



**HAL**  
open science

# Crust des spores de *Bacillus subtilis* : voies de biosynthèse et influence des conditions de sporulation sur sa structure et les propriétés de surface des spores

Audrey Hamiot

► **To cite this version:**

Audrey Hamiot. Crust des spores de *Bacillus subtilis* : voies de biosynthèse et influence des conditions de sporulation sur sa structure et les propriétés de surface des spores. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université de Lille, 2023. Français. NNT : 2023ULILR033 . tel-04394553

**HAL Id: tel-04394553**

**<https://theses.hal.science/tel-04394553>**

Submitted on 15 Jan 2024

**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.

Sommaire



INRAE



Université  
de Lille



Thèse de doctorat de l'Université de Lille

Ecole doctorale Science de la Matière, du Rayonnement et de l'Environnement

Unité Matériaux et Transformations

Equipe : Processus aux Interfaces et Hygiène des Matériaux (INRAE)

---

Crust des spores de *Bacillus subtilis*. Voies de biosynthèse et  
influence des conditions de sporulation sur sa structure et les  
propriétés de surface des spores.

---

Thèse préparée et soutenue publiquement par

Audrey Hamiot

Pour obtenir le grade de Docteur

Spécialité : Sciences Agronomiques et Ecologiques : Biotechnologies

Agroalimentaires, Sciences de l'Aliment, Physiologie

Dirigée par les Docteurs Christine Faille et Thomas Dubois

Soutenue le 05 Juillet 2023 devant la commission d'examen composée de :

Mr Thierry Bénézech, DR, UMET, INRAE, Université de Lille	Président
Mme Nadia Oulahal, DR, MCF-HDR, BioDyMIA, Université Lyon 1	Rapporteuse
Mr Louis Coroller, PR, ESIAB-LUBEM, Université de Brest	Rapporteur
Mme Véronique Broussolle, DR, SQPOV, INRAE, Centre PACA	Examinatrice
Mme Graziella Midelet, Chargée de Projet, ANSES-LSA, Boulogne sur Mer	Examinatrice
Mme Christine Faille, DR, UMET, INRAE, Université de Lille	Directrice de thèse
Mr Thomas Dubois, CR, UMET, INRAE, Université de Lille	Co-Encadrant de thèse



## Remerciements

Je tiens en premier lieu à remercier les membres du jury qui ont accepté d'évaluer mon travail : Thierry Bénézech qui a accepté de présider le jury ; Nadia Oulahal et Louis Coroller qui ont jugé ce travail en qualité de rapporteurs, Véronique Broussolle et Graziella Midelet qui ont accepté d'être examinatrices de ces travaux.

Mes remerciements les plus sincères aussi pour les membres de mes comités de thèse : Isabelle Martin-Verstraete, Frederic Krzewinski et Yann Guerardel. Merci d'avoir suivi l'évolution de ces travaux au cours des années et de m'avoir apporté de précieux conseils sur la direction à leur donner.

Un grand merci à Guillaume Delaplace pour m'avoir accueillie au sein de son équipe PIHM et qui a toujours aidé quand j'avais des problèmes de dossiers bloqués !

Un grand merci à Christine Faille qui a accepté d'encadrer cette thèse. Tu as toujours été là pour discuter et relancer la machine. Je sais que je n'ai pas été la thésarde la plus facile à encadrer et tu m'as toujours poussé à persévérer. Vraiment merci.

J'adresse mes remerciements les plus sincères à Thomas Dubois pour m'avoir fait confiance pour ce projet. Tu as toujours été présent pour répondre à mes questions (même quand elles étaient d'un niveau L2 !), pour m'aider pour mes manip (surtout quand j'obtiens des résultats bizarres...). Grâce à toi je sais maintenant démonter, réparer, et remonter les appareils (bon, pas sûr que j'y arrive toute seule quand même...). Merci de t'être brulé les yeux sur mes écrits, cette épreuve fut particulièrement difficile (pour toi comme pour moi)... J'ai toujours aimé nos discussions.

Je voulais remercier l'ensemble de l'équipe PIHM pour leur accueil. Merci aux autres thésards : Moustapha, Ahmad, Mayssane, Manon, Héni (qui a supporté ma méchanceté pendant plus de trois ans !), Weiji, Samah, Jina, Angela et Carolina parce que c'est toujours sympa de ne pas être seul dans la galère. Merci aux stagiaires qui ont participé à ces travaux : Océane, Amélie et Aya. Un merci particulier à Laurent B. qui répond à toutes mes questions et qui est toujours au courant de tout, à Laurent W. qui répare tout ce que je casse (je ne fais pas exprès !). Merci à Amandine qui sait toujours quand complimenter mes cheveux ! Un grand Merci à ma chère Anne M. (qui nous a lâchement abandonné pour partir en retraite la vilaine !) qui me disait toujours ce qu'elle voyait venir (et qui comprenait mes vieilles références...). Et bien sûr merci à Christophe qui a toujours été là pour m'aider à vaincre les tâches administratives. Merci à Thomas pour ses recommandations manga et nos discussions. Enfin, un grand merci aussi à ma petite Maureenette qui a tellement grandi qu'elle en est partie travailler ailleurs à mon grand regret (même si je suis évidemment contente pour toi !). Merci de me raconter tous tes weekends de voyages et de folies qui me permettaient d'être jeune par procuration !

Ces ~~trois~~ cinq ans n'auraient pas été possibles sans l'aide de Christelle et Luisa. Merci Christelle pour ta très grande aide pour les manip, les commandes et surtout pour les discussions, les rires, les sorties, les courses à Cora et tout ce qui va avec. Si tu dois te souvenir d'un seul truc à propos de moi c'est que j'ai

toujours raison ! Tu verras ça te simplifiera grandement la vie ! Luisa, mon rayon de soleil brésilien, la force tranquille capable de combattre mon stress. Merci de me laisser jouer avec tes cheveux (et non, nous n'avons pas les mêmes !), de me répéter tout le temps que tout ira bien, de me faire sortir de chez moi, d'avoir amélioré mon petit PC (merci Nico !!), de me prêter ton bébé,... merci à vous deux d'avoir été là tout simplement !

J'ai reçu (et nécessité, soyons honnête) beaucoup de soutien et d'encouragements pendant cette thèse. J'ai aussi moins pris le temps de prendre des nouvelles de tout le monde... Promis, je vais faire des efforts (maintenant que je n'ai plus d'excuses...). J'ai donc beaucoup de monde à remercier !

Tout d'abord, merci à mes anciens collègues pasteurien. Merci tout d'abord à Bruno qui m'a donné ma première chance et sans qui je ne serai sûrement pas là aujourd'hui ! Grâce à vous j'ai pu me promener en Europe (et à Besançon !). Merci Chef ! Merci au Sieur Peltier qui a continué à publier des papiers avec mon nom dedans, notamment mon petit pMSR dont je suis tellement fière, et qui prend aussi le temps de me demander comment ça avance au milieu de tous ses projets. Je suis toujours partante pour de nouveaux projets avec toi (à conditions que tu arrêtes de me lancer des stylos à la tête évidemment !). Une énorme merci au Gamin (aussi connu sous le nom de Nicolas). Tu seras toujours mon modèle de ce que doit être un thésard (et tu as placé la barre beaucoup trop haute ! Malheureux !). Nos séances ciné me manquent beaucoup, maintenant je dois regarder des films d'horreur seule ! Tu continues de m'écrire même quand je mets trois ans à répondre, tu essayes toujours de me remotiver et tu m'aides pour mes jeux cinéphiles ! Ton seul défaut au fond c'est que tu n'aies toujours pas vu rockn'rolla...(bon et que tu sois roux aussi un peu). Un grand merci à toi et surtout, Félicitations pour ton nouveau rôle de papa !

Merci ensuite à mes amis. Je vous connais tous depuis plus de sept ans il me semble, ce qui veut dire que vous êtes coincés avec moi à vie maintenant (ce n'est pas moi qui le dis, c'est un article scientifique !).

Merci, à ma Femme de moi qui a aussi eu 3-4 ans bien remplis mais qui répond toujours à mes « à mardi ! ». Si jamais tu as envie de faire la mère indigne et d'abandonner tes enfants pour un petit tour à Disney.... C'est quand tu veux !

Merci à Mme Yahou, qui prend toujours le temps de m'envoyer des messages. J'espère qu'on va enfin trouver le temps pour se voir plus souvent, que je puisse bien connaître Melle Margaux.

Merci à Claire et Flo pour les invites, les escape, la visite à Lille (pardon pour le Lego store Claire... je pouvais pas deviner !), et merci à Jonathan de m'avoir appris les bonnes manières à la boulangerie !

Merci, à Stéphanie, Aurélie et François avec qui j'ai galéré à la sortie de la fac. Allez, cette année c'est la bonne on va enfin réussir à se voir tous ensemble ! Merci particulièrement à Stéphanie et Christophe pour ma jolie voiture (bleue !) et pour me laisser pourrir-gâter leurs enfants sans trop rien dire (en tant que marraine j'ai le droit et puis c'est tout !), et qui, je crois essayent de me recruter dans leur famille ! Merci à Charlotte et Bastien qui crient de joie quand ils me voient et qui sont toujours prêt à me faire plein de câlins.

Merci à Marion, ma sempai retrouvée ! Tu as été mon premier point d'ancrage à Lille, tu m'as prêtée ton chat, laissée squatter ton canap, présentée à tes amis et tu m'as même préparée des coquillettes ! J'ai eu beaucoup de chance de t'avoir ! Merci forcément à Thor au passage, qui a subi mes squattages de canap, qui s'est souvent demandé ce qu'on était encore en train de regarder comme film bizarre et qui essayait de me faire parler espagnol.

Merci à la team Ficelle/Le Suédois et Nodrie/Batteur, pour la visite Lilloise, les soirées jeux en visio et IRL et les bons moments passés ensemble de façon générale. Merci particulièrement à Ficelle et Nodrie, l'Ice Tea Team, qui sévit depuis près de 18 ans déjà (han les vieilles !). Merci pour les weekends marathon/hérisson/fromage. A cause de vous j'ai tout un tas de références que personne d'autres ne comprend. Je n'ai qu'un seul mot pour vous vraiment... MARACAS !

Un merci retentissant à Mathilde. Tu es la seule avec qui je veux bien communiquer par mémos vocaux (et soyons honnêtes, des fois s'appeler simplifierait bien les choses !). Tu as toujours envie d'apprendre des nouveaux trucs et tu partages toujours avec moi. On s'écoute râler mutuellement, et au final, on est toujours d'accord. Merci de m'écouter, de rire à mes blagues, de savoir que je suis une pro de la théorie et de remarquer quand je fais des efforts sur la pratique !

Enfin, merci à mon petit Schpountz. Il faut vraiment qu'on se remette à la communication ! A côté de ça, un simple petit message de toi et hop ! Ca ravigote ! (J'étais obligé de le placer !). Merci d'être là depuis tout ce temps, tout simplement. J'espère que tout se passera bien pour toi et tes brebis !.

Enfin, le meilleur pour la fin, ma famille. Merci à Tata Réjane, qui découpe les anagrammes toutes les semaines pour me les donner, qui trouve toujours les meilleurs puzzles et qui nous a appris l'importance des coquillettes au gryuère. J'espère compter pour les garçons autant que tu comptes pour nous.

Merci à Gaël, qui me voit débarquer chez lui le samedi et qui ne dit rien, qui prenait le temps de se joindre à nos séances jeux pendant le confinement et qui doit suspendre des gousses d'ails au-dessus du lit de Gabin au milieu de la nuit parce que je lui ai parlé de vampires. Niveau beau-frère, je trouve qu'on est pas mal tombés quand même.

Merci à mes trois monstres préférés. Moi, vos bêtises je ne les subis pas donc elles me font bien rire ! Gabin, qui lit mes One Piece plus vite que moi et qui attend gentiment que je le rattrape pour en parler. Maxence, qui subit la malédiction des n°2 (je vous assure qu'on ne fait pas exprès) et qui est toujours le méchant au Time Bombe. Nathan, qui venait de naître quand je suis partie et qui va à l'école maintenant... J'adore partager des trucs avec vous et vous voir grandir. Ce n'est cependant pas une raison pour grandir aussi vite !!!

Merci à ma Igloo et mon Jekyll, mes bébés d'amour qui ne me boudent presque pas quand je rentre, qui sont tous doux et font des ronrons.

Merci à mes soeurette, mes futures héritières qui râlent quand je vais à la fnac, au furet ou au Legostore parce qu'elles savent que je vais dépenser tout leur héritage. Ma conversation whatsapp la plus active ou on râle, on raconte nos malheurs, on s'ignore, on rigole. Merci Marie de me laisser squatter des apremes chez toi (malgré les cheveux blonds que tu vas retrouver partout dans les semaines suivantes), de me faire acheter plein de jeux de société (alors que je vis seule, mais passons), de râler quand tu perds (soit 90% du temps), d'essayer de me faire trier mes affaires (c'est fou qu'après toutes ces années tu y crois encore). Je ne te remercie pas pour la perle dans l'oreille par contre (je t'avais dit que je le mettrais !). Morgane, merci pour les séances ciné prévues à l'avance, les debriefs de nos séries (tu sais celles que tu me dis de commencer et que tu lâches après !), de nos livres (quand on a le temps), des films, de tumblr et tout le reste.

Enfin, merci à mes parents, qui au final ne sont pas si mal ! Vous êtes toujours là pour répondre à toutes mes questions (cuisine, loi, voiture, santé, fleurs, ménage et j'en passe) et vous prévoyez toujours de la bonne viande quand je rentre. Vous ne comprenez pas mon rythme de vie et de travail (moi non plus d'ailleurs), mais vous me laissez hanter les couloirs de la maison au milieu de la nuit sans rien dire. Je suis toujours contente et pressée de rentrer, donc, c'est bien la preuve que vous faites bien les choses au final.

Tous vous m'avez encouragée tout le long de cette thèse, pour me remonter le moral dans les moments de doute et de déprime (qui furent nombreux). Sans vous je n'aurai jamais pu aller aussi loin et je vous remercie sincèrement pour tout cela.

Promis juré je ne recommencerai plus !

Beaucoup de personne finissent par une petite citation. Je ne sais pas vraiment quoi dire, et j'affirme que lorsqu'on n'a rien à dire, tout ce qu'on peut dire c'est Supercalifragilisticexpialidocious !

