flèches indiquent les sites de clivage (d'après Fagan et Fairweather, 2014).

3.2. L'ancrage

Une fois exportées, les SLP s'ancrent dans la paroi cellulaire et s'auto-assemblent pour former un réseau tout autour de la surface du micro-organisme. Chez les bactéries Gram positif, les protéines de couche S sont en général organisées en deux parties : un domaine N-terminal dit d'ancrage à la paroi cellulaire et un domaine C-terminal de cristallisation formant un maillage à la surface bactérienne (Fig. 1.16). Alors que le domaine de cristallisation présente une grande diversité chez les espèces, la partie d'ancrage est généralement très conservée (Zhu *et al.*, 2017). Les protéines

de couche S de tous les micro-organismes sont fixées à la surface de la bactérie de manière non-covalente et peuvent être détachées par l'ajout d'agent chaotropique, de sels ou d'agents chélateurs (Sidhu and Olsen, 1997; Sleytr *et al.*, 2001). Les interactions inter protéiques formant le réseau paracristallin de la couche S semblent plus fortes que celles entre la paroi et chaque SLP, ce qui permet d'extraire la couche S du SCWP (voir I.3) en conservant la symétrie du réseau paracristallin.

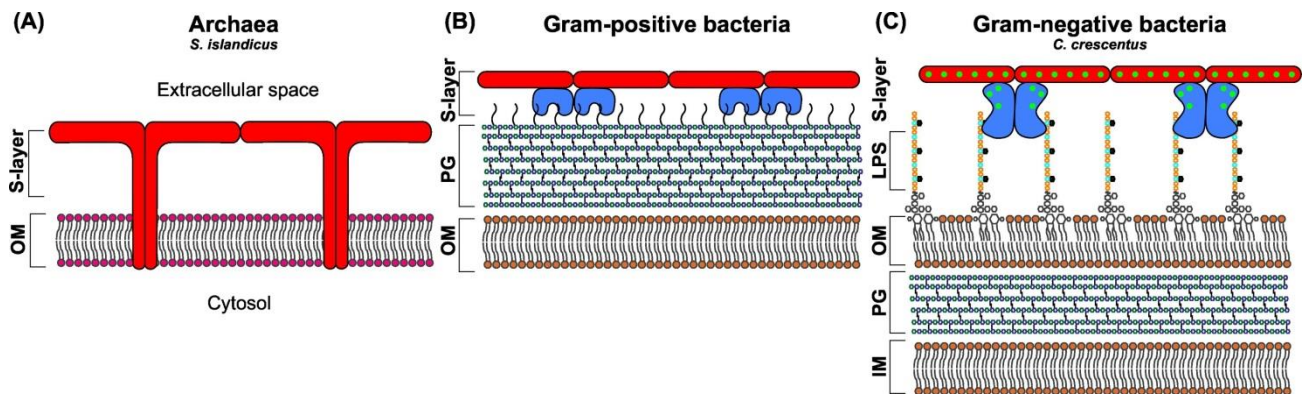


Figure 1.16. Mécanismes d'ancrage des couches S à la surface des Archées et Bactéries : (A) Archée (*S. islandicus*). Les couches S représentées en rouge sont directement ancrées dans la membrane externe, (B) Bactéries Gram positif. Le domaine de cristallisation des couches S est représenté en rouge et les domaines d'ancrages en bleu. Les SLP s'ancrent à la paroi. (C) Bactéries Gram négatif (*Caulobacter crescentus*) Le domaine de cristallisation des couches S est représenté en rouge et les domaines d'ancrages en bleu. Les SLP sont ancrées au LPS. LPS pour lipopolysaccharide, OM pour Membrane externe, PG pour peptidoglycane, IM pour membrane interne (Bharat *et al.*, 2021).

Les SLP des bactéries du groupe *B. cereus* contiennent trois répétitions en tandem d'un domaine situé à l'extrémité N-terminal se liant de manière non covalente au SCWP. Chez *B. anthracis*, les protéines Sap et EA1 contiennent chacune trois domaines consécutifs particuliers de 50 à 60 acides aminés appelés motifs SLH (pour S-layer Homology) situés en N-terminal (Kern *et al.*, 2011; Mesnage *et al.*, 1999). La liaison du domaine SLH au SCWP dépendrait pour les SLP de la cétyl-pyruvylation du motif terminal du SCWP (Chapman *et al.*, 2018; Mesnage *et al.*, 2000; Sychantha *et al.*, 2018). La cétyl-pyruvylation serait catalysée par le produit du gène *csaB*, localisé immédiatement en amont des gènes de couche S chez *B. anthracis* mais aussi chez les autres espèces de *B. cereus* *sl* qui possèdent une couche S (Fig. 1.14). (Mesnage *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2013). De même SpaA, la SLP qui recouvre *Paenibacillus alvi*, est ancrée au dernier sucre du SWCP par les domaines SLH (Legg *et al.*, 2022).

Chez les souches de *B. cereus* *sl* on retrouve d'autres protéines avec des domaines SLH s'ancrant à l'enveloppe cellulaire. Contrairement aux SLP, ces protéines sont incapables de s'auto-assembler spontanément en réseau et donc de former une couche entourant la surface (Kern and Schneewind, 2008). On parle de SLAP pour S-layer associated proteins ou de BSL pour Bacillus S-layer associated proteins chez *B. anthracis* qui en contient 22. Les BSL exercent plusieurs fonctions enzymatiques et participent à différents processus cellulaires tels que le métabolisme du peptidoglycane et l'adhésion aux cellules hôtes (Kern and Schneewind, 2008; Kern *et al.*, 2012; Tarlovsky *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2013). Par exemple, une souche délétée du gène *bslA*, localisé sur le plasmide pXO1, se disperse moins vite dans les tissus des cochons d'inde que la souche parentale (Kern and Schneewind, 2010). Une dose plus importante de spores du mutant *bslA* doit être administrée aux cobayes pour atteindre la même mortalité qu'avec les spores de la souche parentale. Le mutant *bslA* présente également des défauts d'adhérence sur les cellules de mammifères (Kern and Schneewind, 2008). Ainsi, BslAa une fonction à la fois d'adhésine et de facteur de virulence chez *B. anthracis*. Des homologues du gène *bslA* se trouvent sur les plasmides pXO1-like des souches pathogènes *B. cereus* G9241 et *B. cereus* biovar *anthracis* Côte d'Ivoire (Wang *et al.*, 2013). Le rôle de BslO a aussi été étudié. Le mutant *bslO* présente des bacilles anormalement longs (Anderson *et al.*, 2011). Dans les souches sauvages, BslO se situe au niveau des septa cellulaires, cette localisation étant dépendante de l'assemblage de Sap et EA1 (Kern *et al.*, 2012).

Excepté SbsB chez *Geobacillus stearothermophilus* (*G. stearothermophilus*), les autres SLP de *G. stearothermophilus* et celles de *Lactobacillus* et de *Clostridium* ne possèdent pas de domaines SLH, mais ont développé d'autres mécanismes pour s'ancrer aux SCWP. Par exemple, chez *G. stearothermophilus* SbsC contient trois domaines en tandem qui interagissent avec un SCWP chargé négativement et composé de N-acétylglucosamine, de glucose et d'acide 2,3-didésoxy-diacétamido mannosamine uronique (Egelseer *et al.*, 1998; Jarosch *et al.*, 2000). Certains ancrages de SLP se font simplement par liaisons hydrogènes avec le SCWP, c'est le cas de la partie C-terminale de SlapA chez *Lactobacillus brevis* (*L. brevis*) ATCC 8287 (Masuda and Kawata, 1985).

Chez les *Clostridium* tels que *C. difficile*, *C. tetani* et *C. botulinum*, les SLP possèdent trois domaines de répétitions en tandem CWB2₁, CWB2₂ et CWB2₃ (CWB2 pour cell-wall-binding 2) nécessaires à l'ancrage correct à la paroi cellulaire (Lanzoni-Mangutchi *et al.*, 2022; Usenik *et al.*, 2017; Willing *et al.*, 2015). Les protéines de surface, autres que les SLP, ancrées à la paroi par ces domaines CWB2 sont appelées Cwp (pour cell wall proteins). Chez *C. difficile* 630, les trois domaines CWB2 sont localisés en position N-terminale, C-terminale ou centrale chez des protéines

de surfaces qui ne forment pas de couche S (Fagan *et al.*, 2011). Les CWB2, comme les domaines SLH décrits chez *B. anthracis*, sont organisés en trois hélices similaires, ce qui suggère une origine évolutive convergente (Kern *et al.*, 2011; Lanzoni-Mangutchi *et al.*, 2022).

Contrairement aux bactéries Gram positif les mécanismes d'ancrage chez les bactéries Gram négatif sont peu connus. Aucun motif unifié d'ancrage de la couche S n'a encore été décrit pour ces bactéries, mais l'attachement de la couche S des bactéries Gram-négatif se fait par les extrémités N- et C-terminales des SLP au lipopolysaccharides de la membrane externe (Dworkin *et al.*, 1995; Kügelgen *et al.*, 2020) (Fig. 1.16).

Chez les archées, les couches S sont souvent le seul composant de l'enveloppe cellulaire. Elles sont généralement ancrées directement dans la membrane plasmique. Les SLP subissent aussi parfois une modification lipidique leur permettant de s'insérer dans la membrane plasmique (Albers and Meyer, 2011; Rodrigues-Oliveira *et al.*, 2017) (Fig. 1.16).

3.3. Les modifications post-traductionnelles

Les SLP bactériennes et celles des archées présentent un grand niveau de diversité de modifications post-traductionnelles. L'une des plus répandues, observée chez de nombreuses SLP bactériennes et archéennes, est la présence de glycanes exposés en surface. Environ quarante structures différentes de glycanes ont été identifiées chez les bactéries Gram positif et les archées (Kandiba and Eichler, 2014; Ristl *et al.*, 2010; Sumper and Wieland, 1995; Upreti *et al.*, 2003). Les oses sont liés de manière covalente à des résidus asparagine spécifiques (N-glycosylation) ou à des résidus sérine/thréonine/tyrosine (O-glycosylation). Alors que des glycanes liés à l'azote et l'oxygène ont été observés chez les archées, seules des liaisons à l'oxygène ont été observées chez les bactéries (Fagan and Fairweather, 2014; Kelly *et al.*, 2022; Rodrigues-Oliveira *et al.*, 2017). Le rôle de la glycosylation des protéines de la couche S reste peu clair. Chez l'archée *Haloferax*, les glycanes pourraient intervenir dans la stabilité des couches S, la maintenance de leur forme et leur protection contre certains facteurs environnementaux (Tamir and Eichler, 2017).

Chez *C. difficile*, toutes les souches sont recouvertes d'une couche S. La couche S est formée de deux SLP principales : HMW-SLP (pour high molecular weight) de haut poids moléculaire et LMW-SLP (pour low molecular weight) de bas poids moléculaire. Les deux protéines sont issues de la

maturation d'un même précurseur, la protéine SlpA codée par le gène *slpA* (Calabi *et al.*, 2001; Dang *et al.*, 2010). A ce jour, il n'a pas été possible de construire un mutant de SlpA ; elle serait donc essentielle pour *C. difficile*.

La maturation de SlpA est réalisée en deux temps (Fig. 1.17A). Tout d'abord SlpA est exportée à travers la membrane par le système Sec (voir 3.1) au cours duquel son peptide signal est clivé. Puis SlpA est clivée par la protéase à cystéine Cwp84 en deux protéines matures : HMW (42 à 48 kDa) et LMW (32 à 38 kDa) (Kirby *et al.*, 2009). LMW forme une fine couche au dessus de HMW. HMW, très conservée chez *C. difficile*, est composée des domaines CWB2 commun à toutes les Cwp, permettant l'ancrage au sein de la paroi. La partie C-terminale de LMW et la partie N-terminale de HMW sont reliées par des liaisons non-covalentes (Fig. 1.17B et Fig. 1.17C) (Fagan *et al.*, 2009). L'assemblage de ce réseau HMW-LMW très compacte se fait par le biais d'un arrangement en prisme sur la surface externe de la paroi cellulaire (Lanzoni-Mangutchi *et al.*, 2022) (Fig. 1.17C).

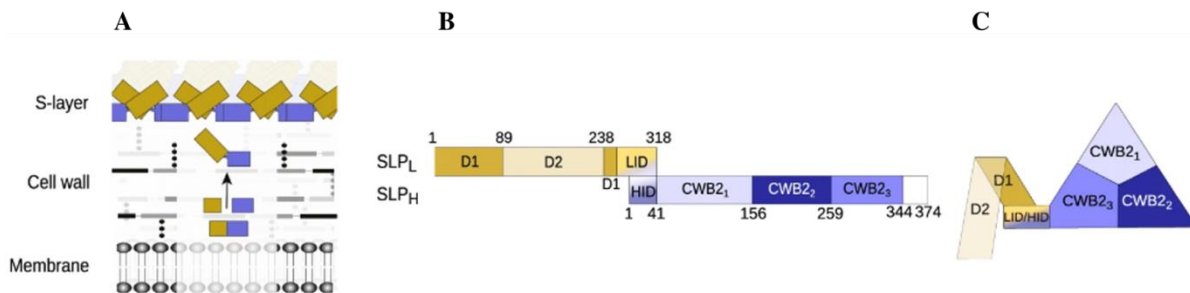


Figure 1.17. Disposition et conformation des SlpA (LMW et HMW) à la surface cellulaire de *C. difficile*. (A) Transport et clivage de SlpA et disposition de LMW (ocre) et HMW (violet). L'organisation du complexe HMW et LMW en conformation (B) primaire et (C) secondaire, (Adapté de Lanzoni-Mangutchi *et al.*, 2022).

De plus, il a été montré que la protéine LWM de la souche Ox247 possède un glycane complexe attaché à la thréonine-38 par une liaison O-glycosidique. L'analyse génomique de cette souche a permis d'identifier un locus de 24 kb contenant des gènes de synthèse et de fixation protéique de ce glycane. Les mutations des gènes de ce locus altèrent ou abolissent la biosynthèse du glycane. L'étude de ces mutants montre que la modification de la glycosylation de la couche S affecte la sporulation, la formation de biofilms et la longueur des cellules (Richards *et al.*, 2018).

Chez les archées, il existe également des modifications lipidiques notamment décrites chez les SLP de *Haloferax volcanii* et *Halobacterium halobium* (Kandiba *et al.*, 2013; Konrad and Eichler, 2002). Enfin, il existe de rares SLP phosphorylées au niveau des tyrosines, comme décrit pour

Aeromonas hydrophila et *Lysinibacillus* (ou *Bacillus*) *sphaericus* (*B. sphaericus*) (Merroun *et al.*, 2005; Thomas and Trust, 1995).

3.4. L'auto-assemblage spontané formant réseau paracristallin

En raison de leur apparence remarquable au microscope, l'assemblage des SLP a été le sujet de recherches assidues de biologistes structurels dans les années 1980 (Deatherage *et al.*, 1983; Kessel *et al.*, 1988). Cependant, les connaissances sur la biologie structurale étaient relativement rares jusqu'aux années 2000, en raison du manque de techniques appropriées pour étudier un biopolymère 2D flexible sur les cellules mais également parce que la couche S n'est pas présente chez les bactéries *E. coli* et *B. subtilis*, deux modèles bactériens largement étudiés. Durant les trente dernières années, l'assemblage de cette structure paracristalline régulière à la surface de microorganismes a été caractérisé par microscopie électronique à transmission (MET), par microscopie à balayage (MEB) et par microscopie à force atomique (AFM), permettant aussi de visualiser les couches S *in vivo* (Baumeister *et al.*, 1990; Dupres *et al.*, 2009; Müller *et al.*, 1996; Panhorst *et al.*, 2001; Sleytr *et al.*, 2001).

La couche S recouvre 30 à 70% de la surface des micro-organismes (Pum *et al.*, 2013; Sleytr, 1997). Les SLP qui la constituent forment un réseau paracristallin d'une épaisseur de 5 à 20 nm chez les bactéries et 70 nm chez les archées (Peters *et al.*, 1995; Sleytr and Beveridge, 1999). Ce réseau est capable de s'agencer en plusieurs symétries : une symétrie oblique, carrée ou hexagonale. Le type de symétrie dépend du nombre d'unités constituant ce réseau, à savoir une (p1), deux (p2), trois (p3), quatre (p4) ou six (p6) monomères (Fig. 1.18) (Messner and Sleytr, 1992). Ce réseau est ponctué de pores allant de 2 à 8 nm. L'espace centre à centre entre deux unités est compris entre 2,5 et 35 nm en fonction des souches de bactéries et d'archées (Sára *et al.*, 1992).

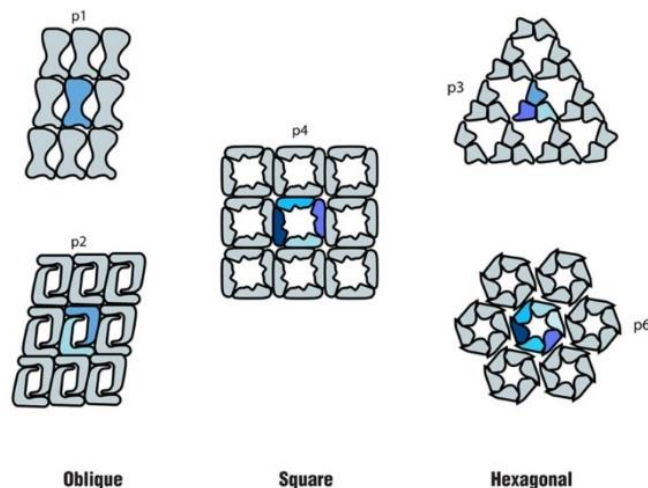


Figure 1.18. Les différents types de symétries de la couche S: oblique (p1, p2), carrée (p4) et hexagonale (p3, p6) (Rodrigues-Oliveira *et al.*, 2017).

Les SLP bactériennes forment des réseaux de toutes symétries tandis que celles des archées s'auto-assemblent majoritairement en symétrie hexagonale. Les symétries peuvent être différentes entre les souches d'une même espèce (Åvall-Jääskeläinen and Palva, 2005; Messner and Sleytr, 1992; Rodrigues-Oliveira *et al.*, 2017; Sidhu and Olsen, 1997; Sleytr *et al.*, 1999).

De plus, grâce à la microscopie à fluorescence en temps réel, la biogénèse des SLP à la surface a été suivie chez l'archée *Haloferax volcanii* et chez les deux bactéries Gram positif *Caulobacter crescentus* et *C. difficile*. Les images microscopiques révèlent que les SLP s'insèrent majoritairement aux pôles ou au septum des cellules, ce qui suggère un rôle dans la division cellulaire (Abdul-Halim *et al.*, 2020; Comerci *et al.*, 2019; Oatley *et al.*, 2020).

4. Régulation des gènes de couche S

Les protéines de couche S sont généralement produites en grande quantité et peuvent constituer 15 % de la production totale de protéines (Sleytr and Messner, 1983). Cette production semble finement contrôlée car en général, très peu de SLP sont retrouvées dans le milieu/surnageant durant la croissance des bactéries (Sára and Sleytr, 2000), excepté pour *B. cereus* où des protéines de couche S sont détectées dans le surnageant de culture (Duport *et al.*, 2020; Sidhu and Olsen, 1997). Pour assurer une production élevée de protéines, les gènes des SLP sont transcrits via des promoteurs forts et les ARNm produits ont une longue demi-vie (Boot and Pouwels, 1996; Fisher *et al.*, 1988; Mignot *et al.*, 2002; Sleytr *et al.*, 1996). Généralement ces gènes sont monocistroniques et chaque gène possède son propre promoteur. Chez certaines bactéries, l'expression d'un gène codant pour

une SLP est sous le contrôle de deux promoteurs ; c'est le cas chez *Aeromonas salmonicida*, *L. brevis*, et *G. stearothermophilus* (Boot and Pouwels, 1996; Chu, 1993; Jarosch *et al.*, 2000; Kahala *et al.*, 1997). L'existence de trois promoteurs disposés en tandem pour un même gène codant pour une SLP a été rapportée chez *B. brevis* et *L. brevis* (Adachi *et al.*, 1989; Jakava-Viljanen *et al.*, 2002). Ces promoteurs, parfois doublés ou triplés, contribuent à une transcription efficace et régulée des gènes de la couche S.

Lorsqu'il y a plusieurs SLP, leur présence à la surface peut dépendre de la phase de croissance. En effet, l'observation de la surface de *B. anthracis* au microscope électronique à transmission (MET) a permis de mettre en évidence une répartition plutôt continue de Sap à la surface de la bactérie en phase exponentielle et une apparition de EA1 en phase stationnaire organisée en amas (Couture-Tosi *et al.*, 2002; Kern *et al.*, 2012; Mignot *et al.*, 2002). Le remodelage des SLP à la surface et la répartition dynamique de Sap et EA1 à la surface lors de la croissance en milieu riche est régulée par des facteurs sigma σ_A pour *sap* et σ_A et σ_H pour *eag* et par les SLP elles-mêmes (Mignot *et al.*, 2002). En effet, les domaines de cristallisation de Sap et EA1 pouvant se lier au gène *eag*, il est suggéré que les deux SLP régulent l'expression de *eag* en agissant comme répresseur transcriptionnel. Une analyse transcriptionnelle a révélé que *sap* et *eag* font partie des gènes réprimés par CodY lors de la phase exponentielle (van Schaik *et al.*, 2009). De plus, des essais *in vitro* ont montré que CodY agirait directement sur ces deux gènes (Château *et al.*, 2013). La surexpression de *codY* conduit à un défaut de séparation des cellules filles (Gopalani *et al.*, 2016). Or, EA1 et Sap sont connues pour leur activité muréine (Ahn *et al.*, 2006). Sap et la protéine associée BslO permettent la séparation des cellules filles lors de la division des cellules (Anderson *et al.*, 2011; Nguyen-Mau *et al.*, 2012). Donc la répression de Sap et de EA1 par CodY pourrait entraîner une mauvaise régulation de l'activité muréine hydrolase. Il a aussi été montré que le régulateur PagR dépendant de l'expression d'AxtA un régulateur de l'expression des gènes de virulence, est responsable de la répression de *sap* et de l'activation de la transcription d'*eag* (Mignot *et al.*, 2003a). De plus, l'expression des gènes *sap* et *eag* est également régulée par le CO₂. En effet, lors de la croissance de *B. anthracis* à l'intérieur de l'hôte ou dans un milieu défini contenant du bicarbonate, *eag* est exprimé à des niveaux plus élevés que *sap*. En réponse à une augmentation de CO₂ dans le milieu, AxtA codé par pXO1 active la transcription de *eag* via PagR (Mignot *et al.*, 2004).

Plus récemment, chez la souche émétique *B. cereus* AH187, une étude protéomique a permis de révéler que Spo0A, impliqué dans l'initiation de la sporulation, contrôle la synthèse des protéines Sap-like et EA1 (Rousset *et al.*, 2020), comme c'est le cas pour Sap de *B. anthracis* (Plaut *et al.*,

2014a). Par ailleurs, la perte de l'hème A synthétase CtaA, impliquée dans le fonctionnement de la chaîne respiratoire, réduit de moitié la production de Sap-like à la surface de *B. cereus* AH187 (Chateau *et al.*, 2022). Le protéome intracellulaire de *B. cereus* AH187 révèle que la production de Sap-like est plus importante dans les cellules qui se développent à 30°C qu'à 16°C (Duport *et al.*, 2020).

En conclusion, la production intense de SLP et la composition de la couche S à la surface dépendent d'un certain nombre de régulateurs, en réponse à la fois à des signaux environnementaux et métaboliques.

5. Diversité Fonctionnelle

5.1. Les couches S des archées : une véritable charpente cellulaire

La couche S des archées constituant le seul composant de l'enveloppe cellulaire, elle est directement attachée à la membrane plasmique (Fig. 1.16). Elle est l'unique couche directement en lien avec l'environnement.

5.1.1. Une armure stabilisant la forme cellulaire

En plus d'être la couche la plus externe, la couche S forme un réseau stable et régulier bien défini, ce qui suggère qu'elle pourrait avoir une fonction de maintien (Engelhardt, 2007; Messner *et al.*, 1986; Wildhaber and Baumeister, 1987). De plus, la couche S des archées a été décrite chez certaines espèces du genre méthanogène comme étant une structure avec beaucoup de feuilletts β . Cette quantité élevée de feuilletts β rigide pourrait stabiliser les protéines et contribuer à la formation de monocouches paracrystallines régulières (Bröckl *et al.*, 1991). Plus récemment, une étude sur *Sulfolobus islandicus* révèle que la taille des cellules des mutants déficients en SLP augmente significativement, jusqu'à six fois le diamètre des cellules de type sauvage (Zhang *et al.*, 2019). Par ailleurs, la forme des cellules dépend de la couche S chez *S. islandicus* (Zink *et al.*, 2019).

5.1.2. Participation à la division cellulaire

Dès 1991, Pum et ses collaborateurs suggèrent que la couche S de *Methanocorpusculum sinense* aurait un rôle dans la division cellulaire (Pum *et al.*, 1991). Plus récemment, deux études menées sur les couches S des hyperthermophiles du genre *Sulfolobus* montrent que l'absence de SLP altérerait la division cellulaire. Chez *S. solfataricus*, elle provoque une augmentation du diamètre cellulaire et du nombre de copies d'ADN génomique, ce qui indique une altération de la division cellulaire (Zink *et al.*, 2019). De même, chez *Sulfolobus islandicus* (*S. islandicus*) la délétion des gènes codant pour les protéines de couche S entraînerait aussi une perturbation de la division cellulaire (Zhang *et al.*, 2019).

5.1.3. Préservation cellulaire face à des environnements hostiles

En tant que structure la plus externe, la couche S joue un rôle clé dans l'adaptation environnementale. En 2007, il a été montré que la symétrie des couches S pouvait être importante pour la protection osmotique de la cellule. Puis récemment, une étude chez *S. islandicus* a montré que les cellules mutantes *AslaA*, dépourvues de couche S, sont plus sensibles lors de la croissance en condition de stress hyperosmotique (Zhang *et al.*, 2019). La glycosylation des protéines de couche S pourrait être un critère supplémentaire de protection pour la cellule. Il a été montré que la N-glycosylation des SLP favorise le maintien de l'intégrité des cellules à température élevée. Les archées hyperthermophiles, en plus d'avoir une membrane plasmique qui diffère de celle des mésophiles, ont une couche S fortement glycosylée lui permettant de résister aux températures élevées (Meyer and Albers, 2013). De même, *Methanobrevibacter smithii*, un méthanogène des zones humides froides dont la température de croissance optimale est proche de 18°C a développé quatre sites de N-glycosylation au sein des SLP lors de la croissance à 30°C (Li *et al.*, 2020).

5.2. Les multiples fonctions de couches S bactériennes

5.2.1. Une protection contre les agressions environnementales

La couche S est décrite comme jouant un rôle dans la protection contre les rayonnements γ et UV (Aravindh *et al.*, 2015; Gupta *et al.*, 2011; Kotiranta *et al.*, 1999). Récemment, Farci et ses collaborateurs ont confirmé que la couche S chez *Deinococcus radiodurans* permettait une meilleure résistance aux radiations et aux températures élevées (Farci *et al.*, 2018). Dans des conditions

hypotoniques, il a été suggéré récemment que la couche S de *B. anthracis* fait office d'exosquelette permettant de maintenir une certaine rigidité et une stabilité de la structure cellulaire (Fioravanti *et al.*, 2022).

Un rôle clé dans l'élimination des métaux toxiques des sols, des sédiments et des eaux contaminées a également été attribué aux SLP. L'organisme le plus étudié pour sa résistance aux métaux est la bactérie *B. sphaericus* JG-A12 isolée de déchets miniers d'Uranium en Allemagne. Les SLP ont une grande affinité de liaison avec les métaux lourds. La couche S fonctionnerait donc probablement comme une barrière pour les métaux de lourds issus de l'environnement (Fahmy *et al.*, 2006). Les trois espèces *B. sphaericus* NCTC 9602, *B. cereus* 4415 et *Bacillus megaterium* NRRL B5385 accumulent de manière sélective et réversible U, Cu, Pb, Al et Cd tandis que Mn, Ni, Zn, et Ga ne sont que faiblement accumulés (Jankowski *et al.*, 2010; Merroun *et al.*, 2005; Selenska-Pobell *et al.*, 1999). De plus, les SLP aideraient à protéger *Caulobacter crescentus* contre les peptides antimicrobiens, ce qui lui procurerait un avantage sélectif (de la Fuente-Núñez *et al.*, 2012).

Hormis les conditions retrouvées dans l'environnement, certaines bactéries peuvent être confrontées aux conditions gastro-intestinales hostiles, à savoir le bas pH de l'estomac, les sels biliaires, les enzymes lytiques, l'absence d'oxygène, le bas potentiel d'oxydoréduction et le microbiote (Ceuppens *et al.*, 2012b; Zigha *et al.*, 2006). Par exemple, la viabilité des cellules de *Lactobacillus acidophilus* (*L. acidophilus*) 92 a été testée avec et sans couche S dans des conditions mimant celles du tube gastro-intestinal (Frece *et al.*, 2005). La couche S permettrait une meilleure résistance cellulaire aux sels biliaires et aux pH acides rencontrés dans l'estomac. De plus, les lactobacilles possédant une couche S résistent mieux aux enzymes gastriques, la pepsine et la pancréatine (Alp *et al.*, 2020; Eslami *et al.*, 2013; Meng *et al.*, 2014).

5.2.2. Adhérence à différents substrats et surfaces

Les SLP, en tant que protéines de surface, ont une fonction adhésive largement étudiée chez les souches du genre *Lactobacillus*. Le retrait de la couche S par méthode chimique a permis de mettre en évidence son rôle dans l'auto-agrégation de plusieurs espèces : *L. acidophilus* ATCC 4356 (Kos *et al.*, 2006), *Lactobacillus helveticus* (*L. helveticus*) M92, chez une dizaine de souches de *Lactobacillus kefir* (*L. kefir*), chez *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum* et *Lactobacillus coryniformis* (Alp *et al.*, 2020; Beganović *et al.*, 2011, 2011; Garrote *et al.*, 2004; Kos *et al.*, 2003; Mobili *et al.*, 2009).

Les SLP peuvent servir de médiateur interactionnel entre les microorganismes, comme entre *Salmonella Typhimurium* et *L. helveticus*, ou encore entre *L. kefir* et *Saccharomyces lypolitica* dans les grains de kefir (Beganović *et al.*, 2011; Golowczyc *et al.*, 2009).

Chez *Lactobacillus* et *Bacillus*, la capacité d'adhésion des SLP aux protéines de la matrice extracellulaire a été étudiée. Les SLP de plusieurs souches de *Lactobacillus crispatus* (*L. crispatus*) sont adhérentes au collagène (Sillanpää *et al.*, 2000; Sun *et al.*, 2013; Toba *et al.*, 1995). SlpA chez *L. brevis* ATCC8287 adhère plus efficacement à la laminine et la fibronectine qu'au collagène. L'étude de Jakava-Viljanen confirme que *L. brevis* adhère davantage à la fibronectine en présence de couche S (Jakava-Viljanen *et al.*, 2002). Chez *B. cereus*, les souches entourées d'une couche S s'attachent davantage au collagène de type I, à la laminine et à la fibronectine que celles qui n'en possèdent pas (Kotiranta *et al.*, 1998; Sanchez *et al.*, 2009). Ces résultats montrent la contribution des SLP à l'interaction initiale entre la bactérie et les muqueuses. La présence de domaines de liaison à la mucine, tapissant les cellules épithéliales, a été également mise en évidence chez *Lactobacillus* et *B. cereus*. La présence de domaine de liaison à la mucine a été décrite chez les SLP de *L. acidophilus* (Buck *et al.*, 2005). Chez *L. kefiri*, le traitement chimique éliminant la couche S a permis de souligner l'importance des SLP dans l'adhésion au mucus. De plus, un lien entre les SLP et l'attachement de *B. cereus* aux mucines a été mis en évidence (Carasi *et al.*, 2014).

En plus d'adhérer aux protéines de la matrice extracellulaire, les SLP adhèrent aux cellules des mammifères. Chez *L. acidophilus*, l'élimination de la couche S par traitement chimique réduit l'adhésion bactérienne aux cellules intestinales humaines Caco-2, à l'épithélium intestinal porcin, aux cellules iléales de souris et aux cellules de colon (Frece *et al.*, 2005; Kos *et al.*, 2003). De même, l'élimination de SlpA, protéine de la couche S de *L. brevis* 8287, abolit l'adhésion aux cellules intestinales Caco-2 et Intestine 407, épithéliales de vessie humaine T24 et endothéliales EA-hy926 (Hynönen *et al.*, 2002). De plus, des anticorps anti-SLP bloquent l'interaction de *L. crispatus* ZJ001 avec cellules cancéreuses humaines HeLa et de *C. difficile* aux cellules Caco-2, ce qui démontre l'implication des SLP dans l'adhésion bactérie-cellule humaine (Calabi *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2007; Merrigan *et al.*, 2013). Chez *B. cereus*, la présence de couche S a été corrélée avec l'adhésion aux cellules épithéliales HeLa, aux neutrophiles humains et aux cellules intestinales Caco-2 (Auger *et al.*, 2009; Kotiranta *et al.*, 1998; Sanchez *et al.*, 2009). Les SLP permettent l'adhésion de *L. brevis* à la cellulose et au xylane, deux polysaccharides des parois cellulaires végétales facilitant l'assimilation des xylo-oligosaccharides dans l'intestin (Hao *et al.*, 2022). Enfin, la couche S de *Lac-*

tiplantibacillus plantarum lui confère une meilleure adhésion sur les cellules épithéliales (Alp, 2022).

La formation de biofilms, permettant la protection des cellules contre les conditions environnementales hostiles, est liée aux protéines de surfaces. Le rôle des couches S dans la formation de biofilms a été étudié pour différentes bactéries formant des biofilms : *C. difficile* et *B. cereus*. Chez *C. difficile*, l'impact de la couche S sur la formation de biofilms a été étudié par comparaison entre la souche mutante et *cwp84* et sa souche parentale. Cwp84 est la protéase responsable du clivage de SlpA formant les deux SLP matures HMW et LMW. L'effet de la délétion de *cpw84* sur la formation de biofilms dépend de la souche. Dans la souche 630 l'accumulation de SlpA non clivée à la surface de la cellule favorise la formation de biofilm tandis que c'est l'inverse dans la souche R20291 (Đapa *et al.*, 2013; Pantaléon *et al.*, 2015). Cwp84 étant impliquée aussi dans la maturation de plusieurs autres protéines de surface, ce phénotype n'est peut-être pas uniquement dû à un défaut de clivage de SlpA. Chez *B. cereus*, la présence de biofilms est négativement corrélée avec la présence de couche S (Auger *et al.*, 2009). De plus, la couche S chez d'autres espèces telles que *Gammaproteobacteria* ou *Candidatus Brocadia anammoxidans* est décrite comme un composant des biofilms (Ali *et al.*, 2020; Wong *et al.*, 2019). Enfin, le mutant de *Tonnerella forsythia* (*T. forsythia*) ne synthétisant pas les deux SLP, TfsA et TfsB, présente une adhésion diminuée des cellules épithéliales gingivales humaines (cellules Ca9-22) et des cellules de carcinome épidermique buccal (cellules KB), ce qui suggère un rôle important de la couche S dans la virulence de cette espèce (Sakakibara *et al.*, 2007).

Les SLP sont donc importantes pour adhérer aux surfaces et notamment aux cellules des mammifères ; l'adhésion permettant aux pathogènes d'envahir les cellules et d'exercer leur pouvoir pathogène.

5.2.3. Rôles dans la pathogénicité et la réponse immunitaire inflammatoire

Les SLP interagissant avec les cellules, on peut penser qu'elles jouent un rôle dans les réponses immunitaires cellulaires. Les SLP de *T. forsythia* et *L. brevis* sont reconnues par les Mincle (Macrophage inducible C-type lectin), ce qui induit la production de cytokines pro-inflammatoires (interleukine-6 (IL-6), et facteur de nécrose tumorale (TNF)) et de cytokines anti-inflammatoires (IL-1 α et TGF- β) (Chinthamani *et al.*, 2017; Prado Acosta *et al.*, 2021). La capacité de la couche S de *C. difficile* à être reconnue par le système immunitaire et à l'activer a également été étudiée. La protéine SlpA (HMW et LMW) déclenche la libération de cytokines pro-inflammatoires, les cytokines

interleukine-12 (IL-12), IL-10 et le TNF- α , mais pas la production d' IL-1 β (Ausiello *et al.*, 2006; Ryan *et al.*, 2011). Les SLP entraînent également la maturation des cellules dendritiques chez les monocytes humains et des cellules dérivées de la moelle osseuse de souris. L'activation des cellules dendritiques dépend du récepteur Toll-Like receptor 4, connu pour être en lien avec la destruction des pathogènes bactériens (Ryan *et al.*, 2011). Ces résultats démontrent le rôle crucial des couches S dans l'induction de la réponse anti-inflammatoire de *T. forsythia* et de *C. difficile*. Une étude récente a permis de mettre en évidence le lien entre la structure de SlpA et la virulence. Pour l'étude, deux mutants résistants à un agent bactéricide ont été sélectionnés. Ces mutants présentent des mutations ponctuelles distinctes dans le gène *slpA* et ne forment pas de couche S. Ils sont complètement avirulents pour les hamsters malgré une colonisation intestinale persistante (Kirk *et al.*, 2017). Chez *Campylobacter fetus* et *B. anthracis*, la couche S empêche la fixation du complément C3 ce qui protège la bactérie de la phagocytose (Fouet, 2009; Thompson, 2002).

Chez *B. anthracis*, les premières études *in vivo* sur les SLP suggèrent que chez des animaux infectés, la réponse immunitaire s'établit contre EA1 (Mesnage *et al.*, 1997).. De plus, l'immunisation par EA1 offre un effet protecteur dans les modèles murins ayant inhalé *B. anthracis* (Uchida *et al.*, 2012). Lors de l'infection de cellules humaines, les deux protéines, Sap et EA1 sont immunogènes (Baillie *et al.*, 2003). Récemment, il a été établi un lien direct entre la polymérisation de Sap et son potentiel en tant que cible antimicrobienne. L'administration sous cutanée de nanocorps anti-Sap dépolymérisant la couche S a permis d'éliminer l'infection par une souche de *B. anthracis* non capsulée et ainsi de prévenir la létalité dans un modèle murin (Fioravanti *et al.*, 2019). Chez *B. cereus* G9241, qui provoque une maladie semblable à la maladie du charbon, l'absence de *csaB*, impliqué dans l'assemblage des SLP à la surface (mais également des protéines à domaines SLH, SLAP), induit une réduction de la virulence chez la souris (Wang *et al.*, 2013). Un rôle probable des SLP dans la virulence de *B. cereus* TF5, qui provoque également une maladie proche de la maladie du charbon, a aussi été décrit (Ghosh *et al.*, 2014). La couche S de la souche marine *B. cereus* VCRCB540 révèle une propriété larvicide anti-moustique (Mani *et al.*, 2018). Le rôle des SLP dans la virulence chez *B. thuringiensis* a également été démontré dans le cas d'endophtalmie. En effet, SlpA activerait immunitaire innée (Mursalin *et al.*, 2020b, 2020a, 2019).

L'interaction des SLP avec les bactériophages a également été étudiée. Chez *L. sphaericus*, un pathogène du moustique, les SLP sont capables de se lier aux bactériophages et de les neutraliser. Chez *B. anthracis*, Sap serait impliquée dans l'infection par le phage spécifique de cette espèce l'AP50c, en agissant probablement comme récepteur (Plaut *et al.*, 2014). Chez les souches de *Clos-*

tridium, les SLP sont décrites comme récepteurs de bactériophages (Whittle *et al.*, 2022). Cependant, il a aussi été décrit que les couches S auraient un rôle de protection chez *C. botulinum* en empêchant la lysine du phage CB01751 de se lier à la paroi cellulaire (Zhang *et al.*, 2022). Cette caractéristique attribuée aux SLP leur permet de contribuer à l'exclusion des pathogènes, et ainsi les SLP pourraient être considérées comme nouveaux agents antimicrobiens et antiviraux pour inhiber les infections.

En conclusion, les couches S jouent un rôle important dans l'interaction avec l'environnement en tant que barrière protectrice, mais également dans l'adhésion cellulaire et la pathogénicité. Bien que de nombreuses fonctions aient été décrites pour les SLP, très peu d'études ont été réalisées sur les SLP des souches émétiques de *B. cereus*.

Objectif de la thèse

B. cereus sensu stricto est une bactérie largement étudiée car elle est fréquemment associée aux TIAC. Les cas les plus graves ont été occasionnés par des souches appartenant au groupe phylogénétique III, qui regroupe toutes les souches de *B. anthracis* et la majorité des souches émétiques (Guinebrière *et al.*, 2008). Les souches émétiques colonisent des niches écologiques spécifiques tels que les racines de graminées, les tubercules et les champignons (Ehling-Schulz *et al.*, 2015). La souche émétique de référence est *B. cereus* AH187 (Ehling-Schulz *et al.*, 2005a). Les souches émétiques se distinguent des autres par la présence d'une couche S à leur surface.

Une couche S est un assemblage protéique qui forme un réseau cristallin bidimensionnel à la surface des bactéries et des archées. La couche S entoure un grand nombre d'espèces bactériennes. Les études génétiques et fonctionnelles décrites dans la littérature montrent qu'il existe une grande diversité dans les séquences et les fonctions des SLP. Très peu d'études se sont intéressées aux couches S des souches émétiques. Leur prévalence dans le groupe III pourrait être liée au pouvoir pathogène ou à la capacité d'adaptation à une niche écologique particulière. Il a également été observé que *B. cereus* AH187 ne produisait plus de couche S dans un milieu oligotrophe comme les eaux de nappe (Rousset *et al.*, 2020).

L'objectif de cette thèse était d'étudier la structure de la couche S de la souche émétique *B. cereus* AH187 et de déterminer sa fonction. Nous avons tout d'abord identifié les deux protéines (SLP) composant la couche S chez *B. cereus* AH187, avant d'étudier leur dynamique de production et leur répartition à la surface de la cellule. Nous avons ensuite étudié l'influence de cette dynamique de production sur les propriétés de surface de la bactérie, après avoir construit une souche mutante ne synthétisant aucune des deux SLPs (Chapitre 2).

La synthèse de SLP étant quantitativement importante chez *B. cereus* AH187, nous nous sommes ensuite intéressées à l'impact de la production des SLP sur la croissance de *B. cereus* et sa capacité à s'adapter à la phase stationnaire à l'aide d'une analyse biochimique et protéomique (Chapitre 3). Nous avons rapporté que la couche S a un rôle important dans l'adaptation à la phase stationnaire. Nous avons confirmé que la couche S en condition de famine pouvait offrir une protection croisée aux autres stress environnementaux (Chapitre 3).

Chapitre 2

Chapitre 2 : La dynamique des protéines de la couche S contrôle les propriétés de surface de la souche *B. cereus* AH187

I. Contexte

De nombreux procaryotes sont recouverts d'un réseau bidimensionnel de sous-unités protéiques. Cette couche de surface (couche S) est incomplètement caractérisée pour de nombreux micro-organismes, dont l'agent pathogène humain *B. cereus*.

La couche S est une caractéristique commune des souches de *B. cereus* émétiques, telles que la souche AH187. La couche S confèrerait-elle à ces souches un avantage sélectif dans leur habitat ?

L'article présenté dans ce chapitre décrit pour la première fois (i) la répartition et la dynamique des protéines de couche S, SL2 et EA1, à la surface de la souche émétique de *B. cereus* AH187, (ii) l'influence de cette dynamique sur les propriétés de surface de la bactérie et enfin, (iii) l'impact de la couche S sur la survie bactérienne dans des conditions de carences nutritionnelles lors de l'entrée en phase stationnaire.

En complément de l'article, nous avons également construit la souche simple mutant $\Delta sl2$ pour nous intéresser à son phénotype, et plus spécialement à la répartition de EA1 à la surface en absence de SL2. De plus, nous avons testé la capacité de la souche sauvage ainsi que des deux souches mutantes $\Delta sl2$ et $\Delta sl2\Delta eag$ à former des biofilms.

Mesure à l'échelle moléculaire des propriétés de surface

Lors de ce travail, nous nous sommes intéressés aux propriétés de surface à l'échelle nanométrique par l'utilisation d'un microscope à force atomique (AFM). Cette technique se développe de plus en plus en microbiologie. Le paragraphe suivant présente la technique et les différentes données auxquelles elle donne d'avoir accès.

Les études sur l'adhésion bactérienne ont longtemps consisté à dénombrer par comptage les bactéries adhérentes aux surfaces. Récemment, des techniques physico-chimiques permettant de mesurer les forces adhésives ont été appliquées à des échantillons biologiques, notamment avec le développement de l'AFM. L'AFM, microscope à sonde locale, balaie la surface d'un échantillon, ce qui lui permet d'obtenir la topographie de surface et d'avoir accès aux forces physico-chimiques locales à l'échelle atomique. Depuis son invention en 1986, l'AFM connaît un essor remarquable en microbiologie (Binnig *et al.*, 1986; Cohen and Bitler, 2008; Dufrière *et al.*, 2021; Müller *et al.*, 2009). L'AFM a été utilisée dans cette étude pour mesurer l'adhésion et l'élasticité de surface.

Principes (Fig. 2.1) : L'AFM est composé d'une pointe très fine (Tip) positionnée à l'extrémité d'un levier très flexible (Cantilever). Ensemble, la pointe et le levier scannent la surface de l'échantillon. La pointe et le levier sont posés sur un système piézoélectrique qui permet de faire bouger la pointe dans les trois dimensions de l'espace (x,y,z). Un faisceau laser est envoyé sur le levier et est reflété sur une photodiode à quatre quadrants. Lorsque le levier est dévié par l'objet observé ou par la force appliquée, le faisceau laser est dévié également de sa position initiale. L'analyse de la déviation du levier permet à la fois de déterminer le parcours exact de la pointe, donnant accès à la topographie, et aussi de mesurer les forces d'interaction entre la surface et la pointe. L'échantillon étant déposé sur un support piézoélectrique, il est déplacé dans toutes les directions de l'espace.

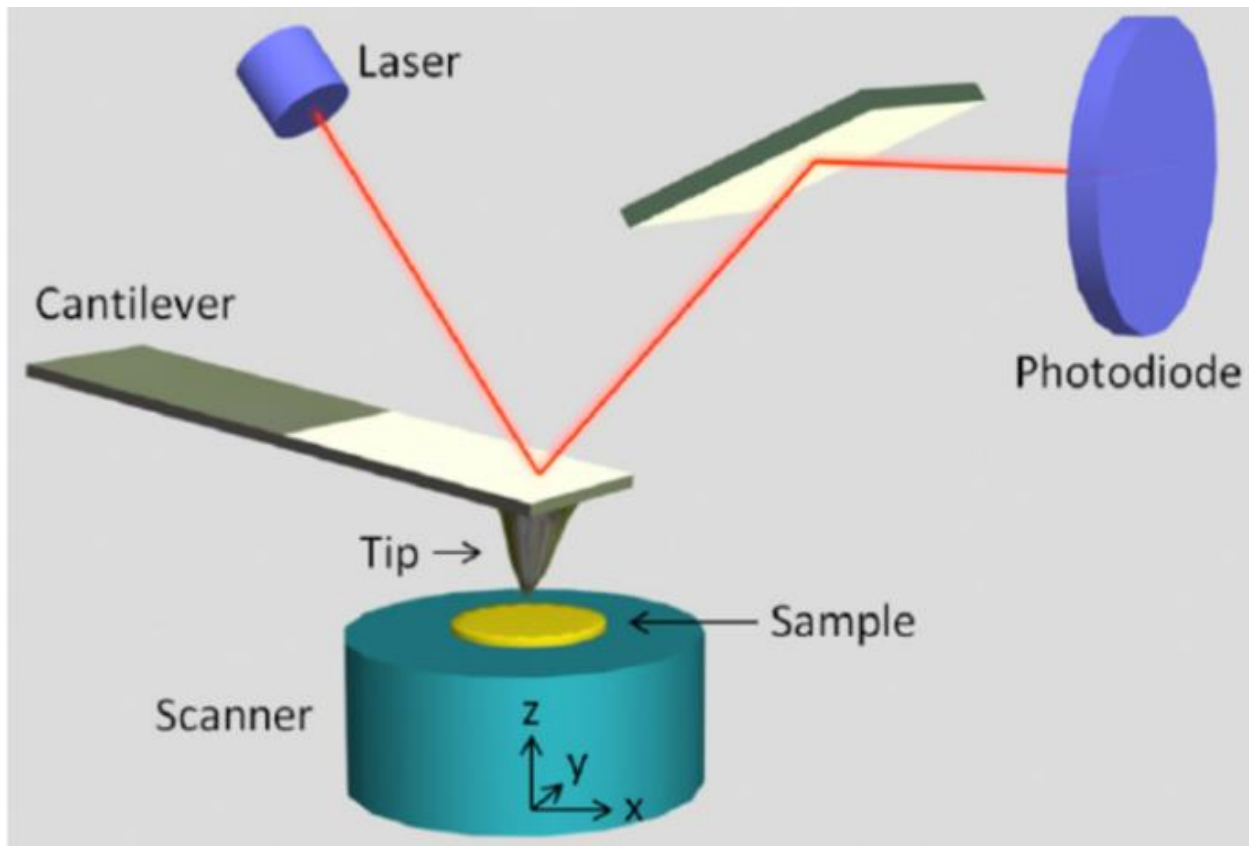


Figure 2.1. Principe de l'AFM (d'après Zeng et al., 2012).

Modes : Il existe différents modes d'analyse en AFM.

- Le mode contact : la pointe se situe sur la surface de l'échantillon et enregistre la topographie. Ce mode est très peu utilisé en microbiologie, car il altère l'échantillon.
- Le mode contact intermittent : la pointe est basée sur la résonance du levier. Lorsque la pointe interagit avec la surface, l'amplitude d'oscillation du levier change. Ce qui permet d'obtenir des informations de surface, comme la hauteur locale. Cette technique a été très utilisée pour analyser les cellules.
- Le mode non-contact : la pointe ne touche pas l'échantillon, elle est gardée à une distance fixe de l'échantillon. La déviation du levier est due aux forces attractives entre l'échantillon et la pointe.

Il est également possible de se renseigner sur les forces, les propriétés physico-chimiques et mécaniques par spectroscopie de forces (on parle d'images quantitatives) mesurant les forces entre la pointe et la surface (Pi and Cai, 2019). Le mouvement d'approche (en bleu Fig. 2.1) et de retrait (en rouge Fig. 2.1) de la pointe vers la surface en un point donné ainsi que les valeurs de déflexion du levier prises lors de ce déplacement vertical permettent d'obtenir une courbe force-distance. D'après

la figure 2.1, lorsque la pointe est située loin de la surface, elle ne ressent pas la présence de l'échantillon et la déflexion du levier ne varie pas (étape 1, Fig. 2.2). Lorsque la pointe s'approche jusqu'à une hauteur à une contrainte (force) donnée, elle rentre en interaction avec la surface *via* des forces attractives. Une fois la pointe et la surface en interaction, le levier continue de s'approcher (étape 2, Fig. 2.2), il est contraint par la force que l'on applique et il se déforme. Au retrait de la pointe, tant que la pointe reste en contact de la surface (étape 3 Fig. 2.2), le trajet reste identique à l'aller. Lorsque qu'il y a une forte adhésion entre la surface et la pointe, la pointe est maintenue plus longtemps en contact avec la surface jusqu'à se détacher brutalement (étape 4, Fig. 2.2), et revenir à sa position initiale. En chaque point de l'image, une courbe force distance est obtenue. Ainsi, il est facile d'avoir accès à la rigidité de la surface bactérienne, à son élasticité et son adhésion, sur des cellules fixées ou vivantes en milieu liquide (Dufrêne *et al.*, 2017).

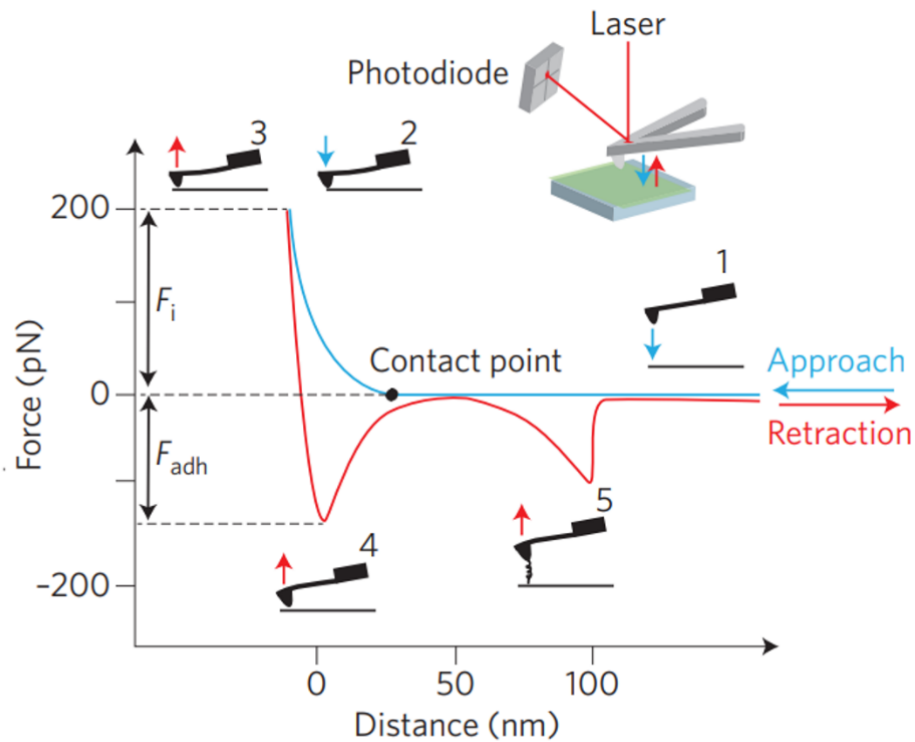


Figure 2.2. Principe des courbes force-distances. Courbe s'approchant en bleu et se retirant en rouge, (d'après Dufrêne *et al.*, 2008).

Dans ce projet, nous avons observé la topographie et mesuré l'adhésion, la dureté et l'élasticité de surface. Pour cela, nous avons tenté de travailler sur des cellules fixées et non-fixées. Le travail de la mesure de l'élasticité sur des cellules non fixées a dû être mis au point.

En conclusion, la technique récente de l'AFM mesure de nombreuses données physico-chimiques en tout point de la surface de la bactérie. Cette méthode moléculaire est de plus en plus utilisée pour étudier les propriétés de surface en bactériologie.

II. Article



Dynamic Profile of S-Layer Proteins Controls Surface Properties of Emetic *Bacillus cereus* AH187 Strain

Cécile Boutonnet¹, Sébastien Lyonnais², Beatrice Alpha-Bazin³, Jean Armengaud³, Alice Château^{1†} and Catherine Duport^{1*†}

¹Avignon Université, INRAE, UMR SQPOV, Avignon, France, ²CEMIPAI, UAR3725, CNRS, Université de Montpellier, Montpellier, France, ³Département Médicaments et Technologies pour la Santé (DMTS), Université Paris Saclay, CEA, INRAE, Bagnols-sur-Cèze, France

OPEN ACCESS

Edited by:

Patrick Eichenberger,
New York University, United States

Reviewed by:

Wenqi Yu,
University of South Florida,
United States
Pratick Khara,
University of Texas Health Science
Center at Houston, United States

*Correspondence:

Catherine Duport
catherine.duport@univ-avignon.fr

[†]These authors have contributed
equally to this work

Specialty section:

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

Received: 06 May 2022

Accepted: 10 June 2022

Published: 29 June 2022

Citation:

Boutonnet C, Lyonnais S,
Alpha-Bazin B, Armengaud J,
Château A and Duport C (2022)
Dynamic Profile of S-Layer Proteins
Controls Surface Properties of Emetic
Bacillus cereus AH187 Strain.
Front. Microbiol. 13:937862.
doi: 10.3389/fmicb.2022.937862

Many prokaryotes are covered by a two-dimensional array of proteinaceous subunits. This surface layers (S-layer) is incompletely characterized for many microorganisms. Here, we studied *Bacillus cereus* AH187. A genome analysis identified two genes encoding the S-layer proteins SL2 and EA1, which we experimentally confirmed to encode the two protein components of the S-layer covering the surface of *B. cereus*. Shotgun proteomics analysis indicated that SL2 is the major component of the *B. cereus* S-layer at the beginning of exponential growth, whereas EA1 becomes more abundant than SL2 during later stages of stationary growth. Microscopy analysis revealed the spatial organization of SL2 and EA1 at the surface of *B. cereus* to depend on their temporal-dynamics during growth. Our results also show that a mutant strain lacking functional SL2 and EA1 proteins has distinct surface properties compared to its parental strain, in terms of stiffness and hydrophilicity during the stationary growth phase. Surface properties, self-aggregation capacity, and bacterial adhesion were observed to correlate. We conclude that the dynamics of SL2 and EA1 expression is a key determinant of the surface properties of *B. cereus* AH187, and that the S-layer could contribute to *B. cereus* survival in starvation conditions.

Keywords: S-layer proteins, *Bacillus cereus*, surfaceome, surface properties, adhesion

INTRODUCTION

Numerous bacteria and almost all archaea are covered by a two-dimensional porous paracrystalline lattice. This 5–70 nm thick lattice is known as the Surface layer (S-layer; Bharat et al., 2021; Pum et al., 2021). The S-layer is composed of one or two extracellular 40–200-kDa (glyco) proteins (Sára and Sleytr, 2000), called S-layer proteins (SLP), that self-assemble into a number of symmetries: oblique (p1 and p2), square (p4), and hexagonal (p3 and p6; Sleytr et al., 1999). Most S-layers cover upwards of 70% of the microorganism's surface area (Sleytr and Beveridge, 1999). In bacteria, the S-layer is composed of approximately 5×10^5 SLP subunits punctuated by identically-sized pores distributed throughout the 2D network. These pores measure 2 to 8 nm in diameter depending on the individual microorganism (Åvall-Jääskeläinen and Palva, 2005; Sleytr et al., 2014). Although very diverse in terms of sequence length, the

primary structures of SLP have a bipartite organization, comprising an amino acid sequence involved in 2D lattice formation, and a sequence that serves to anchor the structure to the cellular envelope. Whereas the lattice-forming sequences have a remarkably divergent composition, the anchoring sequences show little sequence variability (Zhu et al., 2017). In some Gram-positive bacteria, like *Bacillus anthracis*, the anchoring sequences of SLPs contain three tandem cell-wall-binding S-layer homology (SLH) domains (Château et al., 2020; Ravi and Fioravanti, 2021). The SLH domains of the two SLP proteins produced by *B. anthracis* (SAP and EA1) are located at the N-terminus of the protein sequences, and bind non-covalently to peptidoglycan-linked pyruvylated secondary cell wall polymers (SCWPs; Mesnage et al., 1997, 2000; Kern et al., 2011). In addition to SAP and EA1, *B. anthracis* synthesizes and secretes 22 other SLH domain-containing proteins (Kern and Schneewind, 2008; Fagan and Fairweather, 2014). These proteins embed within the S-layer lattice and are thus designated S-layer-associated proteins (SLAPs). These proteins may contribute to the functions assigned to S-layers (Kern et al., 2010, 2012; Anderson et al., 2011).

A multitude of functions have been suggested for prokaryotic S-layers (Fagan and Fairweather, 2014; Zhu et al., 2017). From a general point of view, S-layers play an important role in regulating cell shape, growth, and survival. In their interactions with humans, S-layers are directly involved in bacterial pathogenesis. For example, disruption of S-layer integrity in *B. anthracis* prevents lethality in a mouse model of anthrax (Fioravanti et al., 2019). The S-layer also contributes to the pathogenesis and adaptation of *B. cereus* group species through various mechanisms such as adhesion to extracellular matrices and intestinal cells (Kotiranta et al., 1998; Auger et al., 2009; Sanchez et al., 2009), and intraocular inflammation (Mursalin et al., 2019, 2020). In survival terms, the S-layer also contributes to environmental adaptation, as it protects bacteria from harmful environmental conditions, such as low pH, radiation, high temperatures, osmotic stress and lytic enzymes, antimicrobial peptides, and bacteriophages (Aravindh et al., 2015; Gerbino et al., 2015).

In this study, we investigated the structure, biogenesis, and properties of the S-layer produced by *B. cereus* AH187. This bacterial strain, also known as F4810/72, is a human pathogen causing emetic foodborne illnesses (Ehling-Schulz et al., 2005). Emetic symptoms are caused by cereulide, a dodecadeptide produced by *B. cereus* in contaminated food prior to consumption (Agata et al., 1995, 2002). Like other emetic *B. cereus* strains, *B. cereus* AH187 is phylogenetically close to *B. anthracis* strains (Guinebretière et al., 2008; Carroll et al., 2019), and is covered by an S-layer (Duport et al., 2020; Rousset et al., 2020; Château et al., 2022). With this study, we showed that the S-layer of *B. cereus* AH187 self-assembles from two SLPs: EA1, which is quite similar to its homolog in *B. anthracis*, and SL2, which presents clear differences with respect to *B. anthracis* SAP. Proteomics analyses and microscopy observations revealed SL2 to accumulate at the cell surface from the beginning of growth, whereas the level of EA1, present as patches, reached a maximum during the late stationary growth phase. Deletion

of the *sl2* and *eag* genes encoding SL2 and EA1, respectively, changed the surface properties of *B. cereus* AH187 and revealed the importance of the S-layer in stationary *B. cereus* adhesion.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial Strains and Growth Conditions

The wild-type strain used in this study was *B. cereus* AH187 (F4810/72), which was originally isolated from vomit (Turnbull et al., 1979). The $\Delta sl2\Delta eag$ double mutant was constructed by allelic exchange (Arnaud et al., 2004), applying the previously reported experimental procedure (Château et al., 2022). The pMAD plasmid to achieve allelic exchange was created as follows: the 1-kbp DNA sequences flanking the 5' end of BCAH187_A1064 (up-*sl2*) were amplified by PCR using primer pairs upF-*sl2*-SalI and upR-*sl2*-Sac-NheI-SacII; and the 3' end of BCAH187_A1065 (down-*eag*) was amplified by PCR using the primer pairs downF-*eag*-NheI-SacII and downR-*eag*-NcoI (Supplementary Table S1). Both amplicons were cloned independently into pCR 2.1-TOPO (Invitrogen). The down-*eag* DNA fragment was excised from pCR 2.1-TOPO by digestion with SacI-SacII and inserted between the SacI-SacII sites of the pCR 2.1-TOPO plasmid containing up-*sl2*. An NheI-SacII fragment containing a spectinomycin resistance cassette (Guérout-Fleury et al., 1995) was then inserted between the up-*sl2* and down-*eag* fragments. The resulting up-*sl2*::*spec*::down-*eag* DNA fragment was then isolated using NcoI and SalI and cloned into pMAD digested with the same enzymes. The resulting pMAD-up-*sl2*::*spec*::down-*eag* plasmid was used to create the $\Delta sl2\Delta eag$ mutant. Replacement of *sl2* and *eag* by the spectinomycin resistance cassette was verified by PCR with appropriate oligonucleotide primers (Supplementary Table S1). Complementation experiments could not be performed, as attempts to clone the large *sl2-eag* DNA fragment into pHT304 failed.

Wild-type (WT) *B. cereus* AH187 and the $\Delta sl2\Delta eag$ mutant strains were routinely grown in Lysogeny broth (LB) medium. For proteomic, microscopic, and phenotypic analyses, bacteria were aerobically cultivated in chemically-defined MOD medium (Rosenfeld et al., 2005) supplemented with 30 mM glucose (MODG) at 37°C.

Heterologous Expression of *Bacillus cereus* SL2, and Anti-SL2 Antibody Production

The *B. cereus* BCAH187_A1064 ORF (*sl2*), without its signal peptide, was amplified using specific primers (Supplementary Table S1) in preparation for cloning into the expression plasmid pET100 directional TOPO (Invitrogen). The construction was verified by sequencing, and the recombinant plasmid was used to transform *Escherichia coli* BL21 Star (DE3; Invitrogen). Recombinant cells were grown on LB at 37°C to an OD₆₀₀ of 0.6–0.8. Isopropyl β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) was then added (final concentration 1 mM). After 3 h at 30°C, cells were harvested

by centrifugation (7,000 g, 15 min, 4°C). The pellet was resuspended in equilibration buffer (20 mM Na₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM imidazole), and cells were disrupted using a FastPrep homogenizer, applying three 45-s pulses at 6 m/s (MP biomedical). Samples were centrifuged (7,000 g, 10 min, 4°C), supernatant was collected and incubated for 30 min at room temperature (RT) with 700 µl of functionalized HisPur Ni-NTA beads (Invitrogen). Beads were washed twice with washing buffer (25 mM imidazole in PBS) before eluting recombinant SL2 with 300 mM imidazole in phosphate buffer (PBS). An aliquot of SL2 eluate (1 mg) was run on a 10% SDS-polyacrylamide gel. The SL2-containing band was excised from the gel and used to produce anti-SL2 polyclonal antibodies in rabbits (Eurogentec, Seraing, Belgium). The specificity of the antibodies produced was tested by western blotting. Blot images were analyzed using a Molecular Imager[®] ChemiDoc™ XRS+ (Bio-Rad), and images were processed with Image Lab™ software.

Immunofluorescence Microscopy

WT cells were grown in MODG medium and collected by centrifugation (7,000 g, 5 min, 4°C) at early exponential (EE, OD₆₀₀=0.3), late exponential (LE, OD₆₀₀=2.5), stationary (S, OD₆₀₀=3.5), and late stationary (TS, OD₆₀₀=4.2) growth phases. Cells were fixed overnight with 4% paraformaldehyde at 4°C, washed twice with PBS, and then blocked with 2% Bovine Serum Albumin (BSA) for 30 min at RT under shaking. Cells were incubated with anti-EA1 (Wang et al., 2014) and anti-SL2 primary antibodies (diluted 1:500 and 1:200, respectively) for 1 h at RT, washed twice with PBS and then incubated with Alexa Fluor 594-conjugated goat anti-rabbit polyclonal antibodies (diluted 1:1000, ThermoFisher, A-11012). Images were captured using an Olympus BX61 microscope. Fluorescence microscopy images were analyzed using Fiji and Microbe J software (Ducret et al., 2016). Experiments were performed in triplicate.

Extraction of Extracellular Non-covalently Bound Cell Surface Proteins and Immunodetection of SLPs

Non-covalently bound cell surface proteins that include SLPs and SLAPs were extracted from WT and Δ sl2 Δ eag mutant cells at early exponential (EE, OD₆₀₀ (WT)=0.3±0.0 and OD₆₀₀ (Δ sl2 Δ eag)=0.24±0.1), late exponential (LE, OD₆₀₀ (WT)=2.6±0.3 and OD₆₀₀ (Δ sl2 Δ eag)=2.7±0.2), stationary (S, OD₆₀₀ (WT)=4.1±0.5 and OD₆₀₀ (Δ sl2 Δ eag)=3.5±0.5), late stationary 1 (TS1, OD₆₀₀ (WT)=6.8±1.7 and OD₆₀₀ (Δ sl2 Δ eag)=7.4±2.1), and late stationary 2 (TS2, OD₆₀₀ (WT)=8.1±1.9, and OD₆₀₀ (Δ sl2 Δ eag)=11.4±3.6) growth phases, using 3 M urea buffer, as previously described (Château et al., 2022). Proteins were quantified using the BCA assay kit (Pierce). SLPs were detected by western blotting with rabbit anti-SL2 (1:10,000) or anti-EA1 (1:10000) antibodies applied for 2 h at RT. Immunoreactive products were revealed after incubation with Horseradish Peroxidase (HRP)-conjugated-anti-rabbit antibodies and ECL staining. Images were analyzed as described above.

Peptide Fractionation, Mass Spectrometry, and Analysis

WT and Δ sl2 Δ eag cells were grown in MODG medium and collected by centrifugation (7,000 g, 5 min, 4°C) at EE, LE, S, TS1, and TS2 growth phases. Non-covalently bound cell surface proteins from a total of 30 samples (three biological replicates×five time-points×two strains) of WT and Δ sl2 Δ eag were subjected to a short electrophoretic migration on NuPAGE 4–12% Bis-Tris gels (Invitrogen), using NuPAGE MES supplemented with NuPAGE antioxidant as running buffer (Hartmann and Armengaud, 2014). Proteins were proteolyzed *in gel* with sequencing-grade trypsin (Roche) according to the ProteaseMAX protocol (Promega). Samples were submitted to Liquid Chromatography with Tandem Mass spectrometry (nanoLC-MS/MS) on a Q-Exactive HF mass spectrometer coupled to an Ultimate 3000 nano LC system (Thermo Fisher Scientific, Illkirch-Graffenstaden, France). NanoLC-MS/MS analysis was performed as follows: peptides were loaded for online desalting on a reverse-phase Acclaim PepMap 100 C18 precolumn (100 Å pore size, 300 µm i.d. × 5 mm), and then resolved for 90 min on a nanoscale Acclaim PepMap 100 C18 column (3-µm bead size, 100-Å pore size, 75 µm id × 500 mm) at a flow rate of 200 nL·min⁻¹. Tryptic MS/MS spectra were searched against the *B. cereus* AH187 NCBI_20200622 database using the MASCOT Daemon search engine with the following parameters: 5 ppm peptide mass tolerance, 0.02 Da MS/MS fragment mass tolerance, 2⁺ or 3⁺ peptide charge, a maximum of two missed cleavages, cysteine carbamidomethylation (+57.0215) as fixed modification, and Met oxidation (+15.5949) as variable modification. Only peptides identified at value of $p \leq 0.05$ in homology threshold mode, and proteins identified by at least two distinct peptides were retained upon parsing with IRMa software v1.3.1, as recommended (Christie-Oleza et al., 2012). The false discovery rate determined from the corresponding decoy database was estimated to be less than 1%. Spectral counts, defined as the number of MS/MS spectra assigned per protein, were determined for all validated proteins as previously described (Cogne et al., 2019). Protein abundance was compared between WT and Δ sl2 Δ eag mutant strains by applying the TFold test (Carvalho et al., 2012). Proteins were considered to be differentially accumulated when fold-change ≥ 1.5 and $p \leq 0.05$. The mass spectrometry proteomics data have been submitted to the ProteomeXchange Consortium *via* the PRIDE partner repository under dataset identifiers PXD033486 and 10.6019/PXD033486 for the surface proteome of WT *B. cereus* AH187, and PXD033494 and 10.6019/PXD033494 for the surface proteome of the Δ sl2 Δ eag mutant.

Transmission Electron Microscopy Analysis

WT and Δ sl2 Δ eag cells grown overnight in MODG medium were collected by centrifugation (7,000 g, 5 min, 4°C), and washed twice with 10 mM Tris-HCl pH 8. Bacteria pellets were then resuspended in 25 mM Tris-HCl containing 10 mM MgCl₂, and vortexed three times for 30 s with glass beads (0.01 mm). Cells were fixed with 0.25% glutaraldehyde. Fixed

cells (20–30 μ l) were deposited on 400 mesh copper grids covered with a formvar membrane (Delta, Mauressac, French microscopies), dried by blotting with filter paper, before applying three drops of the anionic negative staining agent ammonium molybdate (1% (w/v)) for 10–20 s. Cells were observed using a HT7800 Hitachi transmission electron microscope (Hitachi, Tokyo, Japan) at an acceleration of 80 kV. Electron micrographs were recorded using an XR401, sCMOS (AMT, Woburn, MA-US) AMT camera.

Atomic Force Microscopy Analysis

For Atomic force microscopy (AFM) measurements, FluoroDish cell culture dishes (World Precision Instruments, United Kingdom) were coated overnight at 4°C with 0.1% poly-L-lysine (Sigma), washed with PBS, air dried and stored at 4°C. AFM imaging was performed at RT on a NanoWizard IV atomic force microscope (JPK BioAFM, Bruker Nano GmbH, Berlin, Germany) mounted on an inverted microscope (Nikon Ti-U, Nikon Instruments Europe B.V, Amsterdam, Netherlands), and equipped with a standard monochrome CCD camera (ProgRes MFCool, Jenoptik, Jena, Germany). A software module (DirectOverlay, JPK BioAFM, Bruker Nano GmbH, Berlin, Germany) was used to calibrate the tip position with the optical image. Bacteria were detected in bright field with a 100 \times objective (Nikon CFI Apo VC, 1.4 NA, oil immersion). AFM topographic images were obtained using the quantitative imaging (QI) mode. Before each set of acquisitions, the sensitivity and spring constants of the cantilever were calibrated (thermal noise method). Using the JPK SPM-data processing software, images were flattened by fitting to a polynomial/histogram line. Low-pass Gaussian and/or median filtering was subsequently applied to remove minor noise from the images. Particle height, based on the height (measured) channel of the QI mode, was analyzed using the cross-section tool in the analysis software. For height and adhesion measurements, the WT and Δ sl2 Δ eag strains were grown to EE phase [OD_{600} (WT, Δ sl2 Δ eag)=0.4 \pm 0.0] in 10 ml of MODG, then collected and washed three times in PBS by gentle centrifugation (4,500 g, 10 min at 4°C) to maintain an intact surface as far as possible. The pellet was fixed for 2 h in 1 ml of fixation buffer (2.5% glutaraldehyde with 0.1 M cacodylate, pH 7.1) before washing and storing in PBS at 4°C. Sample concentrations were adjusted to OD_{600} = 0.1 before depositing the suspension on the functionalized Petri dishes. Images were recorded with an MLCT bio-D cantilever (mean cantilever spring constant = 0.02 N/m, Bruker). The force applied was maintained at 0.250 pN with a constant approach/retract speed of 20 μ m/s (Z-range of 500 nm), at a resolution of 250 nm \times 250 nm for the adhesion images. For *in vivo* stiffness measurements, triplicate suspensions of WT and Δ sl2 Δ eag strains (5 μ l) collected at S growth phase (OD_{600} (WT)=5.4 \pm 0.1 and OD_{600} (Δ sl2 Δ eag)=5.2 \pm 0.2) were diluted in 10 μ l of MOD and then deposited on the functionalized Petri dishes. After incubation for 25 min at RT, the remaining liquid was blotted with paper, and 1 ml of MOD was added before AFM acquisition. Images were recorded with a BL-AC40TS cantilever (mean cantilever spring constant = 0.1 N/m, Olympus). A constant force of 0.5 nN

was applied, a resolution of 500 nm \times 500 nm was used for mechanical analysis images. The approach part of the curves was fitted using the Hertz model and considering a triangular pyramidal tip (opening angle of 35°).

Cell Length Measurement

Images of WT and Δ sl2 Δ eag cells at EE growth phase were acquired in bright field with a 100 \times objective (Nikon CFI Apo VC, 1.4 NA, oil immersion). Bacillus length was measured using Microbe J software (Ducret et al., 2016). Mean values were calculated from 2,920 cells for WT and 5,491 cells for Δ sl2 Δ eag.

Microbial Adhesion to Solvents

WT and Δ sl2 Δ eag cells were grown on MODG medium and collected at exponential [OD_{600} (WT)=0.41 \pm 0.1 and OD_{600} (Δ sl2 Δ eag)=0.47 \pm 0.0] and stationary [OD_{600} (WT)=4.6 \pm 0.3 and OD_{600} (Δ sl2 Δ eag)=4.3 \pm 0.2] growth phases. The surface affinity of cells for polar and non-polar solvents was determined as described by Park et al. (2019). Briefly, cells were washed twice and then resuspended in 0.15 M NaCl. Optical density (OD_{400} nm) of cell suspensions was adjusted to \sim 1 (H_0). Then, 2.4 ml of bacterial suspension was added to 0.4 ml of xylene (non-polar solvent), chloroform (acidic polar solvent), or ethyl acetate (basic polar solvent). The mixtures were stirred for 1 min at 100 rpm in a Vibramax homogenizer (Dutscher) and allowed to decant for 15 min. The OD_{400} (H_1) of the aqueous phase was then measured. The affinity of cells for the solvents (adhesion percentage) was calculated as follows: Adhesion (%) = (1 - H_1/H_0) \times 100. Data are presented as average values with standard deviations calculated based on three independent experiments.

Self-Aggregation

WT and Δ sl2 Δ eag cell suspensions collected from overnight cultures in MODG medium were adjusted to OD_{600} \sim 1. An aliquot of culture suspension (1 ml) was placed in a spectrophotometer cuvette, and OD_{600} was monitored over 24 h static incubation (Château et al., 2022). Results are expressed as percentage of initial OD_{600} . Experiments were performed in triplicate.

Bacterial Adhesion (BioFilm Ring Test®)

WT and Δ sl2 Δ eag strains were grown in Brain Heart Infusion (BHI) medium at 30°C for 24 h. Cultures were adjusted to 10⁶ CFU/ml before distributing 200 μ l aliquots in 96-well polystyrene plates, as previously described (Château et al., 2022). The adhesion capability of WT and Δ sl2 Δ eag strains was determined by measuring a biofilm index (BFI, Biofilm control, France) after 4, 8, and 24 h incubation at 30°C. The Δ BFI (BFI_{control} - BFI_{sample}) was used to define the strength of bacterial adhesion: Δ BFI = 20, total adhesion; 10 < Δ BFI < 13, strong adhesion; Δ BFI < 6, weak adhesion; Δ BFI = 0, no adhesion (Sulaeman et al., 2010). Four replicates (four wells) were analyzed for each strain.

Statistical Analysis

Experiments were performed with at least three biological replicates. Comparisons of multiple data were based on analysis of variance (ANOVA) followed by *post-hoc* analysis, e.g., two-way ANOVA followed by Bonferroni *post-hoc* analysis for SLP profiling, self-aggregation, and adhesion tests. Changes in length, affinity for solvents, and surface stiffness were evaluated using Student's *t*-test. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism software version 6.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, United States). $p \leq 0.05$ were considered significant.

RESULTS

Phylogenetic Distribution of S-Layer-Forming *Bacillus cereus* Strains

In the *B. anthracis* genome, the *sap* and *eag* genes, which encode the S-layer proteins SAP and EA1, are preceded by (i) the *slaP*, *slaQ*, and *secA2* genes, which support S-layer protein secretion and, (ii) the *csaA* and *csaB* genes, which encode a pyruvyl transferase involved in anchoring the S-layer to the cell surface and its associated carbohydrate transport protein, respectively (Kern et al., 2010; Nguyen-Mau et al., 2012, 2015). All these genes belong to a genetic locus known as the S-layer cluster (Missiakas and Schneewind, 2017; Figure 1A). We searched for orthologs of the *B. anthracis* S-layer cluster in the whole genome sequences of 329 *B. cereus* strains, and identified 191 S-layer cluster-containing strains (Supplementary Table S2). Among these 191 strains, 139 belonged to mesophilic phylogroup III, mainly affiliated with subgroups III-5 (19 *B. cereus* emetic strains) or III-8 (103 *B. anthracis* strains), according to the classification described by Guinebretière et al. (Guinebretière et al., 2008). These data confirm that S-layer-forming strains are not widely

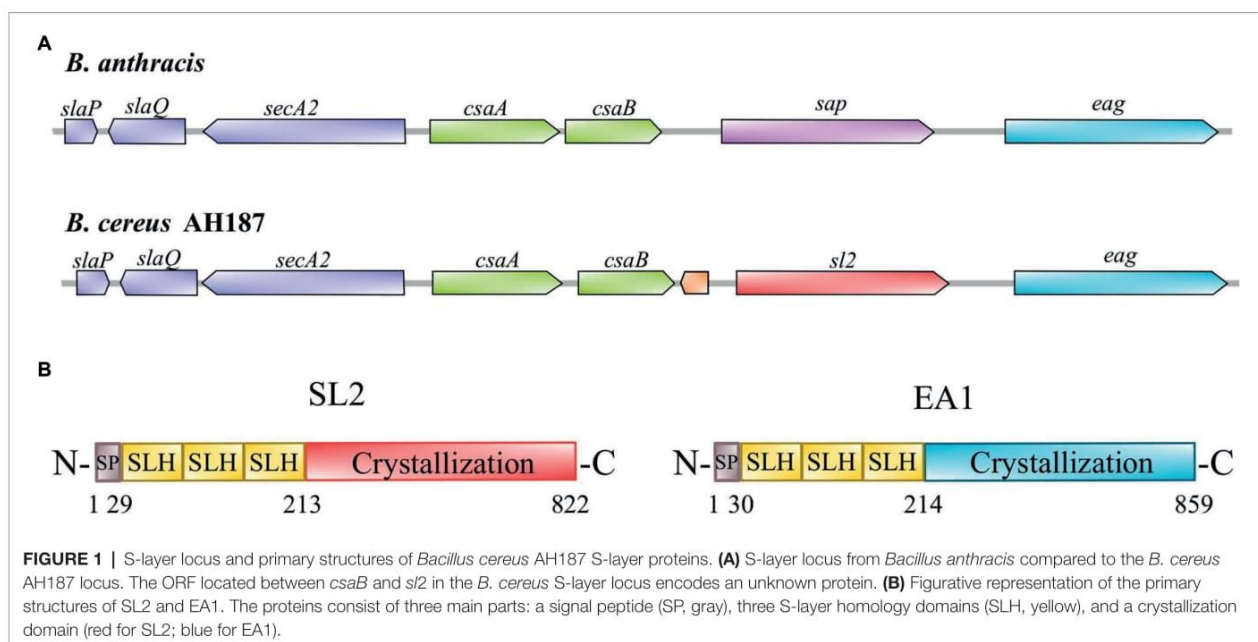
dispersed (Mignot et al., 2001), and that the S-layer is a common feature of mesophilic *B. cereus* strains presenting risks for human health, such as the *B. cereus* AH187 emetic strain.

Molecular Characteristics of *Bacillus cereus* AH187 S-Layer Proteins, SL2 and EA1

The genetic organization of the *B. cereus* AH187 S-layer cluster is illustrated in Figure 1A. BCAH187_A1064 encodes an 822-amino acid protein (B7HXP4) with a calculated molecular mass of 87.5 kDa and pI of 5.71; BCAH187_A1065 encodes an 859-amino acid protein (B7HXP5) with a calculated molecular mass of 91.0 kDa and pI of 6.41. Like their *B. anthracis* orthologs (SAP and EA1), B7HXP4 and B7HXP5 display the typical characteristics of S-layer proteins, i.e., a cleavable N-terminal signal peptide, followed by three tandem repeats of the SLH domain that bind non-covalently to SCWPs, and a C-terminal crystallization domain allowing self-assembly of the S-layer proteins (Figure 1B). The C-terminal crystallization domain of B7HXP4 is different from that of *B. anthracis* SAP, with the two proteins sharing relatively low (33%) sequence similarity (Supplementary Figure S1). In contrast, the C-terminal crystallization domain of B7HXP5 and *B. anthracis* EA1 are similar, with 89% sequence similarity. Based on these characteristics, we renamed B7HXP4 and B7HXP5, SL2 (for S-layer 2 protein) and EA1, respectively, and their genes *sl2* and *eag*.

Morphological Features of WT and $\Delta sl2 \Delta eag$ Mutant Cells

We produced a mutant strain lacking both the *sl2* and *eag* genes by allelic replacement with a spectinomycin resistance cassette. The resulting strain was viable. Western blotting confirmed the absence of SL2 and EA1 in non-covalently attached surface protein extracts from this $\Delta sl2 \Delta eag$ mutant



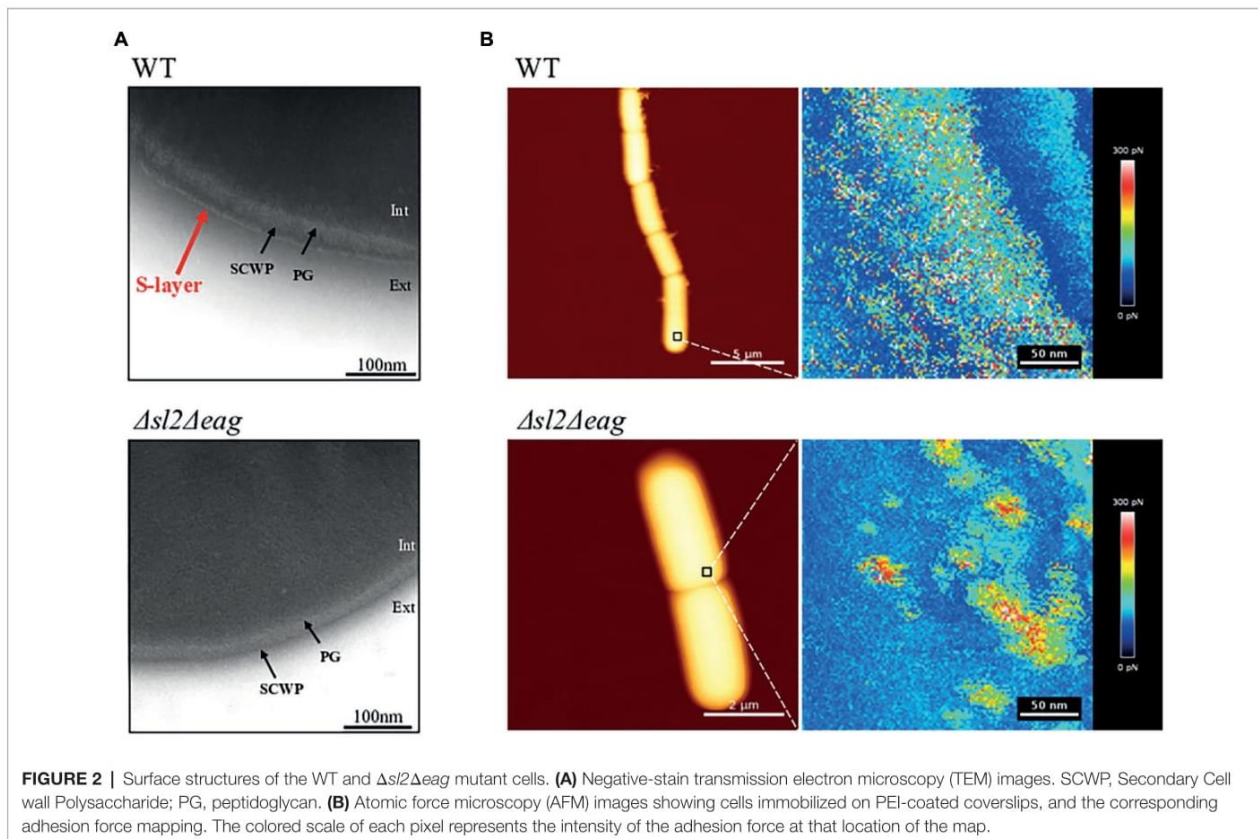
strain (Supplementary Figure S2). Transmission electron microscopy (TEM) images showed that an 8 nm thick S-layer, which surrounds SCWPs on WT cells was undetectable in the $\Delta sl2\Delta eag$ mutant strain (Figure 2A). High-resolution AFM adhesion images confirmed a distinct surface organization in the $\Delta sl2\Delta eag$ mutant compared to WT (Figure 2B). Measurement of bacilli indicated that $\Delta sl2\Delta eag$ cells were significantly shorter than WT cells: $3.085 \pm 0.010 \mu\text{m}$ compared to $3.277 \pm 0.016 \mu\text{m}$, $p < 0.05$ according to *t*-test (Supplementary Figure S3).

Taken together, these data indicate that SL2 and EA1 are required for S-layer assembly in *B. cereus* WT, and that the S-layer contributes to the surface ultrastructure and length of *B. cereus* cells.

Dynamics of the Surface-Layer-Associated Proteome in $\Delta sl2\Delta eag$ Mutant and WT Cells

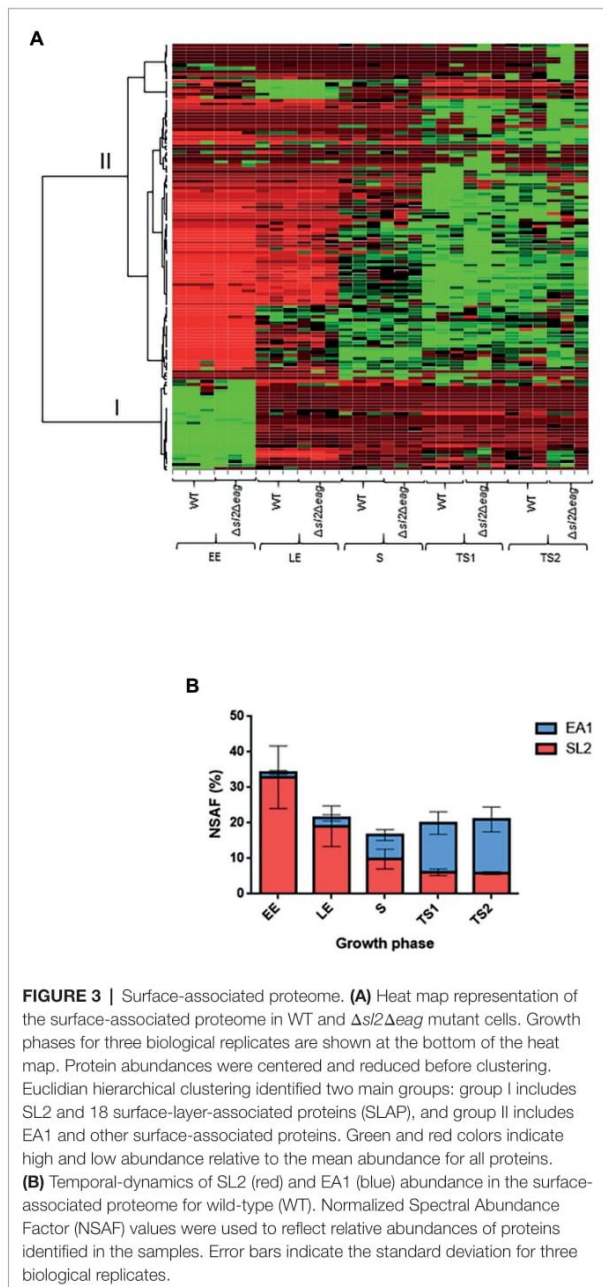
To study the temporal-dynamics of the surface-layer-associated proteome of *B. cereus*, we extracted non-covalently attached surface proteins from cells harvested at five time-points: EE, LE, S, TS1, and TS2 growth phases (Supplementary Figure S4). The proteomics dataset was acquired from biological triplicates for each time-point for WT and $\Delta sl2\Delta eag$ mutant strains.

A total of 858,556 MS/MS spectra were recorded, allowing confident identification of 1,616 proteins, based on the detection of at least two different peptides. Proteins were quantified in each sample (Supplementary Table S3). Principal component analysis (PCA) revealed good homogeneity of the proteomes of the replicates for the two strains at each time-point, and distinguished early and late exponentially growing cells from stationary cells (Supplementary Figure S5). Out of the 1,616 proteins identified, 132 were predicted to be surface-associated due to the presence of a type-I SPase-mediated N-terminal cleavage site, and/or surface anchoring domains (Supplementary Table S4). These 132 proteins, which compose the surfaceome in our conditions, included SL2 and EA1, 21 SLAPs, along with transporters, lipoproteins, proteases, and virulence factors (Supplementary Table S4). Only SL2 and EA1 were undetected in the $\Delta sl2\Delta eag$ mutant strain, and 13 proteins were considered differentially accumulated in extracts from the $\Delta sl2\Delta eag$ mutant compared to WT (value of $p \leq 0.05$ and $|\log_2 \text{fold-change}| \geq 0.56$; Supplementary Table S4). Except for one uncharacterized protein (B7HXE6), the abundance changes for these 13 proteins was growth phase-dependent. In particular, three SLAPs were detected at increased abundance in the $\Delta sl2\Delta eag$ mutant compared to WT at TS2 (Supplementary Table S4). Finally, lack of SL2 and EA1 did not perturb the overall *B. cereus* surfaceome profile (Figure 3A). Figure 3B shows that, in WT cells, EA1 is present



at low levels at the onset of growth compared to SL2 (1.5% vs. 32% in surfaceome), and reached its maximum during the late stationary growth phase (15%) when it was 2-fold more abundant than SL2. Western blot analysis confirmed the temporal-dynamics of SL2 and EA1 expression (Supplementary Figure S6).

Based on these results, we conclude that SL2 is the main component of the *B. cereus* S-layer in growing cells, whereas EA1 is the main component of the S-layer in growth-arrested cells, and that SL2 and EA1 synthesis is growth-phase-dependent.

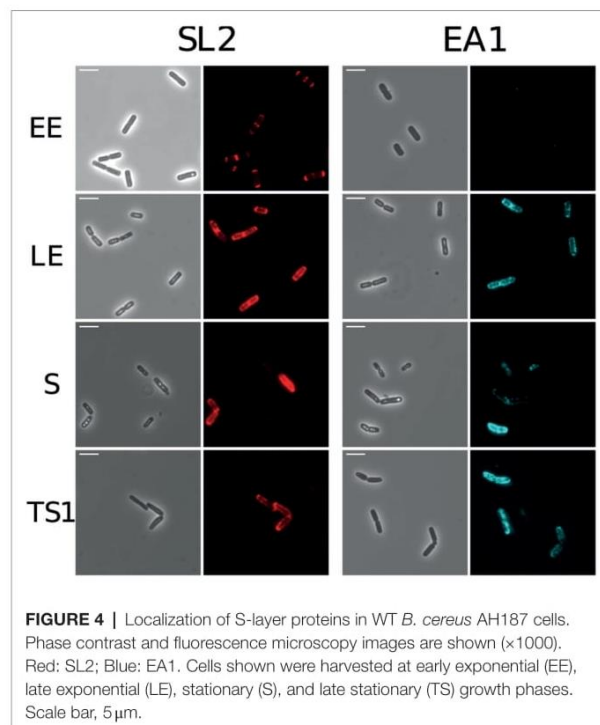


Surface Distribution of EA1 and SL2 in *Bacillus cereus* AH187

Immunofluorescence microscopy was used to localize EA1 and SL2 on the bacterial cell surface. Figure 4 shows that SL2 accumulates at the cell poles in EE cells, and is more widely distributed over the cell surface at later growth stages. EA1 was undetectable at the EE growth phase, in line with its low abundance at this stage of growth. During the LE and S/TS growth phases, the fluorescence signal associated with EA1 revealed patches randomly distributed over the bacterial surface. Based on these results, we can state that SL2 and EA1 display distinct dynamic localization patterns in aerobically growing cells.

Surface Properties of WT and S-Layer-Deficient $\Delta sl2\Delta eag$ Vegetative Cells

To assess how the S-layer influences *B. cereus* cell surface properties, we first compared the electron-acceptor/electron-donor (Lewis acid-base) characteristics of WT and $\Delta sl2\Delta eag$ mutant cells (Park et al., 2019). Figure 5 shows that exponentially growing $\Delta sl2\Delta eag$ cells displayed a high affinity for both the basic (ethyl acetate) and acidic (chloroform) polar solvents, whereas WT cells displayed maximal affinity for the basic polar solvent (Figure 5A). No difference in affinity for polar and non-polar solvents was observed for stationary $\Delta sl2\Delta eag$ cells, whereas WT cells displayed maximal affinity for non-polar xylene (Figure 5B). Taken together, these data indicate that the S-layer reinforces the acidic character of bacterial cells



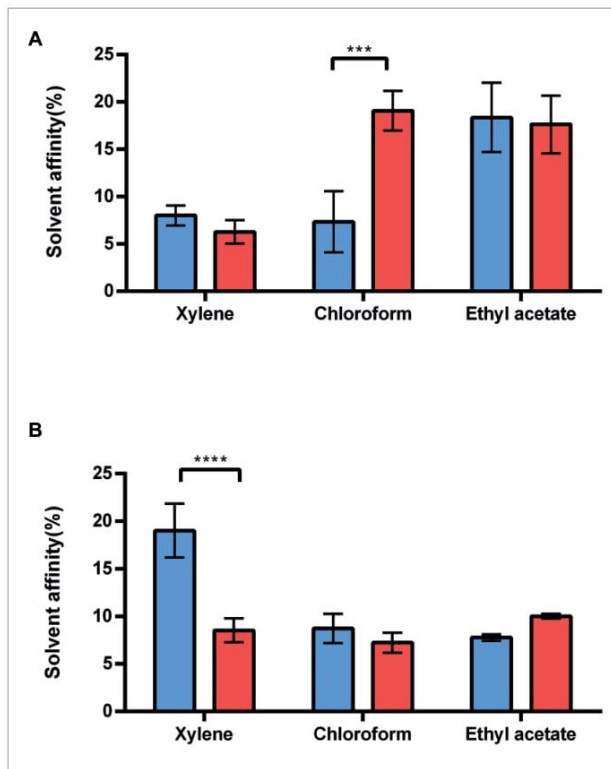


FIGURE 5 | Adhesion of WT and $\Delta sl2\Delta eag$ strains to solvents. **(A)** Adhesion of exponential growing WT cells (blue), and $\Delta sl2\Delta eag$ cells (red) to polar (chloroform and ethyl acetate) and non-polar (xylene) solvents. **(B)** Adhesion of stationary WT cells (blue), and $\Delta sl2\Delta eag$ cells (red) to polar (chloroform and ethyl acetate) and non-polar (xylene) solvents. Values correspond to mean \pm SD for three biological replicates. A *t*-test was used to assess the significance of differences between the strains. ****p* < 0.001; *****p* < 0.0001.

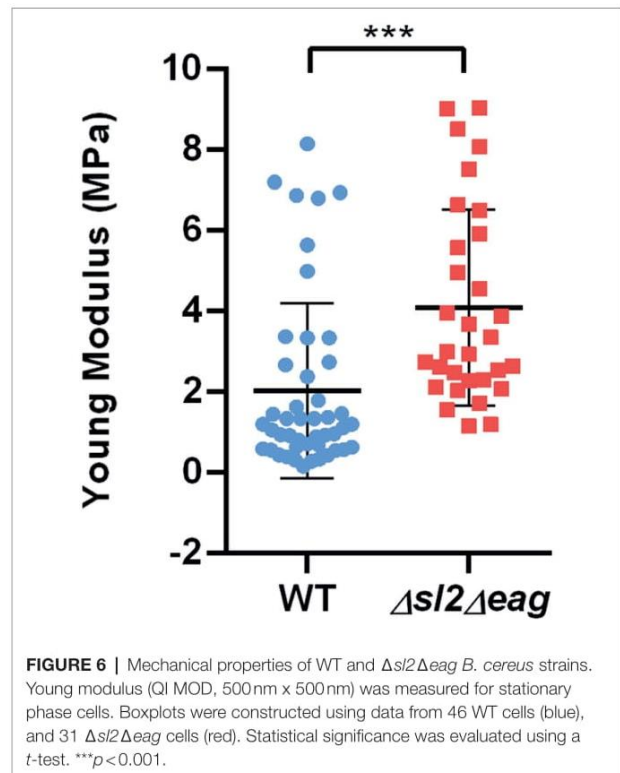


FIGURE 6 | Mechanical properties of WT and $\Delta sl2\Delta eag$ *B. cereus* strains. Young modulus (QI MOD, 500 nm x 500 nm) was measured for stationary phase cells. Boxplots were constructed using data from 46 WT cells (blue), and 31 $\Delta sl2\Delta eag$ cells (red). Statistical significance was evaluated using a *t*-test. ****p* < 0.001.

during the exponential growth phase, and makes the cell surface less hydrophilic during the stationary phase.

We then compared the stiffness of living stationary WT and $\Delta sl2\Delta eag$ mutant cells using AFM (Sára and Sleytr, 1987; Liu et al., 2012). Stiffness is commonly evaluated based on the Young's modulus value (Zheng et al., 2021). Our results showed that the Young's modulus for stationary $\Delta sl2\Delta eag$ cells was 2-fold higher than the Young's modulus for WT cells (Figure 6), indicating that $\Delta sl2\Delta eag$ mutant cells are stiffer than WT cells at stationary growth phase. From these experiments, we concluded that the S-layer decreases the stiffness of stationary *B. cereus* cells and contributes to the mechanical properties of the *B. cereus* surface.

Self-Aggregation and Adhesion Capacities of WT and S-Layer-Deficient $\Delta sl2\Delta eag$ Cells

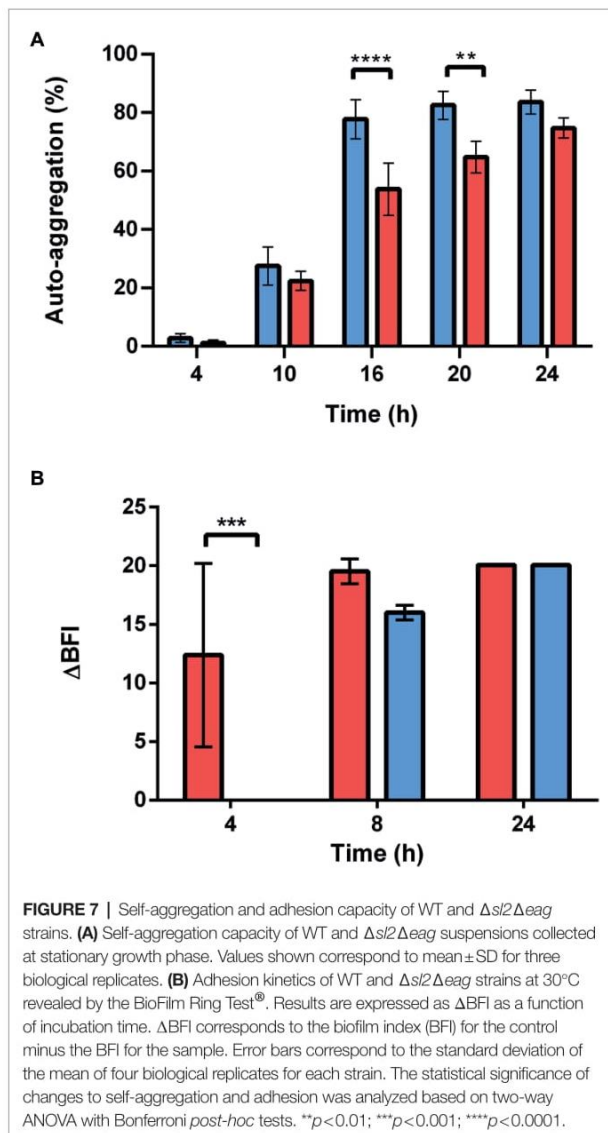
We evaluated the self-aggregation abilities of stationary WT and $\Delta sl2\Delta eag$ cells based on their sedimentation characteristics. The stationary $\Delta sl2\Delta eag$ cells self-aggregated more slowly than the WT cells (Figure 7A). The ability of WT and $\Delta sl2\Delta eag$ cells to form a biomass on a solid surface was determined

using the BioFilm Ring Test® (Sulaeman et al., 2010; Château et al., 2022). The results showed that both WT and $\Delta sl2\Delta eag$ cells formed biofilm on microplates after 24 h of incubation (Figure 7B). However, $\Delta sl2\Delta eag$ cells adhered more slowly than WT cells, in line with their diminished capacity to self-aggregate.

DISCUSSION

Bacteria are in constant interaction with their environment. In vegetative bacteria, the cell surface is a crucial structure that mediates these interactions. The bacterial S-layer, which is in direct contact with environment, plays a key role in the survival and persistence of bacteria (Aravindh et al., 2015; Gerbino et al., 2015). The aim of this study was to characterize the S-layer present on *B. cereus* AH187 cells. The results presented showed that the S-layer contributes to the adhesive properties of stationary *B. cereus* AH187 cells, by modulating their cell surface characteristics. The S-layer could thus enhance survival of *B. cereus* AH187 under stress conditions (Kjelleberg et al., 1982).