## Sommaire



# Sommaire

## INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

<b>I. Les bactéries du genre <i>Bacillus</i></b>	<b>1</b>
<b>A. Généralités/Biologie</b>	<b>1</b>
<b>B. Le groupe <i>B. cereus</i></b>	<b>1</b>
a) Ecologie	2
b) <i>B. cereus</i> , un organisme pathogène	4
c) Phylogénie	8
<b>C. Le groupe <i>B. subtilis</i></b>	<b>9</b>
a) Ecologie	9
b) <i>B. subtilis</i> , un micro-organisme d'altération	12
c) Phylogénie	13
<b>D. La sporulation chez <i>Bacillus</i></b>	<b>16</b>
a) Les étapes de la sporulation	16
b) L'initiation de la sporulation	17
c) La régulation de la sporulation	18
d) La germination	19
<b>II. Les spores de <i>Bacillus</i></b>	<b>20</b>
<b>A. Les structures internes des endospores</b>	<b>20</b>
a) Le cœur.	22
b) Le cortex	23
c) Les tuniques	24
<b>B. L'exosporium chez <i>B. cereus</i></b>	<b>26</b>
<b>C. Le crust chez <i>B. subtilis</i></b>	<b>27</b>
a) Les protéines	28
b) Les glucides	34
<b>D. Propriétés des spores de <i>Bacillus</i></b>	<b>38</b>
a) Propriétés de résistance aux stress	38
b) Propriétés de surface et d'adhésion.	39
<b>III. Problématique des bactéries du genre <i>Bacillus</i> dans les industries agro-alimentaires</b>	<b>42</b>
<b>A. Origine des contaminations dues à <i>Bacillus</i></b>	<b>43</b>
<b>B. Problèmes liés à la présence de <i>Bacillus</i> dans les aliments</b>	<b>43</b>
<b>C. Persistance des bactéries du genre <i>Bacillus</i> dans les industries agroalimentaires.</b>	<b>45</b>
<b>IV. Effet de l'environnement sur les propriétés des spores</b>	<b>47</b>
<b>A. Influence de l'environnement sur les propriétés de surface et d'adhésion des spores mûres</b>	<b>47</b>
a) Influence de la température	48
b) Influence d'un traitement à la soude	48
c) Influence des forces de cisaillement	49
d) Influence de la pression.	50
<b>B. Influence des conditions de sporulation sur les propriétés des spores</b>	<b>50</b>
a) Influence de la température	51

b) Influence de la composition du milieu de sporulation	52
c) Effet du pH	53
d) Effet de l'atmosphère	54

## RESULTATS

<b>I. Rôle des gènes <i>sps</i> et <i>cge</i> dans la biosynthèse du crust.</b>	<b>56</b>
<b>A. Les gènes <i>sps</i> codent pour une voie originale de l'acide légionaminique nécessaire à l'assemblage du crust chez <i>Bacillus subtilis</i></b>	<b>56</b>
<b>B. Les gènes <i>cge</i> influencent la composition en monosaccharides du crust et modulent les propriétés de surface et d'adhésion des spores chez <i>Bacillus subtilis</i>.</b>	<b>59</b>
a) Introduction	59
b) Résultats	59
<b>II. Les conditions de sporulation influencent les propriétés de surface et d'adhésion des spores de <i>Bacillus subtilis</i></b>	<b>66</b>

## DISCUSSION

<b>I. Biosynthèse, composition et organisation du crust</b>	<b>69</b>
<b>A. L'acide légionaminique</b>	<b>69</b>
<b>B. Les gènes <i>cge</i> et leur rôle dans la biosynthèse du crust</b>	<b>71</b>
a) CgeD	71
b) CgeB	72
c) CgeC et CgeE	73
<b>C. Proposition d'organisation de la structure du crust.</b>	<b>74</b>
<b>II. L'influence des conditions de sporulation sur la composition et/ou l'organisation du crust.</b>	<b>76</b>
<b>A. Influence des cations divalents</b>	<b>76</b>
<b>B. Effet de la présence d'agents oxydants</b>	<b>78</b>
<b>C. Effet d'un environnement acide</b>	<b>79</b>
<b>D. Effet d'une diminution de l'oxygénation</b>	<b>79</b>

<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	<b>81</b>
------------------------------------	-----------

<b>VALORISATIONS SCIENTIFIQUES</b>	<b>103</b>
------------------------------------	------------

# Figures et Tables

## INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

<b>Figure 1</b>	Voies de transmission de <i>Bacillus cereus</i>	2
<b>Figure 2</b>	Cycle infectieux de <i>Bacillus thuringiensis</i>	3
<b>Figure 3</b>	Mode d'action de <i>Bacillus thuringiensis</i>	4
<b>Figure 4</b>	Internalisation des toxines de l'Anthrax	5
<b>Figure 5</b>	Représentation schématique d'une cellule végétative de <i>B. anthracis</i>	6
<b>Figure 6</b>	Processus de formation d'un pore par la toxine Nhe	7
<b>Figure 7</b>	Mécanisme de la formation de pores par les Cytolysines Dépendantes du Cholestérol (CDCs)	7
<b>Figure 8</b>	Avantages des interactions plantes/RFPC pour les plantes	11
<b>Figure 9</b>	Evolution de la relation entre les 31 souches du groupe <i>B. subtilis</i> et regroupement hiérarchique	14
<b>Figure 10</b>	Phylogénie des espèces du groupe <i>Bacillus subtilis</i> basée sur le génome des souches représentatives	15
<b>Figure 11</b>	Les différentes étapes du cycle de sporulation	17
<b>Figure 12</b>	Cascade de régulation de la sporulation	18
<b>Figure 13</b>	Les étapes de la germination chez <i>B. subtilis</i>	19
<b>Figure 14</b>	Structure des spores	21
<b>Figure 15</b>	Structure et composition du peptidoglycane primordial chez <i>B. subtilis</i>	22
<b>Figure 16</b>	Structure et composition du peptidoglycane du Cortex chez <i>B. subtilis</i>	23
<b>Figure 17</b>	Organisation et composition des tuniques et du crust	24
<b>Figure 18</b>	Schéma représentant l'assemblage des tuniques au cours de la sporulation chez <i>B. subtilis</i>	25
<b>Figure 19</b>	L'exosporium chez les bactéries du groupe <i>B. cereus</i>	26
<b>Figure 20</b>	Observation en microscopie électronique du crust de spores de différentes souches de <i>Bacillus</i> après coloration au rouge de ruthénium	27
<b>Figure 21</b>	Organisation des gènes codant les protéines du crust	28
<b>Table 1</b>	Résumé des dépendances génétiques pour la localisation des protéines du crust et de la tunique externe	29
<b>Table 2</b>	Résumé des interactions protéine-protéines d'après les essais en double hybride de Krajčiková et al., 2017	29
<b>Figure 22</b>	Observation du crust de spores chez les mutants des protéines du crust en microscopie électronique après coloration au rouge de ruthénium	31

<b>Figure 23</b>	Proposition d'un modèle quant à l'organisation de la fraction protéique du crust	33
<b>Figure 24</b>	Loci des gènes impliqués dans la biosynthèse de la partie glycanique du crust	34
<b>Figure 25</b>	Voie de biosynthèse du Rhamnose chez <i>B. anthracis</i> (Rfb) et chez <i>B. subtilis</i> (Sps) modifiée	35
<b>Table 3</b>	Propriétés de surface et d'adhésion à des coupons en acier inoxydable de spores de différentes souches de <i>Bacillus</i>	41
<b>Figure 26</b>	Potentiel zêta des spores de neuf souches de <i>B. subtilis</i> en fonction du pH	41
<b>Figure 27</b>	Les différents niveaux de production du pain filant	44
<b>Figure 28</b>	Observations en microscopie électronique de l'impact d'un traitement à l'hydroxyde de sodium 2% à 80°C sur des spores de <i>B. cereus</i> après coloration au rouge de ruthénium	49

## RESULTATS

<b>Figure 29</b>	Voie de biosynthèse de l'acide legionaminique chez <i>B. subtilis</i>	57
<b>Figure 30</b>	Courbes de croissance de <i>B. subtilis</i> PY79 et des mutants $\Delta cgeB$ , $\Delta cgeC$ , $\Delta cgeD$ et $\Delta cgeE$	60
<b>Figure 31</b>	Observation en microscopie des spores produites par <i>B. subtilis</i> PY79 et les mutants $\Delta cgeC$ , $\Delta cgeD$ et $\Delta cgeE$	60
<b>Figure 32</b>	Dosage des monosaccharides du crust des spores de <i>B. subtilis</i> PY79 et des mutants des gènes <i>cge</i>	62
<b>Figure 33</b>	Propriété hydrophile/hydrophobe des spores de <i>B. subtilis</i> PY79 et des mutants <i>cge</i> évalué par MATH	62
<b>Figure 34</b>	Potentiel Zêta à pH=7,0 des spores de <i>B. subtilis</i> PY79 et par des mutants des gènes <i>cge</i>	63
<b>Figure 35</b>	Adhésion des spores de <i>B. subtilis</i> PY79 et des mutants des gènes <i>cge</i> a différents matériaux	64
<b>Table 4</b>	Conséquences de la délétion des gènes <i>cgeB</i> , <i>cgeC</i> , <i>cgeD</i> , <i>cgeE</i> sur les propriétés des spores	65
<b>Table 5</b>	Effet des conditions de sporulation sur les propriétés de surface et d'adhésion des spores et la composition du crust.	68

## DISCUSSION

<b>Table 6</b>	Proportion des résidus sérines/thréonines dans la composition en acides aminés des protéines du crust	69
<b>Table 7</b>	Prédiction de domaines et structures pour les protéines Cge après analyse bio-informatique	72
<b>Figure 36</b>	Proposition d'organisation du crust à partir des dernières données bibliographiques et des résultats	75
<b>Figure 37</b>	Proposition du rôle des gènes <i>sps</i> et <i>cge</i> dans la biosynthèse du crust	76

## Introduction Bibliographique

## **I. Les bactéries du genre *Bacillus***

### **A. Généralités/Biologie**

Le phylum des Firmicutes (récemment renommé Bacillota) a été proposé en 1978 par Gibbons et Murray et regroupe des bactéries à Gram positif possédant un ADN pauvre en GC (Gibbons and Murray, 1978; Seong et al., 2018). Les bactéries de ce phylum sont généralement retrouvées dans le sol et les milieux aquatiques. Néanmoins, certaines espèces font parties de la flore intestinale normale des mammifères tandis que d'autres sont des pathogènes des hommes, des animaux ou des plantes. Le phylum des Firmicutes serait composé de sept classes : les *Clostridia*, les *Erysipelotricha*, les *Bacilli*, les *Limnochordia*, les *Negativicus*, les *Thermolithobacteria* et les *Tissierellia* (Seong et al., 2018). Toutefois, selon les mêmes auteurs, l'embranchement des Firmicutes est l'un des groupes taxonomiques les moins robustes, et la hiérarchie taxonomique de cet embranchement reste faible et plutôt fluide. Le genre *Bacillus* appartient à la classe des *Bacilli*. Les bactéries du genre *Bacillus* sont chimio-hétérotrophes, aérobie stricte ou anaérobie facultatif avec l'oxygène comme accepteur d'électron final, et sont des espèces ubiquitaires de l'environnement (Logan and De Vos, 2009). La plupart des espèces sont mésophiles mais quelques espèces sont psychrophiles (*Bacillus insolitus*) ou encore thermophiles (*B. schlegelii* ou *B. thermocloacae*). Le pourcentage en GC des *Bacillus* est en moyenne de 32% (Zeigler and Perkins, 2008). Les bactéries du genre *Bacillus* ont une morphologie en forme de bâtonnets et forment des endospores non déformantes, et ce, à raison d'une spore par cellule végétative. Les endospores produites par ces micro-organismes sont des cellules dormantes, sans capacité de reproduction et qui peuvent survivre à des conditions environnementales qui seraient délétères pour les cellules végétatives, permettant ainsi la survie de ces micro-organismes ainsi que leur propagation ultérieure. Les analyses phylogénétiques basées sur le séquençage de l'ARNr 16S, suggèrent une division du genre *Bacillus* en cinq groupes : *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. megaterium*, *B. circulans* et *B. brevis* (Sicua et al., 2015). Parmi les bactéries du groupe *B. cereus* sont retrouvés plusieurs pathogènes impliqués notamment dans des toxi-infections alimentaires. Les bactéries du groupes *B. subtilis* produisent de nombreuses enzymes extracellulaires. Elles sont de ce fait largement utilisées dans les industries. Ces bactéries sont cependant aussi responsables de l'altération et la détérioration de nombreux produits alimentaires. Ainsi, les bactéries des groupes *B. cereus* et *B. subtilis* sont largement étudiées, notamment afin de maîtriser les risques associés à leur présence, et plus particulièrement au sein des industries agroalimentaires.

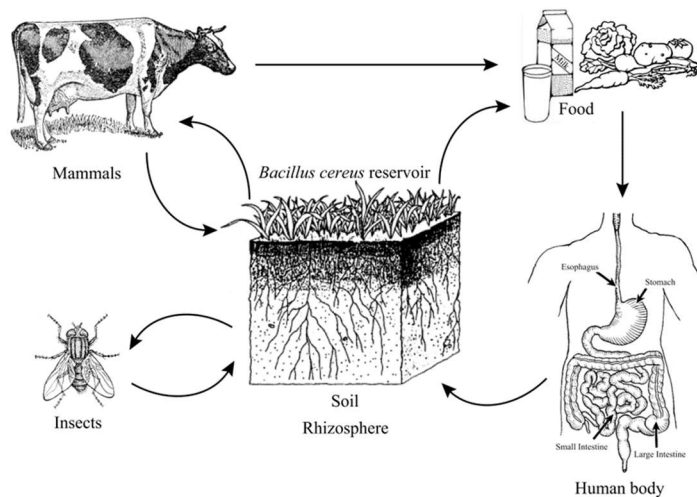
### **B. Le groupe *B. cereus***

Le groupe *B. cereus* est composé de plus de 8 espèces dont *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides*, *B. weihenstephanensis*, *B. cytotoxicus* et *B. toyonensis* (Liu et al., 2015b). Ces bactéries ont un impact considérable sur l'homme que ce soit au niveau de la

santé, de l'agriculture ou encore de l'industrie agroalimentaire. *B. cereus* (*sensu stricto*) et *B. cytotoxicus* sont des pathogènes opportunistes de l'homme responsables d'intoxications alimentaires et *B. anthracis* est l'agent responsable de la maladie du charbon ou anthrax (Guinebretière et al., 2013; Ehling-Schulz et al., 2019). *B. thuringiensis* est un entomopathogène utilisé comme biopesticide et *B. toyonensis* a été utilisé comme probiotique dans l'alimentation des animaux jusqu'à son retrait par la commission européenne en 2015 (Berry et al. 2002; Jiménez et al. 2013; Règlement d'exécution (UE) 2015/1399)

#### a) Écologie

Bien que souvent isolées du sol, les espèces du groupe *B. cereus* ne semblent pas être capable de germer et se multiplier dans cette matrice en absence d'une source de nutriment tel qu'un animal, un insecte ou une plante en décomposition (West et al., 1985). Cette observation est en accord avec les analyses physiologiques et génomiques de ces espèces. En effet, chez ces micro-organismes, peu de gènes permettant la dégradation des polymères d'hydrates de carbone sont retrouvés alors qu'ils possèdent, au contraire, de nombreux gènes codant pour des facteurs extracellulaires comme des enzymes de digestion ou encore des protéines cytotoxiques (Ivanova et al., 2003; Jiménez et al., 2013). Comme présenté dans la **Figure 1**, la contamination par ces bactéries se ferait principalement via des spores issues du sol, l'environnement ou des organismes associés au sol comme par exemple des plantes ou des insectes. Les bactéries du groupe *B. cereus* pénètrent leur hôte par ingestion, inhalation mais aussi via la peau (plaies) (Ehling-Schulz et al., 2019).

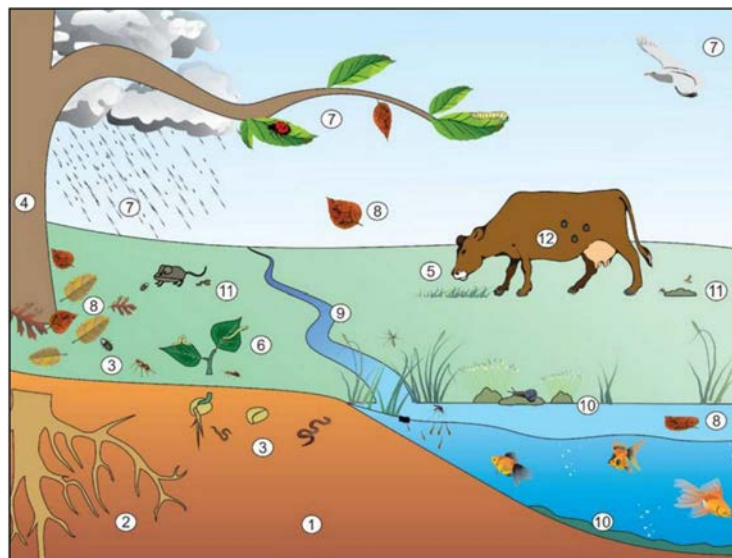


**Figure 1 : Voies de transmission de *Bacillus cereus* d'après Mols and Abee, 2011.** Le sol et les organismes associés au sol comme les plantes, les insectes, les nématodes et les amibes servent de réservoirs majeurs pour l'acquisition des spores. Les bactéries sont transmises à l'homme à travers des produits agricoles comme la nourriture et les textiles d'origine animale. Elles pénètrent les organismes des hommes et des autres mammifères par ingestion, inhalation ou à travers des plaies de la peau.