The S-layer of *B. cereus* AH187 is composed of two SLPs—SL2 and EA1—which are neither glycosylated nor phosphorylated (data not shown). Based on structural and genomic data, SL2 and EA1 are probably secreted at the cell surface, and anchored in the cell wall as reported for SAP and EA1 expressed by *B. anthracis* (Missiakas and Schneewind, 2017). Proteomics and microscopy analyses showed that SL2 is secreted from the



early stages of growth, whereas secretion of EA1 starts later, peaking during the late stationary phase. Thus, the major protein component of the S-layer changes from SL2 during the growing phase to EA1 during the late stationary growth phase. We previously reported that synthesis of EA1 and SL2 were under the control of the master regulator of stationary phase development Spo0A (Rousset et al., 2020). However, full synthesis of SL2 could also depend on the catabolite control protein A (CcpA), which governs the overall response to carbon availability (Dupont et al., 2020). Other general nutritional regulators, such as CodY, could repress the expression of S-layer genes, as described for *sap* and *eag* in *B. anthracis* (Château et al., 2013). Thus, S-layer composition probably relies on general regulatory circuits, allowing *B. cereus* to modulate the composition of its S-layer in response to nutrient conditions and developmental transitions.

The accumulation of SL2 at the cell poles, when its secretion is maximal (EE growth phase), suggests that SL2 is preferentially secreted in this region of the envelope, and thus that development of the S-layer could be coordinated at the cell poles (Janakiraman and Goldberg, 2004). No accumulation of EA1 was observed at the cell poles, rather it formed patches distributed over the cell surface, as reported for its ortholog in *B. anthracis* (Couture-Tosi et al., 2002). Due to their sequential secretion, EA1 could thus anchor to the cell wall at sites that are not already occupied by SL2.

Lack of SL2 and EA1 did not change the surface-associated proteome of *B. cereus* AH187, in particular it had no effect on the growth-phase-dependent profile of SLAPs. This result suggests that SLPs do not regulate SLAP secretion, which—like SL2 secretion—reached its maximum at the beginning of growth. Based on this accumulation profile, these proteins may share a growth-phase-dependent regulatory mechanism controlling their secretion at the cell surface.

Whereas lack of SL2 and EA1, and thus loss of the S-layer, did not affect the overall surface architecture of *B. cereus* AH187, it did slightly decrease the cell length. This morphological difference was not the result of differing growth rates between WT and $\Delta sl2\Delta eag$ mutant strains (Supplementary Figure S4), and thus indicates that the S-layer elongates *B. cereus* cells.

An important result from this study is that the growth-phase-dependent change to S-layer protein composition is associated with changes in the physicochemical surface properties of *B. cereus* cells. Thus, the SL2-enriched S-layer enhances the acidic character (Bellon-Fontaine, 1996) of dividing *B. cereus* cells, and the EA1-enriched S-layer decreases the hydrophilic character of stationary bacterial cells (Kotiranta et al., 1998). These data suggest that, (i) by covering dividing cells, SL2 masks the negatively charged functional groups of surface components, which include proteins, lipids, and polysaccharides, and (ii) anchoring of EA1 in the cell wall decreases the hydrophilicity of the S-layer. Thus, EA1 patches could form hydrophobic sites in the S-layer. Another possibility is that anchoring of EA1 in the cell wall induces conformational changes making the surface more hydrophobic (Xi et al., 2017). In line with this putative conformational change, we found that the S-layer decreased the surface stiffness of stationary *B. cereus* cells. This result contradicts reports for Lactobacilli (Schaer-Zammaretti and Ubbink, 2003), where the cell surfaces of S-layer-forming strains were stiffer than the surfaces of non-S-layer-forming strains. It is possible that this difference may be linked to experimental parameters, as the AFM procedure used to characterize stiffness by Schaer-Zammaretti and Ubbink differed from the procedure used here. However, it is also important to note that the S-layer composition and cell surface topography of *Lactobacilli* are quite distinct from those of *Bacilli* (Pum et al., 2013).

We showed that presence of the S-layer increased the capacity of growth-arrested *B. cereus* cells to adhere to an abiotic surface. Adhesion is governed by a number of physical, chemical, and biological parameters, including hydrophobicity, stiffness, and capacity to self-aggregate (Dufrière, 2002; Trunk et al., 2018; Tamayo et al., 2020; Zheng et al., 2021). Here, we found that adhesion of stationary *B. cereus* cells to an abiotic surface

correlated negatively with stiffness, and positively with hydrophobicity and self-aggregation capacity, all of which are mediated by the S-layer.

In conclusion, although the S-layer is not essential for *B. cereus* growth, it could contribute to stationary phase survival by enhancing the adhesive properties of growth-arrested cells. Indeed, the ability of bacterial cells to adhere to surfaces is a crucial trait for the survival of any microorganism under conditions of stress or starvation (Jaishankar and Srivastava, 2017). The benefits provided by the S-layer in these conditions are linked to the dynamics of the SLP profile, and mainly to the EA1-enrichment of the S-layer, suggesting that EA1 is a component of the bacterial stress response promoting survival in a quiescent vegetative state as an alternative to sporulation. The presence of an S-layer cluster in all emetic *B. cereus* strains, and in *B. cereus* strains classified within phylogenetic groups II, III, VI, and VII, that display some common resistance capacity toward temperature, salt, and pH (Guinebretière et al., 2008), suggests an adaptive function for the S-layer in these strains, enhancing survival in stressful environmental conditions.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The datasets presented in this study can be found in online repositories. The names of the repository/repositories and accession number(s) can be found in the article/**Supplementary Material**.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

AC and CD: conceptualization. CB, AC, SL, and BA-B: methodology. CB, SL, BA-B, JA, AC, and CD: validation and

writing—review and editing. CB, SL, BA-B, AC, and CD: formal analysis. CB and CD: writing—original draft preparation. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

FUNDING

This work was supported by the Platform 3A microscopy facilities, funded by the European Regional Development Fund, the French Ministry for Research, Higher Education and Innovation, the Provence-Alpes-Côte d'Azur region, the Departmental Council of Vaucluse, and the Urban Community of Avignon. The bio-AFM was funded by the REDSAIM program (Montpellier Université). CB's PhD work was supported by a fellowship from the French Ministry for Research and Higher Education (Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur). This work was partly supported by a grant from Avignon University.

ACKNOWLEDGMENTS

We would particularly like to thank Isabelle Bornard for carrying out TEM experiments. We also thank Claire Dargaingaratz for her efficient technical help and Dominique Missiakas for the generous gift of anti-EA1 antibodies.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2022.937862/full#supplementary-material>

REFERENCES

- Agata, N., Ohta, M., Mori, M., and Isobe, M. (1995). A novel dodecapeptide, cereulide, is an emetic toxin of *Bacillus cereus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 129, 17–19. doi: 10.1111/j.1574-6968.1995.tb07550.x
- Agata, N., Ohta, M., and Yokoyama, K. (2002). Production of *Bacillus cereus* emetic toxin (cereulide) in various foods. *Int. J. Food Microbiol.* 73, 23–27. doi: 10.1016/S0168-1605(01)00692-4
- Anderson, V. J., Kern, J. W., McCool, J. W., Schneewind, O., and Missiakas, D. (2011). The SLH-domain protein BslO is a determinant of *Bacillus anthracis* chain length. *Mol. Microbiol.* 81, 192–205. doi: 10.1111/j.1365-2958.2011.07688.x
- Aravindh, S., Selvakumar, R., Ravichandran, J., Mudali, U. K., Anandbabu, C., and Raj, B. (2015). Extremophilic *Bacillus cereus* MVK04 isolated from thorium ore sample possesses self-assembled surface layer protein on cell wall to resist extreme environments. *Geomicrobiol. J.* 32, 445–452. doi: 10.1080/01490451.2014.957425
- Arnaud, M., Chastanet, A., and Debarbouille, M. (2004). New vector for efficient allelic replacement in naturally nontransformable, low-GC-content, gram-positive bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 6887–6891. doi: 10.1128/AEM.70.11.6887-6891.2004
- Auger, S., Ramarao, N., Faille, C., Fouet, A., Aymerich, S., and Gohar, M. (2009). Biofilm formation and cell surface properties among pathogenic and nonpathogenic strains of the *Bacillus cereus* group. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 6616–6618. doi: 10.1128/AEM.00155-09
- Åvall-Jääskeläinen, S., and Palva, A. (2005). *Lactobacillus* surface layers and their applications. *FEMS Microbiol. Rev.* 29, 511–529. doi: 10.1016/j.fmr.2005.04.003
- Bellon-Fontaine, N. M., Rault, J., and van Oss, C. J. (1996). Microbial adhesion to solvents: a novel method to determine the electron-donor/electron-acceptor or Lewis acid-base properties of microbial cells. *Colloids Surf. B.* 7, 47–53. doi: 10.1016/0927-7765(96)01272-6
- Bharat, T. A. M., von Kügelgen, A., and Alva, V. (2021). Molecular logic of prokaryotic surface layer structures. *Trends Microbiol.* 29, 405–415. doi: 10.1016/j.tim.2020.09.009
- Carroll, L. M., Wiedmann, M., Mukherjee, M., Nicholas, D. C., Mingle, L. A., Dumas, N. B., et al. (2019). Characterization of emetic and diarrheal *Bacillus cereus* strains from a 2016 foodborne outbreak using whole-genome sequencing: addressing the microbiological, epidemiological, and bioinformatic challenges. *Front. Microbiol.* 10:144. doi: 10.3389/fmicb.2019.00144
- Carvalho, P. C., Yates, J. R. III, and Barbosa, V. C. (2012). Improving the TFold test for differential shotgun proteomics. *Bioinformatics* 28, 1652–1654. doi: 10.1093/bioinformatics/bts247
- Château, A., Alpha-Bazin, B., Armengaud, J., and Dupont, C. (2022). Heme A synthase deficiency affects the ability of *Bacillus cereus* to adapt to a nutrient-limited environment. *Int. J. Mol. Sci.* 23:1033. doi: 10.3390/ijms23031033
- Château, A., Van der Verren, S. E., Remaut, H., and Fioravanti, A. (2020). The *Bacillus anthracis* cell envelope: composition, physiological role, and clinical relevance. *Microorganisms* 8:1864. doi: 10.3390/microorganisms8121864

- Château, A., van Schaik, W., Joseph, P., Handke, L. D., McBride, S. M., Smeets, F. M. H., et al. (2013). Identification of CodY targets in *Bacillus anthracis* by genome-wide *in vitro* binding analysis. *J. Bacteriol.* 195, 1204–1213. doi: 10.1128/JB.02041-12
- Christie-Oleza, J. A., Fernandez, B., Nogales, B., Bosch, R., and Armengaud, J. (2012). Proteomic insights into the lifestyle of an environmentally relevant marine bacterium. *ISME J.* 6, 124–135. doi: 10.1038/ismej.2011.86
- Cogne, Y., Almunia, C., Gouveia, D., Pible, O., François, A., Degli-Esposti, D., et al. (2019). Comparative proteomics in the wild: accounting for intrapopulation variability improves describing proteome response in a *Gammarus pulex* field population exposed to cadmium. *Aquat. Toxicol.* 214:105244. doi: 10.1016/j.aquatox.2019.105244
- Couture-Tosi, E., Delacroix, H., Mignot, T., Mesnage, S., Chami, M., Fouet, A., et al. (2002). Structural analysis and evidence for dynamic emergence of *Bacillus anthracis* S-layer networks. *J. Bacteriol.* 184, 6448–6456. doi: 10.1128/JB.184.23.6448-6456.2002
- Ducrot, A., Quardokus, E. M., and Brun, Y. V. (2016). MicrobeJ, a tool for high throughput bacterial cell detection and quantitative analysis. *Nat. Microbiol.* 1:16077. doi: 10.1038/nmicrobiol.2016.77
- Dufrène, Y. F. (2002). Atomic force microscopy, a powerful tool in microbiology. *J. Bacteriol.* 184, 5205–5213. doi: 10.1128/JB.184.19.5205-5213.2002
- Duport, C., Rousset, L., Alpha-Bazin, B., and Armengaud, J. (2020). *Bacillus cereus* decreases NHE and CLO exotoxin synthesis to maintain appropriate proteome dynamics during growth at low temperature. *Toxins* 12:645. doi: 10.3390/toxins12100645
- Ehling-Schulz, M., Svensson, B., Guinebretiere, M.-H., Lindbäck, T., Andersson, M., Schulz, A., et al. (2005). Emetic toxin formation of *Bacillus cereus* is restricted to a single evolutionary lineage of closely related strains. *Microbiology* 151, 183–197. doi: 10.1099/mic.0.27607-0
- Fagan, R. P., and Fairweather, N. F. (2014). Biogenesis and functions of bacterial S-layers. *Nat. Rev. Microbiol.* 12, 211–222. doi: 10.1038/nrmicro3213
- Fioravanti, A., Van Hauwermeiren, F., Van der Verren, S. E., Jonckheere, W., Goncalves, A., Pardon, E., et al. (2019). Structure of S-layer protein Sap reveals a mechanism for therapeutic intervention in anthrax. *Nat. Microbiol.* 4, 1805–1814. doi: 10.1038/s41564-019-0499-1
- Gerbino, E., Carasi, P., Mobili, P., Serradell, M. A., and Gómez-Zavaglia, A. (2015). Role of S-layer proteins in bacteria. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 31, 1877–1887. doi: 10.1007/s11274-015-1952-9
- Guérout-Fleury, A. M., Shazand, K., Frandsen, N., and Stragier, P. (1995). Antibiotic-resistance cassettes for *Bacillus subtilis*. *Gene* 167, 335–336. doi: 10.1016/0378-1119(95)00652-4
- 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. *Environ. Microbiol.* 10, 851–865. doi: 10.1111/j.1462-2920.2007.01495.x
- Hartmann, E. M., and Armengaud, J. (2014). Shotgun proteomics suggests involvement of additional enzymes in dioxin degradation by *Sphingomonas wittichii* RW1. *Environ. Microbiol.* 16, 162–176. doi: 10.1111/1462-2920.12264
- Jaishankar, J., and Srivastava, P. (2017). Molecular basis of stationary phase survival and applications. *Front. Microbiol.* 8:2000. doi: 10.3389/fmicb.2017.02000
- Janakiraman, A., and Goldberg, M. B. (2004). Recent advances on the development of bacterial poles. *Trends Microbiol.* 12, 518–525. doi: 10.1016/j.tim.2004.09.003
- Kern, V. J., Kern, J. W., Theriot, J. A., Schneewind, O., and Missiakas, D. (2012). Surface-layer (S-layer) proteins sap and EA1 govern the binding of the S-layer-associated protein BslO at the cell septa of *Bacillus anthracis*. *J. Bacteriol.* 194, 3833–3840. doi: 10.1128/JB.00402-12
- Kern, J., Ryan, C., Faull, K., and Schneewind, O. (2010). *Bacillus anthracis* surface-layer proteins assemble by binding to the secondary cell wall polysaccharide in a manner that requires csaB and tagO. *J. Mol. Biol.* 401, 757–775. doi: 10.1016/j.jmb.2010.06.059
- Kern, J. W., and Schneewind, O. (2008). BslA, a pXO1-encoded adhesin of *Bacillus anthracis*. *Mol. Microbiol.* 68, 504–515. doi: 10.1111/j.1365-2958.2008.06169.x
- Kern, J., Wilton, R., Zhang, R., Binkowski, T. A., Joachimiak, A., and Schneewind, O. (2011). Structure of surface layer homology (SLH) domains from *Bacillus anthracis* surface array protein. *J. Biol. Chem.* 286, 26042–26049. doi: 10.1074/jbc.M111.248070
- Kjelleberg, S., Humphrey, B. A., and Marshall, K. C. (1982). Effect of interfaces on small, starved marine bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 43, 1166–1172. doi: 10.1128/aem.43.5.1166-1172.1982
- Kotiranta, A., Haapasalo, M., Kari, K., Kerosuo, E., Olsen, I., Sorsa, T., et al. (1998). Surface structure, hydrophobicity, phagocytosis, and adherence to matrix proteins of *Bacillus cereus* cells with and without the crystalline surface protein layer. *Infect. Immun.* 66, 4895–4902. doi: 10.1128/IAI.66.10.4895-4902.1998
- Liu, B. Y., Zhang, G. M., Li, X. L., and Chen, H. (2012). Effect of glutaraldehyde fixation on bacterial cells observed by atomic force microscopy. *Scanning* 34, 6–11. doi: 10.1002/sca.20269
- Mesnage, S., Fontaine, T., Mignot, T., Delepierre, M., Mock, M., and Fouet, A. (2000). Bacterial SLH domain proteins are non-covalently anchored to the cell surface via a conserved mechanism involving wall polysaccharide pyruvylation. *EMBO J.* 19, 4473–4484. doi: 10.1093/emboj/19.17.4473
- Mesnage, S., Tosi-Couture, E., Mock, M., Gounon, P., and Fouet, A. (1997). Molecular characterization of the *Bacillus anthracis* main S-layer component: evidence that it is the major cell-associated antigen. *Mol. Microbiol.* 23, 1147–1155. doi: 10.1046/j.1365-2958.1997.2941659.x
- Mignot, T., Denis, B., Couture-Tosi, E., Kolstø, A.-B., Mock, M., and Fouet, A. (2001). Distribution of S-layers on the surface of *Bacillus cereus* strains: phylogenetic origin and ecological pressure. *Environ. Microbiol.* 3, 493–501. doi: 10.1046/j.1462-2920.2001.00220.x
- Missiakas, D., and Schneewind, O. (2017). Assembly and function of the *Bacillus anthracis* S-layer. *Annu. Rev. Microbiol.* 71, 79–98. doi: 10.1146/annurev-micro-090816-093512
- Mursalin, M. H., Coburn, P. S., Livingston, E., Miller, F. C., Astley, R., Fouet, A., et al. (2019). S-layer impacts the virulence of *Bacillus* in endophthalmitis. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 60, 3727–3739. doi: 10.1167/iovs.19-27453
- Mursalin, M. H., Livingston, E. T., and Callegan, M. C. (2020). The cereus matter of *Bacillus* endophthalmitis. *Exp. Eye Res.* 193:107959. doi: 10.1016/j.exer.2020.107959
- Nguyen-Mau, S.-M., Oh, S.-Y., Kern, V. J., Missiakas, D. M., and Schneewind, O. (2012). Secretion genes as determinants of *Bacillus anthracis* chain length. *J. Bacteriol.* 194, 3841–3850. doi: 10.1128/JB.00384-12
- Nguyen-Mau, S.-M., Oh, S.-Y., Schneewind, D. I., Missiakas, D., and Schneewind, O. (2015). *Bacillus anthracis* SlaQ promotes S-layer protein assembly. *J. Bacteriol.* 197, 3216–3227. doi: 10.1128/JB.00492-15
- Park, E., Hussain, M. S., Wei, S., Kwon, M., and Oh, D.-H. (2019). Genotypic and phenotypic characteristics of biofilm formation of emetic toxin producing *Bacillus cereus* strains. *Food Control* 96, 527–534. doi: 10.1016/j.foodcont.2018.10.008
- Pum, D., Breitwieser, A., and Sleytr, U. B. (2021). Patterns in nature—S-layer lattices of bacterial and archaeal cells. *Crystals* 11:869. doi: 10.3390/cryst11080869
- Pum, D., Toca-Herrera, J. L., and Sleytr, U. B. (2013). S-layer protein self-assembly. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 2484–2501. doi: 10.3390/ijms14022484
- Ravi, J., and Fioravanti, A. (2021). S-layers: the proteinaceous multifunctional armors of gram-positive pathogens. *Front. Microbiol.* 12:663468. doi: 10.3389/fmicb.2021.663468
- Rosenfeld, E., Dupont, C., Zigha, A., and Schmitt, P. (2005). Characterization of aerobic and anaerobic vegetative growth of the food-borne pathogen *Bacillus cereus* F4430/73 strain. *Can. J. Microbiol.* 51, 149–158. doi: 10.1139/w04-132
- Rousset, L., Alpha-Bazin, B., Château, A., Armengaud, J., Clavel, T., Berge, O., et al. (2020). Groundwater promotes emergence of asporogenic mutants of emetic *Bacillus cereus*. *Environ. Microbiol.* 22, 5248–5264. doi: 10.1111/1462-2920.15203
- Sanchez, B., Arias, S., Chaignepain, S., Denayrolles, M., Schmitter, J. M., Bressollier, P., et al. (2009). Identification of surface proteins involved in the adhesion of a probiotic *Bacillus cereus* strain to mucin and fibronectin. *Microbiology* 155, 1708–1716. doi: 10.1099/mic.0.025288-0
- Sára, M., and Sleytr, U. B. (1987). Charge distribution on the S layer of *Bacillus steareothermophilus* NRS 1536/3c and importance of charged groups for morphogenesis and function. *J. Bacteriol.* 169, 2804–2809. doi: 10.1128/jb.169.6.2804-2809.1987
- Sára, M., and Sleytr, U. B. (2000). S-layer proteins. *J. Bacteriol.* 182, 859–868. doi: 10.1128/JB.182.4.859-868.2000
- Schaer-Zammaretti, P., and Ubink, J. (2003). Imaging of lactic acid bacteria with AFM—elasticity and adhesion maps and their relationship to biological and structural data. *Ultramicroscopy* 97, 199–208. doi: 10.1016/S0304-3991(03)00044-5

- Sleytr, U. B., and Beveridge, T. J. (1999). Bacterial S-layers. *Trends Microbiol.* 7, 253–260. doi: 10.1016/S0966-842X(99)01513-9
- Sleytr, U. B., Messner, P., Pum, D., and Sára, M. (1999). Crystalline bacterial cell surface layers (S layers): from supramolecular cell structure to biomimetics and nanotechnology. *Angew. Chem. Int. Ed.* 38, 1034–1054. doi: 10.1002/(SICI)1521-3773(19990419)38:8<1034::AID-ANIE1034>3.0.CO;2-#
- Sleytr, U. B., Schuster, B., Egelseer, E.-M., and Pum, D. (2014). S-layers: principles and applications. *FEMS Microbiol. Rev.* 38, 823–864. doi: 10.1111/1574-6976.12063
- Sulaeman, S., Le Bihan, G., Rossero, A., Federighi, M., Dé, E., and Tresse, O. (2010). Comparison between the biofilm initiation of *campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* strains to an inert surface using BioFilm Ring Test®. *J. Appl. Microbiol.* 108, 1303–1312. doi: 10.1111/j.1365-2672.2009.04534.x
- Tamayo, L., Melo, F., Caballero, L., Hamm, E., Díaz, M., Leal, M. S., et al. (2020). Does bacterial elasticity affect adhesion to polymer fibers? *ACS Appl. Mater. Interfaces* 12, 14507–14517. doi: 10.1021/acsami.9b21060
- Trunk, T., Khalil, H. S., and Leo, J. C. (2018). Bacterial autoaggregation. *AIMS Microbiol.* 4, 140–164. doi: 10.3934/microbiol.2018.1.140
- Turnbull, P. C., Kramer, J. M., Jørgensen, K., Gilbert, R. J., and Melling, J. (1979). Properties and production characteristics of vomiting, diarrheal, and necrotizing toxins of *Bacillus cereus*. *Am. J. Clin. Nutr.* 32, 219–228. doi: 10.1093/ajcn/32.1.219
- Wang, Y.-T., Missiakas, D., and Schneewind, O. (2014). GneZ, a UDP-GlcNAc 2-epimerase, is required for S-layer assembly and vegetative growth of *Bacillus anthracis*. *J. Bacteriol.* 196, 2969–2978. doi: 10.1128/JB.01829-14
- Xi, E., Venkateshwaran, V., Li, L., Rego, N., Patel, A. J., and Garde, S. (2017). Hydrophobicity of proteins and nanostructured solutes is governed by topographical and chemical context. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 114, 13345–13350. doi: 10.1073/pnas.1700092114
- Zheng, S., Bawazir, M., Dhall, A., Kim, H.-E., He, L., Heo, J., et al. (2021). Implication of surface properties, bacterial motility, and hydrodynamic conditions on bacterial surface sensing and their initial adhesion. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 9:643722. doi: 10.3389/fbioe.2021.643722
- Zhu, C., Guo, G., Ma, Q., Zhang, F., Ma, F., Liu, J., et al. (2017). Diversity in S-layers. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 123, 1–15. doi: 10.1016/j.pbiomolbio.2016.08.002

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

Publisher's Note: All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2022 Boutonnet, Lyonais, Alpha-Bazin, Armengaud, Château and Duport. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

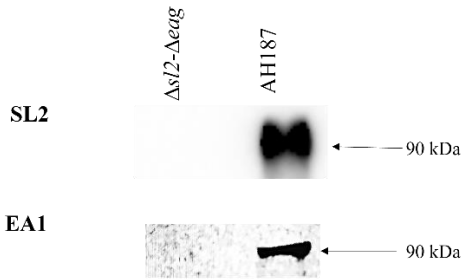


Figure S2. Western blot analysis of non-covalently attached surface protein extracts prepared from WT and mutant $\Delta sl2\Delta eag$ cells. SL2 and EA1 were detected using rabbit polyclonal antibodies and Alexa Fluor 594-conjugated goat anti-rabbit polyclonal antibodies.

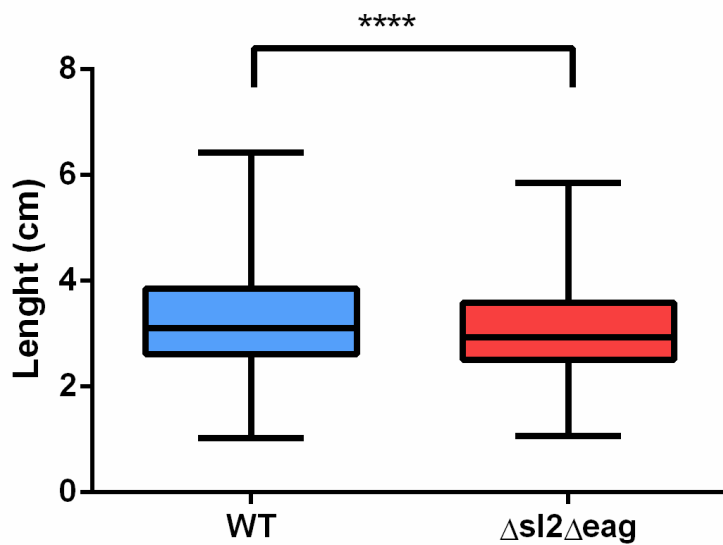


Figure S3. Length of WT and $\Delta sl2\Delta eag$ cells measured from phase microscopy images. Boxplots were constructed from 2 920 cells for WT, and 5 491 cells for $\Delta sl2\Delta eag$. A *t*-test was used to assess the significance of differences in data obtained for the two strains. ****, $P < 0.0001$.

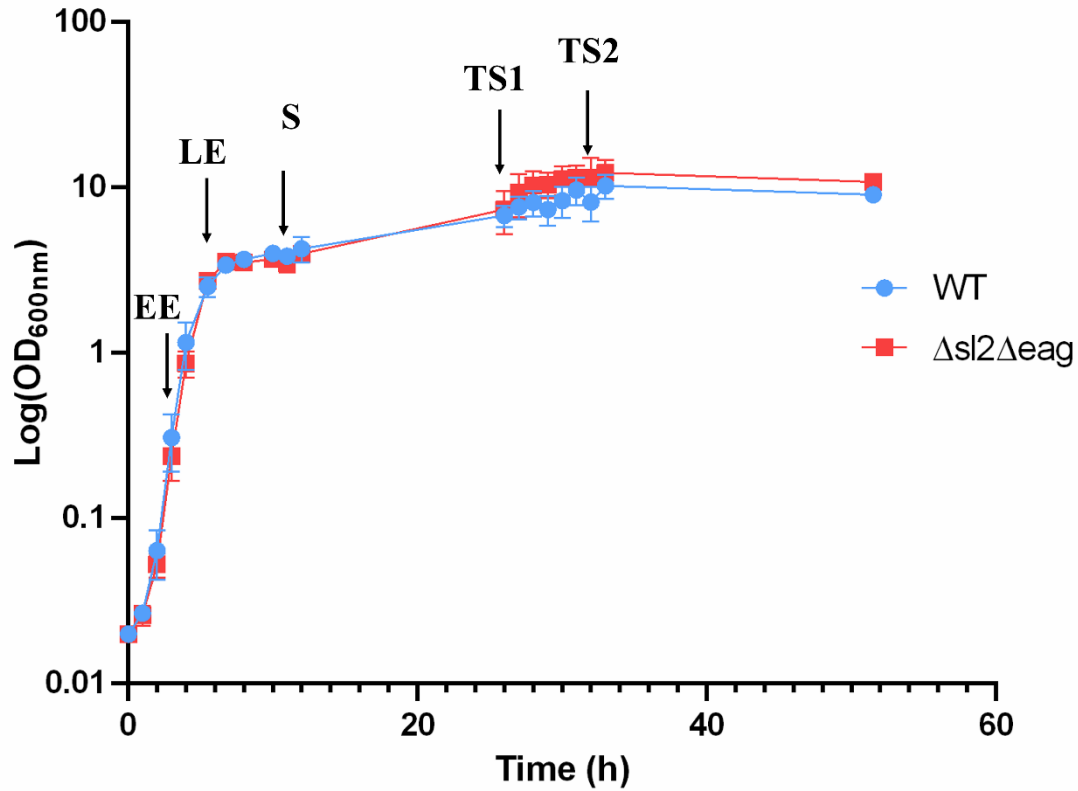


Figure S4. Growth curves for WT and $\Delta sl2\Delta eag$ cells. Cells were grown at 37 °C in MODG medium. Error bars indicate the standard deviation for three biological replicates. Arrows indicate sample-harvesting time-points: EE, Early exponential growth phase; LE, late exponential growth phase; S, stationary growth phase; TS1, late stationary growth phase 1; TS2, late stationary growth phase 2.

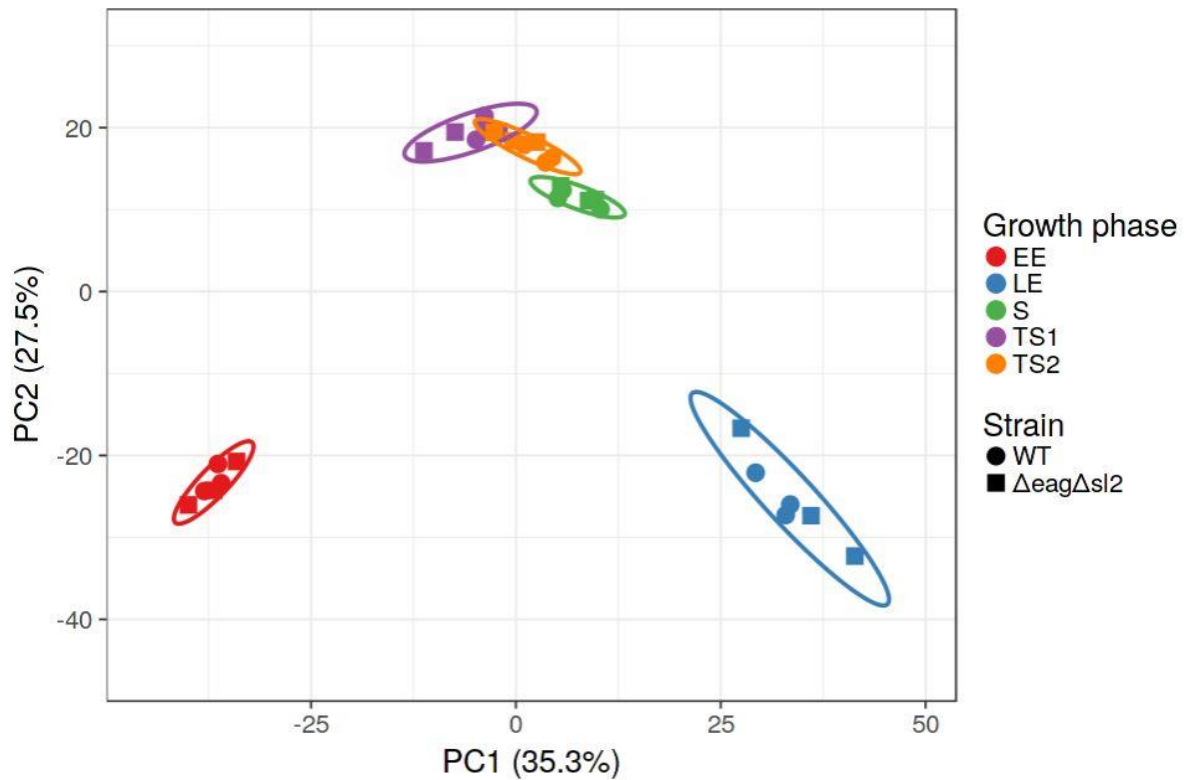


Figure S5. Principal component Analysis (PCA) of WT and $\Delta sl2\Delta eag$ proteomics data. The PCA plot represents 1 616 proteins identified in the biological replicates for which clear proteomics profile differences between EE, LE, S, and TS growth phases were found, as indicated by colors and matching symbols. EE, Early exponential growth phase; LE, late exponential growth phase; S, stationary growth phase; TS1, late stationary growth phase 1; TS2, late stationary growth phase 2.

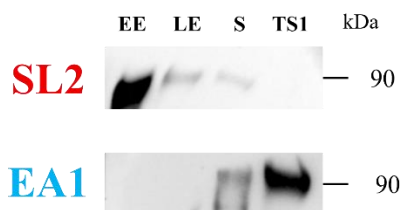


Figure S6. Western blot analysis of SL2 and EA1 synthesis. SL2 and EA1 were detected using rabbit polyclonal antibodies and Alexa Fluor 594-conjugated goat anti-rabbit polyclonal antibodies. EE, Early exponential growth phase; LE, late exponential growth phase; S, stationary growth phase; TS1, late stationary growth phase 1.

Table S1. Oligonucleotides used in this study.

Primers	Sequence
upF-sl2-SalI	aaagtcgacGTCGGAATGTTTCGCTTCTAATCGG
upR-sl2-Sac-NheI-SacII	TACTGTTACTGGTTTGAAAGCcgcggttgctagcTGCTGCTGTCATTGTACCTGCGAT
downF-eag-NheI-sacII	GGTACAATGACAGCAGCAATGctagcaaccgcgGCAGTACAAGTGAACGTTCTTAACAATCCAAATC
downR-eag-NcoI	aaacatGGGCAAATCTCTCATTAAACGAC
exF-sl2	GTCTCCGTATAAGCTCGATATTC
exR-eag	GCTCTCCTAACTGGTAGCTCC
sl2F_Expr_SacI	CACCATGGCAGGTAAAACATTCCCAGACGTAGAT
sl2R_Expr_Nterm_SacI	TTAGCGAGTTACTGTTACTGGTTTGAAAGC

Table S2. Distribution of S-layer cluster-containing strains within *B. cereus* phylogenetic groups.

Analysis of 329 strains. (+) Presence and (-) Absence of the S-layer cluster.

Group and sub-group	S-layer cluster		Total
	+	-	
I	0	9	9
II	16	2	18
III	139	8	147
III-5	19	0	19
III-8	103	3	106
IV	0	77	77
V	0	19	19
VI	31	23	54
VII	5	0	5
Total	191	138	329

III. Expériences complémentaires

L'étude précédente décrit et compare les propriétés de surface et la capacité d'adhésion de la souche mutante $\Delta sl2\Delta eag$ à celle de la souche parentale *B. cereus* AH187 (WT). L'objectif initial de mon projet était d'étudier l'influence de chacune des protéines sur ces propriétés en comparant la souche WT avec les souches simples mutantes $\Delta sl2$ et Δeag . Nous avons construit la souche mutante $\Delta sl2$ sans difficulté mais toutes nos tentatives pour construire le mutant Δeag ont échoué. C'est pourquoi nous avons décidé de ne pas mentionner les résultats obtenus avec les simples mutants dans l'étude précédente. La partie qui suit présente les résultats obtenus avec le simple mutant $\Delta sl2$.

Par ailleurs, dans les travaux précédemment décrits, nous avons montré que la couche S changeait les propriétés de surface de *B. cereus* AH187 au cours de la croissance. Ces changements de propriétés impactent des phénomènes généraux d'adhésion tels que l'auto-agrégation et l'adhésion à des surfaces abiotiques. Nous avons tenté d'examiner l'impact de la couche S sur la formation de biofilms dans différentes conditions chez *B. cereus* AH187.

1. Matériels et méthodes

1.1. Construction de la souche mutante $\Delta sl2$ et conditions de croissance.

La souche mutante $\Delta sl2$ a été construite par échange allélique (Arnaud *et al.*, 2004). Le plasmide pMAD-sap $\Delta sl2$ permettant l'échange allélique a été construit comme suit : les séquences d'ADN de 1kpb flanquant le gène BCAH187_A1064 (gène *sl2*) en amont (up-*sl2*) et en aval (down-*sl2*) ont été amplifiées par PCR en utilisant les paires d'amorces upF-*sl2*-SalI+upR-*sl2* et downF-*sl2*+downR-*sl2*-NcoI, respectivement (Tableau 2.1). Les deux amplicons ont été clonés indépendamment dans pCR 2.1-TOPO (Invitrogen). Le fragment down-*sl2* a été inséré entre les sites SacI-SacII du up-*sl2*-PCR2.1 préalablement digéré dans par ces mêmes enzymes. Un fragment contenant une cassette de résistance à la spectinomycine (Guérout-Fleury *et al.*, 1995) a ensuite été inséré entre les fragments up-*sl2* et down-*sl2* par digestion/clonage avec les enzymes SacII+NheI. Le fragment d'ADN up-*sl2*::spec::down-*sl2* résultant a ensuite été isolé par digestion à l'aide de EcoRI et cloné dans le plasmide pMAD digéré avec la même enzyme. Le plasmide pMAD-sap $\Delta sl2$ résultant a été utilisé

pour créer le mutant $\Delta sl2$. Le remplacement de *sl2* par la cassette de résistance à la spectinomycine a été vérifié par PCR avec les amorces oligonucléotidiques appropriées (Tableau 2.1).

Table 2.1. Amorces utilisées dans cette étude

Amorces	Séquence
sap-upF-SalI	TCGGATCCATATGACGTCGAGTCGGAATGTTTCGCTTCTAATCGG
sap-upR	AGATGCTAGCTGCTGCTGTCATTGTACCTGC
sap-specF-NheI	GACAGCAGCAGCTAGCATCTGTAGACAAATTGTG
sap-specR-SacII	GTTTGAAAGCCCGCGGCGATCTTTTGTTTATAAG
sap-downF	ATCGCCGCGGGCTTTCAAACCAGTAACAGTAACTC
sap downR-NcoI	ATCTATCGATGCATGCCATGGAAGTTGAGCATTTTCATCAACTG

La souche mutante $\Delta sl2$ a été cultivée en milieu LB en routine. Pour les analyses de microscopie par immunofluorescence, les bactéries ont été cultivées en aérobose dans un milieu MODG à 37°C (Boutonnet *et al.*, 2022; Rosenfeld *et al.*, 2005).

1.2. Distribution de EA1 à la surface par microscopie à immunofluorescence

Les souches parentale et $\Delta sl2$ ont été cultivées en MODG et des aliquotes prélevées par centrifugation (7000g, 5min, 4°C) en début de phase exponentielle (EE), en fin de phase exponentielle (LE), en phase stationnaire (S), et en fin de phase stationnaire (TS). Les cellules ont été fixées pendant une nuit avec du paraformaldéhyde 4% à 4°C, lavées deux fois avec du PBS, puis bloquées avec de l'albumine de sérum bovin (BSA) à 2% pendant 30 minutes à température ambiante sous agitation. L'anticorps anti-EA1 a été fixé comme décrit ci-dessus (Boutonnet *et al.*, 2022). Les images de microscopie à fluorescence ont été analysées à l'aide des logiciels Fiji et Microbe J (Ducret *et al.*, 2016).

1.3. Formation de biofilms

Il a été montré précédemment que la souche $\Delta sl2\Delta eag$ mutante adhère moins vite que la souche parentale sur une surface abiotique. Nous avons souhaité déterminer s'il y avait une différence dans

la vitesse de formation de biofilms entre la souche sauvage et la souches mutantes $\Delta sl2$ et $\Delta sl2\Delta eag$. Plusieurs protocoles ont été expérimentés et sont décrits ci-dessous.

Biofilm en microplaque

Une préculture des bactéries (AH187 WT, $\Delta sl2\Delta eag$ et $\Delta sl2$) est réalisée sous agitation dans 5ml de BHI. Les cultures sont prélevées, lavées et resuspendues dans du BHI à $DO_{600nm} = 1$. 200 μ L de cette suspension sont inoculés dans 3 plaques de 96 puits. Les plaques sont placées dans une boîte fermée avec humidificateur, puis incubée 24h, 48h et 72h sans agitation à 37°C. La biomasse totale des biofilms formés est quantifiée avec du cristal violet (CV). Après incubation, le surnageant est éliminé, les biofilms attachés aux parois sont lavés trois fois au PBS pH = 7.4, puis colorés avec 1% (p/v) de CV pendant 20 minutes à température ambiante. Le cristal violet non lié est lavé au PBS. Enfin, le CV fixé aux biofilms est solubilisé par incubation dans 200 μ l d'éthanol 98% pendant 30 min. La concentration de CV est mesurée par spectrophotométrie à 590nm en lecteur de plaque.

Biofilm en tube en verre

Les bactéries (AH187 WT et $\Delta sl2\Delta eag$) en LB, BHI ou MODG à 37°C sous agitation (200 rpm) et sont prélevées aux phases exponentielle et stationnaire. 10 μ L de culture sont dilués dans 2mL de milieu Hydrolysate de Caséine (HCT) (El-Khoury *et al.*, 2021), MOD sans glucose, et MODG dans des tubes à hémolyse en verre, puis placés à 37°C et à 30°C en condition statique pendant 5h, 10h, 16h, 24h, 36h, 48h, 72h, et 96h. Pour la quantification, la pellicule et l'anneau ont été prélevés et resuspendus dans 1mL d'eau pour mesurer la DO_{600nm} par spectrophotomètre.

Biofilm sur coupon d'acier inoxydable

Le développement de biofilms (WT et $\Delta sl2\Delta eag$) a également été testé sur des coupons d'acier inoxydable hydrophile AISI 304 (Planchon *et al.*, 2006; Wijman *et al.*, 2007). Les souches WT et mutante sont incubées dans du LB et MODG à 37°C sous agitation (200 rpm) et sont prélevées en phase exponentielle et en phase stationnaire. 7 ml de ces suspensions sont versés sur le coupon d'acier inoxydable placé dans une boîte de Pétri. Après d'incubation à 37°C en condition statique pendant 2h (étape d'adhésion), la suspension bactérienne est retirée. Les cellules ayant adhéré restent attachées au coupon. 7 mL de milieu stérile (LB, MODG, MOD sans glucose, HCT) est ajouté à nouveau. La culture a été incubée 24h, 48h et 72h à 37°C avec et sans renouvellement de milieu toutes les 24h. Après incubation, les coupons sont lavés deux fois avec 35 ml de sel de tryptone stérile (TS : 1 g/l de bactotryptone et 8.5 g/l de NaCl) sur une table agitante afin d'éliminer les cellules non adhérentes. Les cellules adhérentes sont détachées dans 10 ml de TS dans un bain de

sonication pendant 3 min à 50 Hz. Des dilutions en série sont étalées sur LB gélosé et incubées pendant 18h à 24h à 37°C. La formation de biofilms a été évaluée par dénombrement cellulaire et exprimée en nombre d'unité formant des colonies par centimètre carré de coupons (UFC/cm²).

La formation de biofilm a également été évaluée sur coupon d'acier inoxydable à la verticale en tube. Les cultures sontensemencées et incubées comme décrit ci-dessus. Les coupons d'acier inoxydables sont ensuite incubés à la verticale à 37°C et 30°C dans 10mL de milieu MODG et HCT pendant 12h, 24h, et 48h. Les cellules adhérentes sont ensuite détachées et étalées comme décrit précédemment.

2. Résultats

2.1. Apparition précoce de la protéine EA1.

La microscopie à immunofluorescence a été utilisée pour localiser EA1 à la surface du mutant $\Delta s/2$. La figure 2.3 montre qu'EA1 est présente à la surface de $\Delta s/2$. EA1 apparaît dès la phase exponentielle de croissance EE. L'apparition de EA1 est plus précoce dans la souche $\Delta s/2$ que dans la souche sauvage. EA1 apparaît sous forme de petits amas en phase de croissance EE, puis s'accumule aux pôles pendant la phase de croissance LE, et dans la phase S (Fig. 2.3). En phase TS, EA1 est répartie sur toute la surface de la bactérie, en forme d'amas à la surface (Fig. 2.3).

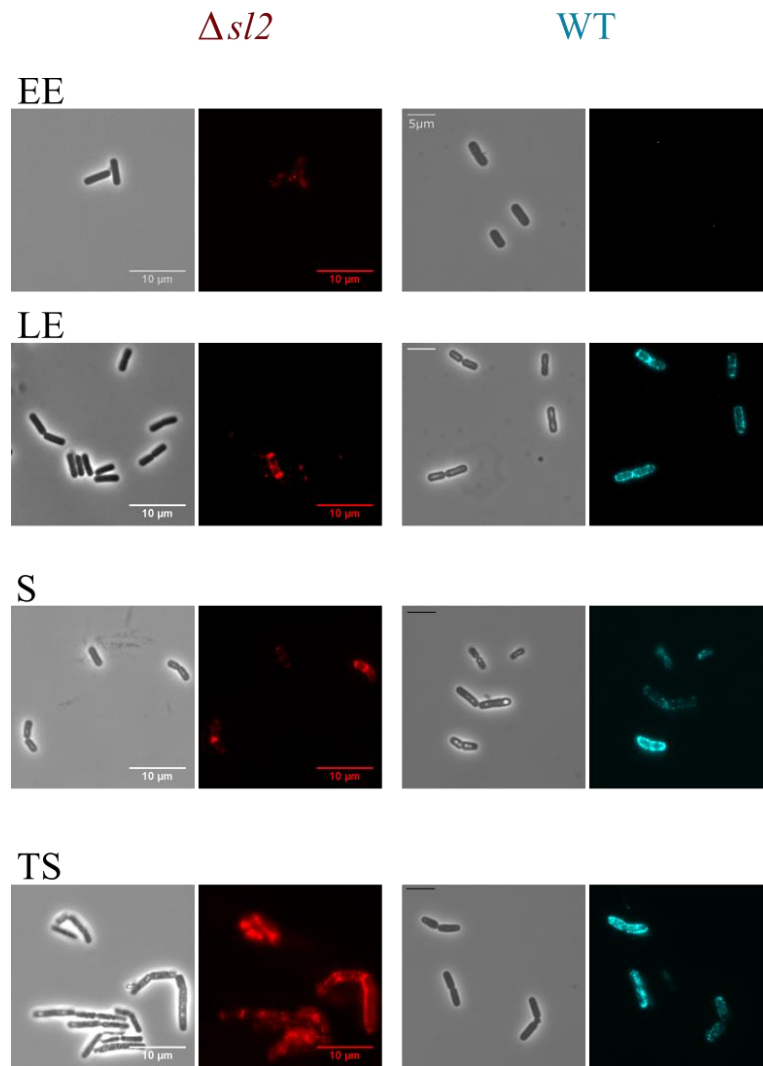


Figure 2.3. Localisation de EA1 à la surface des cellules mutantes de $\Delta sl2$ et parentales *B. cereus* AH187 WT. Les images de contraste de phase et de microscopie à fluorescence sont montrées ($\times 1000$). Les cellules représentées ont été récoltées en phases de croissance exponentielle précoce (EE), exponentielle tardive (LE), stationnaire (S) et stationnaire tardive (TS).

2.2. Capacité des souches à former des biofilms

Biofilm en microplaque

Lorsque la quantité de biofilm formée a pu être mesurée, aucune différence significative n'a pu être mise en évidence entre les deux souches. C'est le cas à 24h, 48h, et 72h en BHI par quantification au CV (Figure 2.4).

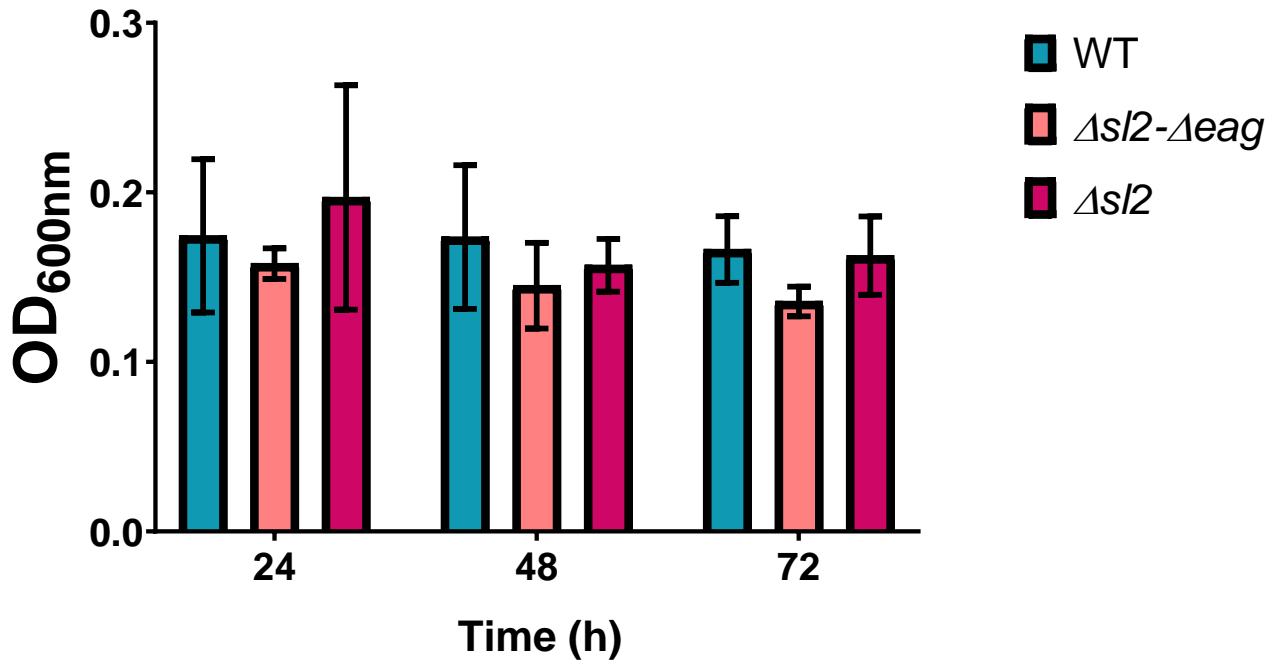


Figure 2.4. Quantification de la formation de biofilms de la souche *B. cereus* AH187 WT et les mutants $\Delta sl2\Delta eag$ et $\Delta sl2$ par la méthode du cristal violet.

Biofilm en tube en verre

Les biofilms forment des pellicules à l'interface air/liquide et des anneaux autour du tube en verre au bout de 10h. Les pellicules sont très fragiles et se détachent très facilement, rendant le prélèvement compliqué, comme illustré dans la figure 2.5.

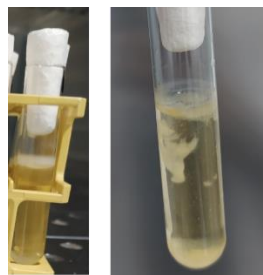


Figure 2.5. Formation de biofilms en tube en verre chez *B. cereus* AH187

Biofilm sur coupon d'acier inoxydable

Les tests de biofilms sur les coupons d'aciers montrent des biofilms fragiles et flottant sous forme de paillettes à l'interface air/liquide. Ils n'ont pas adhéré à la surface de l'acier. Il est donc impossible de distinguer le biofilm des cellules planctoniques. Les pellicules de biofilm formées

lorsque la plaque d'acier était placée à la verticale dans le tube en verre étaient très fragile, comme observée dans les tubes en verre.