Les trois espèces les plus étudiées de ce groupe sont *B. anthracis*, *B. thuringiensis* et *B. cereus* (*sensu stricto*). *B. anthracis* est l'agent étiologique de l'anthrax, ou maladie du charbon, une pathologie affectant principalement les mammifères herbivores. Chez l'homme, cette maladie peut se présenter sous quatre formes selon le mode de contamination : cutanée, gastroentérique, pulmonaire et par

injection (Pilo and Frey, 2018). L'homme reste cependant un hôte accidentel de ce pathogène. Lorsqu'un animal contaminé par *B. anthracis* décède des suites de la maladie, les cellules végétatives présentes en forte quantité dans le sang, sont libérées dans l'environnement, notamment au niveau du sol et de l'herbe où elles vont sporuler. Ces spores peuvent ensuite être ingérées par d'autres animaux se nourrissant dans cette zone. Il a de plus été montré que la présence de carcasses modifie la composition des sols, rendant ces zones plus attractives pour les herbivores ce qui permet une meilleure propagation des spores (Turner et al., 2014). Les spores de *B. anthracis* peuvent également être disséminées dans l'environnement par des animaux charognards ou des mouches nécrophiles notamment via leurs excréments (Alexander et al., 2012; Blackburn et al., 2014).

*B. thuringiensis* peut être retrouvé dans de nombreuses niches environnementales et est capable d'infecter une grande variété d'hôtes rendant le cycle de vie de ce micro-organisme assez complexe (**Figure 2**) (Argôlo-Filho and Loguercio, 2014). Ainsi, bien que le sol soit le réservoir principal de *B. thuringiensis*, ce micro-organisme peut aussi être retrouvé dans les tissus des plantes ou encore associé à des plantes et des sédiments dans le milieu aquatique. Il peut de plus infecter des invertébrés du sol, des herbivores et des organismes aquatiques de façon paraténique ou pathogénique.



**Figure 2 : Cycle infectieux de *Bacillus thuringiensis* d'après Argôlo-Filho and Loguercio, 2014.** Bien que le sol soit le réservoir principal de *B. thuringiensis* (1), ce micro-organisme peut aussi coloniser la rhizosphère en se nourrissant des substances exsudées par les racines (2). S'il est ingéré par des invertébrés du sol, comme des vers, des insectes ou des nématodes (3), *B. thuringiensis* peut les infecter de façon paraténique, en colonisant leurs intestins et leurs excréments sans leur causer de dommages, ou de façon pathogénique résultant en la mort de l'hôte ce qui permet la croissance du micro-organisme dans cet environnement. Ces deux voies conduisent au relargage du pathogène dans l'environnement. La colonisation de la rhizosphère favorise une colonisation endophytique (4), ce qui permet la protection des plantes contre certains herbivores. *B. thuringiensis* est alors capable de proliférer dans les tissus des plantes et de contaminer ainsi des herbivores de façon paraténique (5) ou pathogénique (6). Il peut de plus atteindre la surface des plantes directement à partir du sol du fait de la germination des plantes, par l'éclaboussement du sol par la pluie ou encore par les excréments de ses hôtes comme les insectes et les oiseaux (7). Les feuilles infectées par *B. thuringiensis* peuvent réintroduire dans l'environnement, dans le sol ou l'eau, lorsqu'elles tombent (8, 9). Dans l'eau, *B. thuringiensis* peut infecter et proliférer au sein d'organismes vertébrés et invertébrés et il peut persister dans cet environnement en s'associant à des plantes aquatiques ou des sédiments (10). Les excréments des animaux se nourrissant de plantes ou insectes contaminés peuvent servir de nutriments à la bactérie ou servir de source d'infection pour les coprophages (11). Enfin, *B. thuringiensis* est aussi capable d'infecter les tiques et les acariens (12).

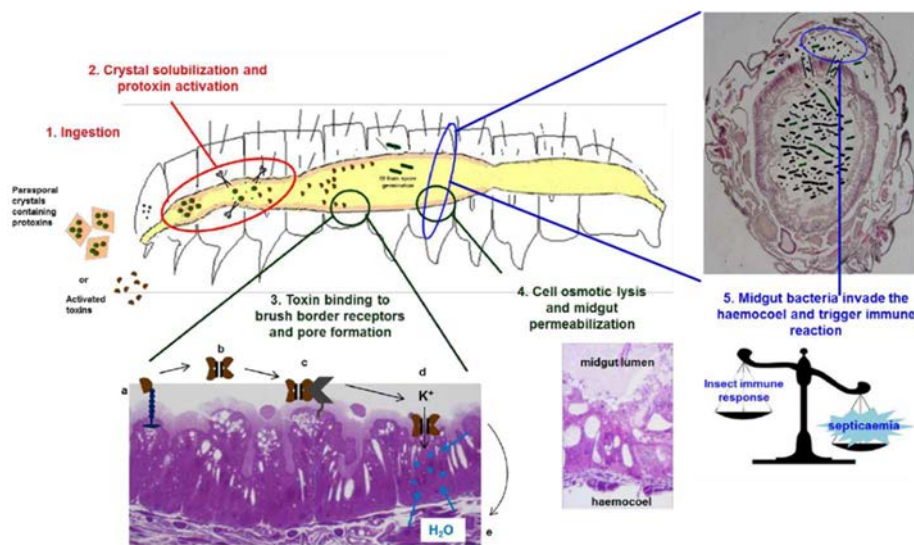


Le cycle infectieux de *B. cereus* reste peu connu. Ce micro-organisme est largement répandu dans l'environnement, et ses spores contaminent ainsi souvent les aliments issus directement du sol comme les légumes, les herbes ou les épices (Ceuppens et al., 2013). On retrouve aussi des spores dans les produits laitiers, probablement dû à une contamination du lait. *B. cereus* colonise probablement les racines et tubercules des plantes soit de façon symbiotique soit sous la forme de biofilms (Ehling-Schulz et al., 2015). Les parties aériennes/en surface des plantes sont contaminées au moment de la récolte, ou par l'intermédiaire d'insectes et de petits animaux se nourrissant au niveau des racines. Les contaminations de plats préparés peuvent être liées à une persistance des spores lors de la transformation des matières premières contaminées.

b) *B. cereus*, un organisme pathogène

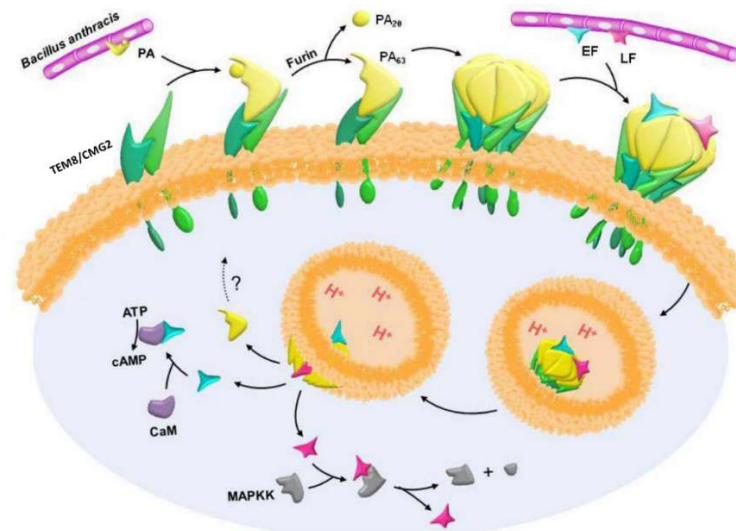
Malgré la parenté étroite des espèces du groupe *B. cereus*, la variabilité de leur pathogénicité est considérable que ce soit au niveau des hôtes ciblés ou des maladies engendrées.

L'entomopathogène *B. thuringiensis* produit des cristaux parasporaux contenant des  $\delta$ -endotoxines (Cry et Cyt) durant la sporulation et secrète des protéines insecticides durant sa croissance végétative (Caccia et al., 2016; Gillis et al., 2019). Les  $\delta$ -endotoxines sont clivées par les protéases intestinales des insectes lors de leur ingestion. Les fragments obtenus se fixent à des récepteurs spécifiques de l'épithélium intestinal et forment des pores perméables aux cations. Il y a alors une lyse des cellules épithéliales suite au choc osmotique ce qui aboutit à la mort de l'insecte hôte (**Figure 3**).



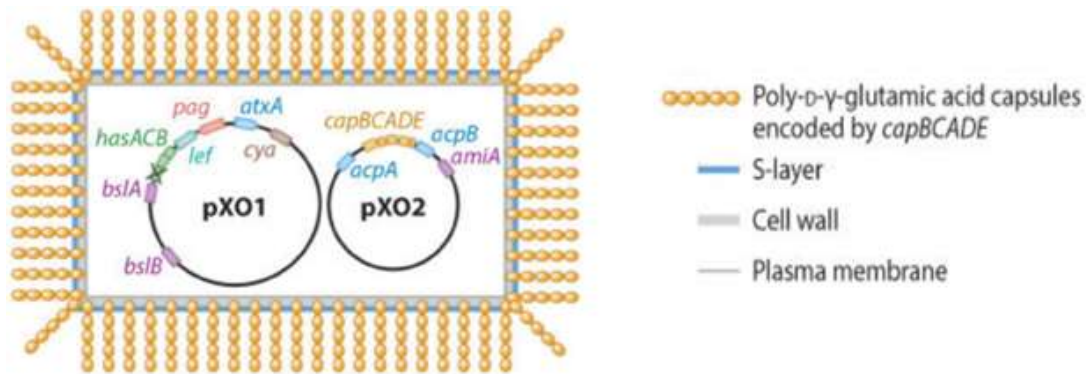
**Figure 3 : Mode d'action de *Bacillus thuringiensis* d'après Caccia et al., 2016.** Après ingestion par un insecte (1) les cristaux sont solubilisés dans le lumen du tube digestif, les protoxines sont alors clivées et les toxines actives sont libérées (2). Les toxines traversent la matrice péririthique et se lient à des récepteurs primaires spécifiques (cadhérines) localisés sur les bordures en brosses des cellules de l'intestin (3a). La liaison des toxines aux cadhérines est associée à un clivage protéolytique suivi de la formation d'oligomères de toxines (3b) qui vont se lier aux récepteurs secondaires (aminopeptidase N des phosphatases alcalines isoformes) (3c). Ces liaisons entraînent l'insertion des toxines dans la membrane, la formation de pores et l'entrée de cations dans les cellules intestinales (3d). Ce déplacement d'ions favorise une entrée d'eau (3e) et un choc osmotique (4). Les dommages tissulaires provoquent une paralysie de l'intestin et le passage des bactéries de l'intestin à l'hémocoèle (5). L'entrée des bactéries dans l'hémocoèle déclenche une réaction immunitaire qui, selon l'immunocompétence de l'hôte et le degré de dommages au niveau de l'intestin, va soit réussir à limiter le processus infectieux ou au contraire n'arrivera pas à empêcher le début d'une septicémie mortelle.

Chez *B. anthracis* les principaux facteurs de virulence sont la toxine de l'anthrax et la capsule de poly- $\gamma$ -D-acide glutamique (Pilo and Frey, 2018). Les gènes qui codent pour ces facteurs de pathogénicité sont situés sur les deux plasmides pXO1 et pXO2 (Okinaka et al., 1999). Le plasmide pXO1, porte les gènes *pagA*, *lef*, et *cya* qui codent respectivement pour l'antigène protecteur (PA), le facteur létal (LF) et le facteur œdémateux (EF) (**Figure 4**) (Missiakas and Schneewind, 2017).



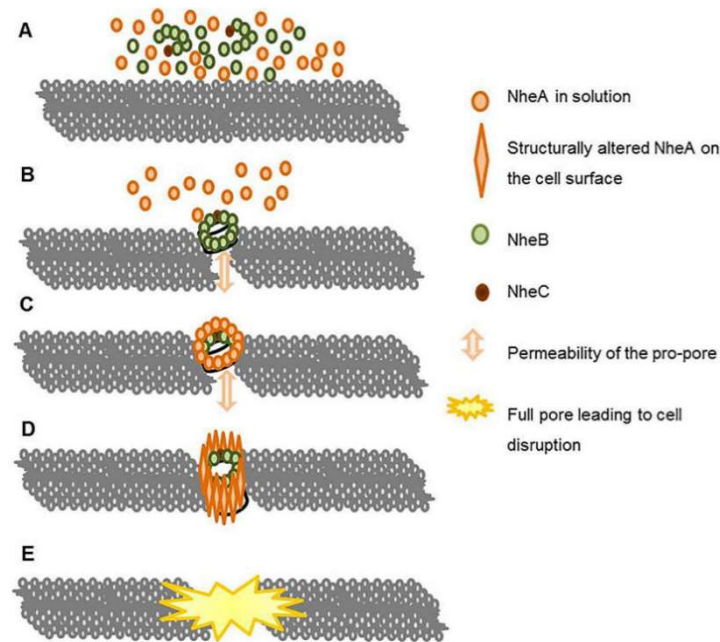
**Figure 4 : Internalisation des toxines de l' Anthrax d'après Golden et al., 2009.** L'antigène protecteur PA de 83kDa se lie aux récepteurs TEM8 et CMG2 présents à la surface des cellules, aussi appelés ANTRX1 et ANTRX2 respectivement. PA est alors clivé par une protéase de l'hôte de type furine, ce qui génère un fragment PA de 63kDa qui va s'oligomériser en une hepta-structure. Le facteur Létal (LF) et le Facteur Œdémateux (EF) vont pouvoir se lier à cette structure et former la toxine Létale (LT) et la Toxine Œdémateuse (ET). Ces structures sont endocytosées dans des vésicules recouvertes de clathrine. L'environnement acide de l'endosome entraîne alors l'insertion de PA dans la membrane permettant ainsi la translocation de EF et LF dans le cytoplasme de la cellule. LF est responsable du clivage de MAPK Kinases de par son activité de zinc protéase, ce qui entraîne un relargage excessif de cytokines dans la cellule et déclenche ainsi une apoptose et la mort de la cellule. EF s'associe à la calmoduline, ce qui lui confère une activité adénylate cyclase lui permettant de convertir l'ATP en AMP cyclique. A haute concentration, l'AMP cyclique entraîne une diminution de la concentration en ions chlorures et une augmentation de l'entrée d'eau dans la cellule ce qui résulte en œdème. Il faut noter que lors de la mort de la cellule contaminée, une partie des toxines peut être transférée aux cellules non-infectées avoisinantes sous la forme d'exosomes.

Les gènes *capBCADE*, qui codent la capsule extracellulaire de polysaccharide, sont portés par le plasmide pXO2 (**Figure 5**). La capsule, de par sa charge négative, permet d'inhiber la phagocytose par les macrophages en diminuant considérablement l'adhésion des IgG ou de l'élément C3b de la réponse du complément à la surface de la cellule (Sharma et al., 2020). La production des toxines et de la capsule est induite lorsque la température atteint 37°C et que le niveau de CO<sub>2</sub> augmente, ce qui correspond aux conditions normales de croissances au sein d'un hôte mammifère.



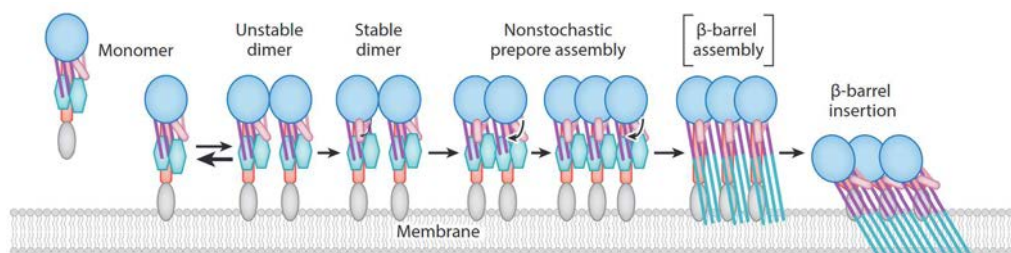
**Figure 5 : Représentation schématique d'une cellule végétative de *B. anthracis* d'après Missiakas and Schneewind, 2017.** En plus des gènes codant pour les toxines (*pag*, *lef*, et *cya*), les plasmides de virulences pXO1 et pXO2 de *B. anthracis* portent les gènes pour la synthèse de la capsule de poly- $\gamma$ -D-acide glutamique (*capBACDE*) ainsi que la capsule en acide hyaluronique (*hasACB*). Le gène *hasA* porte cependant une mutation le rendant inactif. Les plasmides portent aussi trois gènes codant pour des protéines associées à la S-layer (*bslA*, *bslBi* et *amiA*). Le facteur codé par *atxA* active la synthèse des toxines, de la capsule et de *bslA* en réponse à des signaux extérieurs (augmentation de la concentration en  $\text{CO}_2$ ). L'action de AtxA sur *capBACDE* est indirecte et passe par le recrutement des facteurs AcpA et AcpB. La capsule est ancrée directement au peptidoglycane à la surface de la cellule.