En conclusion, dans la souche mutante $\Delta sl2$, EA1 est détectée plus précocement à la surface de *B. cereus* AH187 que chez la souche sauvage. Cependant cette observation n'aurait pas d'impact sur la vitesse de formation de biofilms. La couche S n'aurait pas d'impact sur la formation de biofilm. Ces résultats seront discutés dans la discussion générale (Chapitre 4).

Chapitre 3

Chapitre 3 : La couche S est un élément clé de la réponse aux stress en phase stationnaire

I. Contexte

La couche S de *B. cereus* est composée de deux protéines SL2 et EA1. De nombreux rôles ont été attribués aux couches S chez les micro-organismes mais les fonctions de celles-ci dans les souches émétiques ont été très peu étudiées. Une majorité de souches émétiques possède une couche S. Or les souches émétiques sont en plus d'être très virulentes, capables de résister au stress salin. De plus, nos travaux précédents suggèrent que la couche S serait un avantage en fin de croissance, notamment par sa capacité à mieux adhérer aux surfaces abiotiques.

L'article présenté dans ce chapitre montre que (i) la production de SLP augmente le besoin en énergie de *B. cereus* au cours de la phase exponentielle, (ii) la couche S induit une adaptation aux stress nutritionnels rencontrés en phase stationnaire mais aussi une résistance à d'autres stress environnementaux tels que le stress au froid et osmotique.

En complément de l'article, nous nous sommes intéressées, par une approche biochimique et protéomique, (i) à l'impact de la composition du milieu de croissance sur la production de SLP, et (ii) l'impact des couches S sur les paramètres de croissance de *B. cereus* AH187.

II. Article

S-layer is a key component of the starvation-survival response in *B. cereus* AH187

Cécile Boutonnet¹, Christian Ginies¹, Béatrice Alpha-Bazin², Jean Armengaud², Alice Château¹, and Catherine Duport¹

¹ Avignon Université, INRAE, UMR SQPOV, F-84914 Avignon, France

² Université Paris Saclay, CEA, INRAE, Département Médicaments et Technologies pour la Santé (DMTS), SPI, 30200 Bagnols-sur-Cèze, France.

1. Abstract

Changes in morphology and physiology occur in the stationary-phase bacteria and concomitantly a state of increased resistance against various stresses is established. Stationary phase *Bacillus cereus* AH187 cells are surrounded by an S-layer that promotes their adhesion. Here, we used a label free proteomics approach to study the impact of S-layer on *B. cereus* physiology at different stages of growth. Our data showed that S-layer modulates the adaptive mechanisms that *B. cereus* set up during growth, and the nutritional deficiency response upon entry into stationary phase. As a result, S-layer synthesizing cells are more resistant to abiotic strains, such as salt and cold stresses at stationary phase. Overall, our data indicate, that S-layer triggers an adaptive response that allows *B. cereus* to better resist to adverse conditions upon starvation.

Keywords: S-layer, *Bacillus cereus*, proteome, starvation, environmental stresses

2. Introduction

The *B. cereus* group comprises species capable of causing two forms of gastrointestinal diseases, termed emesis and diarrhea based on clinical symptoms. The emetic reference strain is *B. cereus* AH187 (F4810) (Ehling-Schulz *et al.*, 2005b). This strain is surrounded by an S-layer, composed of two S-layer proteins (SLP), SL2 and EA1. SL2 accumulates at the cell surface before EA1 during growth, and their spatiotemporal localization is accompanied with changes in the physicochemical surface properties of *B. cereus* cells. This enhances the adhesive properties of growth-arrested cells (Boutonnet *et al.*, 2022).

In this study, we investigated the impact of S-layer synthesis on the adaptive response of *B. cereus* AH187 during exponential and stationary growth. For this purpose, the wild-type strain and the mutant lacking S-layer ($\Delta sl2\Delta eag$) were grown in defined MOD medium, supplemented with glucose, and the dynamics of their proteome and exoproteome were compared. We found that S-layer contributes indirectly to the stress resistance of stationary phase cells, by modulating the regulatory pathways upon entry into stationary phase. We thus propose that S-layer is a key component of the adaptive response to starvation.

3. Material and methods

3.1. Bacterial strains, growth conditions, and samples preparation.

The wild-type (WT) *B. cereus* AH187 also named F4810/72, isolated from a vomit (Turnbull, 1979) and the isogenic $\Delta sl2\Delta eag$ mutant, lacking S-layer (Boutonnet *et al.*, 2022) were used in this work. Strains were grown at 37°C under shaking (200 rpm) in MOD medium (Rosenfeld *et al.*, 2005) supplemented with 30 mM glucose (MODG) and buffered at pH 7.2. MODG medium (500 mL in 2L pre-heated Erlenmeyer flasks) was inoculated at an OD_{600nm} of 0.02 from overnight precultures. Samples of each culture were collected by centrifugation (10min, 10 000g, at 4°C) at early exponential (EE), exponential (E), early stationary (ES), and stationary (S) growth phases as indicated in Fig 3.1. Pellets and filtered supernatant (0.2µm filter) were analyzed by proteomic.

Quantification of glucose, amino acids and proteases were performed on the 0.2 μ m-filtered supernatant samples.

3.2. Protein Identification by Liquide Chromatography with Tandem Mass spectrometry (nanoLC–MS/MS) and Label-Free Quantification.

Protein extracts were prepared from cell pellets and culture supernatants as previously described (Madeira *et al.*, 2015). Proteins from WT and Δ *sl2Aeag* culture supernatants were TCA-precipitated and resulting pellets were dissolved in NuPAGE buffer. Protein samples were loaded onto NuPAGE Bis-Tris 4–12% gels (Invitrogen) for a short 5-min migration at 200 V (Hartmann and Armengaud, 2014). Proteins were digested *in gel* with sequencing-grade trypsin (Roche) according to the ProteaseMAX protocol (Promega). Triplicate samples were treated for both WT and Δ *sl2Aeag* mutant.

Peptides mixtures were analyzed by Liquid nanoLC-MS/MS using an Ultimate 3000 nano LC system coupled to Q-Exactive HF mass spectrometer coupled to (Thermo Fisher Scientific, Illkirch-Graffenstaden, France), as previously described (Rousset *et al.*, 2020). Briefly, after being loaded, peptides were desalted online on a reverse-phase Acclaim PepMap 100 C18 precolumn (5mm, 100Å pore size, 300 μ m i.d. \times 5mm), and then resolved on a nanoscale Acclaim Pepmap 100 C18 column (3- μ m bead size, 100-Å pore size, 75 μ m id \times 500mm) at a flow rate of 200nL.min⁻¹. Solvent A (0.1 % formic acid) and solvent B (0.1% formic acid and 80% CH₃CN) were used to perform the gradient. A 90-min gradient (from 4% to 25% B in 75min followed by an increase to 40% B) was used for cellular proteins. For extracellular proteins, a 60-min gradient (from 2.5% to 25% B in 50 min followed by an increase to 40% B) was applied.

Tryptic MS/MS spectra were investigated using the MASCOT Daemon search engine with the following parameters against the *B. cereus* AH187 NCBI_ 20200622 database. Parameters included a mass tolerance of 5 ppm peptide and 0.02 Da MS/MS, 2⁺ or 3⁺ peptide charge, a maximum of two missed cleavages, a cysteine carbamidomethylation as fixed modification and a methionine oxidation as a variable modification. Peptide-to-Spectrum Matches were retained when *p*-value \leq 0.05 in homology threshold mode. Protein identification was validated by at least two distinct peptides upon parsing with IRMa software v1.3.1 (Christie-Oleza *et al.*, 2012), resulting a false discovery rate lower than 1%. NSAF values were calculated by dividing the number of spectra assigned to a protein in a given sample by its molecular weight. Protein abundance comparison between WT and

$\Delta sl2\Delta eag$ mutant was performed using the TFold test (Carvalho *et al.*, 2012). Proteins were considered as differentially accumulated when $p < 0.05$ and fold-change ≥ 1.5 .

3.3. Methylchloroformate (MCF) derivatization and Gaz Chromatography Mass Spectrophotometry (GC-MS) analysis.

Analytical analysis was performed by alkylation derivatization technique using methylchloroformate (MCF) (Villas-Bôas *et al.*, 2011). Filtered supernatant (60 μ L) was resuspended in 100 μ L of 2M NaOH in hemolysis tube. Methanol (167 μ L) and pyridine (34 μ L) were added in the suspension. Twenty μ L of MCF were added and the mixture was vigorously vortexed during 30s. This step is repeated once. To remove the excess of reagent and extract the derivative compound, 400 μ L of chloroform (vortexed 10s) and 400 μ L of 50 mM NaHCO₃ (vortexed 10s) were added. Then, the organic phase was collected and injected on the GC-MS. Derivatization was also realised in alanine d₄ sample for control (Cambridge Isotope Laboratories, Inc.) at 1.58 mg.mL⁻¹.

Analysis of derivative samples was performed on a gas chromatograph coupled with mass spectrometer (Shimadzu QP2010, Kyoto, japan) equipped of a capillary column (ZB-5MS 30 m, 0.25 mm i.d., 0.5 μ m film thickness, Phenomenex, Le Pecq, France). The injection port was used in split mode (split ratio 50) at 270°C. The carrier gas (He) was at the constant velocity 35 cm.s⁻¹. The oven temperature program was as follow: initial temperature 50°C held for 1 min, followed by temperature increases at a rate of 10°C/min up to 280°C. The final temperature was maintained 5 min. Mass spectra were recorded in electronic ionization at 70ev. The scanning range was 40 to 650 amu (atomic mass unit) The transfer line and ion source were 280°C and 200°C, respectively. Compound identification was performed by comparison of their mass spectra with those found in the MCF library (Villas-Bôas *et al.*, 2011) and confirmed by injection of reference standards. The quantification were realized by using equivalent etalon.

3.4. Glucose, acetate and proteases titration

Glucose and acetate were quantified using the BioSenTec kit (Auzeville Tolosane, France). Protease concentration was determined using the Pierce™ Colorimetric Protease Assay kit (Sigma Aldrich, Vienne, Austria). Kits were used according to the manufacturer's protocols.

3.5. Autolytic activity.

Overnight cultures of WT and $\Delta sl2\Delta eag$ mutant strains were diluted in 4 mL of MODG media at an initial OD₆₀₀ of 0.02. Cultures were incubated at 37°C under 200 rpm shaking. Once culture reached early stationary growth phase, cells were washed in 50 mM Tris-HCl buffer pH 8.5, resuspended in the same buffer, plated in 96 well-microplate and incubated 10 h at 30°C (Raddadi *et al.*, 2005). Optical density (OD₆₀₀) measurements were monitored by automated optical density reader (Flx-Xenius XMA, Safas, Monaco). The autolytic rate was expressed as the percentage decrease in OD₆₀₀ after 10h. Experiment was performed in biological triplicate.

3.6. Cold stress survival.

Overnight cultures of WT and $\Delta sl2\Delta eag$ mutant strains were inoculated in 20 mL of MODG media in 50 mL tubes at an initial OD₆₀₀ of 0.02. Cultures were incubated at 37°C under shaking (200 rpm). Once culture reached early stationary growth phase, the cultures were transferred to 4°C with shaking for up to 50 h. Viable cells were determined by plating 100 μ L of 10-fold serial dilutions of cultures on LB agar plates. The colony-forming units (CFU) were counted after 18 h incubation at 30°C. All experiments were performed with four biological replicates.

3.7. Salt stress.

Overnight cultures of WT and $\Delta sl2\Delta eag$ mutant strains were inoculated at 37°C under shaking (200 rpm) in 10 mL of MODG media in 50 mL tubes at an initial OD₆₀₀ of 0.02. Early stationary cells were incubated with 5% (w/v) of sodium chloride (NaCl) for 1 h and 2 h at 37°C under shaking. The number of viable cells was determined by plating 100 μ L of 10-fold serial dilutions of cultures on LB agar plates, and CFU were counted after 18 h incubation at 30°C. All experiments were performed in biological triplicate.

3.8. Statistical analysis.

Data from at least three biological replicates were pooled for statistical analysis. Means were reported with standard deviation (SD). Glucose and protease concentrations were evaluated using the Student's t-test. All the other experiments were analyzed by two-way analysis of variance (ANOVA)

followed by Bonferroni post-hoc analysis. Statistical analyses were performed using the GraphPad Prism software version 8.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). P-values ≤ 0.05 were considered significant.

4. Results

4.1. Growth overview of *B. cereus* WT and $\Delta sl2\Delta eag$ mutant

The impact of S-layer synthesis on cellular processes associated with *B. cereus* AH187 growth was investigated in chemically defined MODG medium, commonly used for *B. cereus* cultivation (Rosenfeld *et al.*, 2005). Figure 3.1 shows that growth curves of WT and $\Delta sl2\Delta eag$ cells are similar, as previously reported (Boutonnet *et al.*, 2022). We collected aliquots of culture extracts at four time-points (named EE, E, ES and S) over the growth curve (Fig. 3.1), and determined the dynamic of glucose and amino acid consumption, and acetate overflow of the WT and the $\Delta sl2\Delta eag$ mutant strains (Fig. 3.2 and Fig.S3.1).

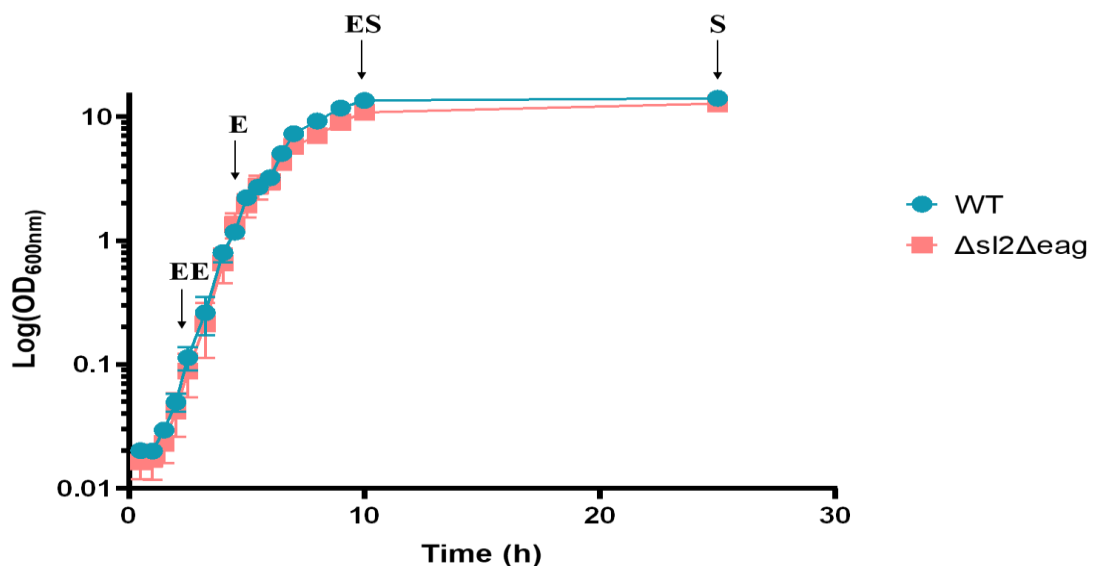


Figure 3.1. Growth curves of WT and $\Delta sl2\Delta eag$ strains. Cells were grown at 37°C in MODG medium. Samples for proteomic analysis were collected at early exponential (EE), exponential (E), early stationary (ES) and stationary (S) growth phases, as indicated.

The data showed that both the WT and $\Delta sl2\Delta eag$ cultures exhibited maximal glucose uptake and acetate secretion rate at EE time point, i.e. at the maximal growth rate. However, $\Delta sl2\Delta eag$ mutant

strain exhibited a lower glucose uptake rate compared to its parent. Both the WT and mutant strain consumed threonine, serine, isoleucine and valine from the beginning of growth, and phenylalanine, tyrosine, methionine, lysine and glutamic acid after 5 h of growth (Fig 3.1 and S3.1). However, the $\Delta sl2\Delta eag$ mutant strain consumed glycine and aspartic acid earlier than the WT strain (at EE compared to E time-point, Fig. 3.2). These data indicate that lack of S-layer synthesis affects the temporal coordination of glucose and amino acid catabolism.

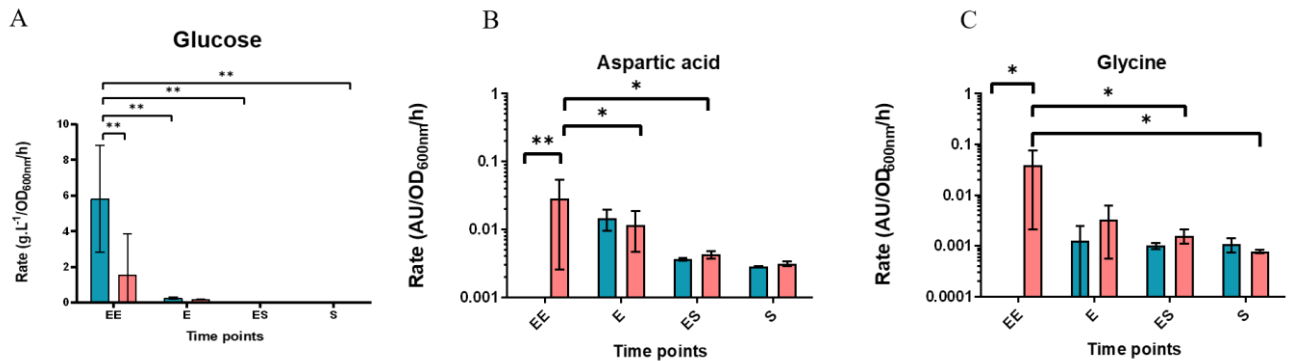


Figure 3.2. Rate of the (A) glucose, (B) acide aspartic and (C) glycine intake by WT (blue) and $\Delta sl2\Delta eag$ (red) cells at early exponential (EE), exponential (E), early stationary (ES), stationary (S) growth phase. *, $P < 0.1$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$

4.2. Comprehensive analysis of cellular proteome remodelling in $\Delta sl2\Delta eag$ cells

To understand how *B. cereus* cells adapt to the lack of S-layer synthesis, we compared the cellular proteome of WT and $\Delta sl2\Delta eag$ cells collected at EE, E, ES, and S time-points (Fig. 3.1). Principal component analysis (PCA) revealed good homogeneity of the biological triplicates for the two strains at each time-point, and distinguished each growth phase (Fig. S3.2). In total, 2329 cellular proteins were identified by at least two distinct peptides across all 12 samples analyzed (Table S3.1). Among them, 309 showed differential abundance in $\Delta sl2\Delta eag$ compared to WT, with 117 proteins less abundant (down-DAPs), and 192 more abundant (up-DAPs) (\log_2 fold-change ≥ 0.46 , p -value ≤ 0.05), Table S3.1). The growth phases distribution of DAPs is illustrated in Figure 3.3 and shows that (i) the number of DAPs increased during growth and reached its maximum at the entry of the stationary growth phase (ES, Fig.3.3A), and (ii) time-points share few DAPs (Fig. 3.3B).

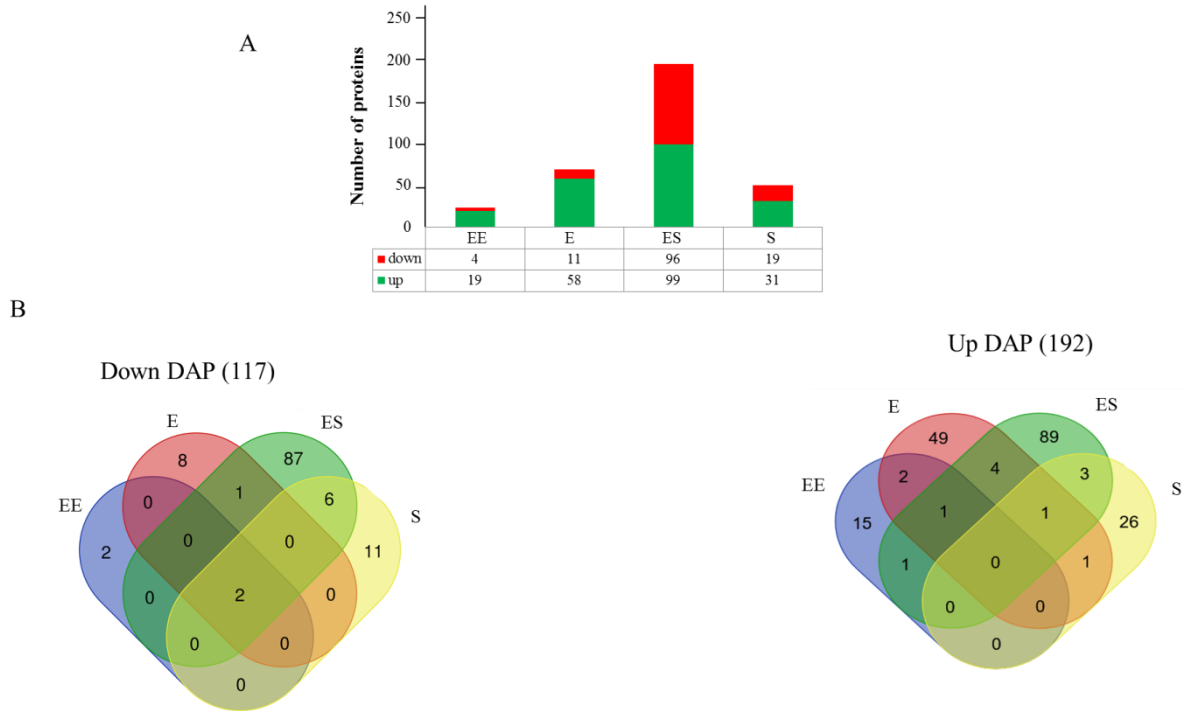


Figure 3.3. Dynamics of cellular proteins, which differentially accumulated (DAPs) in $\Delta sl2\Delta eag$ compared to its parental strain (WT) (A) Bar charts of up- and down- DAPs. The numbers for up- DAPs (green) and down- DAPs (red) were shown above each bar. (B) Venn diagrams of down- and up-DAPs identified at the different time-points. The number of specific and overlapped DAPs is given.

At every time-point, up-DAPs outnumbered down-DAPs. The two down-DAPs identified in all time-points (Fig. 3.3B) are the S-layer proteins SL2 and EA1, which are undetectable in the $\Delta sl2\Delta eag$ cellular proteome (Table S3.2). EA1 abundance increased gradually in WT cellular proteome and peaked upon entry into stationary phase (ES), while SL2 abundance reached its maximum earlier in active growth (at E time-point) (Fig. S3.3). According to their NSAF, both SL2 and EA1 proteins are among the most abundant proteins of the ES-cellular proteome (Fig. S3.3). Taken together, these data indicate that lack of SL2 and EA1 synthesis in $\Delta sl2\Delta eag$ cells is accompanied by a growth phase dependent remodeling of cellular proteome, and the high accumulation of EA1 observed in ES-cellular proteome of WT cells correlates with the major proteome remodeling in $\Delta sl2\Delta eag$ cells. We then focus on some important DAPs identified at each time-point.

EE time-point: Only two down-DAPs were identified at early exponential growth phase, in addition to SL2 and EA1. One of these down-DAPs was the putative transition state transcriptional regulatory protein B7HND9, which could regulate growth phase dependent processes as its

counterparts, AbrB and AbrB' (Lücking *et al.*, 2009). The 19 up-DAPs include two components of signal transduction pathways: (i) YycH (B7HZF1) controls the activity of the YycFG two-component system, which is essential for cell wall homeostasis, cell membrane integrity and cell division in *B. subtilis* (Szurmant *et al.*, 2007); (ii) B7HLT0 is a putative CheY chemotaxis response regulator (Schweinitzer and Josenhans, 2010). Interestingly, an increase of B7HLT0 abundance was also detected in the $\Delta sl2\Delta eag$ mutant strain at E and ES-time points, indicating that lack of S-layer synthesis could up-regulate the chemotaxis transduction pathway during exponential growth phase.

E time-point: At mid-exponential growth phase, up-accumulation of B7HLT0 in $\Delta sl2\Delta eag$ cells was accompanied by up-accumulation of the kinase associated protein B (B7HUQ2, Kap B), which is required for KinB dependent signal transduction pathway in *B. subtilis* (Dartois *et al.*, 1997). In contrast, the putative protein phosphatase 2C, B7HLJ6, and the putative cyclic-di-AMP phosphodiesterase B7HZF7, which could also participate in signal transduction pathways down-accumulated in $\Delta sl2\Delta eag$ cells compared to WT. Figure 3.4 shows that the majority of up-DAPs were clustered in post translational modification/chaperone/defense mechanisms [N] (7 proteins), transcription [S] (8 proteins) and translation [T] (5 proteins) functional groups. They included (i) the co-chaperonin GroES, heat shock protein B7HQ56, and cold-shock protein CspB2 that assist folding of nascent proteins, refolding, and degradation of misfolded proteins, (ii) the protein SufA (B7HUW9) and the NifU-like protein (B7HUU3) that assist Iron-sulfur cluster assembly, and (iii) the RNA chaperone Hfq (B7HKR8), and the methionine sulfoxide reductase MsrA that help to maintain the redox status of cell (Madeira *et al.*, 2017). The 13 up-DAPs classified in transcription/translation [S, T] categories include RNA polymerase subunit Y (RpoY, B7HMU7), transcription elongation and termination factors, five transcriptional regulators and translational ribosomal subunits. Taken together these data suggest that (i) cellular processes associated with growth are more active in $\Delta sl2\Delta eag$ than in WT cells; (ii) increased activity of growth-related processes in $\Delta sl2\Delta eag$ cells was associated with increased cellular stress, and (iii) dysregulation of cellular process in response to lack of S-layer proteins (SLP) synthesis depends on the activation of a transcription adaptation program.

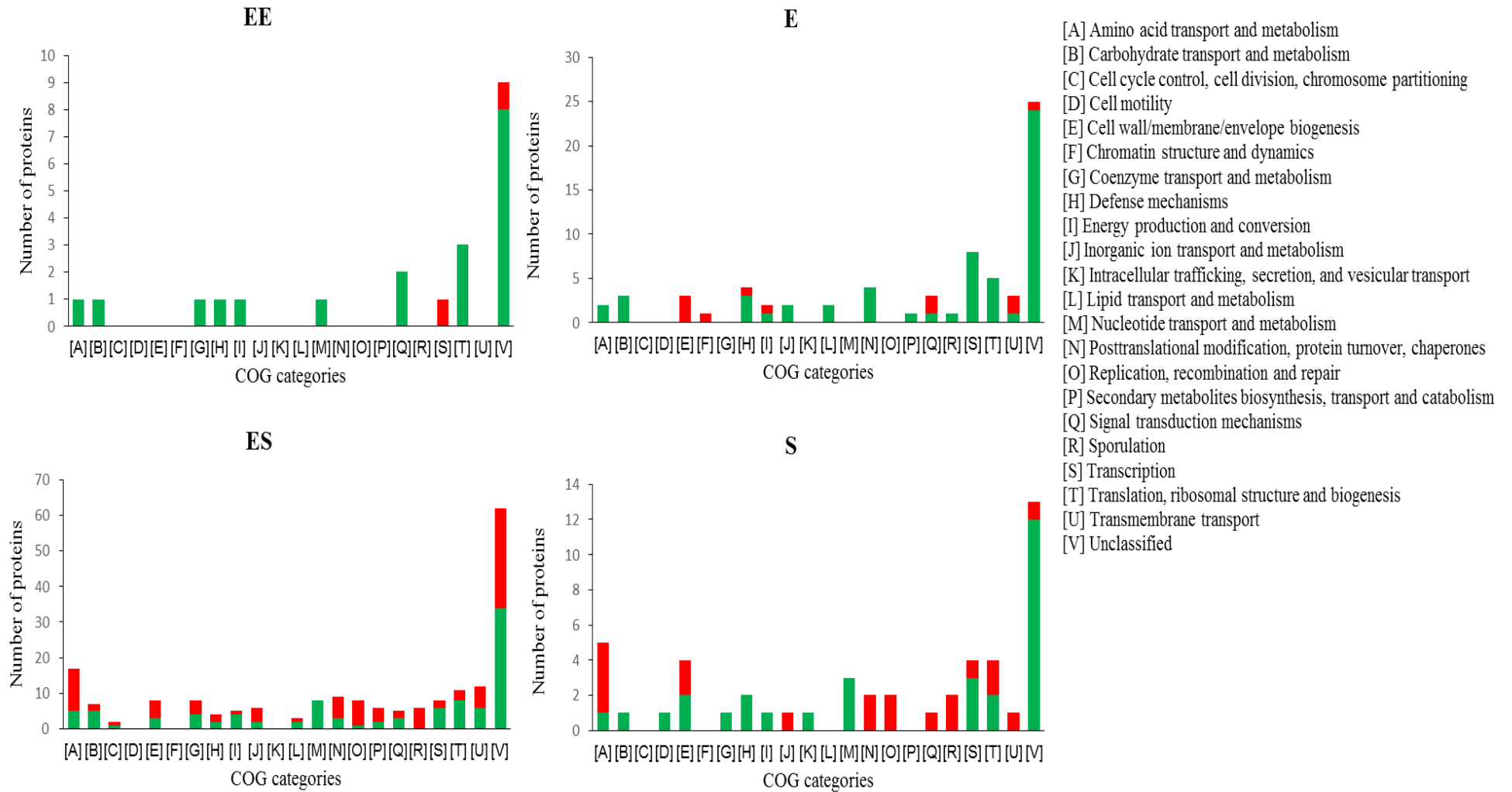


Figure 3.4. Clusters of orthologous groups (COG) distribution of cellular proteins., which differentially accumulated (DAPs) in $\Delta sl2\Delta eag$ strain compared to WT. DAPs were clustered at early exponential (EE), exponential (E), early stationary (ES), and stationary (S) growth phases. The number of up-DAPs is indicated in green and down-DAPs in red, in each COG group.

ES time-point: This time-point characterizes the shift from exponential growth to stationary phase and initiation of sporulation development process. Figure 3.4 shows that up-DAPs were overrepresented in nucleotide transport and metabolism [M], translation [S] and transcription-related [S] functional classes, suggesting that vegetative $\Delta sl2\Delta eag$ cells sustained higher metabolic activity compared to WT cells. Specifically, the up-DAPs clustered in translation [T] category are proteins involved in ribosome biogenesis and translation elongation (Fig. 3.4). The eight up-DAPs clustered in the nucleotide category include proteins that catalyze the biosynthesis of deoxyribonucleotides, which are essential precursors for DNA replication. The up-DAPs classified in transcription process were the DNA-directed RNA polymerase subunit delta (RpoE), and four transcription regulators belonging to the TetR (B7HRK9), GntR (B7HLC7, B7I0K8), and AsR (B7HVK4) families.

The down-DAPs were overrepresented in posttranslational modification/protein turnover/chaperones [N], replication/recombination [O] and sporulation [R] functional classes (Fig. 3.4). The down-DAPs classified in the [N] group include the co-chaperoning GroES, aminopeptidases of the M42 (B7HSN1) and M20 (B7HYH6) families, which can assist in the degradation of misfolded proteins, and a zinc protease (B7HLD8). Two other peptidases and the foldase protein PrsA (B7HQC0), which helps the post-translocational extracellular folding of several secreted up-accumulated in mutant cells. The down-DAPs categorized in the signal transduction mechanisms [Q] class include MutL (B7HLA2), UvrB (B7HWZ4) and RecJ (B7HQG8), which are involved in regulatory systems that cope with DNA damage upon entry into stationary phase. The down-DAPs classified in the sporulation functional class [R] are involved in spore development process. Interestingly, we noted that the two important sigma factors of sporulation machinery activation, σ^E and σ^F (Fujita and Losick, 2002; Karmazyn-Campelli *et al.*, 2008) also down-accumulated in the $\Delta sl2\Delta eag$ mutant cells compared to WT. The σ^F factor is co-transcribed with its regulators, the anti-sigma SpoIIAB (B7HN54) and the anti-anti-sigma factor SpoIIAA (B7HN53) (Lewis *et al.*, 1996), which are also less abundant in the $\Delta sl2\Delta eag$ mutant strain. Taken together the data indicate that lack of S-layer synthesis disturbs the transcription program that regulates the shift from active growth to starvation and entry into the sporulation. Consistent with this disturbance we observed that catalase KatB (B7HZT0) and the DNA-binding protein from starved cells Dps2 (B7HVX5), which protects bacterial cells against many different types of stressors, including starvation, down accumulated in the $\Delta sl2\Delta eag$ mutant strain. This is also the case for the molybdopterin co-factor biosynthesis MoeB (B7HW37) that contributes to maintaining intracellular sulfur and thiol homeostasis and prevents ROS damage (Das *et al.*, 2021), four proteins involved in bacillibactin biosynthesis pathway and three proteins involved in iron-transport. In contrast, the

organic hydroperoxide resistance protein, (OhrR, Clair *et al.*, 2013) and bacterioferritin comigratory protein Bcp (B7HU71) (Singh *et al.*, 2017), which protect cells against peroxide stress up-accumulated in the mutant cells. These data clearly indicate that mutant cells did not deal with oxidative stress and iron starvation encountered at the entry of stationary phase in a similar way than the WT strain.

Amongst other changes, our data revealed a down accumulation of proteins involved in the biosynthesis of branched-chain amino acids: LeuA, LeuB, IlvB, IlvC and IlvE1 encoded by the *ilv-leu* operon. This operon is activated by the global transcriptional regulator CodY (Frenzel *et al.*, 2012). We also found that the Hpr kinase/phosphorylase, which is a sensor of catabolite repression (Deutscher *et al.*, 1995) up-accumulated in mutant cells compared to WT. The lack of S-layer synthesis could thus affect global regulatory pathways upon entry into stationary phase.

S time-point: Proteome remodeling throughout stationary phase (between ES and S-time point) was accompanied by a decrease of the number of DAPs, especially down-DAP (Fig. 3.4). Six down-DAPs were identified at both ES and S-time point, including the three proteins IlvC1, LeuA and LeuB involved in branched chain amino acids (BCAA) biosynthesis. The 11 proteins that were specific to the S time-point include the sugar-binding transcriptional regulator LacI, (B7HNX4), which could act as a repressor in carbon catabolism (Henkin, 1996) and a histidine kinase (B7HPL3). Up-DAPs include the protein Bcp, which is indicative of cellular stress and was previously identified at ES-time point, and two proteins involved in transcriptional regulatory process : the σ^H transcriptional factor (B7HQ58) involved in stress adaptation, toxin gene expression and spore formation (Dubnau *et al.*, 1988; Hadjifrangiskou *et al.*, 2007), and the transcriptional regulator MntR (B7HNW6), which regulates the manganese transport (Lee *et al.*, 2019). In conclusion, lack of S-layer synthesis induces dysregulation of transcriptional program, throughout stationary phase, probably more moderately at late than at early stationary phase.

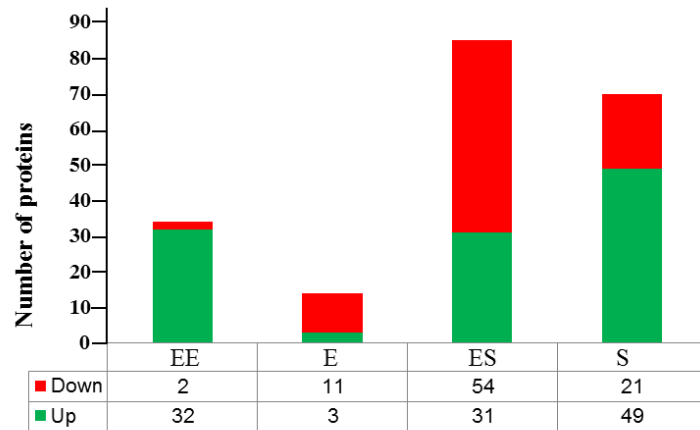
4.3. Exoproteome dynamic analysis

We then examined the impact of S-layer synthesis defect on the *B. cereus* exoproteome during growth. A total of 1781 proteins were identified by at least two peptides out of all 12 samples analyzed (3 biological replicates for each of the 4 time-points, Fig. S3.2, Table S3.2). Among them, 192 proteins showed differential abundance in the *Δsl2Δeag* mutant compared to the WT (Table

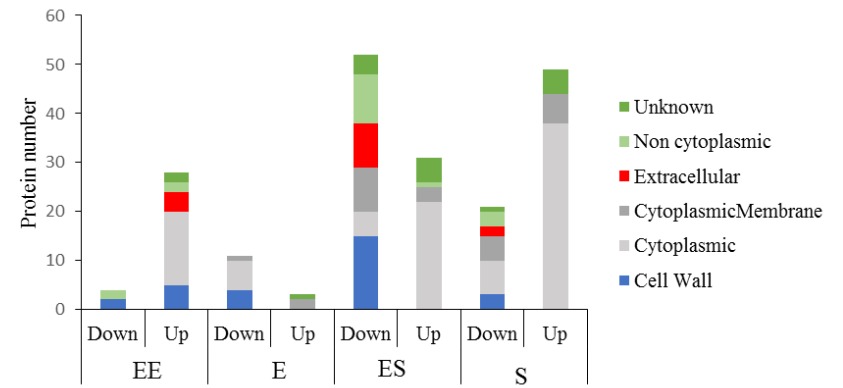
S3.2). Figure 3.5A shows the time-point distribution of the 79 down-DAP and 113 up-DAP. The majority of down-DAPs was identified at the entry into stationary phase (ES-time point), while up-DAPs are shared by EE, ES and S-time points. Very few proteins were detected in at least 2 time-points (3/79 down-DAPS and 5/113 up-DAPS), and only SL2 and EA1 were found to be differentially accumulated in all four time-points (down DAPs, Fig. 3.5B). This indicates that the lack of S-layer synthesis alters *B. cereus* exoproteome in a growth phase dependent manner. Bacterial exoproteomes are known to contain truly extracellular proteins (i.e signal peptide-containing proteins that are actively secreted) and proteins that are released from the cells through (auto-)lysis or other non-classical secretion mechanisms, and mechanical injury (Armengaud *et al.*, 2012). This latest issue probably explains why SL2 and EA1, which are non-covalently attached to secondary cell wall polysaccharide (SCWP), were partially released in WT supernatant. Interestingly, we noted that their time-dynamics was the same in the exoproteome and the cellular proteome (Table S3.1 and Table S3.2).

We determined the sub-localization of all extracellular DAPs. The majority of up-DAPs were typical cytoplasmic proteins, and their proportion was higher at S/ES time-points compared to EE and, especially E-time point (Fig. 3.5C). To investigate the contribution of autolysis processes in the release of cytoplasmic proteins in the extracellular milieu, we compared the autolytic ability of WT and $\Delta sl2\Delta eag$ mutant strains. The results showed that the $\Delta sl2\Delta eag$ mutant strain exhibited a lower autolytic ability compared to the WT (Fig.3.6), indicating that autolysis process has no influence in increased abundance of cytoplasmic proteins in $\Delta sl2\Delta eag$ strain. Besides the typical cytoplasmic proteins, five cell wall (CW)-associated proteins and four typical extracellular proteins showed increased abundance at EE-time point (Table S3.2). These proteins included: (i) the three SLAPs, BslH (B7HYP7), BslP (B7HXN1) and BslM (B7HUB3), which anchored in the SCWP by three SLH domains. BslP could be involved in the peptidoglycan turnover, acting as a murein hydrolase while BslM could be involved in bacterial defense acting as a metallo- β -lactamase (Wang *et al* 2013). (ii) The cell wall peptidase B7HX23 and the bacillolysin B7HS87 (Cerdà-Costa and Xavier Gomis-Rüth, 2014), (iii) the 3 flagellum components B7HLW0, B7HLU5 (FlgC) and B7HLX2, and (iv) the immune inhibitor A (B7HVL4, InhA), are recognized as a virulence factor (Altincicek *et al.*, 2007; Guillemet *et al.*, 2010). The higher abundance of flagellin in the $\Delta sl2\Delta eag$ mutant strain prompted us to evaluate its motility. No motility difference was observed between the $\Delta sl2\Delta eag$ mutant and the WT strain (data not shown).

A



C



B

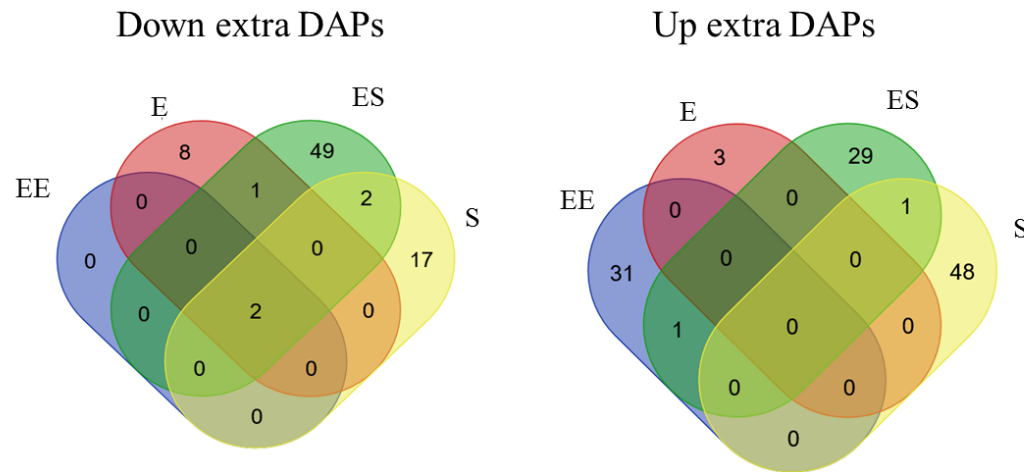


Figure 3.5. Dynamics of proteins of exoprotéome, which differentially accumulated in $\Delta sl2\Delta eag$ compared to parental proteome. (A) Bar chart of up- and down-differentially accumulated proteins (DAPs). The numbers of up- (green) and down- (red) DAPs are shown above each bar. (B) Growth phase distribution of DAPs. (C) Bar chart of up- and down- DAPs classified in unknown, Non cytoplasmic, Extracellular, Cytoplasmic membrane, cytoplasmic and Cell Wall categories..

Figure 3.5C shows that the down-DAPs were mainly CW-associated proteins upon entry into stationary phase but not at late stationary phase (Fig. 3.5C). The 15 CW-associated proteins identified at ES-time point (Table S3.2) include B7HXX6 (possessing a LPxTG motif) that down-accumulated in the mutant strain both at E and ES-time points, the SLAP BslK (B7HZM0) and B7HRI9 that carry a heme-binding near-iron transporter domain (NEAT domain) and could be involved in iron metabolism (Balderas *et al.*, 2012), the SLAP BslT (B7HMJ6), annotated as a murein hydrolase that could support physiological control of the length of *B. cereus* cell chains (Oh *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2013), proteins that could be involved in peptidoglycan turnover and bacterial adhesion (B7HX69, B7HK52 and B7HYB8) and, the type I signal peptidase SipT (SipT, B7HZR3) that could serve to increase the secretory capacity of the bacteria upon entry into stationary phase (Tjalma *et al.*, 1997). A substrate of SipT is pre- β -lactamase, and its low abundance in the $\Delta sl2\Delta eag$ mutant strain could explain why the β -lactamase Bla1 (B7HS58) was significantly less abundant in $\Delta sl2\Delta eag$ compared to WT strain. The other typical extracellular proteins that less accumulated in ES-proteome of mutant strain were the Immune inhibitor A1 protein (InhA1, B7I0J0), described as a potential virulence factor in *B. cereus* (Guillemet *et al.*, 2010; Ramarao and Lereclus, 2005) and seven degradative enzymes (five proteases, sphingomyeline phosphodiesterase and chitinase, Table S3.2). The neutral protease B7HQ08 was less abundant in both ES and S proteome of $\Delta sl2\Delta eag$ cells compared to WT (Table S3.2). In the S-proteome, the protease B7HVA4 was also found significantly less abundant in the $\Delta sl2\Delta eag$ mutant strain. According to its NSAF values, B7HVA4 is a high however abundant protein of the S-exoproteome (Table S3.2).

To determine whether decrease of protease abundance in $\Delta sl2\Delta eag$ mutant strain correlates with decrease of extracellular proteolytic activity, we compared the protease activity of the WT and the $\Delta sl2\Delta eag$ mutant strain. Figure 3.6B shows that $\Delta sl2\Delta eag$ mutant exhibited a lower extracellular proteolytic activity than the WT strain. Finally, the exoproteome data suggest that lack of SLPs disturbs cell wall integrity of *B. cereus* and its capacity to secrete degradative enzymes upon entry into stationary phase, explaining why the exoproteome of mutant strain showed more abundant cytosolic proteins. The high cytoplasmic protein content of S-exoproteome of $\Delta sl2\Delta eag$ mutant strain compared to WT could result from a decrease in proteolytic activity.

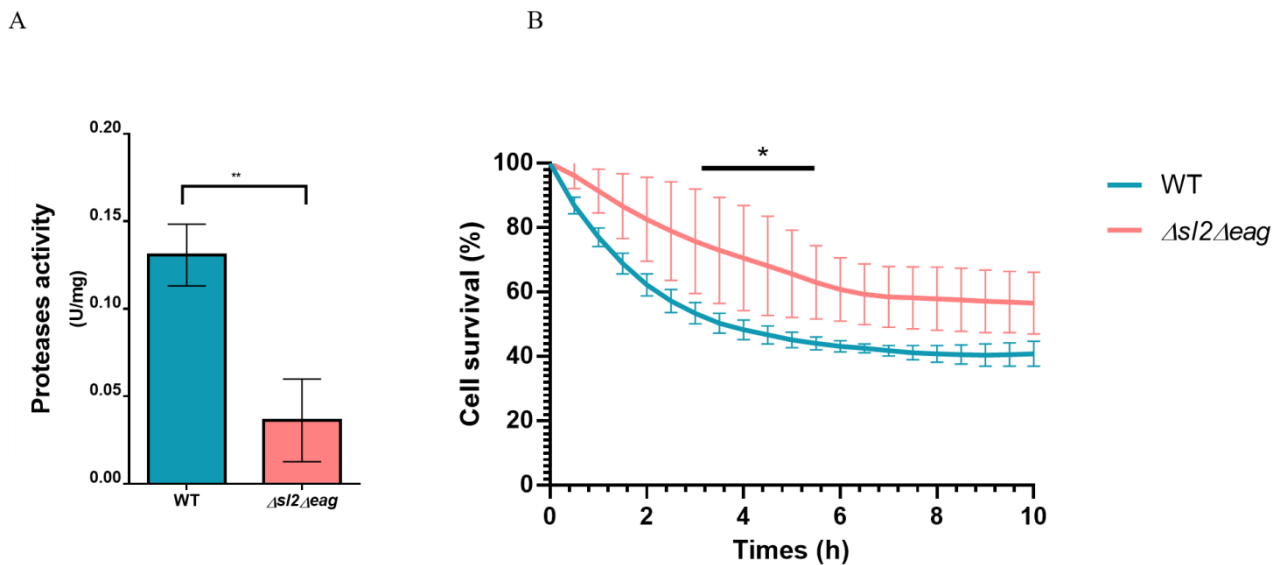


Figure 3.6. Protease and autolytic activity. (A) Extracellular proteolytic activity of $\Delta sl2\Delta eag$ and WT cells. Error bars represent the standard deviation from three biological triplicates.. (B) Autolytic activity of stationary phase WT (blue) and $\Delta sl2\Delta eag$ (red) cells grown in MODG at 37 °C. Cell survival was expressed as $(N/N_0) \times 100$. N_0 is the number of CFU at $T=0$, and N is the number of CFU detected after incubation. The data are mean values obtained from three biological replicates. The bars on the figures indicate the mean standard deviations for the data points. Significant differences ($p < 0.01$) between WT, are indicated with two asterisks **, $P < 0.01$ and *, $P < 0.5$

4.4. Resistance to osmotic and cold stress

The integrity of cell wall is of critical importance for the survival of bacteria to stress, especially osmotic and temperature stresses (Angeles and Scheffers, 2021). Our proteomics data suggested a defect of CW integrity and cellular processes upon entry at the stationary growth phase in the

absence of S-layer. We thus compared the ability of the WT and the $\Delta sl2\Delta eag$ mutant strain to survive to NaCl-mediated osmotic stress and low temperature (Carlin *et al.*, 2013). The results showed that $\Delta sl2\Delta eag$ mutant strain was less resistant to cold temperature (Fig 3.7A), and 5% (w/v) salt stress (Fig 3.7B) than the WT strain.

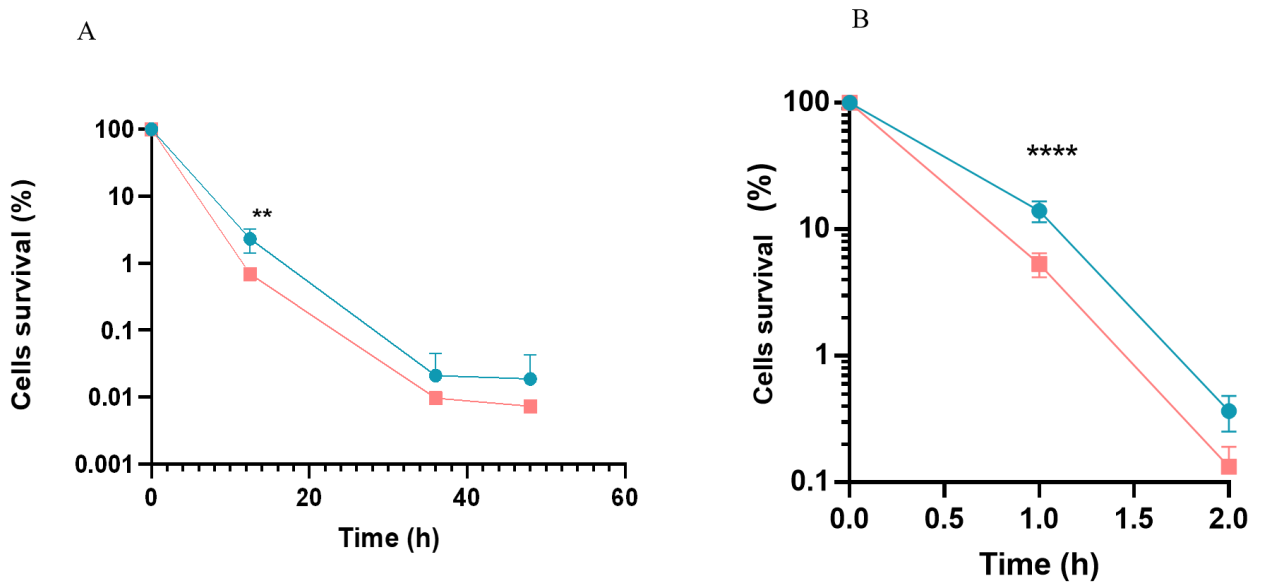


Figure 3.7. Resistance of stationary phase WT and $\Delta sl2\Delta eag$ cells to abiotic stresses. A. Resistance to cold-stress. B. Resistance to 5% NaCl stress. Surviving WT (blue) and $\Delta sl2\Delta eag$ (red) cells were expressed as $(N/N_0) \times 100$. N_0 is the number of CFU at $T=0$, and N is the number of CFU detected after stress. The data are mean values obtained from three biological replicates. The bars on the figures indicate the mean standard deviations for the data points. Statistical analysis was performed by one-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc analysis. ***: $p < 0.001$, ****: $p < 0.0001$

5. Discussion

In nature, bacteria spend the majority of their lifestyle at stationary phase (Gefen *et al.*, 2014). The stationary phase can be caused by nutrient limitation, and several chemical and physical stresses. Survival strategies used by starved bacteria include numerous physiological, morphological and metabolic changes (Morita, 1993, 1988). In our previous work, we showed that *B. cereus* S-layer was enriched in both SL2 and EA1 proteins when growing cells entered the stationary phase, and the S-layer increased the adhesion capacity of starved cells (Boutonnet *et al.*, 2022). In this study, we used a proteomic approach to investigate the impact of S-layer synthesis on stationary growth stage adaptation and the overall regulatory response of *B. cereus*.