*B. cereus* est principalement connu pour son rôle dans de nombreux cas d'intoxications alimentaires se présentant sous forme émétique ou diarrhéique (Dietrich et al., 2021; Jovanovic et al., 2021). Le syndrome émétique est causé par le céréulide, un dodécadepsipeptide cyclique thermostable, non ribosomique (Ehling-Schulz et al., 2006). Le céréulide est codé par l'opéron *cesHPTABCD*, porté par un méga-plasmide dont la structure s'apparente à pXO1. Le céréulide est préformé dans les aliments par les cellules végétatives, et n'est pas dégradé lors de leur cuisson ou de leur digestion (Shinagawa et al., 1996). Le céréulide possède une activité hépatotoxique et agirait comme un ionophore pour l'ion potassium (Kawamura-Sato et al., 2005). Il perméabiliserait la membrane mitochondriale découplant ainsi la phosphorylation oxydative. Dans le cas du syndrome diarrhéique d'une intoxication alimentaire par *B. cereus*, trois principales entérotoxines ont été identifiées : Nhe, Hbl et CytK (Dietrich et al., 2021; Jovanovic et al., 2021), qui agissent par formation de pores et dont l'expression des gènes est régulée par PlcR. Contrairement à la céréulide, les entérotoxines préformées dans les aliments ne contribuent probablement pas aux symptômes, car elles sont sensibles à la chaleur, aux acides ou aux protéases. Nhe est une toxine non-hémolytique composée des protéines NheA, NheB et NheC codées par l'opéron *nheABC* (Granum et al., 1999). Le mode d'action du complexe Nhe a été proposé par Didier et al. et est retranscrit dans la **Figure 6** (Didier et al., 2016). Hbl est une toxine hémolytique composée des protéines L<sub>2</sub>, L<sub>1</sub> et B, codées par l'opéron, *hblCDA* (Heinrichs et al., 1993; Ryan et al., 1997). CytK est une cytotoxine, codée par le seul gène *cytK* dont il existe deux variants : *cytK-1* et *cytK-2* (Fagerlund et al., 2004). Les toxines correspondantes : CytK-1 et CytK-2 partagent 89% d'identité de séquence en acides aminés. Le variant *cytK-2* est le plus répandu parmi les espèces du groupe *B. cereus*, et CytK-2 n'est probablement pas un facteur de virulence pertinent pour le syndrome diarrhéique (Dietrich et al., 2021). En revanche, la toxine CytK-1 est clairement impliquée dans la cytotoxicité des souches de l'espèce *B. cytotoxicus* (Koné et al., 2021).



**Figure 6 : Processus de formation d'un pore par la toxine Nhe d'après Didier *et al.*, 2016.** (A) en solution NheA est sous forme de simples molécules solubles tandis que NheB et NheC forment des complexes; (B) Le complexe NheB/C s'attache à la membrane cellulaire ou des petits pré-pores perméables se forment, de façon indépendante à NheA toujours en solution; (C) NheA va ensuite se lier aux pré-pores puis changer de conformation suite à cette adhésion ; (D) cette modification de structure entraîne la formation complète du pore et ainsi la destruction de la cellule cible (E).

Les bactéries du groupe *B. cereus* possèdent aussi des facteurs de virulence communs tels que les cytolysines dépendantes du cholestérol (CDC), l'inhibiteur Immun A (InhA1) et les phospholipases C. Les CDCs sont des toxines de types tonneaux  $\beta$  qui agissent par formation de pores (Tveten *et al.*, 2015). La céréolysine-O (CLO), la thuringiolysine-O (TLO) et l'anthrolysine-O (ALO) sont trois CDCs qui ont été identifiées chez *B. cereus*, *B. thuringiensis* et *B. anthracis* respectivement (Bernheimer and Grushoff, 1967; Shannon *et al.*, 2003). Ces toxines sont secrétées sous forme de monomères solubles qui vont se lier aux membranes riches en cholestérol où elles vont s'oligomériser entre elles (**Figure 7**). Ces interactions vont conduire à la formation d'une structure stable et d'un pré-pore. Chaque monomère va déployer deux épingle à cheveux  $\beta$  qui vont s'assembler et percer la membrane pour former un pore très large (entre 25 et 30 nm en moyenne).



**Figure 7 : Mécanisme de la formation de pores par les Cytolysines Dépendantes du Cholestérol (CDCs) d'après Tveten *et al.*, 2015.** Les monomères de CDC vont s'associer à la membrane via le cholestérol et vont ensuite s'associer entre eux jusqu'à former des dimères stables. Un monomère non lié à la membrane ne peut interagir pour former un dimère. Les complexes continuent de se lier entre eux jusqu'à former un pré-pore. Les deux faisceaux d'hélice  $\alpha$  de chaque CDC se déploient et se replient en épingle à cheveux  $\beta$  qui s'associent entre eux pour percer la membrane et former le pore en tonneau  $\beta$ .

InhA1 est une métalloprotéase à zinc retrouvée chez les bactéries du groupe *B. cereus* et qui participe à leur pouvoir pathogène. Chez *B. cereus*, InhA1 est intégrée dans l'exosporium des spores et joue un rôle dans leur survie au sein des macrophages ainsi que dans leur capacité à échapper à la phagocytose (Charlton et al., 1999; Ramarao and Lereclus, 2006). Chez *B. thuringiensis*, il existe un rôle synergique entre InhA1 et les toxines Cry lors de l'infection orale de *Spodoptera littoralis* (Dammak et al., 2015). Ainsi, l'action des protéines Cry sur les cellules intestinales permettrait le passage de InhA1 dans l'hémolymphe où elle pourrait hydrolyser les peptides antimicrobiens produits par l'hôte. Enfin, chez *B. anthracis*, des expériences *in vitro* et *in vivo* suggèrent que InhA1 envahi les cellules endothéliales et dégrade la protéine de jonction ZO-1, ce qui contribue à la formation d'une hémorragie dans le système nerveux central de l'hôte (Mukherjee et al., 2011).

Les phospholipases C sont des enzymes qui présentent une activité hémolytique et agissent en clivant les phospholipides directement en amont du groupe phosphate libérant ainsi un diglycéride et un phospho-alcool. Trois phospholipases C ont été identifiées chez les espèces du groupe *B. cereus*, une phosphatidycholine spécifique (PC-PLC), une phosphatidylinositol spécifique (PI-PLC) et une sphingomyélinase (SMase) (Clark et al., 1986; Read et al., 2003; Ghelardi et al., 2007). PC-PLC peut agir en tandem avec la SMase pour former la céréolysine AB qui est capable de lyser les érythrocytes humains et porcins (Gilmore et al., 1989; Beecher and Wong, 2000). Chez *B. anthracis*, il a été montré que PI-PLC jouait un rôle dans la modulation du système immunitaire de l'hôte (Zenewicz et al., 2005). En effet, en présence de cette phosphatase une diminution de l'activation des cellules dendritiques est observée.

### c) Phylogénie

Du fait de l'importance des bactéries du groupe *B. cereus*, leur classification a longuement été étudiée que ce soit par des critères phénotypiques (Priest et al., 1988), par comparaison de leurs ARNr 16S (Ash et al., 1991; Bavykin et al., 2004), par l'étude du polymorphisme de longueur des fragments amplifiés (ALFP) (Hill et al., 2004), ou par séquençage multi-loci (MLST) (Ko et al., 2004; Olsen et al., 2007). Ces différentes approches se sont généralement focalisées sur les trois espèces principales que sont *B. cereus*, *B. thuringiensis* et *B. anthracis*. Les différentes souches de *B. anthracis* forment toujours un groupe à part tandis que dans le cas de *B. cereus* et *B. thuringiensis* les différentes souches restent souvent entremêlées et il est difficile de séparer les deux espèces.

Une étude de 2015 s'est proposée d'analyser près de 224 souches du groupe *B. cereus* par une méthode d'hybridation ADN-ADN digitale (dDDH) et par MLSA basée sur 20 gènes de ménage (Liu et al., 2015b). La technique dDDH est basée sur la méthode phylogénétique GBDP (Genome-Blast Distance Phylogeny). Elle repose sur la comparaison de régions d'ADN présentant une grande similarité entre deux génomes, ce qui permet de calculer des distances inter-génomiques et de construire des arbres phylogénétiques (Auch et al., 2010). Ces distances sont ensuite converties en valeurs dDDH à l'aide du GGDC (Genome-to-Genome Distance Calculator). La MLST consiste à séquencer plusieurs *loci* (généralement entre 4 et 8 gènes de ménages) et à attribuer un nombre à chaque allèle présent à chaque

*locus* (Maiden et al., 1998). Deux allèles sont considérés comme différents à partir d'un seul nucléotide changé. En revanche, cette méthode ne donne pas de poids au nombre de nucléotides différents entre deux allèles et il n'est pas possible de distinguer entre une mutation ponctuelle et des mutations multiples. Pour une souche donnée, la combinaison des nombres obtenus pour chaque *locus* permet d'établir un profil allélique. Lors d'une analyse par MLSA, la comparaison entre les souches se fait directement à partir des séquences d'ADN (Almeida et al., 2010). Cette méthode permet donc de prendre en compte le nombre de nucléotides modifiés entre deux séquences. La MLST est un outil moléculaire d'épidémiologie qui permet de différencier des souches au sein d'espèces connues tandis que la MLSA permet la caractérisation génotypique de souches au sein de groupes de procaryotes plus variés, pouvant aller jusqu'au genre (Gevers et al., 2005). Les arbres phylogénétiques du groupe *B. cereus* obtenus selon l'analyse dDDH et la méthode MLSA sont similaires et permettent de diviser les différentes espèces du groupe en 30 clusters (Liu et al., 2015b). Le premier cluster est associé à *B. anthracis* et peut être divisé en sous-clusters. Le premier sous-cluster est hautement conservé et composé de 28 souches de *B. anthracis*. Les autres sous-clusters sont plus ramifiés et constitués de 20 souches auparavant identifiées comme appartenant aux espèces *B. cereus*, *B. thuringiensis* et un *Bacillus* spp et sont réannotés comme des *B. anthracis* anormaux par les auteurs. Il est encore une fois difficile de séparer les souches des espèces *B. cereus* et *B. thuringiensis*.

Les résultats de cette étude suggèrent également que les gènes de virulence portés par les plasmides pXO1 et pXO2 (Okinaka et al., 1999) ainsi que les gènes *cry* (Berry et al., 2002) ne peuvent pas être utilisés comme critères de classement phylogénétique. En effet, bien que les plasmides pXO1 et pXO2 ne coexistent que chez *B. anthracis*, ils sont séparément retrouvés dans d'autres espèces. Ainsi, le plasmide pXO1 a été identifié dans 43 souches appartenant à 12 espèces différentes et le plasmide pXO2 est présent dans 50 souches réparties sur 11 espèces. De même, les gènes *cry*, identifiés chez *B. thuringiensis* ont été identifiés dans près de 57 souches réparties dans 12 clusters.

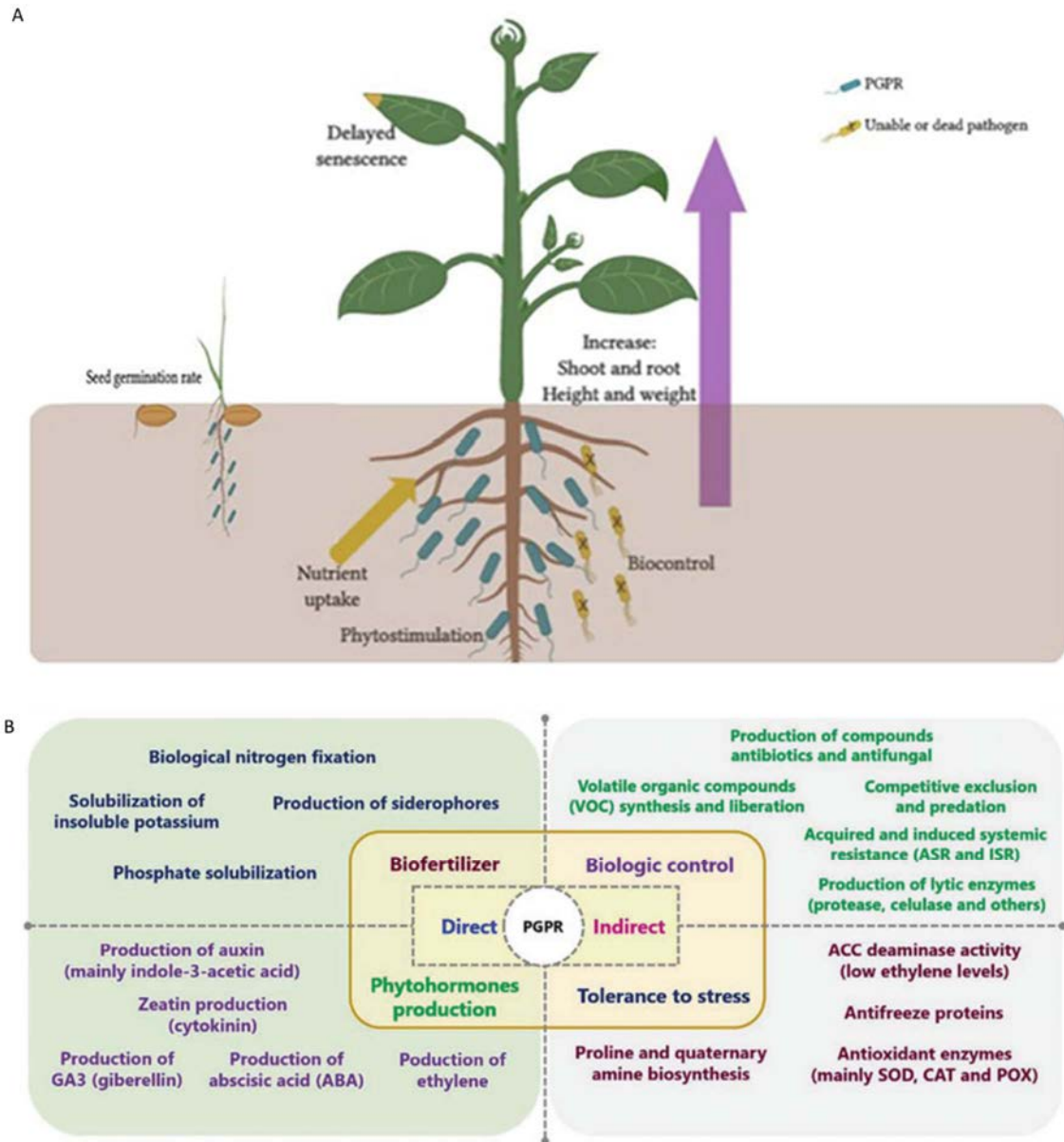
### C. Le groupe *B. subtilis*

Le groupe *B. subtilis* est composé à ce jour d'une vingtaine d'espèces dont près de la moitié ont été identifiées ces vingt dernières années. Le groupe *B. subtilis* a été tout d'abord formé par les trois espèces *B. subtilis*, *B. licheniformis* et *B. pumilus* avant que soit ajouté *B. amyloliquefaciens* en 1987 et *B. atrophaeus* en 1989 (Priest et al., 1987; Nakamura, 1989). *B. mojavensis* et *B. vallismortis* ont ensuite été ajoutés durant les années 1990 (Roberts et al., 1994, 1996). Enfin, au moins cinq nouvelles espèces ont été découvertes durant les années 2000 dont *B. sonorensis*, *B. tequilensis*, ou encore *B. velezensis* (Palmisano et al., 2001; Ruiz-García et al., 2005b, 2005a; Gatson et al., 2006; Wang et al., 2007b).