The metabolic cost of producing large amounts of SL2 at the exponential growth phase and EA1 at the end of growth has no detrimental effect on *B. cereus* growth in MODG medium, both in term of growth rate and final biomass formation. The MODG medium contains both glucose and amino acids, which are rapidly consumed at the beginning of growth to supply the high metabolic demand (Rosenfeld *et al.*, 2005). We observed that glucose was taken up at a lower rate in $\Delta sl2\Delta eag$ compared to WT strain, while the low-cost glycine and aspartate amino acids were taken up at a higher rate, without any change in acetate overflow. This suggests that lack of S-layer synthesis reduces the need of *B. cereus* for glucose as energy source during the early stage of growth (Laouami *et al.*, 2011; Zampieri *et al.*, 2019), and therefore that S-layer synthesis promotes glucose uptake over amino acid uptake when these nutrients are supplied together.

Bacterial cells take up carbon/energy sources under the instruction of signaling pathways, that ensure that cell growth is properly coordinated with both the availability of carbon/energy and the metabolic cost of biomass synthesis, especially protein synthesis (Stülke and Hillen, 2000). Our results indicated that $\Delta sl2\Delta eag$ mutant cells undergo a metabolic program that requires a poor proteome adjustment when carbon sources are abundant (at the beginning of exponential growth), and a high proteome adjustment when nutrient become depleted, i.e. upon entry into stationary phase. At this stage of growth, several proteins that showed abundance level changes in $\Delta sl2\Delta eag$ mutant compared to WT strain are general stress proteins, belonging to the σB regulon (Hecker and Völker, 2001). These proteins include catalase (KatK), DNA-protecting enzyme Dps2, proteins repairing oxidative damage (Ohr, MoeB, Bcp), proteins repairing DNA (MutL, UvrB, RecJ), chaperones proteins involved in survival during osmotic, acid and oxidative stress (GroES and the proteins of the M42 and M40 families) and antibiotic resistance (SipT, Bla1 and BslM). Some of these proteins (KatB, Dsp2, GroES and SipT) are also known to be regulated by CcpA (Voigt *et al.*, 2007) as well as the histidine-containing protein Hpr (Schumacher *et al.*, 2004), and RpoE (Castaldo *et al.*, 2006; Tobisch *et al.*, 1999; Tojo *et al.*, 2011; van Roosmalen *et al.*, 2004). The biosynthetic proteins encoded by the *ilv-leu* operon, which are less abundant in the mutant strain compared to WT are under the dual control of both CcpA, and CodY (Sonenshein, 2007; Tojo *et al.*, 2005). Several proteolytic enzymes and σF and σE sporulation factors, which are also less abundant in the exoproteome and cellular proteome of the $\Delta sl2\Delta eag$ mutant strain respectively, are under the transcriptional control of Spo0A. We conclude that proteome and exoproteome readjustments in response to lack of S-layer synthesis, is instructed by the interconnected regulons σ^B , CcpA, CodY

and Spo0A, which control the nutrient starvation response and general stress response. Upon activation of these stress responses, bacteria decrease the synthesis of proteins needed for exponential growth, and increase the synthesis of proteins that improve the ability of bacteria to find and import nutrient, protect cells against stresses that would appear in the future, and allow efficient adaptation under long unfavorable condition. This cell reprogramming that helps bacteria to survive starvation and stress conditions is less efficient in the absence of S-layer synthesis since *B. cereus* (i) are less resistant to abiotic stresses such osmotic and low temperature stresses and (ii) secrete low amounts of proteolytic enzymes during the stationary phase, including the metalloprotease inhA1 that is involved in bacterial escape from macrophages (Guillemet *et al.*, 2010). In addition, the lack of S-layer synthesis itself decreases the ability of *B. cereus* to survive starvation by decreasing its adhesion capacity (Boutonnet *et al.*, 2022). Finally, S-layer is a key component of the starvation-survival response in *B. cereus* AH187 since it enhances its stress resistance, adhesion capacity and capacity to degrade macromolecules from the environment, and probably its virulence (Frenzel *et al.*, 2012).

In *B. cereus*, S-layer is probably both an actor and a regulator of the starvation/survival response. As an actor, its synthesis must be regulated at the transcriptional level by the starvation regulons. We showed previously that *eag* genes encoding EA1 were regulated by Spo0A (Rousset *et al.*, 2020). Interestingly, in *B. anthracis*, the expression of homologous genes of *sl2* and *eag* (*sap* and *eag*) is regulated by CodY (Château *et al.*, 2013), and in *B. cereus* AH187, a CodY binding site is present in the promoter region of *eag* (data not shown). Expression of the genes encoding S-layer synthesis is thus probably stimulated by nutrient sensing regulons, and SL2 and EA1 are unquestionably actors of the stress response to starvation. In our conditions, the presence of S-layer is sensed by *B. cereus* cells from early stages of growth, probably indirectly through the sensory perception of the energetic demand required for its synthesis and assembly, and the beneficial effect of S-layer synthesis developed further in time results from mechanisms sensing and responding to nutrient starvation. However, we can not exclude that SL2 and EA1 could act directly as transcriptional regulators of these mechanisms (Mignot *et al.*, 2002). In addition, S-layer is important for surface properties of *B. cereus*, and thus may contribute to the surface sensing mechanisms (Zheng *et al.*, 2021).

In conclusion, by synthesizing S-layer, bacteria improve their survival to starvation, and resistance to stress. Most of the *B. cereus* strains belonging to the phylogenic group III possess an S-layer (Boutonnet *et al.*, 2022). The bacteria of this group live in specific niches and are particularly

virulent and resistant to abiotic stress (Carlin *et al.*, 2013). S-layer may thus be a major contributor of their specificities.

6. Acknowledgment

We thank a lot Claire Dargaignaratz for her efficient technical help. CB's PhD work was supported by a fellowship from the French Ministry for Research and Higher Education (Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur). This work was partly supported by a grant from Avignon University.

Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

7. References

- Altincicek, B., Linder, M., Linder, D., Preissner, K.T., Vilcinskis, A., 2007. Microbial Metalloproteinases Mediate Sensing of Invading Pathogens and Activate Innate Immune Responses in the Lepidopteran Model Host *Galleria mellonella*. *Infect. Immun.* 75, 175–183. <https://doi.org/10.1128/IAI.01385-06>
- Angeles, D.M., Scheffers, D.-J., 2021. The Cell Wall of *Bacillus subtilis*. *Curr. Issues Mol. Biol.* 41, 539–596. <https://doi.org/10.21775/cimb.041.539>
- Armengaud, J., Christie-Oleza, J.A., Clair, G., Malard, V., Duport, C., 2012. Exoproteomics: exploring the world around biological systems. *Expert Rev. Proteomics* 9, 561–575. <https://doi.org/10.1586/epr.12.52>
- Balderas, M.A., Nobles, C.L., Honsa, E.S., Alicki, E.R., Maresso, A.W., 2012. Hal Is a *Bacillus anthracis* Heme Acquisition Protein. *J. Bacteriol.* <https://doi.org/10.1128/JB.00685-12>
- Boutonnet, C., Lyonnais, S., Alpha-Bazin, B., Armengaud, J., Château, A., Duport, C., 2022. Dynamic Profile of S-Layer Proteins Controls Surface Properties of Emetic *Bacillus cereus* AH187 Strain. *Front. Microbiol.* 13.
- Carlin, F., Albagnac, C., Rida, A., Guinebretière, M.-H., Couvert, O., Nguyen-The, C., 2013. Variation of cardinal growth parameters and growth limits according to phylogenetic affiliation in the *Bacillus cereus* Group. Consequences for risk assessment. *Food Microbiol.* 33, 69–76. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.08.014>

- Carvalho, P.C., Yates, J.R., III, Barbosa, V.C., 2012. Improving the TFold test for differential shotgun proteomics. *Bioinformatics* 28, 1652–1654. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts247>
- Castaldo, C., Siciliano, R.A., Muscariello, L., Marasco, R., Sacco, M., 2006. CcpA affects expression of the groESL and dnaK operons in *Lactobacillus plantarum*. *Microb. Cell Factories* 5, 35. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-5-35>
- Cerdà-Costa, N., Xavier Gomis-Rüth, F., 2014. Architecture and function of metallopeptidase catalytic domains. *Protein Sci.* 23, 123–144. <https://doi.org/10.1002/pro.2400>
- Chateau, A., Alpha-Bazin, B., Armengaud, J., Duport, C., 2022. Heme A Synthase Deficiency Affects the Ability of *Bacillus cereus* to Adapt to a Nutrient-Limited Environment. *Int J Mol Sci* 17.
- Château, A., van Schaik, W., Joseph, P., Handke, L.D., McBride, S.M., Smeets, F.M.H., Sonenshein, A.L., Fouet, A., 2013. Identification of CodY Targets in *Bacillus anthracis* by Genome-Wide In Vitro Binding Analysis. *J. Bacteriol.* 195, 1204–1213. <https://doi.org/10.1128/JB.02041-12>
- Christie-Oleza, J.A., Fernandez, B., Nogales, B., Bosch, R., Armengaud, J., 2012. Proteomic insights into the lifestyle of an environmentally relevant marine bacterium. *ISME J.* 6, 124–135. <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.86>
- Clair, G., Lorphelin, A., Armengaud, J., Duport, C., 2013. OhrRA functions as a redox-responsive system controlling toxinogenesis in *Bacillus cereus*. *J. Proteomics* 94, 527–539. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2013.10.024>
- Dartois, V., Djavakhishvili, T., Hoch, J.A., 1997. KapB is a lipoprotein required for KinB signal transduction and activation of the phosphorelay to sporulation in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* 26, 1097–1108. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1997.6542024.x>
- Das, M., Dewan, A., Shee, S., Singh, A., 2021. The Multifaceted Bacterial Cysteine Desulfurases: From Metabolism to Pathogenesis. *Antioxidants* 10, 997. <https://doi.org/10.3390/antiox10070997>
- Dubnau, E., Weir, J., Nair, G., Carter, L., Moran, C., Smith, I., 1988. *Bacillus* sporulation gene *spo0H* codes for sigma 30 (sigma H). *J. Bacteriol.* 170, 1054–1062. <https://doi.org/10.1128/jb.170.3.1054-1062.1988>
- Ehling-Schulz, M., Svensson, B., Guinebretiere, M.-H., Lindbäck, T., Andersson, M., Schulz, A., Fricker, M., Christiansson, A., Granum, P.E., Märklbauer, E., Nguyen-The, C., Salkinoja-Salonen, M., Scherer, S., 2005. Emetic toxin formation of *Bacillus cereus* is restricted to a

- single evolutionary lineage of closely related strains. *Microbiology*, 151, 183–197. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27607-0>
- Frenzel, E., Doll, V., Pauthner, M., Lücking, G., Scherer, S., Ehling-Schulz, M., 2012. CodY orchestrates the expression of virulence determinants in emetic *Bacillus cereus* by impacting key regulatory circuits. *Mol. Microbiol.* 85, 67–88. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2012.08090.x>
- Fujita, M., Losick, R., 2002. An investigation into the compartmentalization of the sporulation transcription factor σ^E in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* 43, 27–38. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02732.x>
- Gefen, O., Fridman, O., Ronin, I., Balaban, N.Q., 2014. Direct observation of single stationary-phase bacteria reveals a surprisingly long period of constant protein production activity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111, 556–561. <https://doi.org/10.1073/pnas.1314114111>
- Guillemet, E., Cadot, C., Tran, S.-L., Guinebretière, M.-H., Lereclus, D., Ramarao, N., 2010. The InhA Metalloproteases of *Bacillus cereus* Contribute Concomitantly to Virulence. *J. Bacteriol.* 192, 286–294. <https://doi.org/10.1128/JB.00264-09>
- Hadjifrangiskou, M., Chen, Y., Koehler, T.M., 2007. The Alternative Sigma Factor σ^H Is Required for Toxin Gene Expression by *Bacillus anthracis*. *J. Bacteriol.* 189, 1874–1883. <https://doi.org/10.1128/JB.01333-06>
- Hartmann, E.M., Armengaud, J., 2014. Shotgun proteomics suggests involvement of additional enzymes in dioxin degradation by *Sphingomonas wittichii* RW1. *Environ. Microbiol.* 16, 162–176. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12264>
- Hecker, M., Völker, U., 2001. General stress response of *Bacillus subtilis* and other bacteria, in: *Advances in Microbial Physiology*. Academic Press, pp. 35–91. [https://doi.org/10.1016/S0065-2911\(01\)44011-2](https://doi.org/10.1016/S0065-2911(01)44011-2)
- Henkin, T.M., 1996. The role of the CcpA transcriptional regulator in carbon metabolism in *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 135, 9–15. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1996.tb07959.x>
- Karmazyn-Campelli, C., Rhayat, L., Carballido-López, R., Duperrier, S., Frandsen, N., Stragier, P., 2008. How the early sporulation sigma factor σ^F delays the switch to late development in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* 67, 1169–1180. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06121.x>
- Laouami, S., Messaoudi, K., Alberto, F., Clavel, T., Duport, C., 2011. Lactate Dehydrogenase A Promotes Communication between Carbohydrate Catabolism and Virulence in *Bacillus cereus*. *J. Bacteriol.* 193, 1757–1766. <https://doi.org/10.1128/JB.00024-11>

- Lee, M.Y., Lee, D.W., Joo, H.K., Jeong, K.H., Lee, J.Y., 2019. Structural analysis of the manganese transport regulator MntR from *Bacillus halodurans* in apo and manganese bound forms. PLOS ONE 14, e0224689. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0224689>
- Lewis, P.J., Magnin, T., Errington, J., 1996. Compartmentalized distribution of the proteins controlling the prespore-specific transcription factor σ^F of *Bacillus subtilis*. Genes Cells 1, 881–894. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2443.1996.750275.x>
- Lücking, G., Dommel, M.K., Scherer, S., Fouet, A., Ehling-Schulz, M. 2009, 2009. Cereulide synthesis in emetic *Bacillus cereus* is controlled by the transition state regulator AbrB, but not by the virulence regulator PlcR. Microbiology 155, 922–931. <https://doi.org/10.1099/mic.0.024125-0>
- Madeira, J.-P., Alpha-Bazin, B., Armengaud, J., Duport, C., 2015. Time dynamics of the *Bacillus cereus* exoproteome are shaped by cellular oxidation. Front. Microbiol. 6, 342. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00342>
- Madeira, J.-P., Alpha-Bazin, B.M., Armengaud, J., Duport, C., 2017. Methionine Residues in Exoproteins and Their Recycling by Methionine Sulfoxide Reductase AB Serve as an Antioxidant Strategy in *Bacillus cereus*. Front. Microbiol. 8.
- Mignot, T., Mesnage, S., Couture-Tosi, E., Mock, M., Fouet, A., 2002. Developmental switch of S-layer protein synthesis in *Bacillus anthracis*. Mol. Microbiol. 43, 1615–1627. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02852.x>
- Morita, R.Y., 1993. Bioavailability of Energy and the Starvation State, in: Kjelleberg, S. (Ed.), Starvation in Bacteria. Springer US, Boston, MA, pp. 1–23. https://doi.org/10.1007/978-1-4899-2439-1_1
- Morita, R.Y., 1988. Bioavailability of energy and its relationship to growth and starvation survival in nature. Can. J. Microbiol. 34, 436–441. <https://doi.org/10.1139/m88-076>
- Oh, S.-Y., Lunderberg, J.M., Chateau, A., Schneewind, O., Missiakas, D., 2016. Genes Required for *Bacillus anthracis* Secondary Cell Wall Polysaccharide Synthesis. J. Bacteriol. <https://doi.org/10.1128/JB.00613-16>
- Raddadi, N., Cherif, A., Mora, D., Brusetti, L., Borin, S., Boudabous, A., Daffonchio, D., 2005. The autolytic phenotype of the *Bacillus cereus* group. J. Appl. Microbiol. 99, 1070–1081. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02713.x>
- Ramarao, N., Lereclus, D., 2005. The InhA1 metalloprotease allows spores of the *B. cereus* group to escape macrophages. Cell. Microbiol. 7, 1357–1364. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2005.00562.x>

- Rosenfeld, E., Duport, C., Zigha, A., Schmitt, P., 2005. Characterization of aerobic and anaerobic vegetative growth of the food-borne pathogen *Bacillus cereus* F4430/73 strain. *Can. J. Microbiol.* 51, 149–158. <https://doi.org/10.1139/w04-132>
- Rousset, L., Alpha-Bazin, B., Château, A., Armengaud, J., Clavel, T., Berge, O., Duport, C., 2020. Groundwater promotes emergence of asporogenic mutants of emetic *Bacillus cereus*. *Environ. Microbiol.* 22, 5248–5264. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15203>
- Schumacher, M.A., Allen, G.S., Diel, M., Seidel, G., Hillen, W., Brennan, R.G., 2004. Structural Basis for Allosteric Control of the Transcription Regulator CcpA by the Phosphoprotein HPr-Ser46-P. *Cell* 118, 731–741. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.08.027>
- Schweinitzer, T., Josenhans, C., 2010. Bacterial energy taxis: a global strategy? *Arch. Microbiol.* 192, 507–520. <https://doi.org/10.1007/s00203-010-0575-7>
- Singh, A., Kumar, N., Tomar, P.P.S., Bhose, S., Ghosh, D.K., Roy, P., Sharma, A.K., 2017. Characterization of a bacterioferritin comigratory protein family 1-Cys peroxiredoxin from *Candidatus Liberibacter asiaticus*. *Protoplasma* 254, 1675–1691. <https://doi.org/10.1007/s00709-016-1062-z>
- Sonenshein, A.L., 2007. Control of key metabolic intersections in *Bacillus subtilis*. *Nat. Rev. Microbiol.* 5, 917–927. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1772>
- Stülke, J., Hillen, W., 2000. Regulation of Carbon Catabolism in *Bacillus* Species. *Annu. Rev. Microbiol.* 54, 849–80. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.54.1.849>
- Szurmant, H., Mohan, M.A., Imus, P.M., Hoch, J.A., 2007. YycH and YycI interact to regulate the essential YycFG two-component system in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 189, 3280–3289. <https://doi.org/10.1128/JB.01936-06>
- Tobisch, S., Zühlke, D., Bernhardt, J., Stülke, J., Hecker, M., 1999. Role of CcpA in Regulation of the Central Pathways of Carbon Catabolism in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 181, 6996–7004. <https://doi.org/10.1128/JB.181.22.6996-7004.1999>
- Tojo, S., Satomura, T., Matsuoka, H., Hirooka, K., Fujita, Y., 2011. Catabolite Repression of the *Bacillus subtilis* FadR Regulon, Which Is Involved in Fatty Acid Catabolism ∇ . *J. Bacteriol.* 193, 2388–2395. <https://doi.org/10.1128/JB.00016-11>
- Tojo, S., Satomura, T., Morisaki, K., Deutscher, J., Hirooka, K., Fujita, Y., 2005. Elaborate transcription regulation of the *Bacillus subtilis* ilv-leu operon involved in the biosynthesis of branched-chain amino acids through global regulators of CcpA, CodY and TnrA. *Mol. Microbiol.* 56, 1560–1573. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04635.x>
- van Roosmalen, M.L., Geukens, N., Jongbloed, J.D.H., Tjalsma, H., Dubois, J.-Y.F., Bron, S., van Dijl, J.M., Anné, J., 2004. Type I signal peptidases of Gram-positive bacteria. *Biochim.*

- Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res., Protein Export/Secretion in Bacteria 1694, 279–297.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2004.05.006>
- Villas-Bôas, S.G., Smart, K.F., Sivakumaran, S., Lane, G.A., 2011. Alkylation or Silylation for Analysis of Amino and Non-Amino Organic Acids by GC-MS? *Metabolites* 1, 3–20.
<https://doi.org/10.3390/metabo1010003>
- Voigt, B., Hoi, L.T., Jürgen, B., Albrecht, D., Ehrenreich, A., Veith, B., Evers, S., Maurer, K.-H., Hecker, M., Schweder, T., 2007. The glucose and nitrogen starvation response of *Bacillus licheniformis*. *PROTEOMICS* 7, 413–423. <https://doi.org/10.1002/pmic.200600556>
- Wang, Y.-T., Oh, S.-Y., Hendrickx, A.P.A., Lunderberg, J.M., Schneewind, O., 2013. *Bacillus cereus* G9241 S-Layer Assembly Contributes to the Pathogenesis of Anthrax-Like Disease in Mice. *J. Bacteriol.* 195, 596–605. <https://doi.org/10.1128/JB.02005-12>
- Zampieri, M., Hörl, M., Hotz, F., Müller, N.F., Sauer, U., 2019. Regulatory mechanisms underlying coordination of amino acid and glucose catabolism in *Escherichia coli*. *Nat. Commun.* 10, 3354. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11331-5>
- Zheng, S., Bawazir, M., Dhall, A., Kim, H.-E., He, L., Heo, J., Hwang, G., 2021. Implication of Surface Properties, Bacterial Motility, and Hydrodynamic Conditions on Bacterial Surface Sensing and Their Initial Adhesion. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 9.

8. Supplementary data

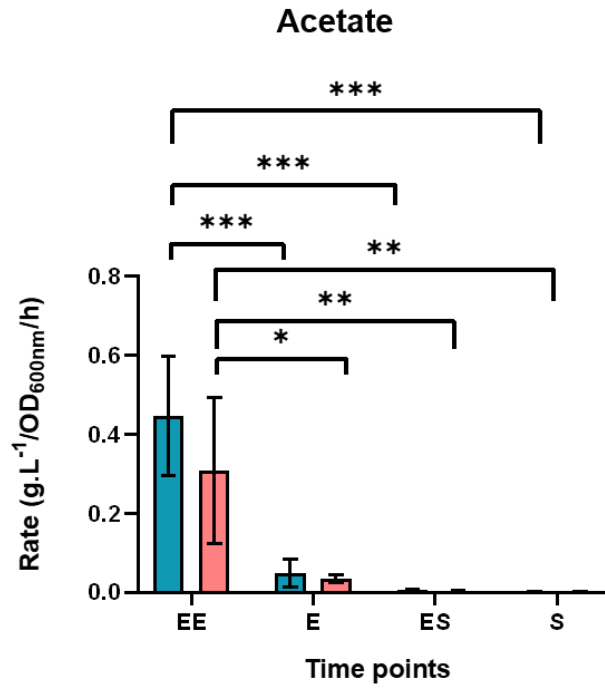
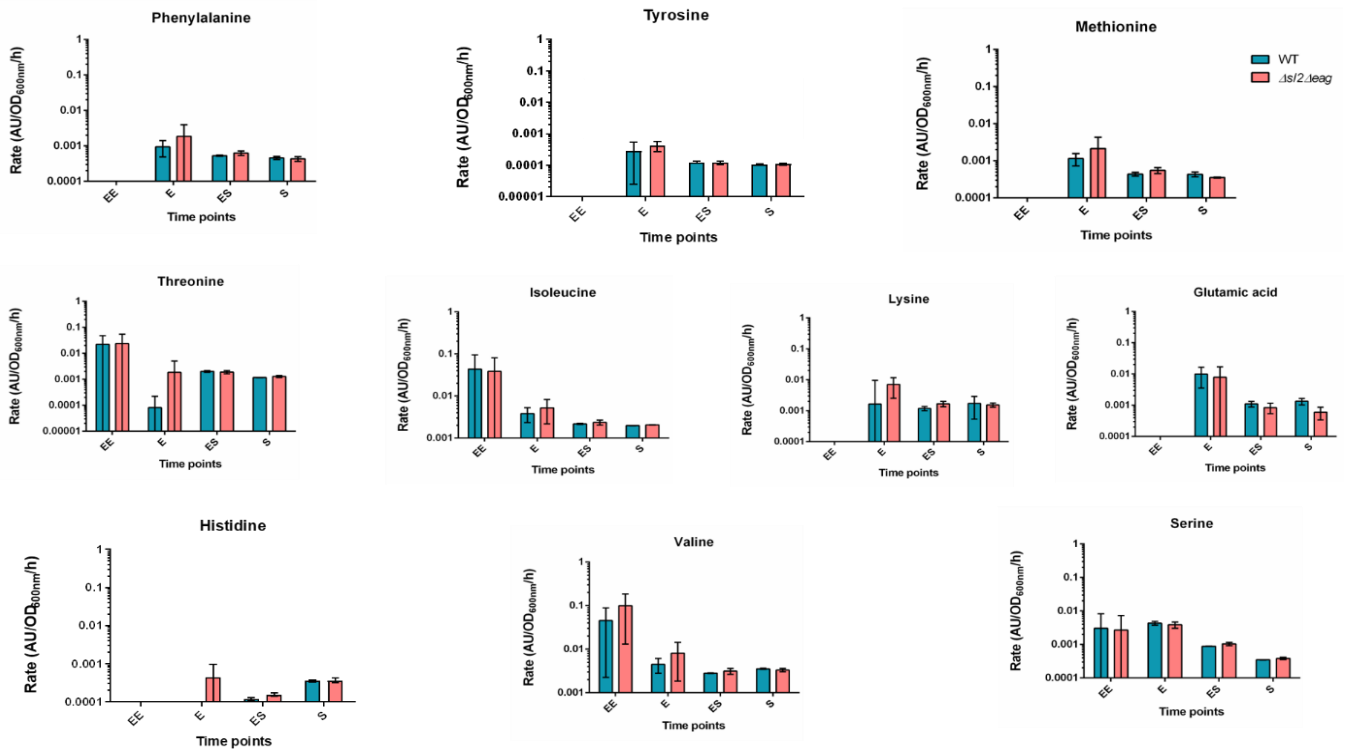


Figure S3.1. Rate of the acetate release by WT (blue) and $\Delta sl2\Delta eag$ (red) cells at early exponential (EE), exponential (E), early stationary (ES), stationary (S) growth phases. **, $P < 0.01$.



Intracellular proteome

Exoproteome

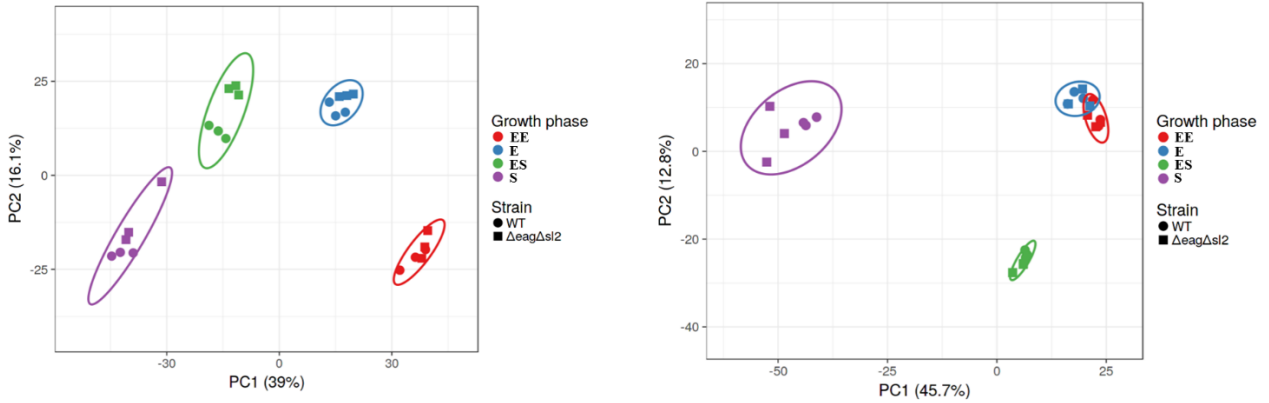


Figure S3.2 Principal component Analysis (PCA) of WT and $\Delta sl2\Delta eag$ intracellular proteome (A) and exoproteome (B) data. The axis labels indicate the percentage of the total variance, which is explained by the first (PC1) and the second component (PC2)

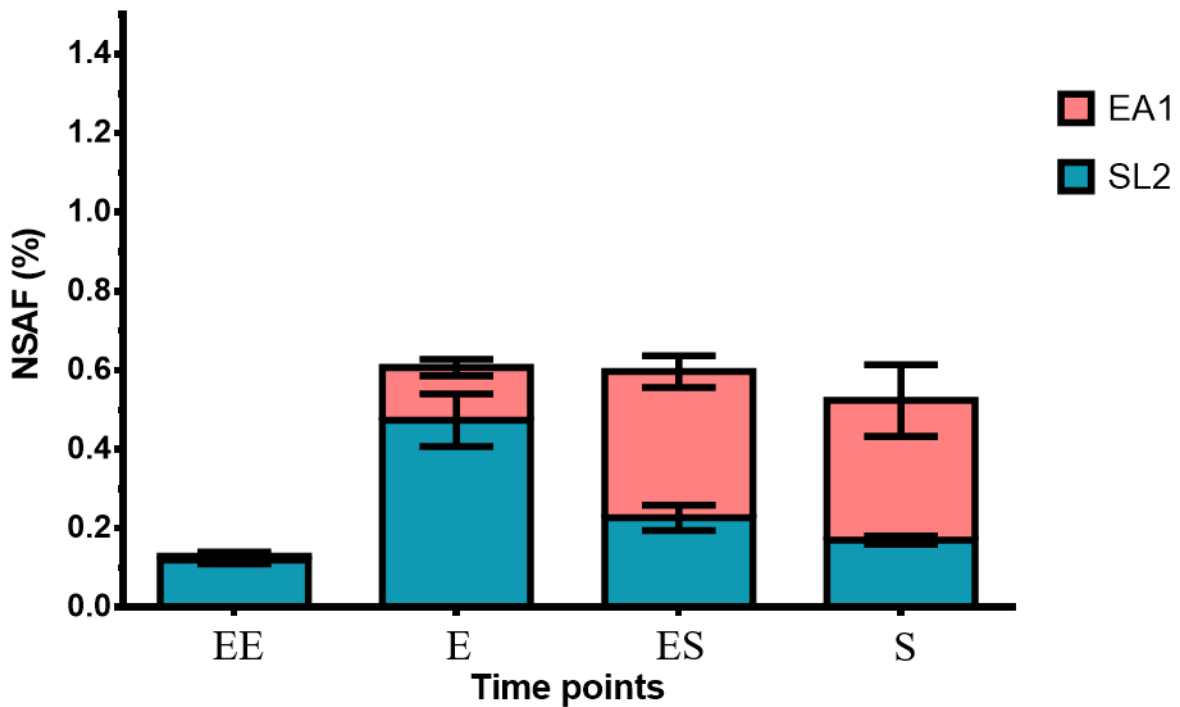


Figure S3.3. Temporal-dynamics of EA1 (red) and SL2 (blue) abundance in the cellular proteome of WT cells at early exponential (EE), exponential (E), early stationary (ES) and stationary (S) growth phases. Normalized Spectral Abundance Factor (NSAF) values were used to reflect relative abundances of proteins identified in the samples. Error bars indicate the standard deviation for three biological replicates.

III. Expériences complémentaires

Nous avons remarqué que la souche *B. cereus* WT et la souche mutante $\Delta sl2\Delta eag$ dépourvu de couche S n'absorbent pas les nutriments à la même vitesse en milieu MODG. Par ailleurs, chez *B. anthracis*, l'expression des gènes *sap* et *eag* dépend du milieu (Mignot *et al.*, 2003b). Nous nous sommes donc interrogées sur l'impact de la composition du milieu sur la production et la proportion des SLP de *B. cereus* AH187.

1. Matériels et méthodes

1.1. Croissances dans différents milieux et extraction de couche S

La souche sauvage WT et la souche mutante $\Delta sl2\Delta eag$ ont été cultivées dans quatre milieux différents : le milieu défini MODG, le milieu MODG sans minéraux, le milieu LB et le milieu BHI. Les croissances ont été réalisées, à partir de précultures de nuit, en microplaques de 96 puits dans un volume de 200 μ L à 37°C durant 24h sous agitation de 200 rpm.

La production de couche S dans ces conditions a également été analysée par immunoblot. Les souches WT et $\Delta sl2\Delta eag$ ont été cultivées dans 100 ml de milieu BHI, LB et MODG en Erlen à 37°C sous agitation (200 rpm) à partir de précultures de nuit. Des échantillons (5mL) ont été prélevés à plusieurs temps de croissance : en début de phase exponentielle (EE), en milieu de phase exponentielle (E), en début de phase stationnaire (ES) et de phase stationnaire (S). Puis les couches S ont été extraites comme décrit précédemment (Boutonnet *et al.*, 2022).

Pour l'analyse protéomique, les cultures des souches WT et $\Delta sl2\Delta eag$ ont été réalisées dans 600mL de milieu MODG sans minéraux à 37°C sous agitation à partir de précultures de nuit. Des échantillons de 50 mL ont été prélevés à plusieurs temps de la croissance (EE, E, ES et S) et la couche S a été extraite comme décrit ci-dessus.

1.2. Immunoblot et analyse protéomique de l'extraction de couche S

Les protéines de surface ont été extraite comme précédemment décrit (Boutonnet *et al.*, 2022). Les protéines extraites des différents aliquotes prélevés pendant la croissance en LB, MODG et BHI ont été quantifiées à l'aide du kit de dosage BCA (Pierce) afin de charger dans le gel SDS-PAGE la même quantité de protéines. Les SLP ont été détectés par western blot (WB) avec des anticorps de lapin anti-SL2 (1:10 000) ou anti-EA1 (1:10 000) appliqués pendant 2 h à température ambiante (Boutonnet et al, 2022). Les complexes immuns ont été révélés après une incubation avec des anticorps secondaires anti-lapin conjugués à la HRP et coloration à l'ECL (Biorad). Les images ont été analysées par Molecular Imager ® ChemiDoc™ XRS+ (Bio-Rad, et traitées avec le logiciel Image Lab™.

Les SLP extraites lors des croissances en MODG sans minéraux ont été analysées en protéomique, en collaboration avec l'équipe du CEA de Bagnols-sur-Cèze (Jean Armengaud et Béatrice Alpha-Bazin). La méthode a été décrite dans les travaux précédents (Boutonnet *et al.*, 2022).

2. Résultats

2.1. Croissance des souches dans les différents milieux.

Afin de déterminer l'impact de la synthèse de la couche S sur la croissance de *B. cereus* en fonction des milieux, nous avons mesuré les deux paramètres de croissance, la biomasse finale mesurée par la DO_{600nm} et la vitesse maximale de croissance (μ_{max}) des souches WT et $\Delta sl2\Delta eag$ dans le MODG, le LB, le MODG sans minéraux et le BHI. Quel que soit le milieu, la biomasse finale obtenue est la même pour la souche mutante et la souche sauvage. Les vitesses maximales des deux souches de sont pas significativement différentes en MODG et en BHI. En LB, la vitesse maximale de la souche mutante est légèrement plus élevée que celle de la souche WT (Fig. 3.8). Donc la couche S serait un léger désavantage pour la croissance de *B. cereus* dans ce milieu. En revanche, la souche mutante montre une vitesse maximale nettement moins élevée que dans la souche WT en MODG sans minéraux. En MODG sans minéraux, la synthèse de la couche S accélérerait la croissance de *B. cereus*.

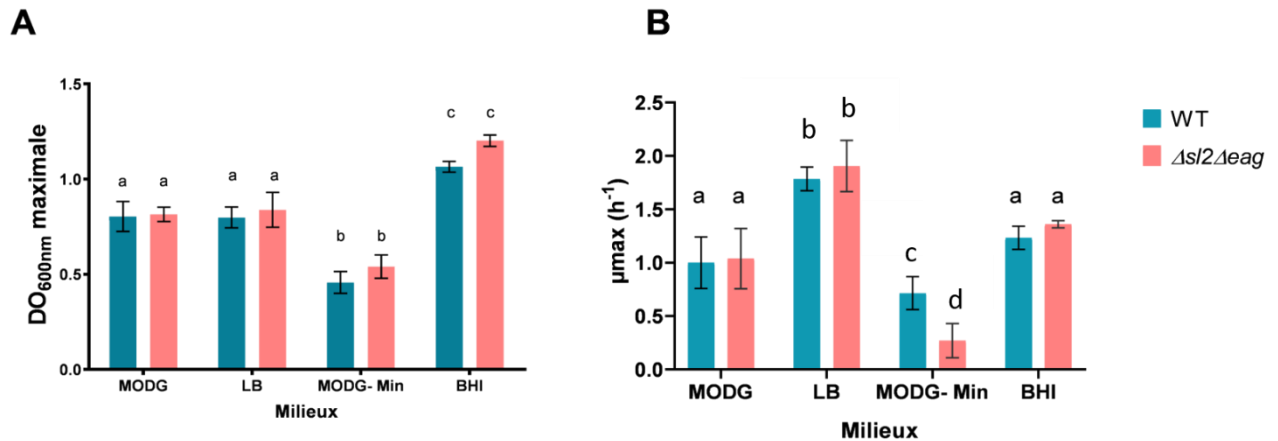


Figure 3.8. Paramètres de croissance en fonction des milieux. (A) Biomasse finale et vitesse maximale (B) μ_{max} finaux des souches WT et $\Delta sl2\Delta eag$ lors de croissance en microplaque en MODG, LB, MODG sans minéraux et BHI.

2.2. Proportion de EA1 et SL2 en fonction du milieu par analyses protéomiques et biochimiques

Les proportions de SL2 et EA1 à différentes phases de la croissance (EE, E et S) dans un milieu carencé en minéraux (MODG sans minéraux) ont été quantifiées par une analyse shotgun (LC-MS/MS). Les résultats montrent que les quantités des deux SLP et leur proportion respective varient en fonction du temps (Fig. 3.9). Les proportions calculées en NSAF de SL2 et EA1 augmentent au cours de la croissance. Cependant SL2 est largement plus abondante qu'EA1 quelle que soit la phase de croissance, avec un taux inférieur à 5% en début de phase exponentielle (EE) pour arriver à plus de 10% des protéines totales en phase stationnaire (S). Ces résultats diffèrent de la dynamique des SLP observée dans le MODG, à savoir que SL2 est davantage produit en début de croissance qu'en fin de croissance alors que EA1 augmente sa proportion au cours de la croissance et devient la SLP prédominante en fin de croissance (Boutonnet *et al.*, 2022).

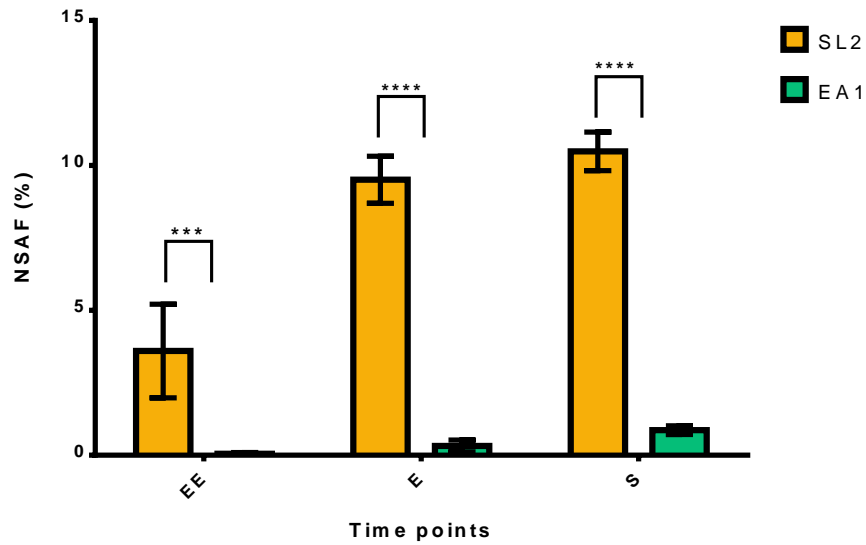


Figure 3.9. Proportions de SL2 et de EA1 au cours de la croissance de *B. cereus* AH187 dans un milieu carencé en minéraux.

Pour compléter ce résultat, nous avons également réalisé des extractions de SLP au cours de la croissance de *B. cereus* AH187 dans 100mL de LB, de BHI et de MODG avec minéraux. Les Western Blot présentés en figure 3.10 montrent qu'en LB, les productions de SL2 et EA1 sont comparables à celles obtenues en MODG respectivement (Boutonnet *et al.*, 2022). En BHI, la proportion de EA1 et de SL2 augmente au cours du temps. La dynamique de SL2 en BHI diffère de celle observée en LB et en MODG.

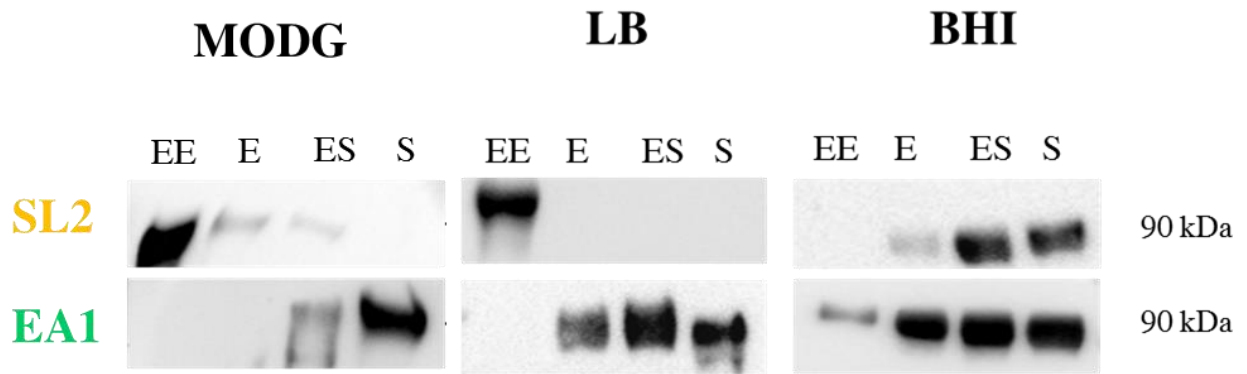


Figure 3.10. Extraction des deux SLP, SL2 et EA1, lors de la croissance en milieu MODG, LB, et BHI de *B. cereus* AH187, révélée par Western Blot.

Ces résultats confirment que la production et la dynamique des SLP en fonction du temps dépendent aussi du milieu de culture. Donc, il semblerait que les gènes de couches S *sl2* et *eag* ne soient pas régulés par les mêmes voies de régulation. Ces résultats seront discutés dans la discussion générale (Chapitre 4).

Chapitre 4

Chapitre 4 : Discussion générale et conclusions

I. Contexte

Les travaux présentés dans ce manuscrit ont permis d'identifier et de caractériser la couche S de *B. cereus* AH187 composée de SL2 et EA1, et d'obtenir des pistes sur son rôle. Pour caractériser et étudier les fonctions de la couche S et de chacune des protéines qui la composent nous avons tenté de construire trois mutants de délétion : les mutants délétés de *sl2* ($\Delta sl2$), *eag* (Δeag) et des deux gènes *sl2* et *eag* ($\Delta sl2 \Delta eag$). Malgré de nombreuses tentatives, nous n'avons pas réussi à construire le simple mutant Δeag . Nous avons alors choisi de nous focaliser sur le rôle global de la couche S, en comparant les phénotypes du double mutant $\Delta sl2 \Delta eag$ à ceux de la souche parentale.

II. Dynamique des SLP à la surface de la cellule végétative

1. Production différentielle de SL2 et EA1

La synthèse de SL2 et EA1 est dépendante de la phase de croissance. Bien que les SLP n'aient pas la même dynamique d'accumulation à la surface de la bactérie, EA1 et SL2 sont présentes à la surface à toutes les phases de la croissance. Ce résultat est en accord avec celui observé chez *B. anthracis* (Mignot *et al.*, 2002). Chez *B. anthracis*, SL2 est produite avant EA1, et l'accumulation de EA1 à la surface de la bactérie provoquerait le relargage de SL2 dans le milieu de culture (Mignot *et al.*, 2002). Chez *B. cereus* AH187, nos résultats suggèrent que EA1 s'accumule au sein d'un réseau de SL2, qui s'établit dès le début de la phase exponentielle de croissance. Les protéines SL2 et EA1 ont été détectées dans l'exoprotéome de *B. cereus*, probablement du fait de la technique employée pour récolter le surnageant et/ou de la lyse naturelle des cellules dans le milieu.

2. Répartition des deux SLP

Nous nous sommes intéressées à la localisation des protéines au cours de la croissance. Tout d'abord nous avons confirmé par MET que la couche S entourait uniformément la surface quelle que soit la phase de croissance chez *B. cereus* AH187.

Par ailleurs, les images obtenues par immunofluorescence au microscope optique suggèrent que la répartition des deux protéines de couche S à la surface de la bactérie est différente : SL2 est répartie sur toute la surface de la bactérie et de manière plus prononcée aux pôles, tandis que EA1 semble s'accumuler sous forme d'amas isolés (Fig.4.1). Pour confirmer ces différences de répartition (uniforme ou amas), il aurait été intéressant de visualiser les protéines par immuno-électron microscopie (Mesnage *et al.*, 1997). La technique de microscopie de fluorescence à balayage STED (stimulated emission depletion), une autre méthode de visualisation des protéines permettant d'obtenir des images en super-résolution aurait pu également être utilisée. Cette technique repose sur la désexcitation sélective des fluorophores à la périphérie du point focal réduisant considérablement la zone émettant de la fluorescence. La microscopie STED aurait permis de confirmer avec une précision nanométrique la répartition de chacune des deux SLP à la surface, en particulier les amas de EA1 (Comerci *et al.*, 2019; Müller *et al.*, 2012). De plus, il a été observé par immunofluorescence que la répartition de EA1 sur la surface était différente en présence et en absence de SL2. En effet, EA1 apparaît plus tôt, et ne se dispose pas en forme d'amas quand SL2 n'est pas synthétisée. Bien que EA1 soit synthétisé en absence de SL2, il semble que SL2 soit nécessaire pour sa disposition en amas à la surface. Donc l'insertion de EA1 se réaliserait au sein d'un réseau de SL2 préétabli.

Chez *B. anthracis*, Sap et EA1 présentent une activité muréine hydrolase clivant le peptidoglycane pour séparer les chaînes des bacilles (Ahn *et al.*, 2006). Cependant, nos observations au microscope optique (chapitre 2) et au microscope électronique à balayage (données non montrées) ne présentent aucune différence : les mutants $\Delta sl2$ et $\Delta sl2\Delta eag$ ne présentent aucun défaut de morphologie ou d'élongation prononcée des cellules en phase exponentielle, comme c'est le cas pour le mutant Δsap chez *B. anthracis*. L'activité muréine hydrolase des protéines SL2 et EA1 pourrait être testée par zymographie (Ahn *et al.*, 2006). Il est possible que l'activité muréine hydrolase des SLP puisse nécessiter l'aide d'autres protéines de surface qui possèdent des domaines SLH permettant leur ancrage au SCWP (SLAPs ou BSL) comme BslO chez *B. anthracis* (Kern *et al.*, 2012).

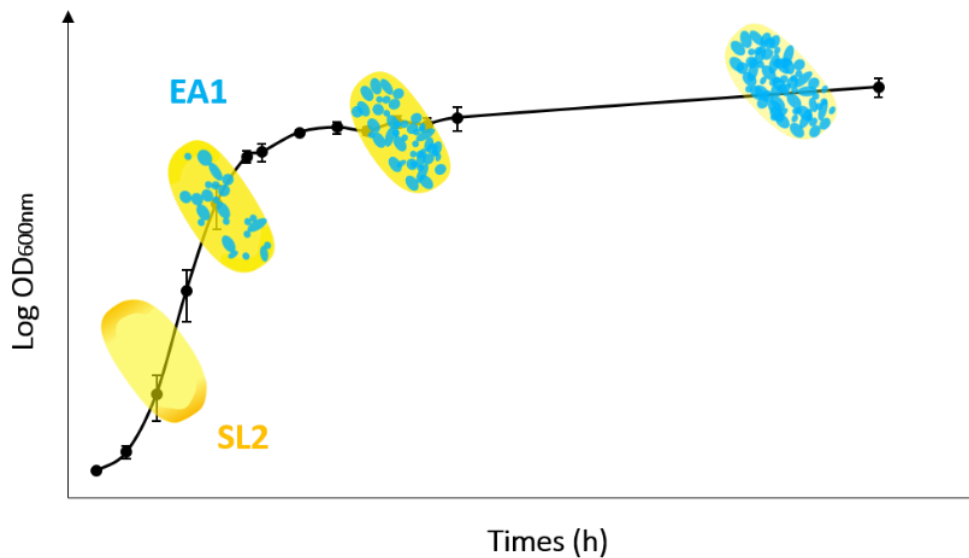


Figure 4.1. Répartition de SL2 et EA1 à la surface au cours de la croissance dans le milieu MODG à 37°C

En conclusion, il semblerait que la production temporelle de SL2 et EA1 au cours de la croissance conditionnerait l'assemblage de la couche S. La production et la sécrétion des protéines de la couche S est coûteuse en énergie, il est donc probable que l'assemblage de la couche S procure un avantage sélectif pour la bactérie.

III. La couche S, élément clé de l'adaptation

1. Les propriétés de surfaces induites par la couche S semblent influencer sur la vitesse d'adhésion

Nos travaux montrent que la couche S accroît la vitesse d'adhésion de *B. cereus* en fin de croissance sur une surface abiotique. L'adhésion des bactéries dépend de la combinaison de plusieurs facteurs notamment des charges de la surface, du type de surface, de la topographie, et de la rigidité. En effet, la surface de *B. cereus* devient plus hydrophobe au cours de la croissance, quand EA1 s'accumule à la surface. La couche S, par son caractère hydrophobe accroît la vitesse d'adhésion de *B. cereus* au polystyrène, polymère également hydrophobe (chapitre 2).

En plus d'étudier le caractère hydrophile/hydrophobe conféré par la couche S à *B. cereus*, nous sommes intéressées à l'élasticité de la surface. Une technique à l'aide de l'AFM a été mise au point pour comparer l'élasticité de surface de *B. cereus* en présence et absence de couche S. Nos résultats ont montré qu'en absence de couche S, la surface des bactéries récoltées en phase stationnaire est moins élastique. Il est pour l'instant difficile de comparer nos résultats avec d'autres études sur l'élasticité de surface, car les mesures dépendent de nombreux paramètres, notamment du milieu, de la méthode de fixation, des caractéristiques du microscope mais également des protéines avec lesquelles la pointe interagit (Dufrêne, 2002; Fioravanti *et al.*, 2022; Mathélié-Guinlet *et al.*, 2020). Une étude récente sur les couches S de *B. anthracis* a permis de comparer l'élasticité de surface de la souche Sterne 34F2 (pXO1⁺; pXO2⁻) aux deux simples mutants RBA91 Δ sap et SM91 Δ eag construits à partir de la souche 9131 (pXO1⁻; pXO2⁻) (Etienne-Toumelin *et al.*, 1995; Fioravanti *et al.*, 2022; Mesnage *et al.*, 1997). Il est à noter que dans ce travail les mutants ne sont pas isogéniques. Cependant, les résultats montrent que l'élasticité de surface évolue au cours de la croissance pour la souche Sterne comme pour la souche mutante Δ sap. Il serait intéressant de mener une étude similaire chez *B. cereus* en utilisant le double mutant Δ sl2 Δ eag et les simples mutants Δ sl2 et Δ eag. Cependant, il pourra être difficile de comparer les résultats obtenus chez *B. cereus* et *B. anthracis* car la composition en acides aminés des protéines Sap et SL2 est très différente. En effet, Sap et SL2 présentent seulement 33% d'homologie correspondant aux domaines SLH très conservés (Boutonnet *et al.*, 2022). De plus, contrairement à ce qui a été décrit dans l'étude de Fioravanti *et al.*, nous avons travaillé avec des cellules mobiles non-fixées. Par ailleurs, d'autres études qui se sont intéressées aux propriétés élastiques des molécules (polysaccharides, couche S) suggèrent que les forces d'élasticité ou d'élongation mesurées reflètent l'étirement et la flexibilité de ces molécules (Müller *et al.*, 1996; van der Aa *et al.*, 2001). Il a été suggéré que les propriétés élastiques de ces longues molécules de surface peuvent jouer un rôle dans la modulation des événements cellulaires telles que l'agrégation et l'adhésion cellulaire (van der Aa *et al.*, 2001).