#### a) Écologie

L'espèce *B. subtilis* est omniprésente dans l'environnement et largement adaptée pour se développer dans diverses niches de la biosphère. Une des raisons pourrait être le fait que ses spores sont facilement transportées dans l'air, et peuvent ainsi migrer sur de longues distances. *B. subtilis* est

notamment très répandue dans le sol, où elle pourrait avoir un mode de vie saprophyte (Vilain et al., 2006). La majorité des bactéries du groupe *B. subtilis* peuvent aussi se développer en association étroite avec les plantes: ce sont des rhizobactéries capables de favoriser la croissance des plantes (RFPC) comme *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. pumilus*, *B. amyloliquefaciens*, ou encore *B. atrophaeus* et *B. velezensis* (anciennement *B. amyloliquefaciens* FZB42) (Hossain et al., 2015; Fan et al., 2017a). La rhizosphère est la fine pellicule de terre autour des racines des plantes. Elle constitue la source de nutriments primaires de la plante et de nombreux micro-organismes y sont associés, les bactéries étant les plus représentées. Parmi les RFPC, les genres *Pseudomonas* et *Bacillus* sont prédominants (Radhakrishnan et al., 2017). La colonisation des racines par *Bacillus* est de nature symbiotique (**Figure 8A**). Ainsi, la présence de RFPC dans la rhizosphère stimule la croissance des plantes et leur fournit une protection contre le stress à travers des mécanismes directs ou indirects (**Figure 8B**) (Blake et al., 2021). En effet, de nombreux nutriments et oligo-éléments importants pour les plantes, tel que l'azote, le phosphore et le fer, se trouvent dans le sol sous une forme inaccessible pour les plantes et doivent donc être fixés ou mobilisés au préalable par les rhizobactéries comme *B. subtilis* (Blake et al., 2021). Les bactéries du groupe *B. subtilis* peuvent de plus stimuler la croissance des plantes en produisant des hormones de croissance végétales ou en induisant leur production dans les plantes à partir de composés sécrétés (Arkhipova et al., 2005). La protection des plantes par *B. subtilis* est assurée par la production de composés antimicrobiens comme par exemple des lipopeptides (surfactine), des exo-enzymes (protéases) ou des composés volatiles (Chen et al., 2008; Liu et al., 2011; Fan et al., 2017b). Les bactéries RFPC activent de plus la résistance induite systémique des plantes (Pieterse et al., 2014). Dans cet état, la plante active des mécanismes de défense latents qui vont s'exprimer lors d'une attaque ultérieure de la plante par un pathogène ou un herbivore. Cet état est activé après une induction par une première attaque ou la présence de bactéries RFPC. Le premier cas utilise une voie de signalisation impliquant des acides sialiques et le deuxième implique l'éthylène et le jasmonate.



**Figure 8 : Avantages des interactions plantes/RFPC pour les plantes d'après Figueiredo *et al.*, 2016 et dos Santos *et al.*, 2020.** A) La présence de bactéries RFPC dans la rhizosphère permet d'améliorer, entre autres, le taux de germination, la vitesse de croissance des racines, la teneur en chlorophylle, l'adsorption des nutriments, la tolérance au stress abiotique, la résistance aux pathogènes ou encore à retarder la sénescence. B) Liste des mécanismes directs et indirectes mis en place par les bactéries RFPC et permettant d'améliorer la croissance et la résistance des plantes hôtes.

Les bactéries RFPC utilisent par ailleurs les exsudats de plantes riches en acides aminés et en sucre comme source d'énergie et de nutriments (Bhattacharyya and Jha, 2011). Ces exsudats servent aussi de signaux moléculaires afin d'activer les capacités chimiotactiques de ces micro-organismes et les attirer vers la rhizosphère. Les nutriments produits et sécrétés dans le sol par les plantes, et notamment les acides aminés, sont détectés par *Bacillus* via les chimiorécepteurs MCP (Glekas et al., 2012; Yang et al., 2015). La transduction du signal par les MCP permet de modifier la trajectoire des bactéries, en direction des nutriments, en changeant soit le sens soit la vitesse de rotation des flagelles. Après avoir migré dans la rhizosphère, les bactéries du groupe *B. subtilis* forment des biofilms. Un



biofilm est une association fonctionnelle de micro-organismes attachés les uns aux autres et/ou attachés à une ou des surfaces ou interfaces, et enrobés d'une matrice polymérique extracellulaire produite par les micro-organismes (Shemesh and Ostrov, 2020). La formation des biofilms peut être induite par des molécules produites par les plantes (Chen et al., 2012; Beauregard et al., 2013). Il a notamment été montré que l'acide L-malique issu d'un exsudat de plants de tomates favorise la formation de biofilms par *B. subtilis* et la protéine kinase KinD a été identifiée comme étant nécessaire à ce processus (Chen et al., 2012). L'arabinogalactane, la pectine et le xylane sont trois polysaccharides produits par *Arabidopsis thaliana* qui stimulent la formation des biofilms chez *B. subtilis* (Beauregard et al., 2013). Ces trois polysaccharides peuvent aussi être digérés, convertis en UDP-galactose et être ainsi directement intégrés à la matrice extracellulaire des biofilms de *B. subtilis*.

#### b) *B. subtilis*, un micro-organisme d'altération

Les bactéries du groupe *B. subtilis* produisent un grand nombre d'enzymes extracellulaires dont certaines peuvent entraîner l'altération des propriétés organoleptiques de nombreux produits transformés dans les industries agroalimentaires. Parmi ces enzymes extracellulaires, on retrouve notamment des protéases, des lipases et des amylases (Harwood and Kikuchi, 2022). *B. subtilis* code pour huit protéases extracellulaires. AprE, aussi appelée subtilisine, et NprE sont les plus abondantes et contribuent à plus de 95% de l'activité extracellulaire de *B. subtilis*. AprE est une serine protéase alcaline et NprE une métalloprotéase A neutre. La subtilisine est thermostable, résistante à une large gamme de pH et sa structure présente des sites de fixation du calcium (Smith et al., 1999; Azrin et al., 2022).

*B. subtilis* produit aussi deux lipases extracellulaires LipA et LipB (Eggert et al., 2002, 2003). Les gènes *lipA* et *lipB* sont régulés différemment en fonction du pH ainsi que de la disponibilité en acides aminés dans le milieu (Eggert et al., 2003). Ainsi un pH acide entraîne la production d'une lipase LipA sans activité enzymatique mais n'affecte pas LipB. La synthèse de LipB est abolie dans un milieu de culture pauvre tandis que la présence d'acide aminés dans le milieu réprime l'expression du gène *lipA*. Ces différences d'expression permettent d'assurer une activité lipolytique pour un large éventail de conditions environnementales. Les régulateurs impliqués dans la synthèse de ces lipases n'ont pas été identifiés pour le moment. LipA se replie en six brins  $\beta$  dans un feuillet  $\beta$  parallèle et entouré d' $\alpha$ -hélices réparties de part et d'autres du feuillet  $\beta$  (Eggert et al., 2002). Sa conformation s'apparente à celles d'autres lipases, quoi que plus petite. La structure prédite de LipB s'apparente à celle de LipA.

L'amylase AmyE de *B. subtilis* est extrêmement utilisée dans les industries. C'est une  $\alpha$ -amylase responsable de l'hydrolyse des liaisons internes 1,4-glycosidiques de l'amidon afin de libérer des produits de plus faible poids moléculaires comme du glucose ou encore du maltose (Pretorius et al., 1986; Gupta and Rao, 2014). Son activité est diminuée à pH acide (Yang et al., 2013). AmyE est constituée de trois domaines A, B et C (Yang et al., 2013). Le domaine A, forme un barillet central de type  $(\beta/\alpha)_8$  et correspond au cœur de la molécule. Le domaine B contient un feuillet  $\beta$  à six brins qui varie entre les différents membres de la famille des  $\alpha$ -amylases. Il est probable que ce domaine soit impliqué dans les différences de spécificité de substrat et de stabilité entre les différentes  $\alpha$ -amylases

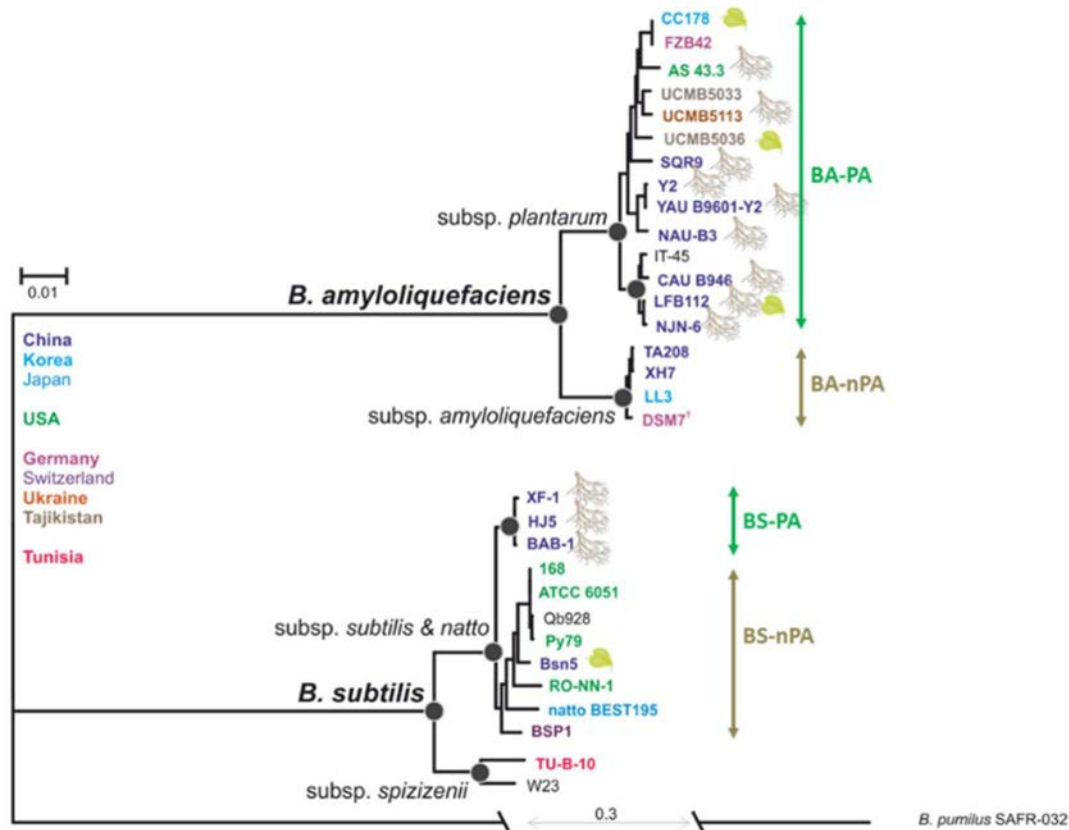
(Svensson, 1994). Le domaine C forme un motif de clé grecque et contient la partie C terminale de l'enzyme.

Ces enzymes peuvent être la cause d'altérations des propriétés organoleptiques des aliments et plus particulièrement au sein des industries laitières et boulangères. Elles conduisent à la production de saveurs et/ou d'odeurs désagréables mais aussi à l'altération de la consistance des produits (voir section III-B).

### c) Phylogénie

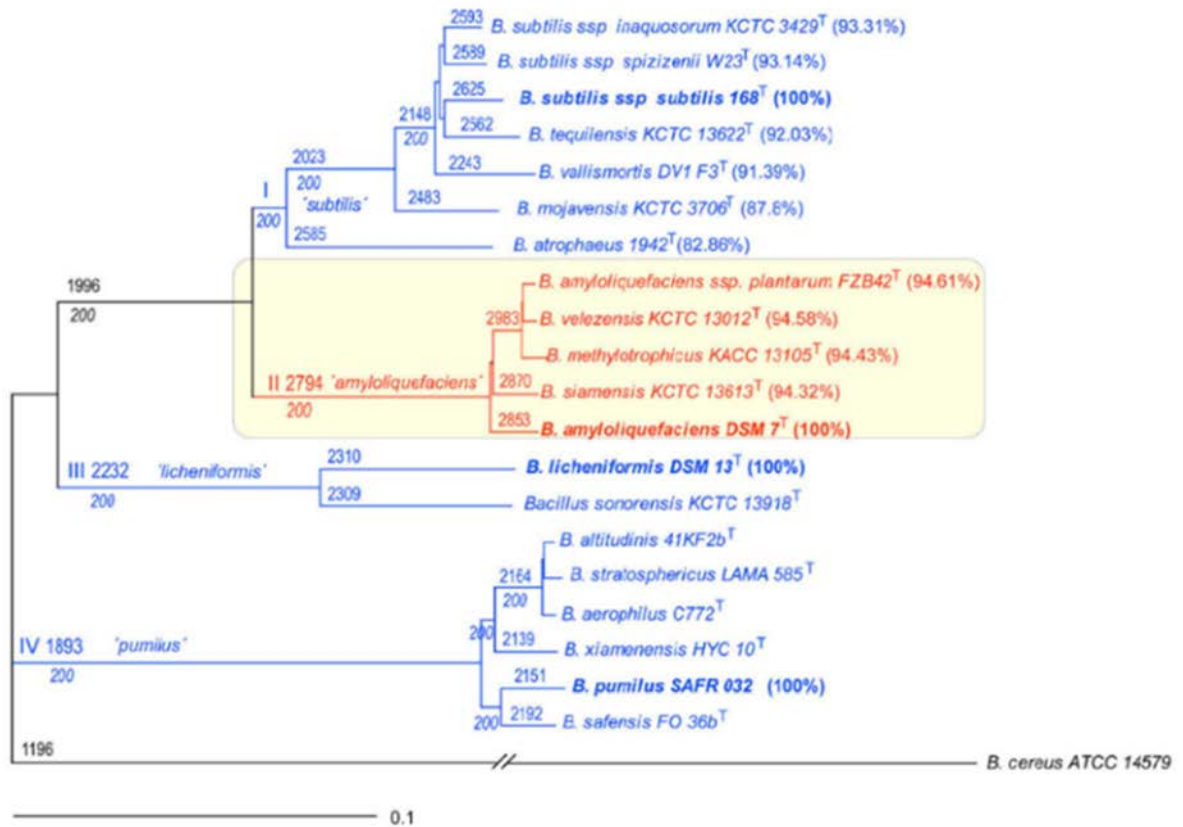
Comme pour le groupe *B. cereus*, les différentes espèces du groupe *B. subtilis* sont génétiquement très proches et difficilement différenciables. L'analyse par séquençage de l'ARNr 16S montre près de 99% d'identité entre les séquences nucléotidiques des différentes souches (Wang et al., 2007a; Hossain et al., 2015). Une étude de 2009, basée sur l'analyse de cinq gènes en plus de l'ARNr 16S ainsi que l'analyse des profils en esters méthyliques d'acide gras (FAME) des différentes souches a abouti à la description d'une nouvelle sous-espèce : *B. subtilis* subsp. *inaquasorum*, ainsi que la répartition des souches du groupe *B. subtilis* en cinq clades (Rooney et al., 2009).

Dans une étude de 2016, Zhang et coll. ont étudié l'évolution des souches des espèces *B. subtilis* et *B. amyloliquefaciens* en prenant en compte leur biotope d'origine (Zhang et al., 2016). Les auteurs ont ainsi mis en évidence la présence de gènes spécifiques aux souches associées aux plantes. Ces gènes interviennent principalement dans le métabolisme, la transcription et la synthèse de métabolites secondaires. De plus, chez les souches associées aux plantes, certains gènes sont présents en un plus grand nombre de copies, notamment des gènes impliqués dans la sporulation. L'arbre phylogénétique issu de cette étude, montre que les espèces *B. subtilis* et *B. amyloliquefaciens* restent bien distinctes, mais aussi que les souches associées aux plantes d'une part et les souches non associées aux plantes d'autre part forment des clusters distincts (**Figure 9**). Ces résultats ainsi que l'analyse des gènes suggèrent une évolution verticale dépendante de l'habitat et un rôle primordial du transfert horizontal de gènes dans l'évolution des génomes.



**Figure 9 :** Evolution de la relation entre les 31 souches du groupe *B. subtilis* et regroupement hiérarchique d'après Zhang *et al.*, 2016. Maximum de vraisemblance phylogénique dérivé de l'alignement de 1835 gènes concaténés. Le symbole de feuille indique une association aux plantes. La couleur indique l'origine biogéographique des souches. Tous les nœuds affichés sur le phylogramme sont soutenus par une valeur de bootstrap > 85% et une probabilité postérieure >0,94 obtenue après 0,2M mcmc générations par une analyse Bayesian. Les cercles noirs indiquent les nœuds les plus importants.

Plus récemment, une analyse dDDH de vingt souches du groupe *B. subtilis* a permis la définition de quatre clades : *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis* et *B. pumilus* (Figure 10) (Fan et al., 2017a). Les auteurs se sont plus particulièrement intéressés au second clade et ont démontré la présence de trois groupes monophylétiques distincts correspondant à *B. amyloliquefaciens*, *B. siamensis* et *B. velezensis*. Ces trois espèces se distinguent de *B. subtilis* par leur capacité à synthétiser des lipopeptides non ribosomiaux de la famille des iturines qui ont une activité antifongique. Ainsi, chez *B. velezensis* FZB42, la souche modèle de RFPC, près de 10% du génome code des enzymes de synthèse de composés antimicrobiens et 13 clusters de gènes sont dédiés à la synthèse de métabolites secondaires possédant une activité antimicrobienne putative (Fan et al., 2018). Bien que la souche *B. subtilis* 168 partage de nombreux gènes nécessaires à l'association aux plantes avec la souche *B. velezensis* FZB42, elle a perdu sa capacité à former des biofilms au niveau des racines et à améliorer la résistance des plantes aux maladies. Cette inaptitude s'explique par la domestication de cette souche aux conditions de laboratoire.



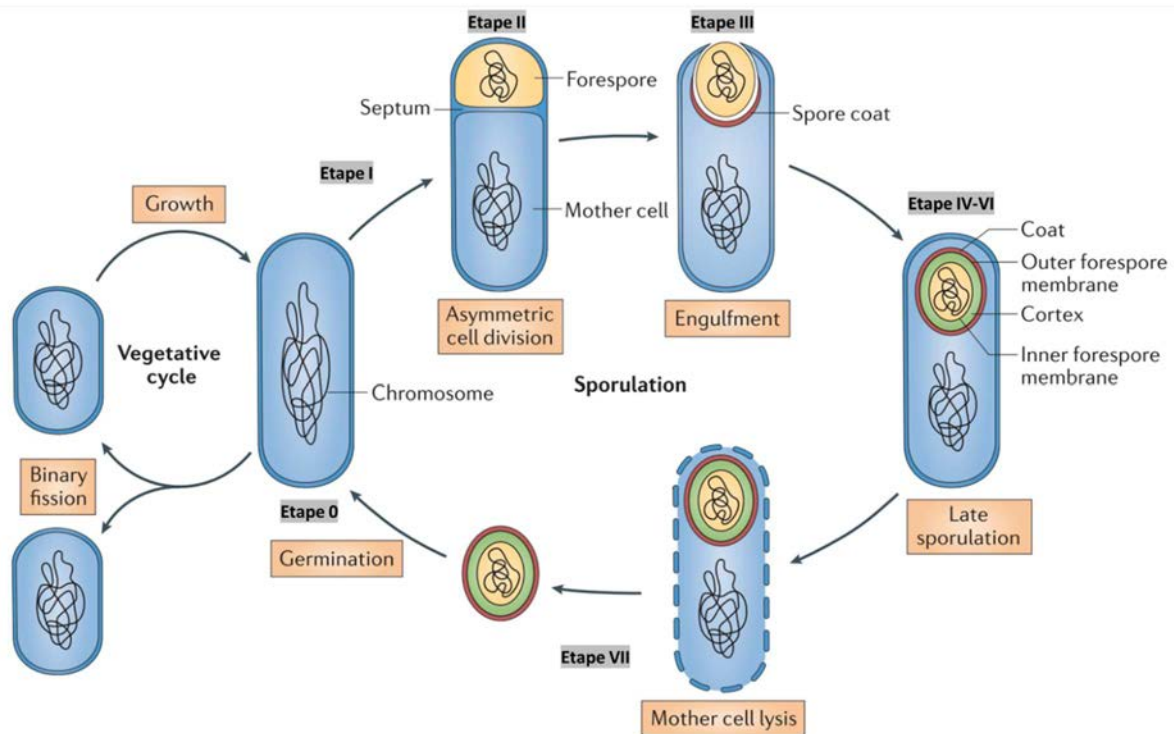
**Figure 10 : Phylogénie des espèces du groupe *Bacillus subtilis* basée sur le génome des souches représentatives d'après Fan et al., 2017.** Le core génome de *B. cereus* ATCC14579 a été utilisé comme groupe extérieur. Les chiffres romains aux embranchements désignent les quatre clades identifiés dans l'analyse. Les nombres aux embranchements désignent le nombre de séquences codantes calculées pour le core génome d'un sous-ensemble de génomes donné. Afin de vérifier l'exactitude de l'arbre, plusieurs jeux de données ont été générés avec le programme SEQBOOT en utilisant 200 répliques de bootstrap. La valeur de bootstrap 200 (100%) est indiquée en dessous des nombres de séquences codantes. Les pourcentages d'identité sont par rapport aux souches *B. subtilis* subsp. *subtilis* 168, *B. amyloliquefaciens* DSM7, *B. licheniformis* DSM13 et *B. pumilus* SAFR032 respectivement. A noter que dans le clade II (« *amyloliquefaciens* ») le groupe avec *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* FZB42, *B. velezensis* KCTC 13012 et *B. methylotrophicus* KACC 13105 est conspécifique. Il en est de même dans le clade IV (« *pumilus* ») pour le groupe composé de *B. altitudinis* 41KF2b, *B. stratosphericus* LAMA 585, et *B. aerophilus* C772. L'échelle correspond à 0,1 substitution par site.

#### D. La sporulation chez *Bacillus*

Au sein du phylum des Firmicutes, la capacité à sporuler est potentiellement retrouvée chez six classes (*Bacilli*, *Clostridia*, *Erysipelotrichia*, *Negativicutes*, *Tissierellia* et *Limnochordia*) (Galperin et al., 2022). *B. subtilis* est la souche modèle de l'étude de la sporulation. La sporulation est un processus biologique de différenciation cellulaire visant à assurer la survie de l'espèce. Ce mécanisme de survie est activé par les bactéries sporulantes lorsque les conditions environnementales sont impropres à leur croissance. La sporulation permet la production de spores à partir de cellules végétatives.

##### a) Les étapes de la sporulation

Le processus de sporulation se décompose en huit étapes, numérotées de 0 à VII, qui sont conservées parmi les différentes espèces (**Figure 11**) (Piggot and Coote, 1976; Tan and Ramamurthi, 2014; Riley et al., 2020). La première étape, numérotée 0, correspond à la multiplication normale des cellules par fission binaire. Lorsque les conditions environnementales ne sont plus favorables à la croissance, les bactéries s'engagent dans le processus de sporulation et elles entrent dans l'étape I. Cette étape correspond à la réplication de l'ADN de la cellule et la ségrégation polaire des deux chromosomes, formant ainsi un filament axial. Lors de l'étape II, la cellule se divise de façon asymétrique par la formation d'un septum au niveau d'un des pôles de la cellule. Le plus grand compartiment correspond à la cellule mère tandis que le plus petit constitue la préspore. Chaque compartiment contient une copie du chromosome. L'étape III correspond à un processus qui s'apparente à la phagocytose. La membrane de la cellule mère s'invagine, ce qui permet l'enveloppement de la préspore (étape dite d'enkystement). La préspore est alors entourée de deux membranes : une membrane interne qui correspond à la membrane originale de la préspore et une membrane externe qui provient de la membrane de la cellule mère. Le cortex est synthétisé pendant l'étape IV entre ces deux membranes tandis que, dans le cœur de la spore, (« core » en anglais), les protéines SASPs (Small Acid-Soluble Proteins) commencent à s'associer au chromosome de la préspore. Au cours de l'étape V, les protéines des tunique s'assemblent dans la cellule mère. A cette étape, l'ADN de la préspore est compacté et saturé de SASPs. L'étape VI correspond à l'étape de maturation des différentes couches de la spore ainsi qu'à la synthèse du dipicolinate dans la cellule mère et son transport dans la préspore. Le cœur de la préspore est alors partiellement déshydraté et la préspore devient résistante à la chaleur. Enfin, lors de l'étape VII, la cellule mère lyse et libère la spore mûre dans l'environnement.



**Figure 11** : Les différentes étapes du cycle de sporulation d'après McKenney *et al.*, 2013. L'étape 0 correspond à la multiplication normale de la cellule. Lors de l'étape I, non représentée ici, l'ADN est répliqué et ségrégué aux deux pôles de la cellule le long d'un filament axial. Lors de l'étape II la cellule mère est séparée de la préspore par la formation d'un septum. La phase III correspond à l'englobement de la préspore par la membrane de la cellule mère. Les différentes couches de la spore sont ensuite synthétisées et assemblées lors des étapes IV à VI. Enfin, la cellule mère lyse et libère la spore mature dans l'environnement lors de l'étape VII. Le processus de germination permet la formation d'une cellule végétative à partir d'une spore.

### b) L'initiation de la sporulation

L'initiation de la sporulation est contrôlée par une cascade de phosphorylation appelé le phosphorelais. Le phosphorelais contrôle le niveau de phosphorylation de Spo0A dans la cellule végétative (**Figure 12A**) (Burbulys *et al.*, 1991; Vishnoi *et al.*, 2013). Il est constitué de protéines phosphorylées intermédiaires (Spo0F et Spo0B), de kinases (KinA à KinE) et de phosphatases (Jiang *et al.*, 2000b; Pompeo *et al.*, 2016).

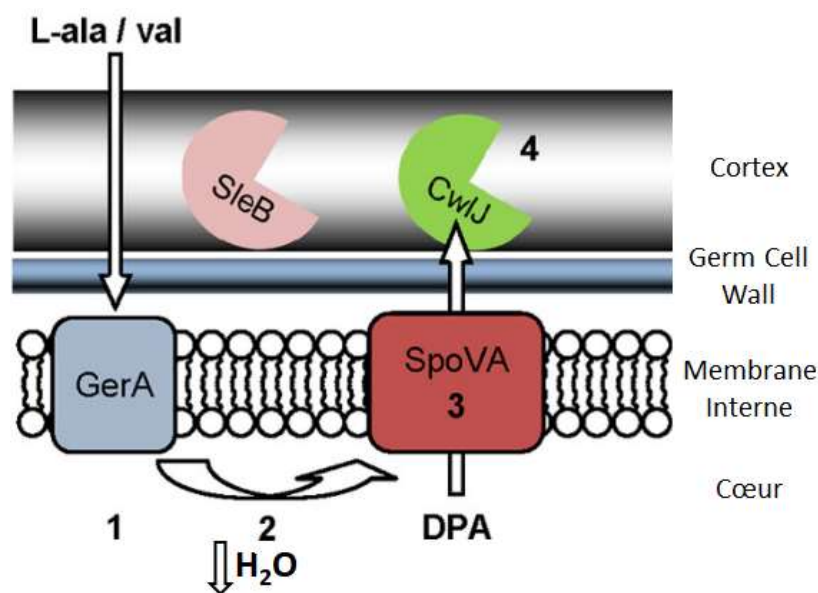
Des signaux environnementaux, métaboliques ou liés au cycle cellulaire sont perçus par les différentes kinases et phosphatases impliquées dans le phosphorelais. Lorsqu'elles sont activées, les kinases KinA-E phosphorylent Spo0F qui transfère son phosphate à Spo0B qui à son tour le transfère à Spo0A (Burbulys *et al.*, 1991; Jiang *et al.*, 2000b). Les phosphatases impliquées dans le phosphorelais sont régulées par des signaux liés notamment à un état physiologique incompatible avec la sporulation comme par exemple la croissance végétative. Les phosphatases Rap déphosphorylent Spo0F-P tandis que Spo0E, YnzD et YisI déphosphorylent directement Spo0A-P (Ohlsen *et al.*, 1994; Jiang *et al.*, 2000a; Perego, 2001; Shafikhani and Leighton, 2004). Il y a ainsi un équilibre entre les activités des kinases et des phosphatases qui dépend des signaux perçus. Le taux de Spo0A-P au sein de la cellule est dépendant de cet équilibre. Lorsque l'activité des kinases dépasse celle des phosphatases, la concentration



Le gène *sigK* est composé des deux pseudogènes *spoIVCB* et *spoIIIC* séparés par un élément mobile de 48 kpb nommé *skin* pour *sigK* intervening sequence (Kunkel et al., 1990). Le *skin* est excisé du génome lors de la sporulation, sous l'action de la recombinase SpoIVCA. La transcription du gène *sigK* est sous le contrôle de  $\sigma^E$  et SpoIIID. Le gène *sigK* code le précurseur pro- $\sigma^K$ . Les gènes *spoIVFA* et *spoIVFB* codent les protéases SpoIVFA et SpoIVFB. La protéine SpoIVFB est une métalloprotéase à zinc localisée dans la membrane de la cellule mère qui est maintenue inactive par les protéines SpoIVFA et BofA en formant un complexe SpoIVFB-BofA-SpoIVFA (Cutting et al., 1991; Ricca et al., 1992). Les protéines SpoIVB et CtpB clivent la protéine régulatrice SpoIVFA qui à son tour active SpoIVFB (Campo & Rudner, 2007). La protéase SpoIVFB activée clive alors pro- $\sigma^K$  en  $\sigma^K$  (**Figure 12B**).

#### d) La germination

La germination est le mécanisme cellulaire qui conduit une spore à former une cellule végétative. Ce mécanisme est généralement déclenché par des molécules de faible poids moléculaire appelées germinants tels que les acides aminés, les sucres et les dérivés de purines ou des phosphates ainsi que des facteurs non nutritionnels tels que le lysozyme, le dodécylamine, le dipicolinate de calcium exogène ou une haute pression (Setlow, 2014a). La germination se décompose en deux phases et implique des récepteurs de germination et deux enzymes lytiques du cortex (**Figure 13**) (Christie and Setlow, 2020).



**Figure 13** : Les étapes de la germination chez *B. subtilis*, modifié d'après Francis et al., 2015. Chez *B. subtilis*, les germinants passent à travers les différentes couches externes de la spore jusqu'à la membrane interne où se trouvent les différents récepteurs Ger (1). Ici, la L-alanine ou la L-valine rejoint son récepteur de germination spécifique GerA. Cette interaction germinant/récepteur entraîne une légère hydratation du cœur de la spore et l'activation du canal SpoVA (2). Le dipicolinate de calcium (DPA) du cœur de la spore est alors libéré dans le cortex (3) où il active l'hydrolase CwlJ responsable de l'hydrolyse du cortex (4).