Malgré une adhésion plus rapide induite par la couche S, cette dernière ne semble pas impacter la capacité de *B. cereus* à former des biofilms. Cependant, il a été décrit précédemment que la capacité à former des biofilms est négativement corrélée à la présence de couche S au sein du groupe *B. cereus* sl (Auger *et al.*, 2009). Nos résultats ne confirment pas cette corrélation. Une explication possible est que les souches qui possèdent une couche S se développent dans des environnements dans lesquels elles n'ont pas besoin de former de biofilms. Il est possible également que les conditions utilisées dans notre étude n'aient pas permis de mettre en évidence une différence de formation de biofilm.

En conclusion la couche S change les propriétés de surface de *B. cereus* AH187 induisant une adhésion plus rapide à une surface abiotique en phase stationnaire. L'adhésion étant un paramètre d'adaptation des bactéries à la phase stationnaire, nous nous sommes interrogés sur le rôle global de la couche S dans la capacité d'adaptation de *B. cereus* AH187 à la phase stationnaire.

2. La couche S, élément essentiel à l'adaptation générale à la phase stationnaire

Dans nos conditions de culture, l'entrée en phase stationnaire est causée par la limitation en sources de carbone et d'énergie, et en particulier par la limitation en glucose et acides aminés (Chapitre 3). La synthèse de la couche S s'accompagne d'une consommation plus rapide du glucose comparativement aux acides aminés en début de croissance, quand ils sont disponibles ensemble dans le milieu. Ceci est révélateur du cout énergétique de la synthèse de la couche S. Bien qu'énergétiquement couteuse, la synthèse de la couche S semble apporter un avantage sélectif en phase stationnaire (Chapitre 3). L'analyse protéomique comparative entre la souche parentale et la souche $\Delta sl2\Delta eag$ dépourvue de couche S a révélé que la couche S régula le protéome et l'exoprotéome de *B. cereus*. Cette régulation semble être orchestrée par les régulateurs interconnectés σB , σH , CcpA, CodY et Spo0A qui contrôlent la réponse générale aux stress et aux stress nutritif et énergétique lors de l'entrée en phase stationnaire (Gao *et al.*, 2021; Piggot and Hilbert, 2004; Sonenshein, 2005). L'activation de ces réponses aux stress permet à la bactérie une adaptation efficace lors de conditions défavorables de longue durée. En plus de l'adaptation aux stress nutritif, la couche S pourrait contribuer à l'adaptation à d'autres stress environnementaux, tels que le stress salin et le stress au froid (Chapitre 3).

En conclusion, en tant qu'acteur de la réponse à la phase stationnaire, la couche S pourrait jouer un rôle de protection contre différents stress environnementaux.

3. Les protéines SL2 et EA1 sont-elles régulées de la même manière ?

3.1. SL2 dépendante du milieu

Si l'on prend en compte toutes les données de protéomique et les résultats de Western Blot obtenus dans ce travail (Chapitres 2 et 3), il apparaît que la quantité de SL2 dans la couche S dépend de la phase de croissance, mais également de la composition du milieu. En milieu défini riche en acides aminés et glucose (MODG) et en milieu non défini LB, le taux de synthèse de SL2 semble être maximal en début de croissance alors qu'en milieu non défini BHI, sa synthèse est maximale en fin de croissance. En milieu appauvri en minéraux (MODG sans minéraux), le taux de synthèse de SL2 semble être constant tout au long de la croissance.

3.2. SL2 et EA1 dépendantes de la phase de croissance

Contrairement à SL2, la synthèse temporelle de EA1 ne dépend pas du milieu. La production de EA1 augmente au cours de la croissance quel que soit le milieu. Il semblerait donc que SL2 et EA1 ne soient pas régulés de la même manière.

Chez *B. anthracis*, le remodelage des SLP à la surface et la répartition dynamique de Sap et EA1 lors de la croissance en milieu riche (BHI) sont contrôlés par de nombreux régulateurs. La transcription est régulée par les facteurs σA pour *sap* et σA et σH pour *eag* (Mignot *et al.*, 2002). Dans la région promotrice du gène *eag* de *B. cereus* AH187, nous avons identifié un site de transcription dépendant du facteur σH , facteur de transcription associé à la transition phase exponentielle-phase stationnaire/sporulation, ce qui suggère une activation de la transcription d'*eag* en fin de croissance (Fig. 4.2.). Chez *B. anthracis*, Sap réprime *eag* pendant la phase exponentielle (Mignot *et al.*, 2002). Nos travaux ont montré que EA1 était synthétisée plus précocement au cours de la croissance dans un mutant $\Delta sl2$, ce qui suggère que chez *B. cereus* AH187, SL2 réprimerait *eag* (Chapitre 2). Nous pourrions tester par des expériences de retard sur gel la fixation de SL2 et EA1 sur la région promotrice de *eag*.

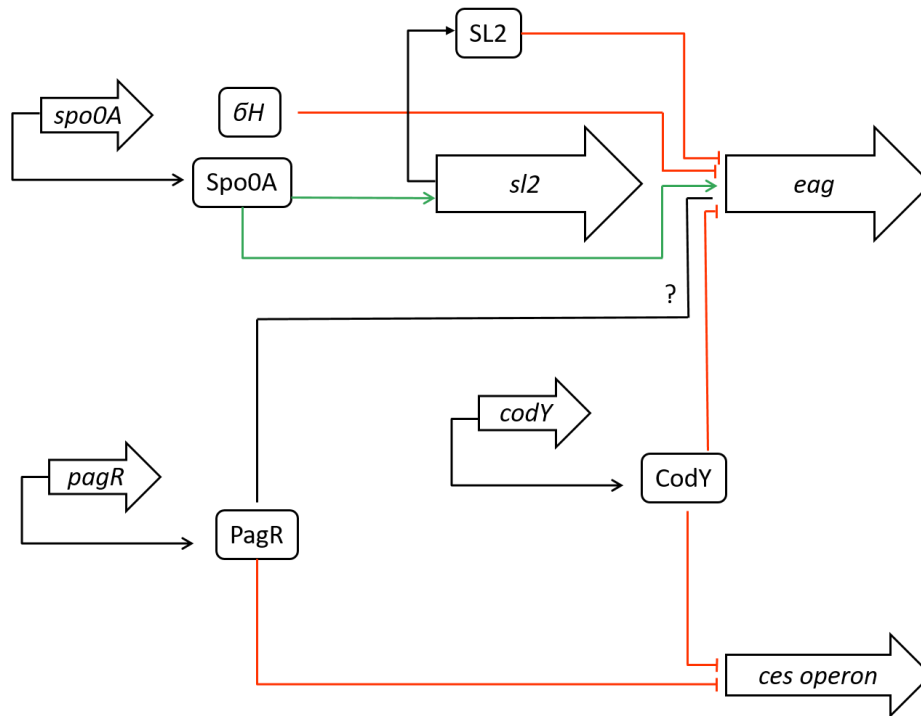


Figure 4.2. Proposition des voies de régulation de la synthèse des protéines de couche S de *B. cereus* AH187. L'activation ou la répression de la transcription des gènes sont schématisées par des flèches respectivement verte et rouge.

Par ailleurs chez *B. anthracis*, PagR, un régulateur de transcription des gènes de toxines localisé sur pXO1, se fixe aux régions promotrices de *sap* et *eag* et réprime et active, l'expression de *sap* et *eag*, respectivement (Mignot *et al.*, 2003a). Chez *B. cereus* AH187, le gène *pagR* est localisé sur le plasmide pCER270. PagR se fixe *in vitro* sur la région promotrice de *eag* (Kalbhenn *et al.*, 2022), ce qui suggère que l'expression du gène *eag* est directement régulée par PagR (Fig 4.2). Dans notre laboratoire, il a été montré que Spo0A, le régulateur majeur de l'initiation de la sporulation, contrôle positivement la synthèse de EA1 chez *B. cereus* AH187 (Rousset *et al.*, 2020). En effet, une analyse protéomique comparative entre un variant qui ne synthétise plus Spo0A et la souche parentale AH187 a été réalisée. L'analyse montre qu'en plus de ne pas sporuler, le variant ne synthétise pas les deux SLP (SL2 et EA1). Lorsque la souche variante est complétée avec *spo0A*, la synthèse de EA1 est rétablie (Fig. 4.2). Au moment de cette étude, l'anticorps anti-SL2 n'avait pas été synthétisé. Il serait donc intéressant de tester par Western Blot si la complémentation restaure l'accumulation de SL2. Chez *B. anthracis*, la délétion de *spo0A* entraîne une réduction de la quantité de Sap dans la couche S (Plaut *et al.*, 2014). Chez *B. cereus* AH187, une boîte de fixation potentielle de Spo0A a été identifiée dans les régions promotrices de *sl2* et *eag*, ce qui suggère que la régulation de la transcription de *sl2* et *eag* par Spo0A serait directe. Des expériences de retard sur gel sont cependant nécessaires pour confirmer ce rôle direct de Spo0A sur l'expression de gènes de SLP.

En conclusion, l'assemblage de la couche S résulterait d'une régulation différente de la synthèse de SL2 et EA1.

3.3. La couche S est-elle impliquée dans la virulence des souches émétiques ?

La majorité des souches émétiques possédant une couche S, il est évident de se demander si la synthèse de la couche S est liée à la virulence. En étudiant la région promotrice des gènes *sl2* et *eag*, nous avons identifié une boîte de fixation potentielle de CodY. CodY est un régulateur impliqué dans la phase de transition et dans le contrôle de nombreux gènes de la phase stationnaire. Or chez *B. anthracis*, CodY réprime directement l'expression de *sap* et *eag* pendant la phase exponentielle (Château *et al.*, 2013). Il est intéressant de noter que chez *B. cereus* AH187, CodY est un répresseur de l'opéron *ces* codant pour la cérulide, et du gène *inhA1* codant pour une métalloprotéase impliquée dans la virulence (Coburn *et al.*, 2021; Frenzel *et al.*, 2012) (Fig. 4.2). Par ailleurs, *inhA1* est directement régulé par le circuit Spo0A-AbrB et SinR (Grandvalet *et al.*, 2001; Guillemet *et al.*, 2010). Or d'après nos résultats (Chapitre 3), InhA1 est deux fois moins produite chez la souche mutante $\Delta sl2 \Delta eag$ que chez la souche sauvage. On pourrait se demander si la synthèse de la couche S aurait également une implication dans la régulation de *inhA1* et de l'opéron *ces* codant pour la cérulide. De plus, la surexpression de *codY* réprime la formation de pellicule de biofilms et la sporulation chez *B. anthracis* (Gopalani *et al.*, 2016). Spo0A-AbrB et SinI/SinR régulent également la formation de biofilm (Huang *et al.*, 2020; S. Xu *et al.*, 2017). Or, l'expression de *codY* et *sinR*, réprimée directement par CodY, est régulée par le milieu croissance (Coburn *et al.*, 2020). On pourrait donc penser que tous ces régulateurs sont impliqués dans la régulation de l'expression des gènes *sl2* et *eag*.

D'autres part, une étude phylogénique dans le groupe *B. cereus* a montré que lorsque les gènes *sap* et *eag* sont présents, les gènes *lytA* et *lytB* codant pour des hydrolases de la paroi sont absents du génome (Soufiane *et al.*, 2011). Il serait intéressant de comparer les phénotypes de souches possédant des gènes *lytA/lytB* avec ceux de la souche AH187 et des trois souches mutantes $\Delta sl2 \Delta eag$, $\Delta sl2$, Δeag pour déterminer l'avantage de former un réseau paracrystallin à l'aide de SL2 et EA1 au lieu de synthétiser les deux hydrolases de la paroi LytA et LytB. Il est possible également d'introduire des copies fonctionnelles des gènes *lytA/lytB* dans les mutants de délétions $\Delta sl2 \Delta eag$, $\Delta sl2$, Δeag et d'analyser leur phénotype.

La distribution des couches S au sein du groupe *B. cereus* interroge. Leur maintien à la surface de certaines souches de *B. cereus* est vraisemblablement dû à l'avantage sélectif qu'elles procurent (Mignot *et al.*, 2001). Nos résultats montrent que sur 329 génomes de *B. cereus* *sl*, 58% possèdent le cluster des gènes de la couche S, c'est-à-dire le ou les deux gènes codant la(les) SLP et les gènes localisés directement en amont, dont les produits permettent la sécrétion et l'ancrage des SLP (Fig.1.14). Le groupe III, qui comporte une majorité de souches possédant une couche S (95%, Tableau S1 – Chapitre 2) recense les souches les plus virulentes, telles que la plupart des souches émétiques de *B. cereus* AH187 et toutes les souches de *B. anthracis*. À ce jour, nous n'avons pas montré que la couche S a un rôle dans la pathogénicité des souches émétiques, mais nos résultats suggèrent que des voies de régulation pourraient contrôler simultanément la synthèse de la céréulide et des couches S. Il serait intéressant de comparer la production de la céréulide entre la souche sauvage WT et les trois souches mutantes $\Delta sl2\Delta eag$, $\Delta sl2$, Δeag .

Au sein du groupe *B. cereus*, les souches des groupes phylogénétiques IV et V ne possèdent pas de couche S, ces groupes incluant des souches impliquées dans des intoxications alimentaires (Guinebretière *et al.*, 2008). Inversement, le groupe phylogénétique VI dont 57% des souches possèdent une couche S ne contient pas de souches pathogènes. Ces observations confirment que la couche S n'est pas exclusivement liée à la pathogénicité des souches mais est également un avantage environnemental ou de croissance.

Finalement, le travail mené dans cette thèse ouvre de nouvelles perspectives sur les rôles de la couche S chez *B. cereus* *sl* et plus particulièrement chez les souches émétiques. Par la suite, il serait intéressant de travailler sur la structure et l'auto-assemblage de SL2 et EA1. Nous avons fait des essais préliminaires en tentant de visualiser au MET les couches S extraites.

Bibliographie

- Abdul-Halim, M.F., Schulze, S., DiLucido, A., Pfeiffer, F., Bisson Filho, A.W., Pohlschroder, M., 2020. Lipid Anchoring of Archaeosortase Substrates and Midcell Growth in *Haloarchaea*. *mBio* 11, e00349-20. <https://doi.org/10.1128/mBio.00349-20>
- Abdulmawjood, A., Herrmann, J., Riede, S., Jimenez, G., Becker, A., Breves, G., 2019. Evaluation of enterotoxin gene expression and enterotoxin production capacity of the probiotic strain *Bacillus toyonensis* BCT-7112T. *PLOS ONE* 14, e0214536. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0214536>
- Abee, T., Groot, M.N., Tempelaars, M., Zwietering, M., Moezelaar, R., Voort, M. van der, 2011. Germination and outgrowth of spores of *Bacillus cereus* group members: Diversity and role of germinant receptors. *Food Microbiology* 28, 199–208. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.03.015>
- Achinas, S., Charalampogiannis, N., Euverink, G.J.W., 2019. A Brief Recap of Microbial Adhesion and Biofilms. *Applied Sciences* 9, 2801. <https://doi.org/10.3390/app9142801>
- Adachi, T., Yamagata, H., Tsukagoshi, N., Udaka, S., 1989. Multiple and tandemly arranged promoters of the cell wall protein gene operon in *Bacillus brevis* 47. *Journal of Bacteriology* 171, 1010–1016. <https://doi.org/10.1128/jb.171.2.1010-1016.1989>
- Agata, N., Ohta, M., Mori, M., Isobe, M., 1995. A novel dodecadepsipeptide, cereulide, is an emetic toxin of *Bacillus cereus*. *FEMS Microbiol Lett* 129, 17–19. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1995.tb07550.x>
- Agata, N., Ohta, M., Mori, M., Shibayama, K., 1999. Growth conditions of and emetic toxin production by *Bacillus cereus* in a defined medium with amino acids. *Microbiol. Immunol.* 43, 15–18. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.1999.tb02367.x>
- Ahn, J.-S., Chandramohan, L., Liou, L.E., Bayles, K.W., 2006. Characterization of CidR-mediated regulation in *Bacillus anthracis* reveals a previously undetected role of S-layer proteins as murein hydrolases. *Mol Microbiol* 62, 1158–1169. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05433.x>
- Alabduladhem, T.O., Bordoni, B., 2022. Physiology, Krebs Cycle, in: *StatPearls*. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL).
- Albers, S.-V., Meyer, B.H., 2011. The archaeal cell envelope. *Nature Reviews Microbiology* 9, 414–426. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2576>
- Albers, S.-V., Szabó, Z., Driessen, A.J.M., 2006. Protein secretion in the Archaea: multiple paths towards a unique cell surface. *Nat Rev Microbiol* 4, 537–547. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1440>
- Ali, S., Jenkins, B., Cheng, J., Lobb, B., Wei, X., Egan, S., Charles, T.C., McConkey, B.J., Austin, J., Doxey, A.C., 2020. Slr4, a newly identified S-layer protein from marine *Gammaproteobacteria*, is a major biofilm matrix component. *Mol Microbiol* 114, 979–990. <https://doi.org/10.1111/mmi.14588>
- Alp, D., 2022. Strain-dependent effectivity, and protective role against enzymes of S-layers in Lactiplanti *Bacillus plantarum* strains. *J Basic Microbiol.* <https://doi.org/10.1002/jobm.202100590>
- Alp, D., Kuleşan, H., Korkut Altıntaş, A., 2020. The importance of the S-layer on the adhesion and aggregation ability of Lactic acid bacteria. *Mol Biol Rep* 47, 3449–3457. <https://doi.org/10.1007/s11033-020-05430-6>
- Altincicek, B., Linder, M., Linder, D., Preissner, K.T., Vilcinskis, A., 2007. Microbial Metalloproteinases Mediate Sensing of Invading Pathogens and Activate Innate Immune Responses in the Lepidopteran Model Host *Galleria mellonella*. *Infection and Immunity* 75, 175–183. <https://doi.org/10.1128/IAI.01385-06>

- An, Y.H., Friedman, R.J., 2000. Handbook of Bacterial Adhesion: Principles, Methods, and Applications. Springer Science & Business Media.
- Anderson, V.J., Kern, J.W., McCool, J.W., Schneewind, O., Missiakas, D., 2011. The SLH-domain protein BsIO is a determinant of *Bacillus anthracis* chain length. *Mol Microbiol* 81, 192–205. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07688.x>
- Andreassen, M., Bøhn, T., Wikmark, O.-G., Van den Berg, J., Løvik, M., Traavik, T., Nygaard, U.C., 2015. Cry1Ab Protein from *Bacillus thuringiensis* and MON810 cry1Ab-transgenic Maize Exerts No Adjuvant Effect After Airway Exposure. *Scandinavian Journal of Immunology* 81, 192–200. <https://doi.org/10.1111/sji.12269>
- Angeles, D.M., Scheffers, D.-J., 2021. The Cell Wall of *Bacillus subtilis*. *Current Issues in Molecular Biology* 41, 539–596. <https://doi.org/10.21775/cimB.041.539>
- Aravindh, S., Selvakumar, R., Ravichandran, J., Mudali, U.K., Anandbabu, C., Raj, B., 2015. Extremophilic *Bacillus cereus* MVK04 Isolated from Thorium Ore Sample Possesses Self-Assembled Surface Layer Protein on Cell Wall to Resist Extreme Environments. *Geomicrobiology Journal* 32, 445–452. <https://doi.org/10.1080/01490451.2014.957425>
- Armengaud, J., Christie-Oleza, J.A., Clair, G., Malard, V., Duport, C., 2012. Exoproteomics: exploring the world around biological systems. *Expert Review of Proteomics* 9, 561–575. <https://doi.org/10.1586/epr.12.52>
- Arnaud, M., Chastanet, A., Debarbouille, M., 2004. New Vector for Efficient Allelic Replacement in Naturally Nontransformable, Low-GC-Content, Gram-Positive Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 6887–6891. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.11.6887-6891.2004>
- Auger, S., Ramarao, N., Faille, C., Fouet, A., Aymerich, S., Gohar, M., 2009. Biofilm Formation and Cell Surface Properties among Pathogenic and Nonpathogenic Strains of the *Bacillus cereus* Group. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 6616–6618. <https://doi.org/10.1128/AEM.00155-09>
- Ausiello, C.M., Cerquetti, M., Fedele, G., Spensieri, F., Palazzo, R., Nasso, M., Frezza, S., Mastrantonio, P., 2006. Surface layer proteins from *Clostridium difficile* induce inflammatory and regulatory cytokines in human monocytes and dendritic cells. *Microbes and Infection* 8, 2640–2646. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2006.07.009>
- Åvall-Jääskeläinen, S., Palva, A., 2005. *Lactobacillus* surface layers and their applications. *FEMS Microbiology Reviews* 29, 511–529. <https://doi.org/10.1016/j.fmrre.2005.04.003>
- Awram, P., Smit, J., 1998. The *Caulobacter crescentus* Paracrystalline S-Layer Protein Is Secreted by an ABC Transporter (Type I) Secretion Apparatus. *Journal of Bacteriology* 180, 3062–3069. <https://doi.org/10.1128/JB.180.12.3062-3069.1998>
- Baatout, S., De Boever, P., Mergeay, M., 2006. Physiological changes induced in four bacterial strains following oxidative stress. *Appl Biochem Microbiol* 42, 369–377. <https://doi.org/10.1134/S0003683806040053>
- Baillie, L., Hebdon, R., Flick-Smith, H., Williamson, D., 2003. Characterisation of the immune response to the UK human anthrax vaccine. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 36, 83–86. [https://doi.org/10.1016/S0928-8244\(03\)00085-3](https://doi.org/10.1016/S0928-8244(03)00085-3)
- Balderas, M.A., Nobles, C.L., Honsa, E.S., Alicki, E.R., Maresso, A.W., 2012. Hal Is a *Bacillus anthracis* Heme Acquisition Protein. *Journal of Bacteriology*. <https://doi.org/10.1128/JB.00685-12>
- Bauer, T., Sipos, W., Stark, T.D., Käser, T., Knecht, C., Brunthaler, R., Saalmüller, A., Hofmann, T., Ehling-Schulz, M., 2018. First Insights Into Within Host Translocation of the *Bacillus cereus* Toxin Cereulide Using a Porcine Model. *Frontiers in Microbiology* 9.
- Baumeister, W., Santarius, U., Volker, S., Dürr, R., Lembcke, G., Engelhardt, H., 1990. The Surface Protein of *Hyperthermus butylicus*: Three Dimensional Structure and Comparison with Other Archaeobacterial Surface Proteins. *Systematic and Applied Microbiology* 13, 105–111. [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(11\)80155-4](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(11)80155-4)

- Beecher, D.J., Macmillan, J.D., 1991. Characterization of the components of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. *Infection and Immunity* 59, 1778–1784. <https://doi.org/10.1128/iai.59.5.1778-1784.1991>
- Beecher, D.J., Wong, A.C.L.Y. 2000, 2000. Cooperative, synergistic and antagonistic haemolytic interactions between haemolysin BL, phosphatidylcholine phospholipase C and sphingomyelinase from *Bacillus cereus*. *Microbiology* 146, 3033–3039. <https://doi.org/10.1099/00221287-146-12-3033>
- Beganović, J., Frece, J., Kos, B., Leboš Pavunc, A., Habjanič, K., Šušković, J., 2011. Functionality of the S-layer protein from the probiotic strain *Lactobacillus helveticus* M92. *Antonie van Leeuwenhoek* 100, 43–53. <https://doi.org/10.1007/s10482-011-9563-4>
- Bellon-Fontaine, M.-N., Rault, J., van Oss, C.J., 1996. Microbial adhesion to solvents: a novel method to determine the electron-donor/electron-acceptor or Lewis acid-base properties of microbial cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 7, 47–53. [https://doi.org/10.1016/0927-7765\(96\)01272-6](https://doi.org/10.1016/0927-7765(96)01272-6)
- Berliner, E., 1915. Über die Schlagsucht der Mehlmottenraupe (*Ephestia kühniella* Zell.) und ihren Erreger *Bacillus thuringiensis* n. sp. *Zeitschrift für Angewandte Entomologie* 2, 29–56. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.1915.tb00334.x>
- Berne, C., Ellison, C.K., Ducret, A., Brun, Y.V., 2018. Bacterial adhesion at the single-cell level. *Nat Rev Microbiol* 16, 616–627. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0057-5>
- Berthold-Pluta, A., Pluta, A., Garbowska, M., Stefańska, I., 2019. Prevalence and Toxicity Characterization of *Bacillus cereus* in Food Products from Poland. *Foods* 8, 269. <https://doi.org/10.3390/foods8070269>
- Bharat, T.A.M., von Kügelgen, A., Alva, V., 2021. Molecular Logic of Prokaryotic Surface Layer Structures. *Trends in Microbiology* 29, 405–415. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2020.09.009>
- Binnig, G., Quate, C.F., Gerber, Ch., 1986. Atomic Force Microscope. *Phys. Rev. Lett.* 56, 930–933. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.56.930>
- Boot, H.J., Pouwels, P.H., 1996. Expression, secretion and antigenic variation of bacterial S-layer proteins. *Molecular Microbiology* 21, 1117–1123. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1996.711442.x>
- Bottone, E.J., 2010. *Bacillus cereus*, a Volatile Human Pathogen. *Clin Microbiol Rev* 23, 382–398. <https://doi.org/10.1128/CMR.00073-09>
- Boutonnet, C., Lyonnais, S., Alpha-Bazin, B., Armengaud, J., Château, A., Dupont, C., 2022. Dynamic Profile of S-Layer Proteins Controls Surface Properties of Emetic *Bacillus cereus* AH187 Strain. *Frontiers in Microbiology* 13.
- Boylan, S.A., Redfield, A.R., Brody, M.S., Price, C.W., 1993. Stress-induced activation of the sigma B transcription factor of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 175, 7931–7937.
- Branda, S.S., Vik, Å., Friedman, L., Kolter, R., 2005. Biofilms: the matrix revisited. *Trends in Microbiology* 13, 20–26. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2004.11.006>
- Braunstein, M., Brown, A.M., Kurtz, S., Jacobs, W.R., 2001. Two Nonredundant SecA Homologues Function in Mycobacteria. *Journal of Bacteriology* 183, 6979–6990. <https://doi.org/10.1128/JB.183.24.6979-6990.2001>
- Brillard, J., Dupont, C.M.S., Berge, O., Dargaignaratz, C., Oriol-Gagnier, S., Doussan, C., Broussolle, V., Gillon, M., Clavel, T., Béard, A., 2015. The Water Cycle, a Potential Source of the Bacterial Pathogen *Bacillus cereus* [WWW Document]. *BioMed Research International*. <https://doi.org/10.1155/2015/356928>
- Brillard, J., Jéhanno, I., Dargaignaratz, C., Barbosa, I., Ginies, C., Carlin, F., Fedhila, S., Nguyen-the, C., Broussolle, V., Sanchis, V., 2010. Identification of *Bacillus cereus* genes specifically expressed during growth at low temperatures. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 2562–2573. <https://doi.org/10.1128/AEM.02348-09>

- Bröckl, G., Behr, M., Fabry, S., Hensel, R., Kaudewitz, H., Biendl, E., König, H., 1991. Analysis and nucleotide sequence of the genes encoding the surface-layer glycoproteins of the hyperthermophilic methanogens *Methanothermobacter fervidus* and *Methanothermobacter sociabilis*. *European Journal of Biochemistry* 199, 147–152. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1991.tb16102.x>
- Brouland, J.P., Sala, N., Tugul, S., Rebecchini, C., Kovari, E., 2018. *Bacillus cereus* bacteremia with central nervous system involvement: A neuropathological study. *NP* 37, 22–27. <https://doi.org/10.5414/NP301041>
- Browne, N., Dowds, B. c. a., 2002. Acid stress in the food pathogen *Bacillus cereus*. *Journal of Applied Microbiology* 92, 404–414. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2002.01541.x>
- Browne, N., Dowds, B. c. a., 2001. Heat and salt stress in the food pathogen *Bacillus cereus*. *Journal of Applied Microbiology* 91, 1085–1094. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01478.x>
- Buck, B.L., Altermann, E., Svingerud, T., Klaenhammer, T.R., 2005. Functional Analysis of Putative Adhesion Factors in *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 8344–8351. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.12.8344-8351.2005>
- Bunt, C.R., Jones, D.S., Tucker, I.G., 1993. The effects of pH, ionic strength and organic phase on the bacterial adhesion to hydrocarbons (BATH) test. *International Journal of Pharmaceutics* 99, 93–98. [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(93\)90350-O](https://doi.org/10.1016/0378-5173(93)90350-O)
- Buono, F., Testa, R., Lundgren, D.G., 1966. Physiology of Growth and Sporulation in *Bacillus cereus* I. Effect of Glutamic and Other Amino Acids. *Journal of Bacteriology* 91, 2291–2299. <https://doi.org/10.1128/jb.91.6.2291-2299.1966>
- Calabi, E., Calabi, F., Phillips, A.D., Fairweather, N.F., 2002. Binding of *Clostridium difficile* Surface Layer Proteins to Gastrointestinal Tissues. *Infection and Immunity* 70, 5770–5778. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.10.5770-5778.2002>
- Calabi, E., Ward, S., Wren, B., Paxton, T., Panico, M., Morris, H., Dell, A., Dougan, G., Fairweather, N., 2001. Molecular characterization of the surface layer proteins from *Clostridium difficile*. *Molecular Microbiology* 40, 1187–1199. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02461.x>
- Callegan, M.C., Cochran, D.C., Kane, S.T., Ramadan, R.T., Chodosh, J., McLean, C., Stroman, D.W., 2006. Virulence Factor Profiles and Antimicrobial Susceptibilities of Ocular *Bacillus* Isolates. *Current Eye Research* 31, 693–702. <https://doi.org/10.1080/02713680600850963>
- Calvo, J.M., Matthews, R.G., 1994. The leucine-responsive regulatory protein, a global regulator of metabolism in *Escherichia coli*. *Microbiological Reviews* 58, 466–490. <https://doi.org/10.1128/mr.58.3.466-490.1994>
- Candela, T., Fouet, A., 2005. *Bacillus anthracis* CapD, belonging to the gamma-glutamyltranspeptidase family, is required for the covalent anchoring of capsule to peptidoglycan. *Mol Microbiol* 57, 717–726. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04718.x>
- Candela, T., Maes, E., Garénaux, E., Rombouts, Y., Krzewinski, F., Gohar, M., Guérardel, Y., 2011. Environmental and Biofilm-dependent Changes in a *Bacillus cereus* Secondary Cell Wall Polysaccharide *. *Journal of Biological Chemistry* 286, 31250–31262. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.249821>
- Candela, T., Mock, M., Fouet, A., 2005. CapE, a 47-Amino-Acid Peptide, Is Necessary for *Bacillus anthracis* Polyglutamate Capsule Synthesis. *Journal of Bacteriology* 187, 7765–7772. <https://doi.org/10.1128/JB.187.22.7765-7772.2005>
- Carasi, P., Ambrosio, N.M., Antoni, G.L.D., Bressollier, P., Urdaci, M.C., Serradell, M. de los A., 2014. Adhesion properties of potentially probiotic *Lactobacillus kefir* to gastrointestinal mucus. *Journal of Dairy Research* 81, 16–23. <https://doi.org/10.1017/S0022029913000526>
- Carlin, F., Albagnac, C., Rida, A., Guinebretière, M.-H., Couvert, O., Nguyen-The, C., 2013. Variation of cardinal growth parameters and growth limits according to phylogenetic

- affiliation in the *Bacillus cereus* Group. Consequences for risk assessment. *Food Microbiol.* 33, 69–76. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.08.014>
- Carlin, F., Brillard, J., Broussolle, V., Clavel, T., Duport, C., Jobin, M., Guinebretiere, M., Auger, S., Sorokine, A., Nguyen-Thé, C., 2010. Adaptation of *Bacillus cereus*, an ubiquitous worldwide-distributed foodborne pathogen, to a changing environment. *Food Research International* 43, 1885–1894. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.10.024>
- Carlin, F., Fricker, M., Pielaat, A., Heisterkamp, S., Shaheen, R., Salkinoja Salonen, M., Svensson, B., Nguyen-the, C., Ehling-Schulz, M., 2006. Emetic toxin-producing strains of *Bacillus cereus* show distinct characteristics within the *Bacillus cereus* group. *International Journal of Food Microbiology* 109, 132–138. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.01.022>
- Carlson, C.J., Getz, W.M., Kausrud, K.L., Cizauskas, C.A., Blackburn, J.K., Bustos Carrillo, F.A., Colwell, R., Easterday, W.R., Ganz, H.H., Kamath, P.L., Økstad, O.A., Turner, W.C., Kolstø, A.-B., Stenseth, N.C., 2018. Spores and soil from six sides: interdisciplinarity and the environmental biology of anthrax (*Bacillus anthracis*). *Biological Reviews* 93, 1813–1831. <https://doi.org/10.1111/brv.12420>
- Caro-Astorga, J., Frenzel, E., Perkins, J.R., Álvarez-Mena, A., de Vicente, A., Ranea, J.A.G., Kuipers, O.P., Romero, D., 2020. Biofilm formation displays intrinsic offensive and defensive features of *Bacillus cereus*. *npj Biofilms Microbiomes* 6, 3. <https://doi.org/10.1038/s41522-019-0112-7>
- Carvalho, P.C., Yates, J.R., III, Barbosa, V.C., 2012. Improving the TFold test for differential shotgun proteomics. *Bioinformatics* 28, 1652–1654. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts247>
- Castaldo, C., Siciliano, R.A., Muscariello, L., Marasco, R., Sacco, M., 2006. CcpA affects expression of the groESL and dnaK operons in *Lactobacillus plantarum*. *Microbial Cell Factories* 5, 35. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-5-35>
- Cerdà-Costa, N., Xavier Gomis-Rüth, F., 2014. Architecture and function of metallopeptidase catalytic domains. *Protein Science* 23, 123–144. <https://doi.org/10.1002/pro.2400>
- Ceuppens, S., Uyttendaele, M., Drieskens, K., Rajkovic, A., Boon, N., VAN de WIELE, T.O.M., 2012a. Survival of *Bacillus cereus* Vegetative Cells and Spores during In Vitro Simulation of Gastric Passage. *J Food Prot* 75, 690–694. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-11-481>
- Ceuppens, S., Van de Wiele, T., Rajkovic, A., Ferrer-Cabaceran, T., Heyndrickx, M., Boon, N., Uyttendaele, M., 2012b. Impact of intestinal microbiota and gastrointestinal conditions on the in vitro survival and growth of *Bacillus cereus*. *International journal of food microbiology* 155, 241–6. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.02.013>
- Chamberland, C., 1883. Le charbon et la vaccination charbonneuse d'après les travaux récents de M. Pasteur. *B. Tignol*.
- Chapman, R.N., Liu, L., Boons, G.-J., 2018. 4,6-O-Pyruvyl Ketal Modified N-Acetylmannosamine of the Secondary Cell Wall Polysaccharide of *Bacillus anthracis* Is the Anchoring Residue for Its Surface Layer Proteins. *J. Am. Chem. Soc.* 140, 17079–17085. <https://doi.org/10.1021/jacs.8b08857>
- Chateau, A., Alpha-Bazin, B., Armengaud, J., Duport, C., 2022. Heme A Synthase Deficiency Affects the Ability of *Bacillus cereus* to Adapt to a Nutrient-Limited Environment. *Int. J. Mol. Sci.* 17.
- Chateau, A., Lunderberg, J.M., Oh, S.Y., Abshire, T., Friedlander, A., Quinn, C.P., Missiakas, D.M., Schneewind, O., 2018. Galactosylation of the Secondary Cell Wall Polysaccharide of *Bacillus anthracis* and Its Contribution to Anthrax Pathogenesis. *Journal of Bacteriology* 200, e00562-17. <https://doi.org/10.1128/JB.00562-17>
- Chateau, A., Van der Verren, S.E., Remaut, H., Fioravanti, A., 2020. The *Bacillus anthracis* Cell Envelope: Composition, Physiological Role, and Clinical Relevance. *Microorganisms* 8, 1864. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8121864>

- Château, A., van Schaik, W., Joseph, P., Handke, L.D., McBride, S.M., Smeets, F.M.H., Sonenshein, A.L., Fouet, A., 2013. Identification of CodY Targets in *Bacillus anthracis* by Genome-Wide In Vitro Binding Analysis. *Journal of Bacteriology* 195, 1204–1213. <https://doi.org/10.1128/JB.02041-12>
- Château, A., van Schaik, W., Six, A., Aucher, W., Fouet, A., 2011. CodY regulation is required for full virulence and heme iron acquisition in *Bacillus anthracis*. *The FASEB Journal* 25, 4445–4456. <https://doi.org/10.1096/fj.11-188912>
- Chen, X., Xu, J., Shuai, J., Chen, J., Zhang, Z., Fang, W., 2007. The S-layer proteins of *Lactobacillus crispatus* strain ZJ001 is responsible for competitive exclusion against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella typhimurium*. *International Journal of Food Microbiology* 115, 307–312. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.11.007>
- Chinthamani, S., Settem, R.P., Honma, K., Kay, J.G., Sharma, A., 2017. Macrophage inducible C-type lectin (Mincle) recognizes glycosylated surface (S)-layer of the periodontal pathogen *Tannerella forsythia*. *PLOS ONE* 12, e0173394. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173394>
- Choudhury, B., Leoff, C., Saile, E., Wilkins, P., Quinn, C.P., Kannenberg, E.L., Carlson, R.W., 2006. The Structure of the Major Cell Wall Polysaccharide of *Bacillus anthracis* Is Species-specific. *J. Biol. Chem.* 281, 27932–27941. <https://doi.org/10.1074/jbc.M605768200>
- Christie-Oleza, J.A., Fernandez, B., Nogales, B., Bosch, R., Armengaud, J., 2012. Proteomic insights into the lifestyle of an environmentally relevant marine bacterium. *ISME J* 6, 124–135. <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.86>
- Chu, S., 1993. Molecular analysis of the structure and expression of the *Aeromonas Salmonicida* surface layer protein gene vapA (Thesis).
- Clair, G., Armengaud, J., Duport, C., 2012. Restricting fermentative potential by proteome remodeling: an adaptive strategy evidenced in *Bacillus cereus*. *Mol. Cell Proteomics* 11, M111.013102. <https://doi.org/10.1074/mcp.M111.013102>
- Clair, G., Lorphelin, A., Armengaud, J., Duport, C., 2013. OhrRA functions as a redox-responsive system controlling toxinogenesis in *Bacillus cereus*. *Journal of Proteomics* 94, 527–539. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2013.10.024>
- Clark, F.E., 1937. The Relation of *Bacillus siamensis* and Similar Pathogenic Spore-forming Bacteria to *Bacillus cereus*. *J Bacteriol* 33, 435–443.
- Claus, H., Akça, E., Debaerdemaeker, T., Evrard, C., Declercq, J.-P., Harris, J.R., Schlott, B., König, H., 2005. Molecular organization of selected prokaryotic S-layer proteins. *Can. J. Microbiol.* 51, 731–743. <https://doi.org/10.1139/w05-093>
- Coburn, P.S., Miller, F.C., Enty, M.A., Land, C., LaGrow, A.L., Mursalin, M.H., Callegan, M.C., 2020. Expression of *Bacillus cereus* Virulence-Related Genes in an Ocular Infection-Related Environment. *bioRxiv* 2020.03.17.995753. <https://doi.org/10.1101/2020.03.17.995753>
- Coburn, P.S., Miller, F.C., Enty, M.A., Land, C., LaGrow, A.L., Mursalin, M.H., Callegan, M.C.Y., 2021, 2021. The *Bacillus* virulome in endophthalmitis. *Microbiology* 167, 001057. <https://doi.org/10.1099/mic.0.001057>
- Cohen, S.R., Bitler, A., 2008. Use of AFM in bio-related systems. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 13, 316–325. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2008.02.002>
- Comerci, C.J., Herrmann, J., Yoon, J., Jabbarpour, F., Zhou, X., Nomellini, J.F., Smit, J., Shapiro, L., Wakatsuki, S., Moerner, W.E., 2019. Topologically-guided continuous protein crystallization controls bacterial surface layer self-assembly. *Nature Communications* 10, 2731. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10650-x>
- Cotter, P.D., Hill, C., 2003. Surviving the Acid Test: Responses of Gram-Positive Bacteria to Low pH. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 67, 429–453. <https://doi.org/10.1128/MMBR.67.3.429-453.2003>

- Cotton, D.J., Gill, V.J., Marshall, D.J., Gress, J., Thaler, M., Pizzo, P.A., 1987. Clinical features and therapeutic interventions in 17 cases of *Bacillus* bacteremia in an immunosuppressed patient population. *Journal of Clinical Microbiology* 25, 672–674. <https://doi.org/10.1128/jcm.25.4.672-674.1987>
- Couture-Tosi, E., Delacroix, H., Mignot, T., Mesnage, S., Chami, M., Fouet, A., Mosser, G., 2002. Structural Analysis and Evidence for Dynamic Emergence of *Bacillus anthracis* S-Layer Networks. *Journal of Bacteriology* 184, 6448–6456. <https://doi.org/10.1128/JB.184.23.6448-6456.2002>
- Dang, T.H.T., Riva, L. de la, Fagan, R.P., Storck, E.M., Heal, W.P., Janoir, C., Fairweather, N.F., Tate, E.W., 2010. Chemical Probes of Surface Layer Biogenesis in *Clostridium difficile*. *ACS Chem. Biol.* 5, 279–285. <https://doi.org/10.1021/cb9002859>
- Dapa, T., Leuzzi, R., Ng, Y.K., Baban, S.T., Adamo, R., Kuehne, S.A., Scarselli, M., Minton, N.P., Serruto, D., Unnikrishnan, M., 2013. Multiple Factors Modulate Biofilm Formation by the Anaerobic Pathogen *Clostridium difficile*. *Journal of Bacteriology* 195, 545–555. <https://doi.org/10.1128/JB.01980-12>
- Dartois, V., Djavakhishvili, T., Hoch, J.A., 1997. KapB is a lipoprotein required for KinB signal transduction and activation of the phosphorelay to sporulation in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology* 26, 1097–1108. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1997.6542024.x>
- Das, M., Dewan, A., Shee, S., Singh, A., 2021. The Multifaceted Bacterial Cysteine Desulfurases: From Metabolism to Pathogenesis. *Antioxidants* 10, 997. <https://doi.org/10.3390/antiox10070997>
- Davaine, C., 1863. Recherches sur les infuoires du sang dans la maladie de la pustule maligne.
- de la Fuente-Núñez, C., Mertens, J., Smit, J., Hancock, R.E.W., 2012. The Bacterial Surface Layer Provides Protection against Antimicrobial Peptides. *Applied and Environmental Microbiology* 78, 5452–5456. <https://doi.org/10.1128/AEM.01493-12>
- de Sarrau, B., Clavel, T., Clerté, C., Carlin, F., Giniès, C., Nguyen-The, C., 2012. Influence of Anaerobiosis and Low Temperature on *Bacillus cereus* Growth, Metabolism, and Membrane Properties. *Appl Environ Microbiol* 78, 1715–1723. <https://doi.org/10.1128/AEM.06410-11>
- Deatherage, J.F., Taylor, K.A., Amos, L.A., Moody, M.F., 1983. Three-dimensional arrangement of the cell wall protein of *Sulfolobus acidocaldarius*. *Journal of Molecular Biology* 167, 823–848. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(83\)80113-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(83)80113-2)
- den Besten, H.M.W., Ingham, C.J., van Hylckama Vlieg, J.E.T., Beerthuyzen, M.M., Zwietering, M.H., Abee, T., 2007. Quantitative Analysis of Population Heterogeneity of the Adaptive Salt Stress Response and Growth Capacity of *Bacillus cereus* ATCC 14579. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 4797–4804. <https://doi.org/10.1128/AEM.00404-07>
- den Besten, H.M.W., Mols, M., Moezelaar, R., Zwietering, M.H., Abee, T., 2009. Phenotypic and Transcriptomic Analyses of Mildly and Severely Salt-Stressed *Bacillus cereus* ATCC 14579 Cells. *Applied and Environmental Microbiology* 75, 4111–4119. <https://doi.org/10.1128/AEM.02891-08>
- Deutscher, J., Francke, C., Postma, P.W., 2006. How Phosphotransferase System-Related Protein Phosphorylation Regulates Carbohydrate Metabolism in Bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 70, 939–1031. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00024-06>
- Díaz-Pérez, A.L., Díaz-Pérez, C., Campos-García, J., 2016. Bacterial l-leucine catabolism as a source of secondary metabolites. *Rev Environ Sci Biotechnol* 15, 1–29. <https://doi.org/10.1007/s11157-015-9385-3>
- Dierick, K., Van Coillie, E., Swiecicka, I., Meyfroidt, G., Devlieger, H., Meulemans, A., Hoedemaekers, G., Fourie, L., Heyndrickx, M., Mahillon, J., 2005. Fatal Family Outbreak of *Bacillus cereus*-Associated Food Poisoning. *Journal of Clinical Microbiology* 43, 4277–4279. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.8.4277-4279.2005>

- Dietrich, R., Jessberger, N., Ehling-Schulz, M., Märtlbauer, E., Granum, P.E., 2021. The Food Poisoning Toxins of *Bacillus cereus*. *Toxins* 13, 98. <https://doi.org/10.3390/toxins13020098>
- Diomandé, S.E., Chamot, S., Antolinos, V., Vasai, F., Guinebretière, M.-H., Bornard, I., Nguyen-the, C., Broussolle, V., Brillard, J., 2014. The CasKR Two-Component System Is Required for the Growth of Mesophilic and Psychrotolerant *Bacillus cereus* Strains at Low Temperatures. *Applied and Environmental Microbiology* 80, 2493–2503. <https://doi.org/10.1128/AEM.00090-14>
- Diomandé, S.E., Doublet, B., Vasai, F., Guinebretière, M.-H., Broussolle, V., Brillard, J., 2016. Expression of the genes encoding the CasK/R two-component system and the DesA desaturase during *Bacillus cereus* cold adaptation. *FEMS Microbiol Lett* 363, fnw174. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnw174>
- Diomandé, S.E., Nguyen-the, C., Abee, T., Tempelaars, M.H., Broussolle, V., Brillard, J., 2015. Involvement of the CasK/R two-component system in optimal unsaturation of the *Bacillus cereus* fatty acids during low-temperature growth. *International Journal of Food Microbiology*, Special Issue: FoodMicro 2014, 24th International ICFMH Conference, From single cells to functions of consortia in food microbiology, 1 - 4 September, 2014, Nantes, France. 213, 110–117. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.04.043>
- Donlan, R.M., 2002. Biofilms: Microbial Life on Surfaces. *Emerg Infect Dis* 8, 881–890. <https://doi.org/10.3201/eid0809.020063>
- Drysdale, M., Heninger, S., Hutt, J., Chen, Y., Lyons, R.C., Koehler, T.M., 2005. Capsule synthesis by *Bacillus anthracis* is required for dissemination in murine inhalation anthrax. *The EMBO Journal* 24, 221–227. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600495>
- Dubnau, E., Weir, J., Nair, G., Carter, L., Moran, C., Smith, I., 1988. *Bacillus* sporulation gene *spo0H* codes for sigma 30 (sigma H). *Journal of Bacteriology* 170, 1054–1062. <https://doi.org/10.1128/jb.170.3.1054-1062.1988>
- Ducret, A., Quardokus, E.M., Brun, Y.V., 2016. MicrobeJ, a tool for high throughput bacterial cell detection and quantitative analysis. *Nat Microbiol* 1, 1–7. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.77>
- Dufrêne, Y.F., 2002. Atomic Force Microscopy, a Powerful Tool in Microbiology. *Journal of Bacteriology* 184, 5205–5213. <https://doi.org/10.1128/JB.184.19.5205-5213.2002>
- Dufrêne, Y.F., Ando, T., Garcia, R., Alsteens, D., Martinez-Martin, D., Engel, A., Gerber, C., Müller, D.J., 2017. Imaging modes of atomic force microscopy for application in molecular and cell biology. *Nature Nanotech* 12, 295–307. <https://doi.org/10.1038/nnano.2017.45>
- Dufrêne, Y.F., Viljoen, A., Mignolet, J., Mathelié-Guinlet, M., 2021. AFM in cellular and molecular microbiology. *Cellular Microbiology* 23, e13324. <https://doi.org/10.1111/cmi.13324>
- Duport, C., Jobin, M., Schmitt, P., 2016. Adaptation in *Bacillus cereus*: From Stress to Disease. *Front. Microbiol.* 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01550>
- Duport, C., Madeira, J.-P., Farjad, M., Alpha-Bazin, B., Armengaud, J., 2021. Methionine Sulfoxide Reductases Contribute to Anaerobic Fermentative Metabolism in *Bacillus cereus*. *Antioxidants* 10, 819. <https://doi.org/10.3390/antiox10050819>
- Duport, C., Rousset, L., Alpha-Bazin, B., Armengaud, J., 2020. *Bacillus cereus* Decreases NHE and CLO Exotoxin Synthesis to Maintain Appropriate Proteome Dynamics During Growth at Low Temperature. *Toxins* 12, 645. <https://doi.org/10.3390/toxins12100645>
- Dupres, V., Alsteens, D., Pauwels, K., Dufrêne, Y.F., 2009. In Vivo Imaging of S-Layer Nanoarrays on *Corynebacterium glutamicum*. *Langmuir* 25, 9653–9655. <https://doi.org/10.1021/la902238q>
- Durand-Heredia, J., Hsieh, H.-Y., Thompson, B.M., Stewart, G.C., 2022. ExsY, CotY, and CotE Effects on *Bacillus anthracis* Outer Spore Layer Architecture. *Journal of Bacteriology* 0, e00291-22. <https://doi.org/10.1128/jb.00291-22>