Lors de la première phase, un récepteur de germination, situé dans la membrane interne de la spore, est activé par un ou plusieurs germinants qui lui sont spécifiques (**Figure 13**). Chez *B. subtilis*,



les trois récepteurs de germination principaux sont GerA, GerB et GerK. Ces récepteurs sont composés de trois sous unités A, B et C. Le récepteur GerA est activé par la présence de L-alanine ou de L-valine tandis que les récepteurs GerB et GerK détectent un mélange de L-asparagine, D-glucose, D-fructose et  $K^+$ . Il a été rapporté qu'une population de spores soumises à de hautes pressions isostatiques germe de façon hétérogène. Certaines spores germent rapidement, tandis que d'autres germent lentement ou ne germent pas. La voie d'activation de la germination en condition de haute pression isostatique n'a pas encore été identifiée. Les hautes pressions pourraient agir directement sur un ou plusieurs récepteurs ou encore agir directement sur la membrane interne des spores (Delbrück et al., 2021). L'activation des récepteurs Ger déclencherait l'ouverture d'un canal dans la membrane interne qui entraîne la libération de cations monovalents comme  $H^+$ ,  $K^+$  ou  $Na^+$  puis la libération du dipicolinate de calcium du cœur de la spore (Vepachedu and Setlow, 2007). Le canal permettant le transport du dipicolinate de calcium est formé par la protéine SpoVA (**Figure 13**). Le dipicolinate libéré est remplacé par de l'eau ce qui augmente le degré d'hydratation du cœur de la spore. La libération du dipicolinate de calcium déclenche de façon directe ou indirecte l'entrée dans la phase deux de la germination.

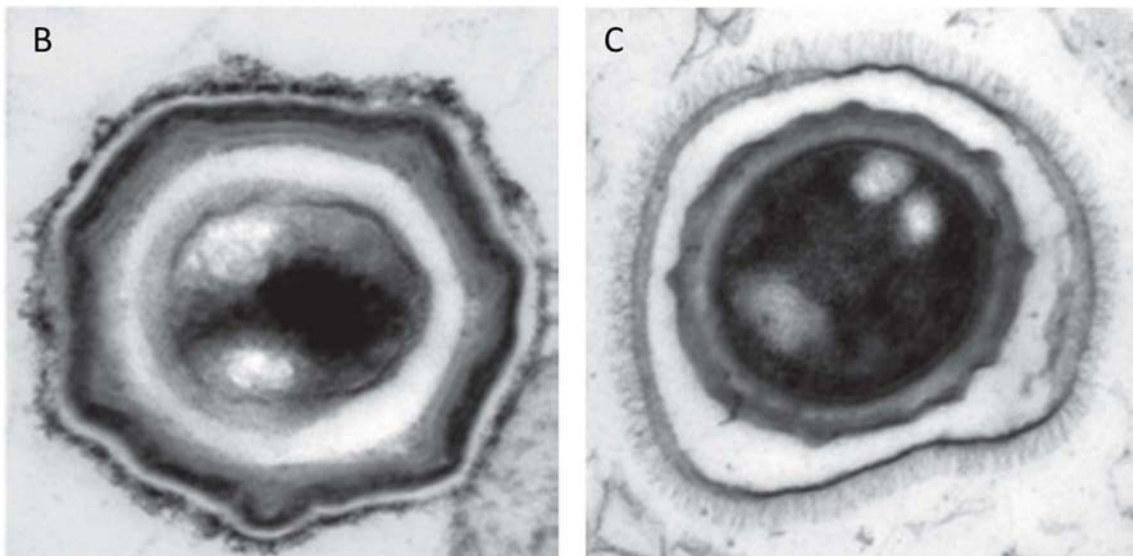
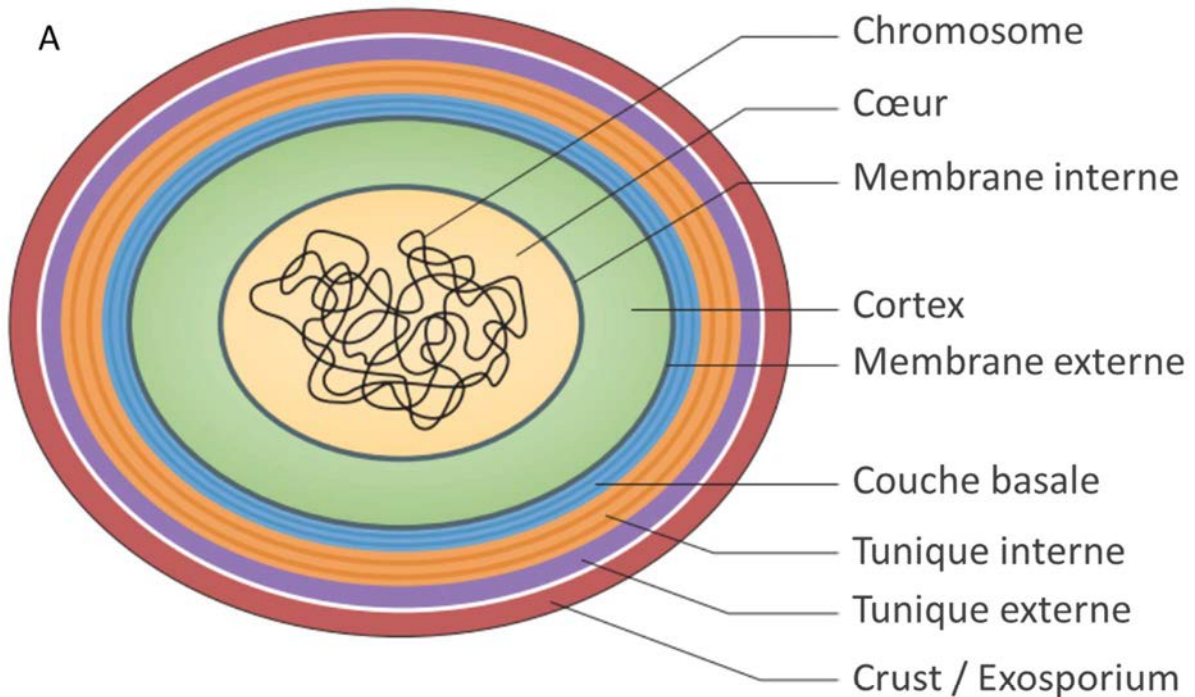
Au cours de la deuxième phase, deux enzymes lytiques du cortex, SleB et CwlJ, sont activées. Ces deux enzymes dégradent spécifiquement le peptidoglycane du cortex. L'hydrolyse du cortex entraîne une expansion et une augmentation de l'hydratation du cœur de la spore. Une fois le cœur de la spore complètement réhydraté, l'activité métabolique de la cellule redémarre et conduit à la reprise d'une croissance végétative (Paredes-Sabja et al., 2011).

## **II. Les spores de *Bacillus***

La production de spores est le système de résistance mis en place par les *Bacillus* pour survivre à toute modification environnementale impropre à la survie de l'espèce. Les capacités de résistance des spores sont liées à leur structure particulière.

### **A. Les structures internes des endospores**

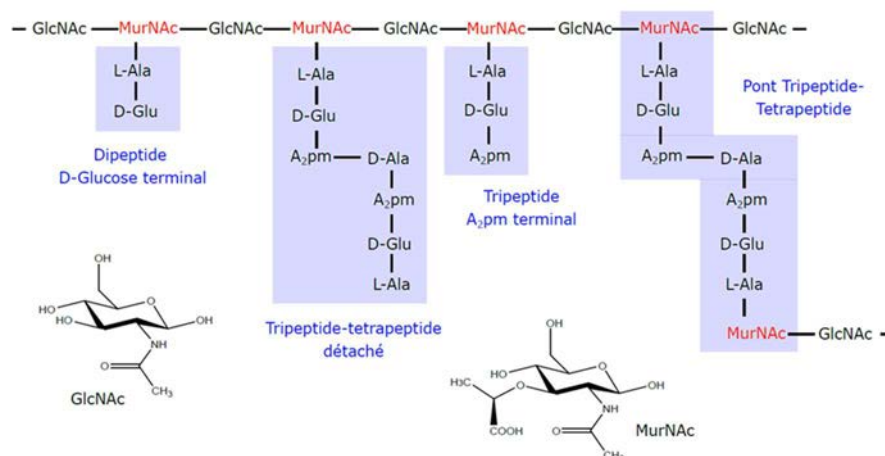
Chez les *Bacillus*, les endospores sont de forme ovale et elles sont constituées de couches concentriques (**Figure 14A**) (McKenney et al., 2013). Au centre de la spore se trouve le cœur qui contient l'ADN. Le cœur est délimité par une membrane recouverte du « germ cell wall », du cortex et des tuniques. Si la structure des spores est globalement conservée au sein du genre *Bacillus*, il existe cependant un polymorphisme de la couche la plus externe des spores. Chez les bactéries du groupe *B. subtilis*, le « crust » est la couche la plus superficielle de la spore tandis que chez les bactéries du groupe *B. cereus* la couche la plus externe est l'exosporium (**Figure 14B et 14C**) (Gerhardt and Ribi, 1964; McKenney et al., 2010; Faille et al., 2014b).



**Figure 14 : Structure des spores d'après McKenney, Driks, and Eichenberger 2013.** A) Schéma des différentes couches composant la spore. Le cœur au centre contient le chromosome. Viennent ensuite la membrane interne, le cortex formé de peptidoglycane et la membrane externe. La couche basale, et les deux tuniques sont riches en protéines. Enfin la couche la plus externe varie selon les espèces. Le crust est retrouvé chez les bactéries du groupe *B. subtilis* tandis que l'exosporium est observé chez les bactéries du groupe *B. cereus*. B) Observation d'une spore de *B. subtilis* en microscopie électronique après coloration au rouge de ruthénium. C) Observation d'une spore de *B. anthracis* en microscopie électronique après coloration au rouge de ruthénium.

a) Le cœur.

Le cœur contient l'ADN de la spore, de petites protéines solubles (« Small Acid Soluble Proteins » ou SASPs) et de l'acide dipicolinique et de nombreuses enzymes. Il se caractérise par une faible teneur en eau. L'ADN est condensé et enroulé autour de SASPs de type  $\alpha/\beta$  entraînant une conformation en hélice de type A (Setlow, 1992). Cette conformation, qui est favorisée par la faible hydratation du cœur, se caractérise par un plus grand nombre de paires par tour et un sillon mineur plus large par rapport à une conformation de type B. Cette conformation en hélice de type A confère à l'ADN une plus grande résistance à certains agents chimiques génotoxique ou mutagènes (Nicholson et al., 2000). L'acide dipicolinique du cœur est associé à des cations divalents comme le calcium, le magnésium ou le manganèse (Nicholson et al., 2000). Des acides ribonucléiques (ARNr, ARNt, ARNm) et des ribosomes sont également retrouvés au sein du cœur (Setlow and Christie, 2020). Ces acides ribonucléiques seraient des « vestiges » du processus de sporulation. En effet, l'activité ATPase dans le cœur de la spore est trop basse pour témoigner de la synthèse de protéines et les ARN présents se dégradent au cours du temps. La faible teneur en eau du cœur ainsi que la présence de minéraux jouent un rôle clé dans la résistance des spores à la chaleur humide (Nicholson et al., 2000; Setlow, 2014b). Le dipicolinate présent dans le cœur de la spore permet le maintien de ces deux paramètres (Paidhungat et al., 2000). En l'absence de dipicolinate, le cœur de la spore est plus hydraté, moins minéralisé et la résistance à la chaleur humide diminue. Le cœur est délimité par la membrane interne qui est recouverte d'un peptidoglycane primordial ou « germ cell wall ». La composition et la structure du « germ cell wall » s'apparente à celle du peptidoglycane d'une cellule végétative. Il est constitué de longues chaînes de glycanes liées entre elles par des chaînes latérales penta-peptidiques (**Figure 15**).

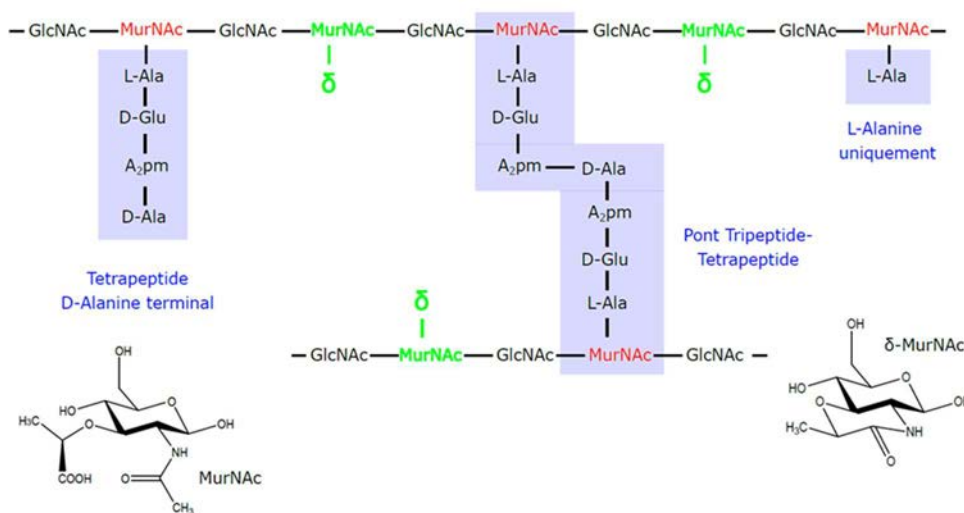


**Figure 15 : Structure et composition du peptidoglycane primordial chez *B. subtilis*, modifié d'après Smith et al., 2000.** GlcNAc : acide N-acétyl-glucosamine ; MurNAc : acide N-acétyl-muramique ; Ala : alanine ; Glu : glutamate ; A<sub>2</sub>pm : acide meso-diaminopimelique.

Les chaînes de glycanes sont constituées de la répétition d'un disaccharide constitué de N-acétylglucosamine (GlcNAc) et d'acide N-acétylmuramique (MurNAc) liés par une liaison osidique  $\beta$ -1,4 (Angeles and Scheffers, 2020; Christie and Setlow, 2020). Les peptides, de séquence L-Ala-D-Glu-A<sub>2</sub>pm-D-Ala-D-Ala, sont liés aux glycanes par l'intermédiaire des groupements carboxyles des résidus d'acide N-acétylmuramique. Les liaisons entre les peptides se forment entre l'acide meso-diaminopimelique d'un peptide avec la D-Alanine en position 4 d'un autre peptide.

#### b) Le cortex

Le cortex est principalement constitué d'un peptidoglycane qui a une structure spécifique. Comme le peptidoglycane primordial, il présente une répétition de résidus GlcNAc et MurNAc. En revanche, dans le peptidoglycane du cortex, 50% des résidus MurNAc sont sous la forme  $\delta$ -lactame (**Figure 16**) (Angeles and Scheffers, 2020). Les résidus  $\delta$ -lactame n'ont pas de rôle dans la dormance et la déshydratation des spores mais ils sont la cible d'enzymes corticolytiques lors de la germination. Les résidus  $\delta$ -lactame ne possèdent pas de groupement carboxyles. Il en résulte que le nombre de liaisons peptidiques entre les chaînes de glycanes est fortement réduit (Angeles and Scheffers, 2020). De plus, 15 à 25 % des résidus MurNAc ont leurs chaînes latérales raccourcies à un simple résidu L-Ala (Popham and Bernhards, 2015). Ainsi, le taux de réticulation du cortex est estimé à 2,9% soit le plus faible taux de réticulation connu pour du peptidoglycane (**Figure 16**).

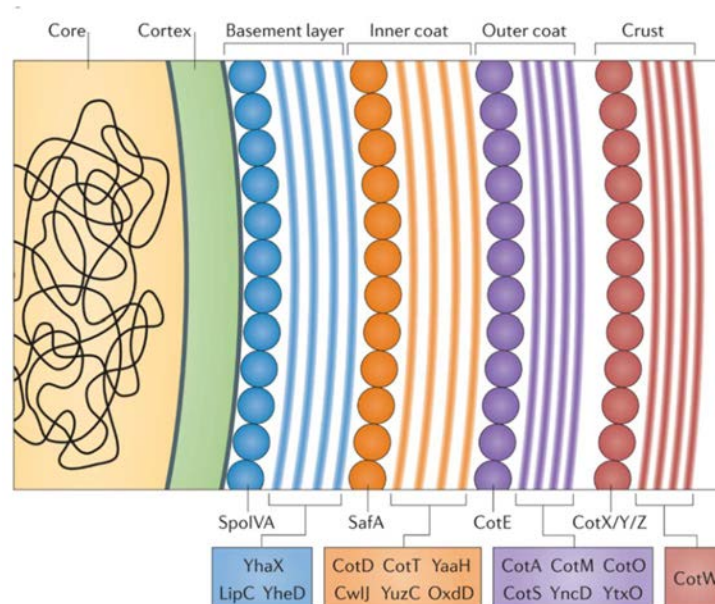


**Figure 16 : Structure et composition du peptidoglycane du Cortex chez *B. subtilis*, modifié d'après Smith et al., 2000.** GlcNAc : acide N-acétyl-glucosamine ; MurNAc : acide N-acétyl-muramique ;  $\delta$ -MurNAc : acide  $\delta$ -lactame-muramique ; Ala : alanine ; Glu : glutamate ; A<sub>2</sub>pm : acide meso-diaminopimelique.