- Dworkin, J., Tummuru, M.K., Blaser, M.J., 1995. A lipopolysaccharide-binding domain of the *Campylobacter fetus* S-layer protein resides within the conserved N terminus of a family of silent and divergent homologs. *Journal of Bacteriology* 177, 1734–1741. <https://doi.org/10.1128/jb.177.7.1734-1741.1995>
- Egelseer, E.M., Leitner, K., Jarosch, M., Hotzy, C., Zayni, S., Sleytr, U.B., Sára, M., 1998. The S-Layer Proteins of Two *Bacillus stearothermophilus* Wild-Type Strains Are Bound via Their N-Terminal Region to a Secondary Cell Wall Polymer of Identical Chemical Composition. *Journal of Bacteriology* 180, 1488–1495. <https://doi.org/10.1128/JB.180.6.1488-1495.1998>
- Ehling-Schulz, M., Frenzel, E., Gohar, M., 2015. Food–bacteria interplay: pathometabolism of emetic *Bacillus cereus*. *Front Microbiol* 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00704>
- Ehling-Schulz, M., Fricker, M., Grallert, H., Rieck, P., Wagner, M., Scherer, S., 2006. Cereulide synthetase gene cluster from emetic *Bacillus cereus*: Structure and location on a mega virulence plasmid related to *Bacillus anthracis* toxin plasmid pXO1. *BMC Microbiol* 6, 20. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-6-20>
- Ehling-Schulz, M., Fricker, M., Scherer, S., 2004. *Bacillus cereus*, the causative agent of an emetic type of food-borne illness. *Molecular Nutrition & Food Research* 48, 479–487. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200400055>
- Ehling-Schulz, M., Svensson, B., Guinebretiere, M.-H., Lindbäck, T., Andersson, M., Schulz, A., Fricker, M., Christiansson, A., Granum, P.E., Märtilbauer, E., Nguyen-The, C., Salkinoja-Salonen, M., Scherer, S., 2005a. Emetic toxin formation of *Bacillus cereus* is restricted to a single evolutionary lineage of closely related strains. *Microbiology* 151, 183–197. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27607-0>
- Ehling-Schulz, M., Svensson, B., Guinebretiere, M.-H., Lindbäck, T., Andersson, M., Schulz, A., Fricker, M., Christiansson, A., Granum, P.E., Märtilbauer, E., Nguyen-The, C., Salkinoja-Salonen, M., Scherer, S., 2005b. Emetic toxin formation of *Bacillus cereus* is restricted to a single evolutionary lineage of closely related strains. *Microbiology*, 151, 183–197. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27607-0>
- Ekman, J.V., Kruglov, A., Andersson, M.A., Mikkola, R., Raulio, M., Salkinoja-Salonen, M., 2012. Cereulide produced by *Bacillus cereus* increases the fitness of the producer organism in low-potassium environments. *Microbiology* 158, 1106–1116. <https://doi.org/10.1099/mic.0.053520-0>
- El-Khoury, N., Bennaceur, I., Verplaetse, E., Aymerich, S., Lereclus, D., Kallassy, M., Gohar, M., 2021. Massive Integration of Planktonic Cells within a Developing Biofilm. *Microorganisms* 9, 298. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9020298>
- El-Khoury, N., Majed, R., Perchat, S., Kallassy, M., Lereclus, D., Gohar, M., 2016. Spatio-Temporal Evolution of Sporulation in *Bacillus thuringiensis* Biofilm. *Frontiers in Microbiology* 7.
- Ellen, A.F., Zolghadr, B., Driessen, A.M.J., Albers, S.-V., 2010. Shaping the Archaeal Cell Envelope. *Archaea* 2010, e608243. <https://doi.org/10.1155/2010/608243>
- Engelhardt, H., 2007. Are S-layers exoskeletons? The basic function of protein surface layers revisited. *J Struct Biol* 160, 115–124. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2007.08.003>
- Eslami, N., Kermanshahi, R.K., Erfan, M., 2013. Studying the Stability of S-Layer Protein of *Lactobacillus Acidophilus* ATCC 4356 in Simulated Gastrointestinal Fluids Using SDS-PAGE and Circular Dichroism. *Iran J Pharm Res* 12, 47–56.
- Estruch, J.J., Carozzi, N.B., Desai, N., Duck, N.B., Warren, G.W., Koziel, M.G., 1997. Transgenic plants: An emerging approach to pest control. *Nat Biotechnol* 15, 137–141. <https://doi.org/10.1038/nbt0297-137>
- Etienne-Toumelin, I., Sirard, J.C., Duflot, E., Mock, M., Fouet, A., 1995. Characterization of the *Bacillus anthracis* S-layer: cloning and sequencing of the structural gene. *Journal of Bacteriology* 177, 614–620. <https://doi.org/10.1128/jb.177.3.614-620.1995>

- Fagan, R.P., Albesa-Jové, D., Qazi, O., Svergun, D.I., Brown, K.A., Fairweather, N.F., 2009. Structural insights into the molecular organization of the S-layer from *Clostridium difficile*. *Molecular Microbiology* 71, 1308–1322. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06603.x>
- Fagan, R.P., Fairweather, N.F., 2014. Biogenesis and functions of bacterial S-layers. *Nat Rev Microbiol* 12, 211–222. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3213>
- Fagan, R.P., Fairweather, N.F., 2011. *Clostridium difficile* Has Two Parallel and Essential Sec Secretion Systems *. *Journal of Biological Chemistry* 286, 27483–27493. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.263889>
- Fagan, R.P., Janoir, C., Collignon, A., Mastrantonio, P., Poxton, I.R., Fairweather, N.F.Y., 2011. A proposed nomenclature for cell wall proteins of *Clostridium difficile*. *Journal of Medical Microbiology* 60, 1225–1228. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.028472-0>
- Fagerlund, A., Ween, O., Lund, T., Hardy, S.P., Granum, P.E.Y. 2004, 2004. Genetic and functional analysis of the *cytK* family of genes in *Bacillus cereus*. *Microbiology* 150, 2689–2697. <https://doi.org/10.1099/mic.0.26975-0>
- Fahmy, K., Merroun, M., Pollmann, K., Raff, J., Savchuk, O., Hennig, C., Selenska-Pobell, S., 2006. Secondary Structure and Pd(II) Coordination in S-Layer Proteins from *Bacillus sphaericus* Studied by Infrared and X-Ray Absorption Spectroscopy. *Biophysical Journal* 91, 996–1007. <https://doi.org/10.1529/biophysj.105.079137>
- Farci, D., Slavov, C., Piano, D., 2018. Coexisting properties of thermostability and ultraviolet radiation resistance in the main S-layer complex of *Deinococcus radiodurans*. *Photochem. Photobiol. Sci.* 17, 81–88. <https://doi.org/10.1039/C7PP00240H>
- Feltcher, M.E., Braunstein, M., 2012. Emerging themes in SecA2-mediated protein export. *Nat Rev Microbiol* 10, 779–789. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2874>
- Fernández, M., Zúñiga, M., 2006. Amino Acid Catabolic Pathways of Lactic Acid Bacteria. *Critical Reviews in Microbiology* 32, 155–183. <https://doi.org/10.1080/10408410600880643>
- Fioravanti, A., Mathelie-Guinlet, M., Dufrière, Y., Remaut, H., 2022. The *Bacillus anthracis* S-layer is an exoskeleton-like structure that imparts mechanical and osmotic stabilization to the cell wall. *PNAS Nexus* pgac121. <https://doi.org/10.1093/pnasnexus/pgac121>
- Fioravanti, A., Van Hauwermeiren, F., Van der Verren, S.E., Jonckheere, W., Goncalves, A., Pardon, E., Steyaert, J., De Greve, H., Lamkanfi, M., Remaut, H., 2019. Structure of S-layer protein Sap reveals a mechanism for therapeutic intervention in anthrax. *Nat Microbiol* 4, 1805–1814. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0499-1>
- Fisher, J.A., Smit, J., Agabian, N., 1988. Transcriptional analysis of the major surface array gene of *Caulobacter crescentus*. *J Bacteriol* 170, 4706–4713.
- Forsberg, L.S., Choudhury, B., Leoff, C., Marston, C.K., Hoffmaster, A.R., Saile, E., Quinn, C.P., Kannenberg, E.L., Carlson, R.W., 2011. Secondary cell wall polysaccharides from *Bacillus cereus* strains G9241, 03BB87 and 03BB102 causing fatal pneumonia share similar glycosyl structures with the polysaccharides from *Bacillus anthracis*. *Glycobiology* 21, 934–948. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwr026>
- Fouet, A., 2009. The surface of *Bacillus anthracis*. *Molecular Aspects of Medicine* 30, 374–385. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2009.07.001>
- Français, M., Bott, R., Dargaignaratz, C., Giniès, C., Carlin, F., Broussolle, V., Nguyen-Thé, C., 2021. Short-Chain and Unsaturated Fatty Acids Increase Sequentially From the Lag Phase During Cold Growth of *Bacillus cereus*. *Frontiers in Microbiology* 12.
- Français, M., Carlin, F., Broussolle, V., Nguyen-Thé, C., 2019. *Bacillus cereus* *cshA* Is Expressed during the Lag Phase of Growth and Serves as a Potential Marker of Early Adaptation to Low Temperature and pH. *Appl. Environ. Microbiol.* 85. <https://doi.org/10.1128/AEM.00486-19>
- Frankland, G.C., Frankland, P.F., Lankester, E.R., 1887. XI. Studies on some new micro-organisms obtained from air. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. (B.)* 178, 257–287. <https://doi.org/10.1098/rstB.1887.0011>

- Frece, J., Kos, B., Svetec, I.K., Zgaga, Z., Mrsa, V., Susković, J., 2005. Importance of S-layer proteins in probiotic activity of *Lactobacillus acidophilus* M92. *J Appl Microbiol* 98, 285–292. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02473.x>
- Frenzel, E., Doll, V., Pauthner, M., Lücking, G., Scherer, S., Ehling-Schulz, M., 2012. CodY orchestrates the expression of virulence determinants in emetic *Bacillus cereus* by impacting key regulatory circuits. *Molecular Microbiology* 85, 67–88. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2012.08090.x>
- Fujita, M., Losick, R., 2002. An investigation into the compartmentalization of the sporulation transcription factor σ^E in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology* 43, 27–38. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02732.x>
- Gaillard, S., Leguerinel, I., Mafart, P., 1998. Modelling combined effects of temperature and pH on the heat resistance of spores of *Bacillus cereus*. *Food Microbiology* 15, 625–630. <https://doi.org/10.1006/fmic.1998.0201>
- Gao, T., Li, Y., Chai, Y., Wang, Q., Ding, M., 2021. SigB regulates stress resistance, glucose starvation, MnSOD production, biofilm formation, and root colonization in *Bacillus cereus* 905. *Appl Microbiol Biotechnol* 105, 5943–5957. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11402-y>
- Gao, X., Swarge, B.N., Dekker, H.L., Roseboom, W., Brul, S., Kramer, G., 2021. The Membrane Proteome of Spores and Vegetative Cells of the Food-Borne Pathogen *Bacillus cereus*. *International Journal of Molecular Sciences* 22, 12475. <https://doi.org/10.3390/ijms22212475>
- Garrote, G.L., Delfederico, L., Bibiloni, R., Abraham, A.G., Pérez, P.F., Semorile, L., Antoni, G.L.D., 2004. Lactobacilli isolated from kefir grains: evidence of the presence of S-layer proteins. *Journal of Dairy Research* 71, 222–230. <https://doi.org/10.1017/S0022029904000160>
- Gauvry, E., Mathot, A.-G., Leguérinel, I., Couvert, O., Postollec, F., Broussolle, V., Coroller, L., 2017. Knowledge of the physiology of spore-forming bacteria can explain the origin of spores in the food environment. *Research in Microbiology, Beneficial and detrimental spore-formers* 168, 369–378. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2016.10.006>
- Gefen, O., Fridman, O., Ronin, I., Balaban, N.Q., 2014. Direct observation of single stationary-phase bacteria reveals a surprisingly long period of constant protein production activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111, 556–561. <https://doi.org/10.1073/pnas.1314114111>
- Geng, P., Tian, S., Yuan, Z., Hu, X., 2017. Identification and genomic comparison of temperate bacteriophages derived from emetic *Bacillus cereus*. *PLOS ONE* 12, e0184572. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184572>
- Gerbino, E., Carasi, P., Mobili, P., Serradell, M.A., Gómez-Zavaglia, A., 2015. Role of S-layer proteins in bacteria. *World J Microbiol Biotechnol* 31, 1877–1887. <https://doi.org/10.1007/s11274-015-1952-9>
- Gerhardt, P., Ribí, E., 1964. Ultrastructure of the exosporium enveloping spores of *Bacillus cereus*. *Journal of Bacteriology* 88, 1774–1789. <https://doi.org/10.1128/jb.88.6.1774-1789.1964>
- Germaine, G.R., Coggiola, E., Murrell, W.G., 1973. Development of Ultraviolet Resistance in Sporulating *Bacillus cereus* T. *Journal of Bacteriology* 116, 823–831.
- Ghosh, N., Goel, A.K., Alam, S.I., 2014. Exoproteome analysis of a novel strain of *Bacillus cereus* implicated in disease resembling cutaneous anthrax. *Infect. Genet. Evol.* 22, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.12.014>
- Glasset, B., Herbin, S., Granier, S.A., Cavalié, L., Lafeuille, E., Guérin, C., Ruimy, R., Casagrande-Magne, F., Levast, M., Chautemps, N., Decousser, J.-W., Belotti, L., Pelloux, I., Robert, J., Brisabois, A., Ramarao, N., 2018. *Bacillus cereus*, a serious cause of nosocomial infections:

- Epidemiologic and genetic survey. PLOS ONE 13, e0194346. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194346>
- Golowczyc, M.A., Mobili, P., Garrote, G.L., Serradell, M. de los A., Abraham, A.G., Antoni, G.L.D., 2009. Interaction between *Lactobacillus kefir* and *Saccharomyces lipolytica* isolated from kefir grains: evidence for lectin-like activity of bacterial surface proteins. *Journal of Dairy Research* 76, 111–116. <https://doi.org/10.1017/S0022029908003749>
- Gomes, I.B., Lemos, M., Fernandes, S., Borges, A., Simões, L.C., Simões, M., 2021. The Effects of Chemical and Mechanical Stresses on *Bacillus cereus* and *Pseudomonas fluorescens* Single- and Dual-Species Biofilm Removal. *Microorganisms* 9, 1174. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9061174>
- Goossens, P.L., 2009. Animal models of human anthrax: The Quest for the Holy Grail. *Molecular Aspects of Medicine* 30, 467–480. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2009.07.005>
- Gopalani, M., Dhiman, A., Rahi, A., Bhatnagar, R., 2016. Overexpression of the pleiotropic regulator CodY decreases sporulation, attachment and pellicle formation in *Bacillus anthracis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 469, 672–678. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.12.019>
- Gopinathan, A., Kumar, A., Sen, A.C., Sudha, S., Varma, P., Gs, S., Eapen, M., Dinesh, K.R., 2018. A Case Series and Review of *Bacillus cereus* Endocarditis from India. *Open Microbiol J* 12, 28–33. <https://doi.org/10.2174/1874285801812010028>
- Grandvalet, C., Gominet, M., Lereclus, D., 2001. Identification of genes involved in the activation of the *Bacillus thuringiensis* inhA metalloprotease gene at the onset of sporulation. *Microbiology (Reading)* 147, 1805–1813. <https://doi.org/10.1099/00221287-147-7-1805>
- Granum, P.E., Lund, T., 1997. *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiol Lett* 157, 223–228. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1997.tb12776.x>
- Granum, P.E., O'sullivan, K., Lund, T., 1999. The sequence of the non-haemolytic enterotoxin operon from *Bacillus cereus*. *FEMS Microbiology Letters* 177, 225–229. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1999.tb13736.x>
- Graumann, P.L., Marahiel, M.A., 1999. Cold shock proteins CspB and CspC are major stationary-phase-induced proteins in *Bacillus subtilis*. *Arch Microbiol* 171, 135–138. <https://doi.org/10.1007/s002030050690>
- Gray, D.A., Dugar, G., Gamba, P., Strahl, H., Jonker, M.J., Hamoen, L.W., 2019. Extreme slow growth as alternative strategy to survive deep starvation in bacteria. *Nat Commun* 10, 890. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08719-8>
- Green, E.R., Meccas, J., 2016. Bacterial Secretion Systems – An overview. *Microbiol Spectr* 4, 10.1128/microbiolspec.VMBF-0012–2015. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.VMBF-0012-2015>
- Guérout-Fleury, A.M., Shazand, K., Frandsen, N., Stragier, P., 1995. Antibiotic-resistance cassettes for *Bacillus subtilis*. *Gene* 167, 335–336. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(95\)00652-4](https://doi.org/10.1016/0378-1119(95)00652-4)
- Guillemet, E., Cadot, C., Tran, S.-L., Guinebretière, M.-H., Lereclus, D., Ramarao, N., 2010. The InhA Metalloproteases of *Bacillus cereus* Contribute Concomitantly to Virulence. *Journal of Bacteriology* 192, 286–294. <https://doi.org/10.1128/JB.00264-09>
- Guinebretière, M.-H., Auger, S., Galleron, N., Contzen, M., De Sarrau, B., De Buyser, M.-L., Lamberet, G., Fagerlund, A., Granum, P.E., Lereclus, D., De Vos, P., Nguyen-The, C., Sorokin, A., 2013. *Bacillus cytotoxicus* sp. nov. is a novel thermotolerant species of the *Bacillus cereus* Group occasionally associated with food poisoning. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63, 31–40. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.030627-0>
- Guinebretiere, M.-H., Fagerlund, A., Granum, P.E., Nguyen-The, C., 2006. Rapid discrimination of cytK-1 and cytK-2 genes in *Bacillus cereus* strains by a novel duplex PCR system. *FEMS Microbiology Letters* 259, 74–80. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2006.00247.x>

- Guinebretière, M.-H., Thompson, F.L., Sorokin, A., Normand, P., Dawyndt, P., Ehling-Schulz, M., Svensson, B., Sanchis, V., Nguyen-The, C., Heyndrickx, M., Vos, P.D., 2008. Ecological diversification in the *Bacillus cereus* Group. *Environmental Microbiology* 10, 851–865. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2007.01495.x>
- Guinebretière, M.-H., Velge, P., Couvert, O., Carlin, F., Debuyser, M.-L., Nguyen-The, C., 2010. Ability of *Bacillus cereus* Group Strains To Cause Food Poisoning Varies According to Phylogenetic Affiliation (Groups I to VII) Rather than Species Affiliation. *Journal of Clinical Microbiology* 48, 3388–3391. <https://doi.org/10.1128/JCM.00921-10>
- Gupta, A.K., Pathak, R., Singh, B., Gautam, Hemlata, Kumar, Ram, Kumar, Raj, Arora, R., Gautam, Hemant, 2011. Proteomic analysis of global changes in protein expression during exposure of gamma radiation in *Bacillus* sp. HKG 112 isolated from saline soil. *J. Microbiol. Biotechnol.* 21, 574–581.
- Guzmán-Soto, I., McTiernan, C., Gonzalez-Gomez, M., Ross, A., Gupta, K., Suuronen, E.J., Mah, T.-F., Griffith, M., Alarcon, E.I., 2021. Mimicking biofilm formation and development: Recent progress in in vitro and in vivo biofilm models. *iScience* 24, 102443. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.102443>
- Hadjifrangiskou, M., Chen, Y., Koehler, T.M., 2007. The Alternative Sigma Factor σ^H Is Required for Toxin Gene Expression by *Bacillus anthracis*. *Journal of Bacteriology* 189, 1874–1883. <https://doi.org/10.1128/JB.01333-06>
- Hamitouche, F., Armengaud, J., Dedieu, L., Duport, C., 2021. Cysteine Proteome Reveals Response to Endogenous Oxidative Stress in *Bacillus cereus*. *International Journal of Molecular Sciences* 22, 7550. <https://doi.org/10.3390/ijms22147550>
- Han, C.S., Xie, G., Challacombe, J.F., Altherr, M.R., Bhotika, S.S., Bruce, D., Campbell, C.S., Campbell, M.L., Chen, J., Chertkov, O., Cleland, C., Dimitrijevic, M., Doggett, N.A., Fawcett, J.J., Glavina, T., Goodwin, L.A., Hill, K.K., Hitchcock, P., Jackson, P.J., Keim, P., Kewalramani, A.R., Longmire, J., Lucas, S., Malfatti, S., McMurry, K., Meincke, L.J., Misra, M., Moseman, B.L., Mundt, M., Munk, A.C., Okinaka, R.T., Parson-Quintana, B., Reilly, L.P., Richardson, P., Robinson, D.L., Rubin, E., Saunders, E., Tapia, R., Tesmer, J.G., Thayer, N., Thompson, L.S., Tice, H., Ticknor, L.O., Wills, P.L., Brettin, T.S., Gilna, P., 2006. Pathogenomic Sequence Analysis of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* Isolates Closely Related to *Bacillus anthracis*. *Journal of Bacteriology* 188, 3382–3390. <https://doi.org/10.1128/JB.188.9.3382-3390.2006>
- Hao, Z., Zhang, W., Wang, X., Wang, Y., Qin, X., Luo, H., Huang, H., Su, X., 2022. Identification of WxL and S-Layer Proteins from *Lactobacillus brevis* with the Ability to Bind Cellulose and Xylan. *International Journal of Molecular Sciences* 23, 4136. <https://doi.org/10.3390/ijms23084136>
- Haque, M.A., Russell, N.J.Y. 2004, 2004. Strains of *Bacillus cereus* vary in the phenotypic adaptation of their membrane lipid composition in response to low water activity, reduced temperature and growth in rice starch. *Microbiology* 150, 1397–1404. <https://doi.org/10.1099/mic.0.26767-0>
- Hartmann, E.M., Armengaud, J., 2014. Shotgun proteomics suggests involvement of additional enzymes in dioxin degradation by *Sphingomonas wittichii* RW1. *Environmental Microbiology* 16, 162–176. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12264>
- Hauge, S., 1955. Food Poisoning Caused by Aerobic Spore-Forming Bacilli. *Journal of Applied Bacteriology* 18, 591–595. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1955.tb02116.x>
- Haydar, A., Tran, S.-L., Guillemet, E., Darrigo, C., Perchat, S., Lereclus, D., Coquet, L., Jouenne, T., Ramarao, N., 2018. InhA1-Mediated Cleavage of the Metalloprotease NprA Allows *Bacillus cereus* to Escape From Macrophages. *Frontiers in Microbiology* 9.

- Hecker, M., Völker, U., 2001. General stress response of *Bacillus subtilis* and other bacteria, in: *Advances in Microbial Physiology*. Academic Press, pp. 35–91. [https://doi.org/10.1016/S0065-2911\(01\)44011-2](https://doi.org/10.1016/S0065-2911(01)44011-2)
- Hecker, M., Völker, U., 1998. Non-specific, general and multiple stress resistance of growth-restricted *Bacillus subtilis* cells by the expression of the σ^B regulon. *Molecular Microbiology* 29, 1129–1136. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.00977.x>
- Helgason, E., Tourasse, N.J., Meisal, R., Caugant, D.A., Kolstø, A.-B., 2004. Multilocus Sequence Typing Scheme for Bacteria of the *Bacillus cereus* Group. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 191–201. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.1.191-201.2004>
- Henkin, T.M., 1996. The role of the CcpA transcriptional regulator in carbon metabolism in *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiology Letters* 135, 9–15. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1996.tb07959.x>
- Hicks, C.W., Sweeney, D.A., Cui, X., Li, Y., Eichacker, P.Q., 2012. An overview of anthrax infection including the recently identified form of disease in injection drug users. *Intensive Care Med* 38, 1092–1104. <https://doi.org/10.1007/s00134-012-2541-0>
- Hornstra, D., Andersson, M.A., Teplova, V.V., Mikkola, R., Uotila, L.M., Andersson, L.C., Roivainen, M., Gahmberg, C.G., Salkinoja-Salonen, M.S., 2013. Potato Crop as a Source of Emetic *Bacillus cereus* and Cereulide-Induced Mammalian Cell Toxicity. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 3534–3543. <https://doi.org/10.1128/AEM.00201-13>
- Hoton, F.M., Andrup, L., Swiecicka, I., Mahillon, J. 2005, 2005. The cereulide genetic determinants of emetic *Bacillus cereus* are plasmid-borne. *Microbiology* 151, 2121–2124. <https://doi.org/10.1099/mic.0.28069-0>
- Houry, A., Briandet, R., Aymerich, S., Gohar, M.Y. 2010, 2010. Involvement of motility and flagella in *Bacillus cereus* biofilm formation. *Microbiology* 156, 1009–1018. <https://doi.org/10.1099/mic.0.034827-0>
- Houwink, A.L., 1953. A macromolecular mono-layer in the cell wall of *Spirillum spec.* *Biochimica et Biophysica Acta* 10, 360–366. [https://doi.org/10.1016/0006-3002\(53\)90266-2](https://doi.org/10.1016/0006-3002(53)90266-2)
- Huang, Y., Flint, S.H., Loo, T.S., Palmer, J.S., 2022. Emetic toxin production of *Bacillus cereus* in a biofilm. *LWT* 154, 112840. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112840>
- Huang, Y., Flint, S.H., Palmer, J.S., 2020. *Bacillus cereus* spores and toxins - The potential role of biofilms. *Food Microbiol.* 90, 103493. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103493>
- Hynönen, U., Westerlund-Wikström, B., Palva, A., Korhonen, T.K., 2002. Identification by Flagellum Display of an Epithelial Cell- and Fibronectin-Binding Function in the SlpA Surface Protein of *Lactobacillus brevis*. *Journal of Bacteriology* 184, 3360–3367. <https://doi.org/10.1128/JB.184.12.3360-3367.2002>
- Itoh, Y., Nishijyo, T., Nakada, Y., 2007. Histidine Catabolism and Catabolite Regulation, in: Ramos, J.-L., Filloux, A. (Eds.), *Pseudomonas: A Model System in Biology*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 371–395. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6097-7_13
- Ivanova, N., Sorokin, A., Anderson, I., Galleron, N., Candelon, B., Kapatral, V., Bhattacharyya, A., Reznik, G., Mikhailova, N., Lapidus, A., Chu, L., Mazur, M., Goltsman, E., Larsen, N., D'Souza, M., Walunas, T., Grechkin, Y., Pusch, G., Haselkorn, R., Fonstein, M., Dusko Ehrlich, S., Overbeek, R., Kyrpides, N., 2003. Genome sequence of *Bacillus cereus* and comparative analysis with *Bacillus anthracis*. *Nature* 423, 87–91. <https://doi.org/10.1038/nature01582>
- Jakava-Viljanen, M., Åvall-Jääskeläinen, S., Messner, P., Sleytr, U.B., Palva, A., 2002. Isolation of Three New Surface Layer Protein Genes (slp) from *Lactobacillus brevis* ATCC 14869 and Characterization of the Change in Their Expression under Aerated and Anaerobic Conditions. *Journal of Bacteriology* 184, 6786–6795. <https://doi.org/10.1128/JB.184.24.6786-6795.2002>

- Jankowski, U., Merroun, M.L., Selenska-Pobell, S., Fahmy, K., 2010. S-Layer protein from *Lysinibacillus sphaericus* JG-A12 as matrix for Au III sorption and Au-nanoparticle formation. *Spectroscopy* 24, 177–181. <https://doi.org/10.3233/SPE-2010-0408>
- Jarosch, M., Egelseer, E.M., Mattanovich, D., Sleytr, U.B., Sára, M.Y. 2000, 2000. S-layer gene sbsC of *Bacillus stearothermophilus* ATCC 12980: molecular characterization and heterologous expression in *Escherichia coli*. The GenBank accession number for the sequence described in this paper is AF055578. *Microbiology* 146, 273–281. <https://doi.org/10.1099/00221287-146-2-273>
- Jensen, G.B., Hansen, B.M., Eilenberg, J., Mahillon, J., 2003. The hidden lifestyles of *Bacillus cereus* and relatives. *Environmental Microbiology* 5, 631–640. <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2003.00461.x>
- Jessberger, N., Dietrich, R., Janowski, R., Niessing, D., Märklbauer, E., 2022. Presence and function of Hbl B', the fourth protein component encoded by the hbl operon in *Bacillus cereus*. *Virulence* 13, 483–501. <https://doi.org/10.1080/21505594.2022.2046951>
- Jessberger, N., Dietrich, R., Schauer, K., Schwemmer, S., Märklbauer, E., Benz, R., 2020. Characteristics of the Protein Complexes and Pores Formed by *Bacillus cereus* Hemolysin BL. *Toxins* 12, 672. <https://doi.org/10.3390/toxins12110672>
- Jiménez, G., Urdiain, M., Cifuentes, A., López-López, A., Blanch, A.R., Tamames, J., Kämpfer, P., Kolstø, A.-B., Ramón, D., Martínez, J.F., Codoñer, F.M., Rosselló-Móra, R., 2013. Description of *Bacillus toyonensis* sp. nov., a novel species of the *Bacillus cereus* group, and pairwise genome comparisons of the species of the group by means of ANI calculations. *Systematic and Applied Microbiology* 36, 383–391. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2013.04.008>
- Jobin, M.-P., Clavel, T., Carlin, F., Schmitt, P., 2002. Acid tolerance response is low-pH and late-stationary growth phase inducible in *Bacillus cereus* TZ415. *International Journal of Food Microbiology, Notermans Special Issue* 79, 65–73. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00180-0](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00180-0)
- Jurtshuk, P., 1996. Bacterial Metabolism, in: Baron, S. (Ed.), *Medical Microbiology*. University of Texas Medical Branch at Galveston, Galveston (TX).
- Kahala, M., Savijoki, K., Palva, A., 1997. In vivo expression of the *Lactobacillus brevis* S-layer gene. *Journal of Bacteriology* 179, 284–286. <https://doi.org/10.1128/jb.179.1.284-286.1997>
- Kalbhenn, E.M., Kranzler, M., Gacek-Matthews, A., Grass, G., Stark, T.D., Frenzel, E., Ehling-Schulz, M., 2022. Impact of a Novel PagR-like Transcriptional Regulator on Cereulide Toxin Synthesis in Emetic *Bacillus cereus*. *International Journal of Molecular Sciences* 23, 11479. <https://doi.org/10.3390/ijms231911479>
- Kandiba, L., Eichler, J., 2014. Archaeal S-layer glycoproteins: post-translational modification in the face of extremes. *Frontiers in Microbiology* 5.
- Kandiba, L., Guan, Z., Eichler, J., 2013. Lipid modification gives rise to two distinct *Haloferax volcanii* S-layer glycoprotein populations. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1828, 938–943. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2012.11.023>
- Karmazyn-Campelli, C., Rhayat, L., Carballido-López, R., Duperrier, S., Frandsen, N., 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. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06121.x>
- Karthika, S., Midhun, S.J., Jisha, M.S., 2020. A potential antifungal and growth-promoting bacterium *Bacillus* sp. KTMA4 from tomato rhizosphere. *Microbial Pathogenesis* 142, 104049. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104049>
- Kelly, J., Vinogradov, E., Robotham, A., Tessier, L., Logan, S.M., Jarrell, K.F., 2022. Characterizing the N- and O-linked glycans of the PGF-CTERM sorting domain-containing S-layer protein

- of *Methanoculleus marisnigri*. *Glycobiology* 32, 629–644. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwac019>
- Kern, J., Schneewind, O., 2010. BslA, the S-layer adhesin of *B. anthracis*, is a virulence factor for anthrax pathogenesis. *Molecular Microbiology* 75, 324–332. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06958.x>
- Kern, J., Wilton, R., Zhang, R., Binkowski, T.A., Joachimiak, A., Schneewind, O., 2011. Structure of Surface Layer Homology (SLH) Domains from *Bacillus anthracis* Surface Array Protein. *J. Biol. Chem.* 286, 26042–26049. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.248070>
- Kern, J.W., Schneewind, O., 2008. BslA, a pXO1-encoded adhesin of *Bacillus anthracis*. *Molecular Microbiology* 68, 504–515. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06169.x>
- Kern, V.J., Kern, J.W., Theriot, J.A., Schneewind, O., Missiakas, D., 2012. Surface-Layer (S-Layer) Proteins Sap and EA1 Govern the Binding of the S-Layer-Associated Protein BslO at the Cell Septa of *Bacillus anthracis*. *Journal of Bacteriology* 194, 3833–3840. <https://doi.org/10.1128/JB.00402-12>
- Kessel, M., Wildhaber, I., Cohen, S., Baumeister, W., 1988. Three-dimensional structure of the regular surface glycoprotein layer of *Halobacterium volcanii* from the Dead Sea. *The EMBO Journal* 7, 1549–1554. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1988.tb02974.x>
- Kim, J.-B., Kim, J.-M., Kim, C.-H., Seo, K.S., Park, Y.-B., Choi, N.-J., Oh, D.-H., 2010. Emetic toxin producing *Bacillus cereus* Korean isolates contain genes encoding diarrheal-related enterotoxins. *International Journal of Food Microbiology, The 16th CBL (Club des Bactéries Lactiques) Symposium, May 2009, Toulouse, France* 144, 182–186. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.08.021>
- Kinns, H., Badelt-Lichtblau, H., Egelseer, E.M., Sleytr, U.B., Howorka, S., 2010. Identifying Assembly-Inhibiting and Assembly-Tolerant Sites in the SbsB S-Layer Protein from *Geobacillus stearothermophilus*. *Journal of Molecular Biology* 395, 742–753. <https://doi.org/10.1016/j.jmB.2009.10.012>
- Kirby, J.M., Ahern, H., Roberts, A.K., Kumar, V., Freeman, Z., Acharya, K.R., Shone, C.C., 2009. Cwp84, a Surface-associated Cysteine Protease, Plays a Role in the Maturation of the Surface Layer of *Clostridium difficile* *. *Journal of Biological Chemistry* 284, 34666–34673. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.051177>
- Kirk, J.A., Gebhart, D., Buckley, A.M., Lok, S., Scholl, D., Douce, G.R., Govoni, G.R., Fagan, R.P., 2017. New class of precision antimicrobials redefines role of *Clostridium difficile* S-layer in virulence and viability. *Science Translational Medicine* 9. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aah6813>
- Klemm, P., Schembri, M.A., 2000. Bacterial adhesins: function and structure. *International Journal of Medical Microbiology* 290, 27–35. [https://doi.org/10.1016/S1438-4221\(00\)80102-2](https://doi.org/10.1016/S1438-4221(00)80102-2)
- Koch, R., 1876. Die Aetiologie der Milzbrand-Krankheit, begründet auf die Entwicklungsgeschichte *Bacillus Anthracis*. *Beiträge zur Biologie der Pflanzen* 2, 277–310.
- Konrad, Z., Eichler, J., 2002. Lipid modification of proteins in Archaea: attachment of a mevalonic acid-based lipid moiety to the surface-layer glycoprotein of *Haloferax volcanii* follows protein translocation. *Biochemical Journal* 366, 959–964. <https://doi.org/10.1042/bj20020757>
- Kos, B., Šušković, J., Vuković, S., Šimpraga, M., Frece, J., Matošić, S., 2003. Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. *Journal of Applied Microbiology* 94, 981–987. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.01915.x>
- Kotiranta, A., Haapasalo, M., Kari, K., Kerosuo, E., Olsen, I., Sorsa, T., Meurman, J.H., Lounatmaa, K., 1998. Surface Structure, Hydrophobicity, Phagocytosis, and Adherence to Matrix Proteins of *Bacillus cereus* Cells with and without the Crystalline Surface Protein Layer. *Infection and Immunity* 66, 4895–4902.

- Kotiranta, A., Lounatmaa, K., Haapasalo, M., 2000. Epidemiology and pathogenesis of *Bacillus cereus* infections. *Microbes and Infection* 2, 189–198. [https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(00\)00269-0](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(00)00269-0)
- Kotiranta, A.K., Ito, H., Haapasalo, M.P.P., Lounatmaa, K., 1999. Radiation sensitivity of *Bacillus cereus* with and without a crystalline surface protein layer. *FEMS Microbiol Lett* 179, 275–280. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1999.tb08738.x>
- Kranzler, M., Stollewerk, K., Rouzeau-Szynalski, K., Blayo, L., Sulyok, M., Ehling-Schulz, M., 2016. Temperature Exerts Control of *Bacillus cereus* Emetic Toxin Production on Post-transcriptional Levels. *Front Microbiol* 7. <https://doi.org/10.3389/fmicB.2016.01640>
- Kügelgen, A. von, Tang, H., Hardy, G.G., Kureisaite-Ciziene, D., Brun, Y.V., Stansfeld, P.J., Robinson, C.V., Bharat, T.A.M., 2020. In Situ Structure of an Intact Lipopolysaccharide-Bound Bacterial Surface Layer. *Cell* 180, 348–358.e15. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.12.006>
- Ladeuze, S., Lentz, N., Delbrassinne, L., Hu, X., Mahillon, J., 2011. Antifungal Activity Displayed by Cereulide, the Emetic Toxin Produced by *Bacillus cereus*. *Appl Environ Microbiol* 77, 2555–2558. <https://doi.org/10.1128/AEM.02519-10>
- Laishley, E.J., Bernlohr, R.W., 1968. Regulation of Arginine and Proline Catabolism in *Bacillus licheniformis*. *Journal of Bacteriology* 96, 322–329. <https://doi.org/10.1128/jB.96.2.322-329.1968>
- Lanzoni-Mangutchi, P., Banerji, O., Wilson, J., Barwinska-Sendra, A., Kirk, J.A., Vaz, F., O’Beirne, S., Baslé, A., El Omari, K., Wagner, A., Fairweather, N.F., Douce, G.R., Bullough, P.A., Fagan, R.P., Salgado, P.S., 2022. Structure and assembly of the S-layer in *C. difficile*. *Nat Commun* 13, 970. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-28196-w>
- Laouami, S., Messaoudi, K., Alberto, F., Clavel, T., Duport, C., 2011. Lactate Dehydrogenase A Promotes Communication between Carbohydrate Catabolism and Virulence in *Bacillus cereus*. *Journal of Bacteriology* 193, 1757–1766. <https://doi.org/10.1128/JB.00024-11>
- Larsen, H.D., Jørgensen, K., 1997. The occurrence of *Bacillus cereus* in Danish pasteurized milk. *International Journal of Food Microbiology* 34, 179–186. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(96\)01182-8](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(96)01182-8)
- Le Lay, J., Bahloul, H., Sérino, S., Jobin, M., Schmitt, P., 2015. Reducing activity, glucose metabolism and acid tolerance response of *Bacillus cereus* grown at various pH and oxydo-reduction potential levels. *Food Microbiol.* 46, 314–321. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.07.007>
- Lechner, S., Mayr, R., Francis, K.P., Prüß, B.M., Kaplan, T., Wießner-Gunkel, E., Stewart, G.S.A.B., Scherer, S., 1998. *Bacillus weihenstephanensis* sp. nov. is a new psychrotolerant species of the *Bacillus cereus* group. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 48, 1373–1382. <https://doi.org/10.1099/00207713-48-4-1373>
- Lee, K., Costerton, J.W., Ravel, J., Auerbach, R.K., Wagner, D.M., Keim, P., Leid, J.G. 2007, 2007. Phenotypic and functional characterization of *Bacillus anthracis* biofilms. *Microbiology* 153, 1693–1701. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2006/003376-0>
- Lee, M.Y., Lee, D.W., Joo, H.K., Jeong, K.H., Lee, J.Y., 2019. Structural analysis of the manganese transport regulator MntR from *Bacillus halodurans* in apo and manganese bound forms. *PLOS ONE* 14, e0224689. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0224689>
- Legg, M.S.G., Hager-Mair, F.F., Krauter, S., Gagnon, S.M.L., López-Guzmán, A., Lim, C., Blaukopf, M., Kosma, P., Schäffer, C., Evans, S.V., 2022. The S-layer homology domains of *Paenibacillus alvei* surface protein SpaA bind to cell wall polysaccharide through the terminal monosaccharide residue. *Journal of Biological Chemistry* 101745. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2022.101745>

- Lemire, J., Alhasawi, A., Appanna, V. p., Tharmalingam, S., Appanna, V. d., 2017. Metabolic defence against oxidative stress: the road less travelled so far. *Journal of Applied Microbiology* 123, 798–809. <https://doi.org/10.1111/jam.13509>
- Leoff, C., Choudhury, B., Saile, E., Quinn, C.P., Carlson, R.W., Kannenberg, E.L., 2008. Structural Elucidation of the Nonclassical Secondary Cell Wall Polysaccharide from *Bacillus cereus* ATCC 10987 COMPARISON WITH THE POLYSACCHARIDES FROM *BACILLUS ANTHRACIS* AND *B. CEREUS* TYPE STRAIN ATCC 14579 REVEALS BOTH UNIQUE AND COMMON STRUCTURAL FEATURES. *J. Biol. Chem.* 283, 29812–29821. <https://doi.org/10.1074/jbc.M803234200>
- Lequin, M.H., Vermeulen, J.R., Elburg, R.M. van, Barkhof, F., Kornelisse, R.F., Swarte, R., Govaert, P.P., 2005. *Bacillus cereus* Meningoencephalitis in Preterm Infants: Neuroimaging Characteristics. *American Journal of Neuroradiology* 26, 2137–2143.
- Lewis, L.O., Yousten, A.A., 1988. Bacteriophage attachment to the S-layer proteins of the mosquito-pathogenic strains of *Bacillus sphaericus*. *Current Microbiology* 17, 55–60. <https://doi.org/10.1007/BF01568820>
- Lewis, P.J., Magnin, T., Errington, J., 1996. Compartmentalized distribution of the proteins controlling the prespore-specific transcription factor σ^F of *Bacillus subtilis*. *Genes to Cells* 1, 881–894. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2443.1996.750275.x>
- Li, H., Yang, R., Hao, L., Wang, C., Li, M., 2021. CspB and CspC are induced upon cold shock in *Bacillus cereus* strain D2. *Can. J. Microbiol.* 67, 703–712. <https://doi.org/10.1139/cjm-2021-0025>
- Li, L., Ren, M., Xu, Y., Jin, C., Zhang, W., Dong, X., 2020. Enhanced glycosylation of an S-layer protein enables a psychrophilic methanogenic archaeon to adapt to elevated temperatures in abundant substrates. *FEBS Letters* 594, 665–677. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13650>
- Li, W., Ma, L., Shen, X., Wang, J., Feng, Q., Liu, L., Zheng, G., Yan, Y., Sun, X., Yuan, Q., 2019. Targeting metabolic driving and intermediate influx in lysine catabolism for high-level glutarate production. *Nat Commun* 10, 3337. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11289-4>
- Lindbäck, T., Fagerlund, A., Rødland, M.S., Granum, P.E., 2004. Characterization of the *Bacillus cereus* Nhe enterotoxin. *Microbiology*, 150, 3959–3967. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27359-0>
- Low, L.Y., Yang, C., Perego, M., Osterman, A., Liddington, R.C., 2005. Structure and Lytic Activity of a *Bacillus anthracis* Prophage Endolysin*. *Journal of Biological Chemistry* 280, 35433–35439. <https://doi.org/10.1074/jbc.M502723200>
- Lücking, G., Dommel, M.K., Scherer, S., Fouet, A., Ehling-Schulz, M. 2009, 2009. Cereulide synthesis in emetic *Bacillus cereus* is controlled by the transition state regulator AbrB, but not by the virulence regulator PlcR. *Microbiology* 155, 922–931. <https://doi.org/10.1099/mic.0.024125-0>
- Lücking, G., Frenzel, E., Rüttschle, A., Marxen, S., Stark, T.D., Hofmann, T., Scherer, S., Ehling-Schulz, M., 2015. Ces locus embedded proteins control the non-ribosomal synthesis of the cereulide toxin in emetic *Bacillus cereus* on multiple levels. *Frontiers in Microbiology* 6.
- Lund, T., De Buyser, M.-L., Granum, P.E., 2000. A new cytotoxin from *Bacillus cereus* that may cause necrotic enteritis. *Molecular Microbiology* 38, 254–261. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.02147.x>
- Lund, T., Granum, P.E., 1996. Characterisation of a non-haemolytic enterotoxin complex from *Bacillus cereus* isolated after a foodborne outbreak. *FEMS Microbiology Letters* 141, 151–156. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1996.tb08377.x>
- Lyu, Y., Ye, L., Xu, J., Yang, X., Chen, W., Yu, H., 2016. Recent research progress with phospholipase C from *Bacillus cereus*. *Biotechnol Lett* 38, 23–31. <https://doi.org/10.1007/s10529-015-1962-6>

- Madeira, J.-P., Alpha-Bazin, B., Armengaud, J., Duport, C., 2015. Time dynamics of the *Bacillus cereus* exoproteome are shaped by cellular oxidation. *Frontiers in Microbiology* 6, 342. <https://doi.org/10.3389/fmicB.2015.00342>
- Madeira, J.-P., Alpha-Bazin, B.M., Armengaud, J., Duport, C., 2017. Methionine Residues in Exoproteins and Their Recycling by Methionine Sulfoxide Reductase AB Serve as an Antioxidant Strategy in *Bacillus cereus*. *Frontiers in Microbiology* 8.
- Mailloux, R., 2015. Still at the Center of it All; Novel Functions of the Oxidative Krebs Cycle. *Bioenergetics Open Access* 4. <https://doi.org/10.4172/2167-7662.1000122>
- Majed, R., Faille, C., Kallassy, M., Gohar, M., 2016. *Bacillus cereus* Biofilms-Same, Only Different. *Front Microbiol* 7, 1054. <https://doi.org/10.3389/fmicB.2016.01054>
- Makino, S., Uchida, I., Terakado, N., Sasakawa, C., Yoshikawa, M., 1989. Molecular characterization and protein analysis of the cap region, which is essential for encapsulation in *Bacillus anthracis*. *Journal of Bacteriology* 171, 722–730. <https://doi.org/10.1128/jB.171.2.722-730.1989>
- Mani, C., Selvakumari, J., Han, Y., Jo, Y., Thirugnanasambantham, K., Sundarapandian, S., Poopathi, S., 2018. Molecular Characterization of Mosquitocidal Toxin (Surface Layer Protein, SLP) from *Bacillus cereus* VCRC B540. *Appl Biochem Biotechnol* 184, 1094–1105. <https://doi.org/10.1007/s12010-017-2602-5>
- Martínez, M.G., Prado Acosta, M., Candurra, N.A., Ruzal, S.M., 2012. S-layer proteins of *Lactobacillus acidophilus* inhibits JUNV infection. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 422, 590–595. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.05.031>
- Marxen, S., Stark, T.D., Frenzel, E., Rüttschle, A., Lücking, G., Pürstinger, G., Pohl, E.E., Scherer, S., Ehling-Schulz, M., Hofmann, T., 2015a. Chemodiversity of cereulide, the emetic toxin of *Bacillus cereus*. *Anal Bioanal Chem* 407, 2439–2453. <https://doi.org/10.1007/s00216-015-8511-y>
- Marxen, S., Stark, T.D., Rüttschle, A., Lücking, G., Frenzel, E., Scherer, S., Ehling-Schulz, M., Hofmann, T., 2015b. Multiparametric Quantitation of the *Bacillus cereus* Toxins Cereulide and Isocereulides A–G in Foods. *J. Agric. Food Chem.* 63, 8307–8313. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b03705>
- Masuda, K., Kawata, T., 1985. Reassembly of a Regularly Arranged Protein in the Cell Wall of *Lactobacillus buchneri* and Its Reattachment to Cell Walls: Chemical Modification Studies.
- Mathelié-Guinlet, M., Asmar, A.T., Collet, J.-F., Dufrière, Y.F., 2020. Lipoprotein Lpp regulates the mechanical properties of the *E. coli* cell envelope. *Nature Communications* 11, 1789. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15489-1>
- Mayr, B., Kaplan, T., Lechner, S., Scherer, S., 1996. Identification and purification of a family of dimeric major cold shock protein homologs from the psychrotrophic *Bacillus cereus* WSBC 10201. *Journal of Bacteriology* 178, 2916–2925. <https://doi.org/10.1128/jB.178.10.2916-2925.1996>
- McDougald, D., Rice, S.A., Barraud, N., Steinberg, P.D., Kjelleberg, S., 2012. Should we stay or should we go: mechanisms and ecological consequences for biofilm dispersal. *Nat Rev Microbiol* 10, 39–50. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2695>
- McKenney, P.T., Driks, A., Eichenberger, P., 2013. The *Bacillus subtilis* endospore: assembly and functions of the multilayered coat. *Nature Reviews Microbiology* 11, 33–44. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2921>
- Meer, R.R., Baker, J., Bodyfelt, F.W., Griffiths, M.W., 1991. Psychrotrophic *Bacillus* spp. in Fluid Milk Products: A Review. *Journal of Food Protection* 54, 969–979. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-54.12.969>
- Melling, J., Capel, B.J., Turnbull, P.C., Gilbert, R.J., 1976. Identification of a novel enterotoxigenic activity associated with *Bacillus cereus*. *J Clin Pathol* 29, 938. <https://doi.org/10.1136/jcp.29.10.938>

- Melo, A.M.P., Teixeira, M., 2016. Supramolecular organization of bacterial aerobic respiratory chains: From cells and back. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics, Organization and dynamics of bioenergetic systems in bacteria* 1857, 190–197. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2015.11.001>
- Meng, J., Zhu, X., Gao, S.-M., Zhang, Q.-X., Sun, Z., Lu, R.-R., 2014. Characterization of surface layer proteins and its role in probiotic properties of three *Lactobacillus* strains. *International Journal of Biological Macromolecules* 65, 110–114. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.01.024>
- Merrigan, M.M., Venugopal, A., Roxas, J.L., Anwar, F., Mallozzi, M.J., Roxas, B.A.P., Gerding, D.N., Viswanathan, V.K., Vedantam, G., 2013. Surface-Layer Protein A (SlpA) Is a Major Contributor to Host-Cell Adherence of *Clostridium difficile*. *PLOS ONE* 8, e78404. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078404>
- Merroun, M.L., Raff, J., Rossberg, A., Hennig, C., Reich, T., Selenska-Pobell, S., 2005. Complexation of Uranium by Cells and S-Layer Sheets of *Bacillus sphaericus* JG-A12. *Appl Environ Microbiol* 71, 5532–5543. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.9.5532-5543.2005>
- Mesnager, S., Fontaine, T., Mignot, T., Delepierre, M., Mock, M., Fouet, A., 2000. Bacterial SLH domain proteins are non-covalently anchored to the cell surface via a conserved mechanism involving wall polysaccharide pyruvylation. *The EMBO Journal* 19, 4473–4484. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.17.4473>
- Mesnager, S., Tosi-Couture, E., Mock, M., Fouet, A., 1999. The S-layer homology domain as a means for anchoring heterologous proteins on the cell surface of *Bacillus anthracis*. *Journal of Applied Microbiology* 87, 256–260. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1999.00880.x>
- Mesnager, S., Tosi-Couture, E., Mock, M., Gounon, P., Fouet, A., 1997. Molecular characterization of the *Bacillus anthracis* main S-layer component: evidence that it is the major cell-associated antigen. *Molecular Microbiology* 23, 1147–1155. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1997.2941659.x>
- Messelh auer, U., Ehling-Schulz, M., 2018. *Bacillus cereus*—a Multifaceted Opportunistic Pathogen. *Curr Clin Micro Rpt* 5, 120–125. <https://doi.org/10.1007/s40588-018-0095-9>
- Messelh usser, U., Frenzel, E., Bl ochinger, C., Zucker, R., K ampfer, P., Ehling-Schulz, M., 2014. Emetic *Bacillus cereus* Are More Volatile Than Thought: Recent Foodborne Outbreaks and Prevalence Studies in Bavaria (2007–2013). *BioMed Research International* 2014, e465603. <https://doi.org/10.1155/2014/465603>
- Messner, P., Pum, D., Sleytr, U.B., 1986. Characterization of the ultrastructure and the self-assembly of the surface layer of *Bacillus stearothermophilus* strain NRS 2004/3a. *J Ultrastruct Mol Struct Res* 97, 73–88. [https://doi.org/10.1016/s0889-1605\(86\)80008-8](https://doi.org/10.1016/s0889-1605(86)80008-8)
- Messner, P., Sleytr, U.B., 1992. Crystalline Bacterial Cell-Surface Layers, in: Rose, A.H. (Ed.), *Advances in Microbial Physiology*. Academic Press, pp. 213–275. [https://doi.org/10.1016/S0065-2911\(08\)60218-0](https://doi.org/10.1016/S0065-2911(08)60218-0)
- Meyer, B.H., Albers, S., 2013. Hot and sweet: protein glycosylation.
- Mignot, T., Couture-Tosi, E., Mesnager, S., Mock, M., Fouet, A., 2004. In vivo *Bacillus anthracis* gene expression requires PagR as an intermediate effector of the AtxA signalling cascade. *International Journal of Medical Microbiology* 293, 619–624. <https://doi.org/10.1078/1438-4221-00306>
- Mignot, T., Denis, B., Couture-Tosi, E., Kolst , A.-B., Mock, M., Fouet, A., 2001. Distribution of S-layers on the surface of *Bacillus cereus* strains: phylogenetic origin and ecological pressure. *Environmental Microbiology* 3, 493–501. <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2001.00220.x>
- Mignot, T., Mesnager, S., Couture-Tosi, E., Mock, M., Fouet, A., 2002. Developmental switch of S-layer protein synthesis in *Bacillus anthracis*. *Molecular Microbiology* 43, 1615–1627. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02852.x>

- Mignot, T., Mock, M., Fouet, A., 2003a. A plasmid-encoded regulator couples the synthesis of toxins and surface structures in *Bacillus anthracis*. *Molecular Microbiology* 47, 917–927. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03345.x>
- Mignot, T., Mock, M., Fouet, A., 2003B. A plasmid-encoded regulator couples the synthesis of toxins and surface structures in *Bacillus anthracis*. *Molecular Microbiology* 47, 917–927. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03345.x>
- Miller, R.A., Beno, S.M., Kent, D.J., Carroll, L.M., Martin, N.H., Boor, K.J., Kovac, J., 2016. *Bacillus wiedmannii* sp. nov., a psychrotolerant and cytotoxic *Bacillus cereus* group species isolated from dairy foods and dairy environments. *Int J Syst Evol Microbiol* 66, 4744–4753. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001421>
- Milner, R.J., 1994. History of *Bacillus thuringiensis*. *Agriculture, Ecosystems & Environment, Bacillus Thuringiensis* 49, 9–13. [https://doi.org/10.1016/0167-8809\(94\)90014-0](https://doi.org/10.1016/0167-8809(94)90014-0)
- Missiakas, D., Schneewind, O., 2017. Assembly and Function of the *Bacillus anthracis* S-Layer. *Annu. Rev. Microbiol.* 71, 79–98. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-090816-093512>
- Mobili, P., de los Ángeles Serradell, M., Trejo, S.A., Avilés Puigvert, F.X., Abraham, A.G., De Antoni, G.L., 2009. Heterogeneity of S-layer proteins from aggregating and non-aggregating *Lactobacillus kefir* strains. *Antonie van Leeuwenhoek* 95, 363–372. <https://doi.org/10.1007/s10482-009-9322-y>
- Mock, M., Fouet, A., 2001. Anthrax. *Annual Review of Microbiology* 55, 647–671. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.55.1.647>
- Moeller, R., Wassmann, M., Reitz, G., Setlow, P., 2011. Effect of radioprotective agents in sporulation medium on *Bacillus subtilis* spore resistance to hydrogen peroxide, wet heat and germicidal and environmentally relevant UV radiation. *Journal of Applied Microbiology* 110, 1485–1494. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.05004.x>
- Moir, A., 2006. How do spores germinate? *Journal of Applied Microbiology* 101, 526–530. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.02885.x>
- Mols, M., 2009. *Bacillus cereus* acid stress responses.
- Mols, M., Abee, T., 2011a. *Bacillus cereus* responses to acid stress. *Environmental Microbiology* 13, 2835–2843. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02490.x>
- Mols, M., Abee, T., 2011B. Primary and secondary oxidative stress in *Bacillus*. *Environmental Microbiology* 13, 1387–1394. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02433.x>
- Mols, M., De Been, M., Zwietering, M.H., Moezelaar, R., Abee, T., 2007. Metabolic capacity of *Bacillus cereus* strains ATCC 14579 and ATCC 10987 interlinked with comparative genomics. *Environmental Microbiology* 9, 2933–2944. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2007.01404.x>
- Morita, R.Y., 1993. Bioavailability of Energy and the Starvation State, in: Kjelleberg, S. (Ed.), *Starvation in Bacteria*. Springer US, Boston, MA, pp. 1–23. https://doi.org/10.1007/978-1-4899-2439-1_1
- Morita, R.Y., 1988. Bioavailability of energy and its relationship to growth and starvation survival in nature. *Can. J. Microbiol.* 34, 436–441. <https://doi.org/10.1139/m88-076>
- Mortimer, P.R., Mccann, G., 1974. FOOD-POISONING EPISODES ASSOCIATED WITH *BACILLUS CEREUS* IN FRIED RICE. *The Lancet*, Originally published as Volume 1, Issue 7865 303, 1043–1045. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(74\)90434-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(74)90434-6)
- Moses, S., Sinner, T., Zapras, A., Stöveken, N., Hoffmann, T., Belitsky, B.R., Sonenshein, A.L., Bremer, E., 2012. Proline Utilization by *Bacillus subtilis*: Uptake and Catabolism. *Journal of Bacteriology* 194, 745–758. <https://doi.org/10.1128/JB.06380-11>
- Müller, D.J., Baumeister, W., Engel, A., 1996. Conformational change of the hexagonally packed intermediate layer of *Deinococcus radiodurans* monitored by atomic force microscopy. *Journal of Bacteriology* 178, 3025–3030. <https://doi.org/10.1128/jb.178.11.3025-3030.1996>

- Müller, D.J., Krieg, M., Alsteens, D., Dufrêne, Y.F., 2009. New frontiers in atomic force microscopy: analyzing interactions from single-molecules to cells. *Current Opinion in Biotechnology, Analytical biotechnology* 20, 4–13. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2009.02.005>
- Müller, T., Schumann, C., Kraegeloh, A., 2012. STED Microscopy and its Applications: New Insights into Cellular Processes on the Nanoscale. *ChemPhysChem* 13, 1986–2000. <https://doi.org/10.1002/cphc.201100986>
- Mursalin, M.H., Coburn, P.S., Livingston, E., Miller, F.C., Astley, R., Fouet, A., Callegan, M.C., 2019. S-layer Impacts the Virulence of *Bacillus* in Endophthalmitis. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 60, 3727–3739. <https://doi.org/10.1167/iovs.19-27453>
- Mursalin, M.H., Coburn, P.S., Miller, F.C., Livingston, E.T., Astley, R., Callegan, M.C., 2020a. Innate Immune Interference Attenuates Inflammation In *Bacillus* Endophthalmitis. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 61, 17. <https://doi.org/10.1167/iovs.61.13.17>
- Mursalin, M.H., Livingston, E.T., Callegan, M.C., 2020B. The *cereus* matter of *Bacillus* endophthalmitis. *Experimental Eye Research* 193, 107959. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2020.107959>
- Nakamura, L.K., 1998. *Bacillus pseudomycooides* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 48, 1031–1035. <https://doi.org/10.1099/00207713-48-3-1031>
- Nguyen-Mau, S.-M., Oh, S.-Y., Kern, V.J., Missiakas, D.M., Schneewind, O., 2012. Secretion Genes as Determinants of *Bacillus anthracis* Chain Length. *Journal of Bacteriology* 194, 3841–3850. <https://doi.org/10.1128/JB.00384-12>
- Nguyen-Mau, S.-M., Oh, S.-Y., Schneewind, D.I., Missiakas, D., Schneewind, O., 2015. *Bacillus anthracis* SlaQ Promotes S-Layer Protein Assembly. *J. Bacteriol.* 197, 3216–3227. <https://doi.org/10.1128/JB.00492-15>
- Nicholson, W.L., Schuerger, A.C., Setlow, P., 2005. The solar UV environment and bacterial spore UV resistance: considerations for Earth-to-Mars transport by natural processes and human spaceflight. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, Biological Effects of Ultraviolet Radiation* 571, 249–264. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2004.10.012>
- Oatley, P., Kirk, J.A., Ma, S., Jones, S., Fagan, R.P., 2020. Spatial organization of *Clostridium difficile* S-layer biogenesis. *Scientific Reports* 10, 14089. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-71059-x>
- Oh, S.-Y., Budzik, J.M., Garufi, G., Schneewind, O., 2011. Two capsular polysaccharides enable *Bacillus cereus* G9241 to cause anthrax-like disease. *Molecular Microbiology* 80, 455–470. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07582.x>
- Oh, S.-Y., Lunderberg, J.M., Chateau, A., Schneewind, O., Missiakas, D., 2016. Genes Required for *Bacillus anthracis* Secondary Cell Wall Polysaccharide Synthesis. *Journal of Bacteriology*. <https://doi.org/10.1128/JB.00613-16>
- Oikawa, T., 2007. Alanine, Aspartate, and Asparagine Metabolism in Microorganisms, in: Wendisch, V.F. (Ed.), *Amino Acid Biosynthesis ~ Pathways, Regulation and Metabolic Engineering, Microbiology Monographs*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 273–288. https://doi.org/10.1007/7171_2006_062
- Okinaka, R., Cloud, K., Hampton, O., Hoffmaster, A., Hill, K., Keim, P., Koehler, T., Lamke, G., Kumano, S., Manter, D., Martinez, Y., Ricke, D., Svensson, R., Jackson, P., 1999. Sequence, assembly and analysis of pX01 and pX02. *Journal of Applied Microbiology* 87, 261–262. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1999.00883.x>
- Paananen, A., Mikkola, R., Saraneva, T., Matikainen, S., Hess, M., Andersson, M., Julkunen, I., Salkinoja-Salonen, M.S., Timonen, T., 2002. Inhibition of human natural killer cell activity by cereulide, an emetic toxin from *Bacillus cereus*. *Clinical and Experimental Immunology* 129, 420–428. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2249.2002.01898.x>

- Pandiani, F., Brillard, J., Bornard, I., Michaud, C., Chamot, S., Nguyen-the, C., Broussolle, V., 2010. Differential Involvement of the Five RNA Helicases in Adaptation of *Bacillus cereus* ATCC 14579 to Low Growth Temperatures. *Applied and Environmental Microbiology* 76, 6692–6697. <https://doi.org/10.1128/AEM.00782-10>
- Panhorst, M., Brückl, H., Kiefer, B., Reiss, G., Santarius, U., Guckenberger, R., 2001. Formation of metallic surface structures by ion etching using a S-layer template. *Journal of Vacuum Science & Technology B: Microelectronics and Nanometer Structures Processing, Measurement, and Phenomena* 19, 722–724. <https://doi.org/10.1116/1.1364699>
- Pantaléon, V., Soavelomandroso, A.P., Bouttier, S., Briandet, R., Roxas, B., Chu, M., Collignon, A., Janoir, C., Vedantam, G., Candela, T., 2015. The *Clostridium difficile* Protease Cwp84 Modulates both Biofilm Formation and Cell-Surface Properties. *PLOS ONE* 10, e0124971. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0124971>
- Paraszkiwicz, K., Moryl, M., Płaza, G., Bhagat, D., K. Satpute, S., Bernat, P., 2021. Surfactants of microbial origin as antibiofilm agents. *International Journal of Environmental Health Research* 31, 401–420. <https://doi.org/10.1080/09603123.2019.1664729>
- Park, E., Hussain, M.S., Wei, S., Kwon, M., Oh, D.-H., 2019. Genotypic and phenotypic characteristics of biofilm formation of emetic toxin producing *Bacillus cereus* strains. *Food Control* 96, 527–534. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.10.008>
- Park, K.-M., Kim, H.-J., Kim, M.-S., Koo, M., 2021. Morphological Features and Cold-Response Gene Expression in Mesophilic *Bacillus cereus* Group and Psychrotolerant *Bacillus cereus* Group under Low Temperature. *Microorganisms* 9, 1255. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9061255>
- Patel, M.S., Nemeria, N.S., Furey, W., Jordan, F., 2014. The Pyruvate Dehydrogenase Complexes: Structure-based Function and Regulation *. *Journal of Biological Chemistry* 289, 16615–16623. <https://doi.org/10.1074/jbc.R114.563148>
- Peng, J.-S., Tsai, W.-C., Chou, C.-C., 2001. Surface characteristics of *Bacillus cereus* and its adhesion to stainless steel. *International Journal of Food Microbiology* 65, 105–111. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00517-1](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00517-1)
- Peters, J., Nitsch, M., Kühlmorgen, B., Golbik, R., Lupas, A., Kellermann, J., Engelhardt, H., Pfander, J.-P., Müller, S., Goldie, K., Engel, A., Stetter, K.-O., Baumeister, W., 1995. Tetrabrachion: A Filamentous Archaeobacterial Surface Protein Assembly of Unusual Structure and Extreme Stability. *Journal of Molecular Biology* 245, 385–401. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1994.0032>
- Pi, J., Cai, J., 2019. Cell Topography and Its Quantitative Imaging by AFM, in: Santos, N.C., Carvalho, F.A. (Eds.), *Atomic Force Microscopy: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*. Springer, New York, NY, pp. 99–113. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8894-5_6
- Piggot, P.J., Hilbert, D.W., 2004. Sporulation of *Bacillus subtilis*. *Current Opinion in Microbiology, Growth and development* 7, 579–586. <https://doi.org/10.1016/j.miB.2004.10.001>
- Planchon, S., Gaillard-Martinie, B., Dordet-Frisoni, E., Bellon-Fontaine, M.N., Leroy, S., Labadie, J., Hébraud, M., Talon, R., 2006. Formation of biofilm by *Staphylococcus xylosum*. *International Journal of Food Microbiology* 109, 88–96. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.01.016>
- Plaut, R.D., Beaver, J.W., Zemansky, J., Kaur, A.P., George, M., Biswas, B., Henry, M., Bishop-Lilly, K.A., Mokashi, V., Hannah, R.M., Pope, R.K., Read, T.D., Stibitz, S., Calendar, R., Sozhamannan, S., 2014a. Genetic Evidence for the Involvement of the S-Layer Protein Gene *sap* and the Sporulation Genes *spoOA*, *spoOB*, and *spoOF* in Phage AP50c Infection of *Bacillus anthracis*. *Journal of Bacteriology* 196, 1143–1154. <https://doi.org/10.1128/JB.00739-13>

- Plaut, R.D., Beaber, J.W., Zemansky, J., Kaur, A.P., George, M., Biswas, B., Henry, M., Bishop-Lilly, K.A., Mokashi, V., Hannah, R.M., Pope, R.K., Read, T.D., Stibitz, S., Calendar, R., Sozhamannan, S., 2014B. Genetic Evidence for the Involvement of the S-Layer Protein Gene *sap* and the Sporulation Genes *spo0A*, *spo0B*, and *spo0F* in Phage AP50c Infection of *Bacillus anthracis*. *Journal of Bacteriology* 196, 1143–1154. <https://doi.org/10.1128/JB.00739-13>
- Pollmann, K., Raff, J., Schnorpfeil, M., Radeva, G., Selenska-Pobell, S., 2005. Novel surface layer protein genes in *Bacillus sphaericus* associated with unusual insertion elements. *Microbiology* 151, 2961–2973. <https://doi.org/10.1099/mic.0.28201-0>
- Pomerantsev, A.P., Kalnin, K.V., Osorio, M., Leppla, S.H., 2003. Phosphatidylcholine-Specific Phospholipase C and Sphingomyelinase Activities in Bacteria of the *Bacillus cereus* Group. *Infection and Immunity* 71, 6591–6606. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.11.6591-6606.2003>
- Prado Acosta, M., Goyette-Desjardins, G., Scheffel, J., Dudeck, A., Ruland, J., Lepenies, B., 2021. S-Layer From *Lactobacillus brevis* Modulates Antigen-Presenting Cell Functions via the Mincle-Syk-Card9 Axis. *Frontiers in Immunology* 12.
- Prado Acosta, M., Ruzal, S.M., Cordo, S.M., 2016. S-layer proteins from *Lactobacillus* sp. inhibit bacterial infection by blockage of DC-SIGN cell receptor. *International Journal of Biological Macromolecules* 92, 998–1005. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.07.096>
- Pum, D., Messner, P., Sleytr, U.B., 1991. Role of the S layer in morphogenesis and cell division of the archaeobacterium *Methanococcus sinense*. *J Bacteriol* 173, 6865–6873.
- Pum, D., Toca-Herrera, J.L., Sleytr, U.B., 2013. S-Layer Protein Self-Assembly. *International Journal of Molecular Sciences* 14, 2484–2501. <https://doi.org/10.3390/ijms14022484>
- Raddadi, N., Belaouis, A., Tamagnini, I., Hansen, B.M., Hendriksen, N.B., Boudabous, A., Cherif, A., Daffonchio, D., 2009. Characterization of polyvalent and safe *Bacillus thuringiensis* strains with potential use for biocontrol. *Journal of Basic Microbiology* 49, 293–303. <https://doi.org/10.1002/jobm.200800182>
- Raddadi, N., Cherif, A., Mora, D., Brusetti, L., Borin, S., Boudabous, A., Daffonchio, D., 2005. The autolytic phenotype of the *Bacillus cereus* group. *Journal of Applied Microbiology* 99, 1070–1081. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02713.x>
- Raheb, J., Naghdi, S., Flint, K.P., 2008. The Effect of Starvation Stress on the Protein Profiles in *Flexibacter chinensis*. *Iranian Biomedical Journal* 12, 67–75.
- Ramarao, N., Lereclus, D., 2005. The InhA1 metalloprotease allows spores of the *B. cereus* group to escape macrophages. *Cellular Microbiology* 7, 1357–1364. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2005.00562.x>
- Rasko, D.A., Rosovitz, M.J., Økstad, O.A., Fouts, D.E., Jiang, L., Cer, R.Z., Kolstø, A.-B., Gill, S.R., Ravel, J., 2007. Complete Sequence Analysis of Novel Plasmids from Emetic and Periodontal *Bacillus cereus* Isolates Reveals a Common Evolutionary History among the *B. cereus*-Group Plasmids, Including *Bacillus anthracis* pXO1. *J Bacteriol* 189, 52–64. <https://doi.org/10.1128/JB.01313-06>
- Ratnayake-Lecamwasam, M., Serror, P., Wong, K.-W., Sonenshein, A.L., 2004. *Bacillus subtilis* CodY represses early-stationary-phase genes by sensing GTP levels 12.
- Raymond, B., Wyres, K.L., Sheppard, S.K., Ellis, R.J., Bonsall, M.B., 2010. Environmental Factors Determining the Epidemiology and Population Genetic Structure of the *Bacillus cereus* Group in the Field. *PLOS Pathogens* 6, e1000905. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000905>
- Reitzer, L., 2005. Catabolism of Amino Acids and Related Compounds. *EcoSal Plus* 1. <https://doi.org/10.1128/ecosalplus.3.4.7>
- Richards, E., Bouché, L., Panico, M., Arbeloa, A., Vinogradov, E., Morris, H., Wren, B., Logan, S.M., Dell, A., Fairweather, N.F., 2018. The S-layer protein of a *Clostridium difficile* SLCT-

- 11 strain displays a complex glycan required for normal cell growth and morphology. *J Biol Chem* 293, 18123–18137. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.004530>
- Ristl, R., Steiner, K., Zarschler, K., Zayni, S., Messner, P., Schäffer, C., 2010. The S-Layer Glycome—Adding to the Sugar Coat of Bacteria. *International Journal of Microbiology* 2011, e127870. <https://doi.org/10.1155/2011/127870>
- Rodrigues-Oliveira, T., Belmok, A., Vasconcellos, D., Schuster, B., Kyaw, C.M., 2017. Archaeal S-Layers: Overview and Current State of the Art. *Front. Microbiol.* 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02597>
- Romeo, T., Snoep, J.L., 2005. Glycolysis and Flux Control. *EcoSal Plus* 1. <https://doi.org/10.1128/ecosalplus.3.5.1>
- Rosas-Garcia, N.M., 2009. Biopesticide Production from *Bacillus thuringiensis*: An Environmentally Friendly Alternative. *Recent Patents on Biotechnology* 3, 28–36.
- Rosenfeld, E., Duport, C., Zigha, A., Schmitt, P., 2005a. Characterization of aerobic and anaerobic vegetative growth of the food-borne pathogen *Bacillus cereus* F4430/73 strain. *Can. J. Microbiol.* 51, 149–158. <https://doi.org/10.1139/w04-132>
- Rosenfeld, E., Duport, C., Zigha, A., Schmitt, P., 2005b. Characterization of aerobic and anaerobic vegetative growth of the food-borne pathogen *Bacillus cereus* F4430/73 strain. *Can. J. Microbiol.* 51, 149–158. <https://doi.org/10.1139/w04-132>
- Rousset, L., Alpha-Bazin, B., Château, A., Armengaud, J., Clavel, T., Berge, O., Duport, C., 2020. Groundwater promotes emergence of asporogenic mutants of emetic *Bacillus cereus*. *Environmental Microbiology* 22, 5248–5264. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15203>
- Ruan, L., Crickmore, N., Peng, D., Sun, M., 2015. Are nematodes a missing link in the confounded ecology of the entomopathogen *Bacillus thuringiensis*? *Trends in Microbiology* 23, 341–346. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2015.02.011>
- Rumbaugh, K.P., Sauer, K., 2020. Biofilm dispersion. *Nat Rev Microbiol* 18, 571–586. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0385-0>
- Ryan, A., Lynch, M., Smith, S.M., Amu, S., Nel, H.J., McCoy, C.E., Dowling, J.K., Draper, E., O'Reilly, V., McCarthy, C., O'Brien, J., Eidhin, D.N., O'Connell, M.J., Keogh, B., Morton, C.O., Rogers, T.R., Fallon, P.G., O'Neill, L.A., Kelleher, D., Loscher, C.E., 2011. A Role for TLR4 in *Clostridium difficile* Infection and the Recognition of Surface Layer Proteins. *PLOS Pathogens* 7, e1002076. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002076>
- Ryan, P.A., Macmillan, J.D., Zilinskas, B.A., 1997. Molecular cloning and characterization of the genes encoding the L1 and L2 components of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. *Journal of Bacteriology* 179, 2551–2556. <https://doi.org/10.1128/jb.179.8.2551-2556.1997>
- Ryu, J.-H., Beuchat, L.R., 2005. Biofilm Formation and Sporulation by *Bacillus cereus* on a Stainless Steel Surface and Subsequent Resistance of Vegetative Cells and Spores to Chlorine, Chlorine Dioxide, and a Peroxyacetic Acid-Based Sanitizer. *Journal of Food Protection* 68, 2614–2622. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-68.12.2614>
- Sakakibara, J., Nagano, K., Murakami, Y., Higuchi, N., Nakamura, H., Shimozato, K., Yoshimura, F., 2007. Loss of adherence ability to human gingival epithelial cells in S-layer protein-deficient mutants of *Tannerella forsythensis*. *Microbiology* 153, 866–876. <https://doi.org/10.1099/mic.0.29275-0>
- Sanchez, B., Arias, S., Chaignepain, S., Denayrolles, M., Schmitter, J.M., Bressollier, P., Urdaci, M.C., 2009. Identification of surface proteins involved in the adhesion of a probiotic *Bacillus cereus* strain to mucin and fibronectin. *Microbiology* 155, 1708–1716. <https://doi.org/10.1099/mic.0.025288-0>
- Sára, M., Pum, D., Sleytr, U.B., 1992. Permeability and charge-dependent adsorption properties of the S-layer lattice from *Bacillus coagulans* E38-66. *Journal of Bacteriology* 174, 3487–3493. <https://doi.org/10.1128/jb.174.11.3487-3493.1992>

- Sára, M., Sleytr, U.B., 2000. S-Layer Proteins. *Journal of Bacteriology* 182, 859–868. <https://doi.org/10.1128/JB.182.4.859-868.2000>
- Sára, M., Sleytr, U.B., 1996. Crystalline bacterial cell surface layers (S-layers): From cell structure to biomimetics. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 65, 83–111. [https://doi.org/10.1016/S0079-6107\(96\)00007-7](https://doi.org/10.1016/S0079-6107(96)00007-7)
- Sára, Margit, Sleytr, U.B., 1996. Biotechnology and biomimetic with crystalline bacterial cell surface layers (S-layers). *Micron* 27, 141–156. [https://doi.org/10.1016/0968-4328\(96\)80628-7](https://doi.org/10.1016/0968-4328(96)80628-7)
- Sauer, U., Eikmanns, B.J., 2005. The PEP-pyruvate-oxaloacetate node as the switch point for carbon flux distribution in bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 29, 765–794. <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2004.11.002>
- Schnepf, E., Crickmore, N., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., Zeigler, D.R., Dean, D.H., 1998. *Bacillus thuringiensis* and Its Pesticidal Crystal Proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62, 775–806. <https://doi.org/10.1128/MMBR.62.3.775-806.1998>
- Schreiber, N., Hackl, G., Reisinger, A.C., Zollner-Schwetz, I., Eller, K., Schlagenhafen, C., Pietzka, A., Czerwenka, C., Stark, T.D., Kranzler, M., Fickert, P., Eller, P., Ehling-Schulz, M., 2022. Acute Liver Failure after Ingestion of Fried Rice Balls: A Case Series of *Bacillus cereus* Food Poisonings. *Toxins* 14, 12. <https://doi.org/10.3390/toxins14010012>
- Schumacher, M.A., Allen, G.S., Diel, M., Seidel, G., Hillen, W., Brennan, R.G., 2004. Structural Basis for Allosteric Control of the Transcription Regulator CcpA by the Phosphoprotein HPr-Ser46-P. *Cell* 118, 731–741. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.08.027>
- Schweinitzer, T., Josenhans, C., 2010. Bacterial energy taxis: a global strategy? *Arch Microbiol* 192, 507–520. <https://doi.org/10.1007/s00203-010-0575-7>
- Selenska-Pobell, S., Panak, P., Miteva, V., Boudakov, I., Bernhard, G., Nitsche, H., 1999. Selective accumulation of heavy metals by three indigenous *Bacillus* strains, *B. cereus*, *B. megaterium* and *B. sphaericus*, from drain waters of a uranium waste pile. *FEMS Microbiology Ecology* 29, 59–67. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.1999.tb00598.x>
- Serra, D.O., Hengge, R., 2014. Stress responses go three dimensional – the spatial order of physiological differentiation in bacterial macrocolony biofilms. *Environmental Microbiology* 16, 1455–1471. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12483>
- Setlow, P., 2006. Spores of *Bacillus subtilis*: their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals. *Journal of Applied Microbiology* 101, 514–525. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02736.x>
- Severin, A., Tabei, K., Tomasz, A., 2004. The Structure of the Cell Wall Peptidoglycan of *Bacillus cereus* RSVF1, a Strain Closely Related to *Bacillus anthracis*. *Microbial Drug Resistance* 10, 77–82. <https://doi.org/10.1089/1076629041310082>
- Shockman, G.D., Barren, J.F., 1983. Structure, Function, and Assembly of Cell Walls of Gram-Positive Bacteria. *Annual Review of Microbiology* 37, 501–527. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.37.100183.002441>
- Sidhu, M.S., Olsen, I., 1997. S-layers of *Bacillus* species. *Microbiology*, 143, 1039–1052. <https://doi.org/10.1099/00221287-143-4-1039>
- Sillanpää, J., Martínez, B., Antikainen, J., Toba, T., Kalkkinen, N., Tankka, S., Lounatmaa, K., Keränen, J., Höök, M., Westerlund-Wikström, B., Pouwels, P.H., Korhonen, T.K., 2000. Characterization of the Collagen-Binding S-Layer Protein CbsA of *Lactobacillus crispatus*. *Journal of Bacteriology* 182, 6440–6450. <https://doi.org/10.1128/JB.182.22.6440-6450.2000>
- Singh, A., Kumar, N., Tomar, P.P.S., Bhose, S., Ghosh, D.K., Roy, P., Sharma, A.K., 2017. Characterization of a bacterioferritin comigratory protein family 1-Cys peroxidoredoxin from *Candidatus Liberibacter asiaticus*. *Protoplasma* 254, 1675–1691. <https://doi.org/10.1007/s00709-016-1062-z>
- Sleytr, U.B., 2016. Curiosity And Passion For Science And Art. World Scientific.

- Sleytr, U.B., 1997. I. Basic and applied S-layer research: an overview. *FEMS Microbiology Reviews* 20, 5–12. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1997.tb00301.x>
- Sleytr, U.B., Beveridge, T.J., 1999. Bacterial S-layers. *Trends in Microbiology* 7, 253–260. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(99\)01513-9](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(99)01513-9)
- Sleytr, U.B., Messner, P., 1983. Crystalline Surface Layers on Bacteria. *Annual Review of Microbiology* 37, 311–339. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.37.100183.001523>
- Sleytr, U.B., Messner, P., Pum, D., Sára, M., 1999. Crystalline Bacterial Cell Surface Layers (S Layers): From Supramolecular Cell Structure to Biomimetics and Nanotechnology. *Angewandte Chemie International Edition* 38, 1034–1054. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-3773\(19990419\)38:8<1034::AID-ANIE1034>3.0.CO;2-#](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-3773(19990419)38:8<1034::AID-ANIE1034>3.0.CO;2-#)
- Sleytr, U.B., Messner, P., Pum, D., Sara, M., 1996. *Crystalline Bacterial Cell Surface Proteins*. Elsevier.
- Sleytr, U.B., Sára, M., Pum, D., Schuster, B., 2001. Characterization and use of crystalline bacterial cell surface layers. *Progress in Surface Science* 68, 231–278. [https://doi.org/10.1016/S0079-6816\(01\)00008-9](https://doi.org/10.1016/S0079-6816(01)00008-9)
- Smit, E., Oling, F., Demel, R., Martinez, B., Pouwels, P.H., 2001. The S-layer Protein of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356: Identification and Characterisation of Domains Responsible for S-protein Assembly and Cell Wall Binding. *Journal of Molecular Biology* 305, 245–257. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.4258>
- Sohngen, P., Blaise, P., Duchesne, B., Rakic, J.-M., 2012. LE CAS CLINIQUE DU MOIS Panophtalmie post-traumatique. *Rev Med Liège* 3.
- Solano, C., Echeverz, M., Lasa, I., 2014. Biofilm dispersion and quorum sensing. *Current Opinion in Microbiology, Cell regulation* 18, 96–104. <https://doi.org/10.1016/j.miB.2014.02.008>
- Sonenshein, A.L., 2007. Control of key metabolic intersections in *Bacillus subtilis*. *Nat Rev Microbiol* 5, 917–927. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1772>
- Sonenshein, A.L., 2005. CodY, a global regulator of stationary phase and virulence in Gram-positive bacteria. *Current Opinion in Microbiology, Cell Regulation* 8, 203–207. <https://doi.org/10.1016/j.miB.2005.01.001>
- Soufiane, B., Sirois, M., Côté, J.-C., 2011. Mutually exclusive distribution of the sap and eag S-layer genes and the lytB/lytA cell wall hydrolase genes in *Bacillus thuringiensis*. *Antonie van Leeuwenhoek* 100, 349. <https://doi.org/10.1007/s10482-011-9590-1>
- Steen, M.K., Bruno-Murtha, L.A., Chaux, G., Lazar, H., Bernard, S., Sulis, C., 1992. *Bacillus cereus* endocarditis: report of a case and review. *Clin. Infect. Dis.* 14, 945–946. <https://doi.org/10.1093/clinids/14.4.945>
- Stenfors, L.P., Granum, P.E., 2001. Psychrotolerant species from the *Bacillus cereus* group are not necessarily *Bacillus weihenstephanensis*. *FEMS Microbiology Letters* 197, 223–228. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2001.tb10607.x>
- Stincone, A., Prigione, A., Cramer, T., Wamelink, M.M.C., Campbell, K., Cheung, E., Olin-Sandoval, V., Grüning, N.-M., Krüger, A., Tauqeer Alam, M., Keller, M.A., Breitenbach, M., Brindle, K.M., Rabinowitz, J.D., Ralser, M., 2015. The return of metabolism: biochemistry and physiology of the pentose phosphate pathway. *Biological Reviews* 90, 927–963. <https://doi.org/10.1111/brv.12140>
- Stülke, J., Hillen, W., 2000. Regulation of Carbon Catabolism in *Bacillus* Species. *Annual review of microbiology* 54, 849–80. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.54.1.849>
- Sue, D., Hoffmaster, A.R., Popovic, T., Wilkins, P.P., 2006. Capsule Production in *Bacillus cereus* Strains Associated with Severe Pneumonia. *Journal of Clinical Microbiology* 44, 3426–3428. <https://doi.org/10.1128/JCM.00873-06>
- Sumper, M., Wieland, F.T., 1995. Chapter 6 Bacterial glycoproteins, in: Montreuil, J., Vliegthart, J.F.G., Schachter, H. (Eds.), *New Comprehensive Biochemistry, Glycoproteins*. Elsevier, pp. 455–473. [https://doi.org/10.1016/S0167-7306\(08\)60600-6](https://doi.org/10.1016/S0167-7306(08)60600-6)

- Sun, Z., Kong, J., Hu, S., Kong, W., Lu, W., Liu, W., 2013. Characterization of a S-layer protein from *Lactobacillus crispatus* K313 and the domains responsible for binding to cell wall and adherence to collagen. *Appl Microbiol Biotechnol* 97, 1941–1952. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4044-x>
- Susin, M.F., Baldini, R.L., Gueiros-Filho, F., Gomes, S.L., 2006. GroES/GroEL and DnaK/DnaJ have distinct roles in stress responses and during cell cycle progression in *Caulobacter crescentus*. *J Bacteriol* 188, 8044–8053. <https://doi.org/10.1128/JB.00824-06>
- Swiecicka, I., 2008. Natural occurrence of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus* in eukaryotic organisms: a case for symbiosis. *Biocontrol Science and Technology* 18, 221–239. <https://doi.org/10.1080/09583150801942334>
- Swiecicka, I., Mahillon, J., 2006. Diversity of commensal *Bacillus cereus* sensu lato isolated from the common sow bug (*Porcellio scaber*, Isopoda). *FEMS Microbiol. Ecol.* 56, 132–140. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2006.00063.x>
- Sychantha, D., Chapman, R.N., Bamford, N.C., Boons, G.-J., Howell, P.L., Clarke, A.J., 2018. Molecular Basis for the Attachment of S-Layer Proteins to the Cell Wall of *Bacillus anthracis*. *Biochemistry* 57, 1949–1953. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.8b00060>
- Szurmant, H., Mohan, M.A., Imus, P.M., Hoch, J.A., 2007. YycH and YycI interact to regulate the essential YycFG two-component system in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 189, 3280–3289. <https://doi.org/10.1128/JB.01936-06>
- Tamir, A., Eichler, J., 2017. N-Glycosylation Is Important for Proper *Haloferax volcanii* S-Layer Stability and Function. *Applied and Environmental Microbiology* 83, e03152-16. <https://doi.org/10.1128/AEM.03152-16>
- Tang, L., Zhang, Y.X., Hutchinson, C.R., 1994. Amino acid catabolism and antibiotic synthesis: valine is a source of precursors for macrolide biosynthesis in *Streptomyces ambofaciens* and *Streptomyces fradiae*. *Journal of Bacteriology* 176, 6107–6119. <https://doi.org/10.1128/jb.176.19.6107-6119.1994>
- Tarlovsky, Y., Fabian, M., Solomaha, E., Honsa, E., Olson, J.S., Maresso, A.W., 2010. A *Bacillus anthracis* S-Layer Homology Protein That Binds Heme and Mediates Heme Delivery to IsdC. *Journal of Bacteriology*. <https://doi.org/10.1128/JB.00054-10>
- Thomas, S.R., Trust, T.J., 1995. Tyrosine Phosphorylation of the Tetragonal Paracrystalline Array of *Aeromonas hydrophila*: Molecular Cloning and High-level Expression of the S-layer Protein Gene. *Journal of Molecular Biology* 245, 568–581. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1994.0047>
- Thomassin, S., Jobin, M.P., Schmitt, P., 2006. The acid tolerance response of *Bacillus cereus* ATCC14579 is dependent on culture pH, growth rate and intracellular pH. *Arch. Microbiol.* 186, 229–239. <https://doi.org/10.1007/s00203-006-0137-1>
- Thompson, S.A., 2002. *Campylobacter* Surface-Layers (S-Layers) and Immune Evasion. *Ann Periodontol* 7, 43–53. <https://doi.org/10.1902/annals.2002.7.1.43>
- Thompson, S.A., Shedd, O.L., Ray, K.C., Beins, M.H., Jorgensen, J.P., Blaser, M.J., 1998. *Campylobacter fetus* Surface Layer Proteins Are Transported by a Type I Secretion System. *Journal of Bacteriology* 180, 6450–6458. <https://doi.org/10.1128/JB.180.24.6450-6458.1998>
- Tian, S., Xiong, H., Geng, P., Yuan, Z., Hu, X., 2019. CesH Represses Cereulide Synthesis as an Alpha/Beta Fold Hydrolase in *Bacillus cereus*. *Toxins (Basel)* 11. <https://doi.org/10.3390/toxins11040231>
- Toba, T., Virkola, R., Westerlund, B., Bjorkman, Y., Sillanpaa, J., Vartio, T., Kalkkinen, N., Korhonen, T.K., 1995. A Collagen-Binding S-Layer Protein in *Lactobacillus crispatus*. *Applied and Environmental Microbiology* 61, 2467–2471. <https://doi.org/10.1128/aem.61.7.2467-2471.1995>

- Tobisch, S., Zühlke, D., Bernhardt, J., Stülke, J., Hecker, M., 1999. Role of CcpA in Regulation of the Central Pathways of Carbon Catabolism in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* 181, 6996–7004. <https://doi.org/10.1128/JB.181.22.6996-7004.1999>
- Tojo, S., Satomura, T., Matsuoka, H., Hirooka, K., Fujita, Y., 2011. Catabolite Repression of the *Bacillus subtilis* FadR Regulon, Which Is Involved in Fatty Acid Catabolism ∇ . *J Bacteriol* 193, 2388–2395. <https://doi.org/10.1128/JB.00016-11>
- Tojo, S., Satomura, T., Morisaki, K., Deutscher, J., Hirooka, K., Fujita, Y., 2005. Elaborate transcription regulation of the *Bacillus subtilis* ilv-leu operon involved in the biosynthesis of branched-chain amino acids through global regulators of CcpA, CodY and TnrA. *Molecular Microbiology* 56, 1560–1573. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04635.x>
- Tourasse, N.J., Helgason, E., Klevan, A., Sylvestre, P., Moya, M., Haustant, M., Økstad, O.A., Fouet, A., Mock, M., Kolstø, A.-B., 2011. Extended and global phylogenetic view of the *Bacillus cereus* group population by combination of MLST, AFLP, and MLEE genotyping data. *Food Microbiology* 28, 236–244. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.06.014>
- Tran, S.-L., Guillemet, E., Ngo-Camus, M., Clybourn, C., Puhar, A., Moris, A., Gohar, M., Lereclus, D., Ramarao, N., 2011. Haemolysin II is a *Bacillus cereus* virulence factor that induces apoptosis of macrophages. *Cellular Microbiology* 13, 92–108. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2010.01522.x>
- Turnbull, P.C., Kramer, J.M., Jørgensen, K., Gilbert, R.J., Melling, J., 1979. Properties and production characteristics of vomiting, diarrheal, and necrotizing toxins of *Bacillus cereus*. *The American Journal of Clinical Nutrition* 32, 219–228. <https://doi.org/10.1093/ajcn/32.1.219>
- Uchida, M., Harada, T., Enkhtuya, J., Kusumoto, A., Kobayashi, Y., Chiba, S., Shyaka, A., Kawamoto, K., 2012. Protective effect of *Bacillus anthracis* surface protein EA1 against anthrax in mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 421, 323–328. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.04.007>
- Uchino, Y., Iriyama, N., Matsumoto, K., Hirabayashi, Y., Miura, K., Kurita, D., Kobayashi, Y., Yagi, M., Kodaira, H., Hojo, A., Kobayashi, S., Hatta, Y., Takeuchi, J., 2012. A Case Series of *Bacillus Cereus* Septicemia in Patients with Hematological Disease. *Internal Medicine* 51, 2733–2738. <https://doi.org/10.2169/internalmedicine.51.7258>
- Upreti, R.K., Kumar, M., Shankar, V., 2003. Bacterial glycoproteins: Functions, biosynthesis and applications. *PROTEOMICS* 3, 363–379. <https://doi.org/10.1002/pmic.200390052>
- Usenik, A., Renko, M., Mihelič, M., Lindič, N., Borišek, J., Perdih, A., Pretnar, G., Müller, U., Turk, D., 2017. The CWB2 Cell Wall-Anchoring Module Is Revealed by the Crystal Structures of the *Clostridium difficile* Cell Wall Proteins Cwp8 and Cwp6. *Structure* 25, 514–521. <https://doi.org/10.1016/j.str.2016.12.018>
- van der Aa, B.C., Michel, R.M., Asther, M., Torrez Zamora, M., Rouxhet, P.G., Dufrêne, Y.F., 2001. Stretching Cell Surface Macromolecules by Atomic Force Microscopy. *Langmuir* 17, 3116–3119. <https://doi.org/10.1021/la001573s>
- Van Loosdrecht, M.C.M., Norde, W., Zehnder, A.J.B., 1990. Physical Chemical Description of Bacterial Adhesion. *J Biomater Appl* 5, 91–106. <https://doi.org/10.1177/088532829000500202>
- van Roosmalen, M.L., Geukens, N., Jongbloed, J.D.H., Tjalsma, H., Dubois, J.-Y.F., Bron, S., van Dijl, J.M., Anné, J., 2004. Type I signal peptidases of Gram-positive bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research, Protein Export/Secretion in Bacteria* 1694, 279–297. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2004.05.006>
- van Schaik, W., Château, A., Dillies, M.-A., Coppée, J.-Y., Sonenshein, A.L., Fouet, A., 2009. The Global Regulator CodY Regulates Toxin Gene Expression in *Bacillus anthracis* and Is Required for Full Virulence. *Infection and Immunity* 77, 4437–4445. <https://doi.org/10.1128/IAI.00716-09>

- Vilain, S., Luo, Y., Hildreth, M.B., Brözel, V.S., 2006. Analysis of the life cycle of the soil saprophyte *Bacillus cereus* in liquid soil extract and in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 4970–4977. <https://doi.org/10.1128/AEM.03076-05>
- Villas-Bôas, S.G., Smart, K.F., Sivakumaran, S., Lane, G.A., 2011. Alkylation or Silylation for Analysis of Amino and Non-Amino Organic Acids by GC-MS? *Metabolites* 1, 3–20. <https://doi.org/10.3390/metabo1010003>
- Voigt, B., Hoi, L.T., Jürgen, B., Albrecht, D., Ehrenreich, A., Veith, B., Evers, S., Maurer, K.-H., Hecker, M., Schweder, T., 2007. The glucose and nitrogen starvation response of *Bacillus licheniformis*. *PROTEOMICS* 7, 413–423. <https://doi.org/10.1002/pmic.200600556>
- Walser, V., Kranzler, M., Dawid, C., Ehling-Schulz, M., Stark, T.D., Hofmann, T.F., 2022. *Bacillus cereus* Toxin Repertoire: Diversity of (Iso)cereulide(s). *Molecules* 27, 872. <https://doi.org/10.3390/molecules27030872>
- Walser, V., Kranzler, M., Ehling-Schulz, M., Stark, T.D., Hofmann, T.F., 2021. Structure Revision of Isocereulide A, an Isoform of the Food Poisoning Emetic *Bacillus cereus* Toxin Cereulide. *Molecules* 26, 1360. <https://doi.org/10.3390/molecules26051360>
- Wang, Y.-T., Oh, S.-Y., Hendrickx, A.P.A., Lunderberg, J.M., Schneewind, O., 2013. *Bacillus cereus* G9241 S-Layer Assembly Contributes to the Pathogenesis of Anthrax-Like Disease in Mice. *Journal of Bacteriology* 195, 596–605. <https://doi.org/10.1128/JB.02005-12>
- Warda, A.K., Siezen, R.J., Boekhorst, J., Wells-Bennik, M.H.J., Jong, A. de, Kuipers, O.P., Groot, M.N.N., Abee, T., 2016. Linking *Bacillus cereus* Genotypes and Carbohydrate Utilization Capacity. *PLOS ONE* 11, e0156796. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0156796>
- Whittle, M.J., Bilverstone, T.W., van Esveld, R.J., Lücke, A.C., Lister, M.M., Kuehne, S.A., Minton, N.P., 2022. A Novel Bacteriophage with Broad Host Range against *Clostridioides difficile* Ribotype 078 Supports SlpA as the Likely Phage Receptor. *Microbiol Spectr* e0229521. <https://doi.org/10.1128/spectrum.02295-21>
- Wijman, J.G.E., Leeuw, P.P.L.A. de, Moezelaar, R., Zwietering, M.H., Abee, T., 2007. Air-Liquid Interface Biofilms of *Bacillus cereus*: Formation, Sporulation, and Dispersion. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 1481–1488. <https://doi.org/10.1128/AEM.01781-06>
- Wildhaber, I., Baumeister, W., 1987. The cell envelope of *Thermoproteus tenax*: three-dimensional structure of the surface layer and its role in shape maintenance. *EMBO J* 6, 1475–1480.
- Williams, D.D., Turnbough, C.L., 2004. Surface Layer Protein EA1 Is Not a Component of *Bacillus anthracis* Spores but Is a Persistent Contaminant in Spore Preparations. *Journal of Bacteriology* 186, 566–569. <https://doi.org/10.1128/JB.186.2.566-569.2004>
- Williamson, K.S., Richards, L.A., Perez-Osorio, A.C., Pitts, B., McInnerney, K., Stewart, P.S., Franklin, M.J., 2012. Heterogeneity in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms Includes Expression of Ribosome Hibernation Factors in the Antibiotic-Tolerant Subpopulation and Hypoxia-Induced Stress Response in the Metabolically Active Population. *J Bacteriol* 194, 2062–2073. <https://doi.org/10.1128/JB.00022-12>
- Willing, S.E., Candela, T., Shaw, H.A., Seager, Z., Mesnage, S., Fagan, R.P., Fairweather, N.F., 2015. *Clostridium difficile* surface proteins are anchored to the cell wall using CWB2 motifs that recognise the anionic polymer PSII. *Molecular Microbiology* 96, 596–608. <https://doi.org/10.1111/mmi.12958>
- Wong, L.L., Natarajan, G., Boleij, M., Thi, S.S., Winnerdy, F.R., Mugunthan, S., Lu, Y., Lee, J.-M., Lin, Y., van Loosdrecht, M., Law, Y., Kjelleberg, S., Seviour, T., 2019. Isolation of a putative S-layer protein from anammox biofilm extracellular matrix using ionic liquid extraction (preprint). *Bioengineering*. <https://doi.org/10.1101/705566>
- Xu, S., Yang, N., Zheng, S., Yan, F., Jiang, C., Yu, Y., Guo, J., Chai, Y., Chen, Y., 2017. The spo0A-sinI-sinR Regulatory Circuit Plays an Essential Role in Biofilm Formation, Nematicidal Activities, and Plant Protection in *Bacillus cereus* AR156. *MPMI* 30, 603–619. <https://doi.org/10.1094/MPMI-02-17-0042-R>

- Xu, Z., Xie, J., Liu, J., Ji, L., Soteyome, T., Peters, B.M., Chen, D., Li, B., Li, L., Shirtliff, M.E., 2017. Whole-genome resequencing of *Bacillus cereus* and expression of genes functioning in sodium chloride stress. *Microb Pathog* 104, 248–253. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.01.040>
- Yoon, Y., Lee, H., Lee, S., Kim, S., Choi, K.-H., 2015. Membrane fluidity-related adaptive response mechanisms of foodborne bacterial pathogens under environmental stresses. *Food Research International* 72, 25–36. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.03.016>
- Zampieri, M., Hörl, M., Hotz, F., Müller, N.F., Sauer, U., 2019. Regulatory mechanisms underlying coordination of amino acid and glucose catabolism in *Escherichia coli*. *Nature Communications* 10, 3354. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11331-5>
- Zapras, A., Bleisteiner, M., Kerres, A., Hoffmann, T., Bremer, E., 2015. Uptake of Amino Acids and Their Metabolic Conversion into the Compatible Solute Proline Confers Osmoprotection to *Bacillus subtilis*. *Applied and Environmental Microbiology* 81, 250–259. <https://doi.org/10.1128/AEM.02797-14>
- Zeraik, A.E., Nitschke, M., 2012. Influence of growth media and temperature on bacterial adhesion to polystyrene surfaces. *Braz. arch. biol. technol.* 55, 569–576. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132012000400012>
- Zhang, C., Wipfler, R.L., Li, Y., Wang, Z., Hallett, E.N., Whitaker, R.J., 2019. Cell Structure Changes in the Hyperthermophilic *Crenarchaeon Sulfolobus islandicus* Lacking the S-Layer. *mBio* 10, e01589-19. <https://doi.org/10.1128/mBio.01589-19>
- Zhang, X., Li, P., Zheng, Q., Hou, J., 2019. *Lactobacillus acidophilus* S-layer protein-mediated inhibition of PEDV-induced apoptosis of Vero cells. *Veterinary Microbiology* 229, 159–167. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2019.01.003>
- Zhang, Z., Douillard, F.P., Korkeala, H., Lindström, M., 2022. Specific Isolation of *Clostridium botulinum* Group I Cells by Phage Lysin Cell Wall Binding Domain with the Aid of S-Layer Disruption. *International Journal of Molecular Sciences* 23, 8391. <https://doi.org/10.3390/ijms23158391>
- Zheng, S., Bawazir, M., Dhall, A., Kim, H.-E., He, L., Heo, J., Hwang, G., 2021. Implication of Surface Properties, Bacterial Motility, and Hydrodynamic Conditions on Bacterial Surface Sensing and Their Initial Adhesion. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 9.
- Zhu, C., Guo, G., Ma, Q., Zhang, F., Ma, F., Liu, J., Xiao, D., Yang, X., Sun, M., 2017. Diversity in S-layers. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 123, 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2016.08.002>
- Zigha, A., Rosenfeld, E., Schmitt, P., Dupont, C., 2006. Anaerobic cells of *Bacillus cereus* F4430/73 respond to low oxidoreduction potential by metabolic readjustments and activation of enterotoxin expression. *Arch Microbiol* 185, 222–233. <https://doi.org/10.1007/s00203-006-0090-z>
- Zink, I.A., Pfeifer, K., Wimmer, E., Sleytr, U.B., Schuster, B., Schleper, C., 2019. CRISPR-mediated gene silencing reveals involvement of the archaeal S-layer in cell division and virus infection. *Nat Commun* 10, 4797. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12745-x>
- Zinser, E.R., Kolter, R., 1999. Mutations Enhancing Amino Acid Catabolism Confer a Growth Advantage in Stationary Phase. *Journal of Bacteriology* 181, 5800–5807. <https://doi.org/10.1128/JB.181.18.5800-5807.1999>

Structure and function of the S-layer in *Bacillus cereus* AH187

ABSTRACT :

Bacillus cereus is a human foodborne pathogen associated to diarrheal and emetic syndrome. The emetic syndrome is usually associated with the ingestion of food containing cereulide. The cereulide is a peptide toxin produced by the emetic strains causing nausea and vomiting. *B. cereus* AH187, the emetic reference strain, is covered by a two-dimensional paracrystalline protein network, called the S-layer. The two constitutive proteins of the S-layer are SL2 and EA1. Their proportion and their arrangement on the surface change during the growth. The S-layer participates in the surface properties of *B. cereus* and would promote adhesion to abiotic surfaces in *B. cereus*. Moreover, by synthesizing the S-layer, bacterium improves its starvation survival, and its resistance to stress in stationary phase. Therefore, the S-layer would indirectly contribute to the stress resistance of cells in stationary phase, by modulating the regulatory pathways.

Keywords: *Bacillus cereus*, S-layer proteins, surface properties, proteomics, environmental stress conditions, adaptation

Structure et fonction de la couche S chez la *Bacillus cereus* AH187.

RÉSUMÉ :

Bacillus cereus est un pathogène humain fréquemment associé aux Toxi-Infections Alimentaires Collectives (TIAC). Les TIAC à *B. cereus* sont caractérisées par des syndromes diarrhéiques et émétiques. Le syndrome émétique est généralement associé à l'ingestion d'aliments contenant de la céréulide, une toxine peptidique produite par les souches dites émétiques. *B. cereus* AH187 est la souche émétique de référence. Elle est recouverte par un réseau protéique paracristallin bidimensionnel, appelé couche S. Les deux protéines constitutives de la couche S sont les protéines SL2 et EA1. Leur proportion et leur disposition à la surface de la bactérie varient au cours de la croissance. La couche S participe aux propriétés de surface de *B. cereus* et pourrait favoriser l'adhésion des surfaces abiotiques chez *B. cereus*. De plus, en synthétisant la couche S, les bactéries améliorent leur survie à la famine, et leur résistance au stress en phase stationnaire. La couche S contribuerait donc indirectement à la résistance au stress des cellules en phase stationnaire, en modulant les voies de régulation.

Mots clés : *Bacillus cereus*, protéines de couche S, propriétés de surface, protéomique, stress environnementaux, adaptation