Le cortex constitue une structure de résistance mécanique des spores face à la forte pression osmotique générée par la concentration importante des solutés dans le cœur. Le cortex pourrait jouer un rôle dans la création et le maintien de l'état compressé de la membrane interne pendant la sporulation et ce, jusqu'à la germination (Angeles and Scheffers, 2020; Christie and Setlow, 2020).

c) Les tuniques

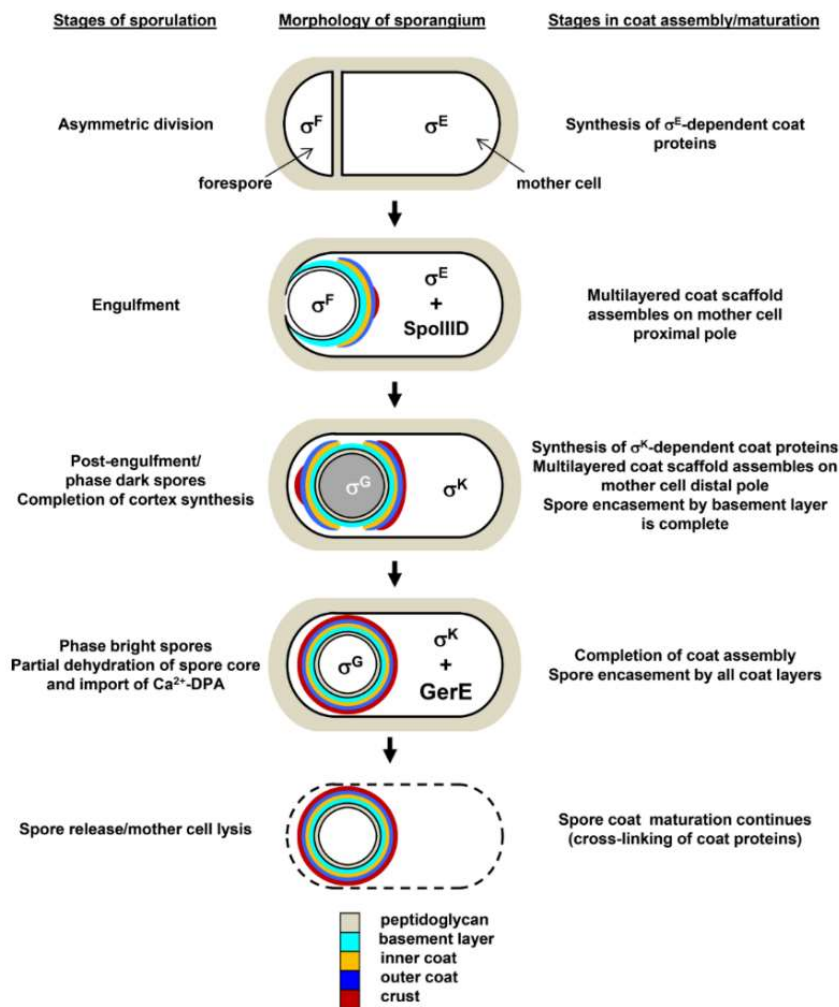
Chez *B. subtilis*, les tuniques sont constituées de trois couches : la couche basale, la tunique interne et la tunique externe (**Figure 17**). Les tuniques sont principalement constituées de protéines. Plus de 80 protéines ont été identifiées comme constitutives des tuniques, ce qui représente près de 30% du nombre total de protéines de la spore (Driks and Eichenberger, 2016). En microscopie électronique, la tunique interne a une apparence lamellaire tandis que la tunique externe est plus épaisse et plus dense aux électrons (Driks and Eichenberger, 2016).



**Figure 17 : Organisation et composition des tuniques et du crust d'après McKenney et al., 2013.** Les protéines morphogénétiques sont représentées par des ronds.

La formation de chacune des trois couches nécessite des protéines morphogénétiques qui sont produites précocement pendant la sporulation. Lors d'études de génétique inverse, l'observation de spores en microscopie électronique a permis d'identifier cinq protéines morphogénétiques des tuniques : SpoIVA, SpoVM, SpoVID, SafA et CotE (**Figure 18**) (McKenney et al., 2013; Driks and Eichenberger, 2016; Krajčiková et al., 2021). Ces protéines morphogénétiques recrutent et assemblent les protéines des tuniques. Elles assurent ainsi la propagation des tuniques autour de la présore. L'assemblage des tuniques par les protéines morphogénétiques a lieu dans la cellule mère des bactéries au cours de la sporulation (**Figure 18**). Il se déroule en deux étapes : i) La couche basale est synthétisée au cours de l'étape d'enkystement de la présore par la membrane de la cellule végétative et ii) les tuniques interne et externe sont synthétisées au cours de l'étape V de la sporulation. L'assemblage de chacune des tuniques dépend de protéines morphogénétiques spécifiques (**Figures 17**). SpoIVA et SpoVID sont essentielles à la formation de la couche basale, SafA contrôle l'assemblage de la tunique interne et CotE est nécessaire à l'assemblage de la tunique externe. La localisation des protéines morphogénétiques nécessite la présence de l'ATPase SpoIVA dès le début de l'enkystement (Castaing et al., 2013). La

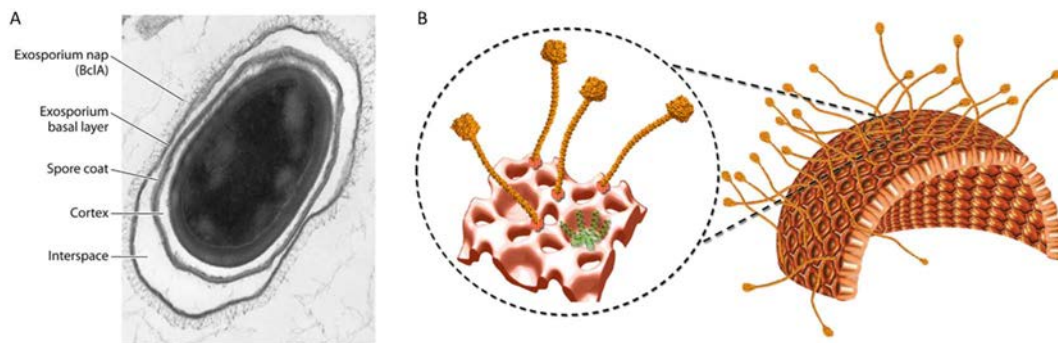
localisation de SpoIVA à la surface de la préspore implique une interaction avec SpoVM, un peptide de 26 résidus qui reconnaît la courbure positive de la membrane externe de la préspore (Ramamurthi et al., 2009; Kim et al., 2017). SpoIVA recrute également SafA et CotE qui sont nécessaires à la deuxième étape de l'assemblage des tuniques. Les tuniques protègent le cœur et le cortex de la spore des produits chimiques et enzymes lytiques ainsi que de la digestion de la spore par des nématodes ou des protozoaires (Setlow, 2014b). En effet, les tuniques sont semi-perméables et ne laissent passer en général que des molécules de moins de 5 kDa. En revanche, elles sont perméables aux germinants qui peuvent ainsi accéder à leurs récepteurs dans la membrane interne. Les tuniques participent également à la résistance des spores à des espèces réactives de l'oxygène tel que le peroxyde d'hydrogène. En revanche, elles ne participent pas à la résistance aux UV ou à la chaleur humide (Nicholson et al., 2000).



**Figure 18 :** Schéma représentant l'assemblage des tuniques au cours de la sporulation chez *B. subtilis* d'après Driks and Eichenberger 2016. La colonne de gauche représente les différentes étapes de la sporulation lors du suivi en microscopie (MET, microscopie à contraste de phase ou microscopie à fluorescence avec une coloration de la membrane). La colonne centrale et celle de droite représentent les différentes étapes de la morphogenèse des différentes couches formant les tuniques de la spore.

## B. L'exosporium chez *B. cereus*

La couche la plus externe chez les bactéries du groupe *B. cereus* est appelé exosporium. L'exosporium a été mis en évidence en 1876 par Robert Koch chez *B. anthracis* (Koch, 1876; Flügge, 1886; Stewart, 2015). La structure et l'organisation de l'exosporium ont, par la suite, été mise en évidence par microscopie électronique (Ball et al., 2008; Faille et al., 2010a; Kailas et al., 2011; Rodenburg et al., 2014). Au sein du groupe *B. cereus*, l'exosporium est constitué d'une enveloppe protéique, la couche basale, qui est recouverte d'appendices (« hairlike nap») (**Figure 19A**). Il est séparé des tuniques par un interespace et il est ancré à la tunique externe par des interactions protéines-protéines (Henriques and Moran, Jr., 2007; Stewart, 2015). Ces interactions impliquent notamment la protéine CotE et des protéines de l'exosporium telles que ExsY et CotY (Boydston et al., 2006; Lablaine et al., 2021). La protéine ExsY est la principale protéine de structure de la couche basale (Terry et al., 2017). En effet, lorsqu'elle est produite dans un hôte hétérologue, la protéine ExsY de *B. cereus* est capable de s'auto-assembler et de former une structure en nid d'abeille qui ressemble à la couche basale de l'exosporium (**Figure 19B**).



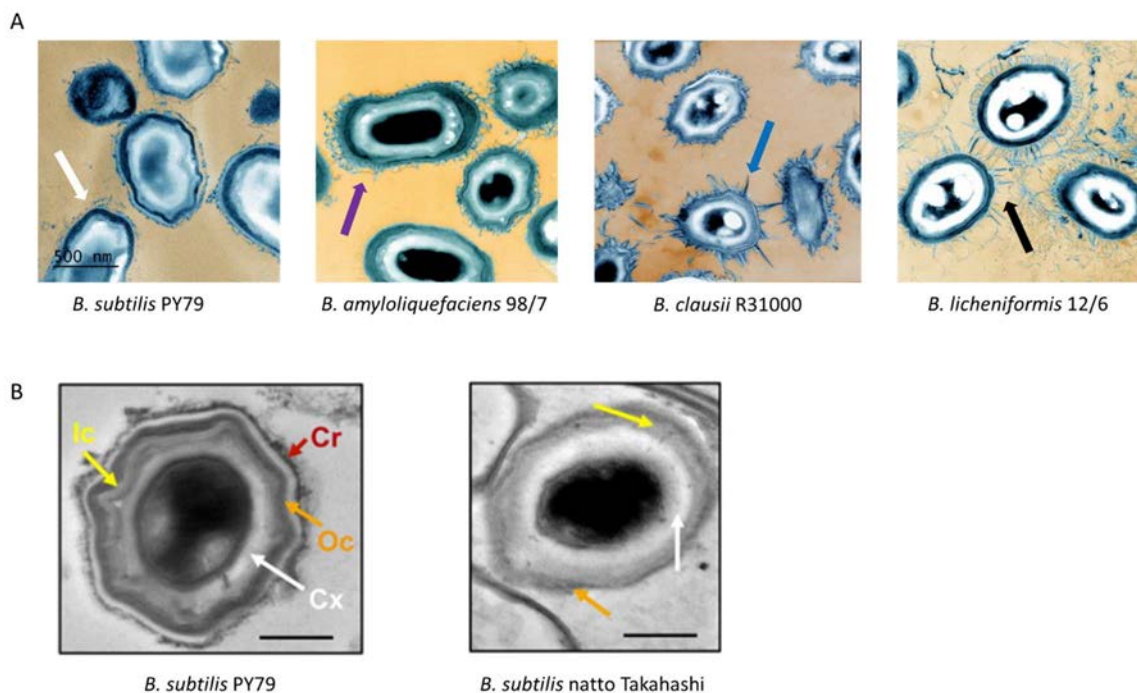
**Figure 19 : L'exosporium chez les bactéries du groupe *B. cereus*.** A) Spore de *B. anthracis* observée au microscope électronique d'après Stewart 2015. Les flèches indiquent les différentes couches observables avec notamment la mise en évidence de l'interspace entre les tuniques et l'exosporium, la couche basale et la structure « hair nap » à la surface de la spore. B) Représentation schématisique de la structure possible de l'exosporium des spores de *B. cereus* d'après Kailas et al., 2011. La couche basale de l'exosporium forme un réseau bidimensionnel de cupules s'ouvrant sur l'extérieur (nid d'abeille). Les fibrilles de type collagène sont formées par la protéine BclA et ancrées à la surface par les protéines ExsFA, ExsFB et ExsK en formant avec elles un complexe de haut poids moléculaire.

Au sein du groupe *B. cereus*, les appendices à la surface de la couche basale sont principalement composés de la glycoprotéine BclA (**Figure 19B**). La glycoprotéine BclA est nécessaire à la formation des appendices et elle forme un complexe de haut poids moléculaire avec ExsFA, ExsFB et ExsK (Sylvestre et al., 2005; Severson et al., 2009). Les protéines ExsFA (ou BxpB) et ExsFB jouent un rôle clé dans la localisation de BclA sur la couche basale. L'importance de BclA dans la formation des appendices s'explique par la structure de cette glycoprotéine. La région centrale de BclA contient un domaine « collagen-like » (CLR) composé de répétition du motif GXX. Il peut y avoir de 17 à 91 répétitions de ce motif et la longueur des filaments à la surface de la spore est directement corrélée au nombre de répétitions (Sylvestre et al., 2003). Des enzymes sont aussi retrouvées au sein de la couche

basale de l'exosporium. L'alanine racémase Alr ainsi que les hydrolases d'inosine LunA et LunH sont impliquées dans la régulation de la germination de la spore (Redmond et al., 2004; McKevitt et al., 2007). De plus, les superoxydes dismutases SODA1 et SOD15 jouent un rôle dans la résistance des spores aux stress oxydatifs (Cybulski et al., 2009).

### C. Le crust chez *B. subtilis*

Le crust a été mis en évidence pour la première fois lors d'observations en microscopie de fluorescence visant à définir la localisation de protéines des tuniques. Cette observation a ensuite été confirmée en microscopie électronique en transmission après contre-coloration de coupes de spores au rouge de ruthénium (Waller et al., 2004; Imamura et al., 2010; McKenney et al., 2010). Plus récemment, de nouvelles observations en microscopie électronique ont montré que le crust est un caractère partagé par la plupart des spores du groupe *B. subtilis* (Faille et al., 2014b; Shuster et al., 2019a). Cependant, la morphologie du crust varie d'une espèce à l'autre et parfois d'une souche à l'autre au sein d'une même espèce (Figure 20).



**Figure 20 : Observation en microscopie électronique du crust de spores de différentes souches de *Bacillus* après coloration au rouge de ruthénium.** (A) Comparaison de la morphologie du crust à la surface des spores de différentes espèces de *Bacillus* d'après Faille *et al.*, 2014. Le crust présente une structure « hair-like nap » qui s'apparente à celle de l'exosporium chez les spores des souches *B. subtilis* PY79 et *B. amyloliquefaciens* 98/7 mais semble plus épais à la surface des spores produites par *B. amyloliquefaciens* 98/7 (flèches blanche et violette). Les filaments du crust s'assemblent et forment des points plus épais tout autour de la spores (flèche bleue) chez *B. clausii* R31000, tandis que les spores de la souche *B. licheniformis* 12/6 présentent, quant à elles, des filaments beaucoup plus longs et flexueux (flèche noire). (B) Observation de la morphologie des tuniques et du crust chez deux souches de *B. subtilis* d'après Shuster *et al.*, 2019. Les spores de la souche *B. subtilis* PY79 présentent un cortex (Cx, indiqué par la flèche blanche), une tunique interne d'apparence lamellaire (Ic, flèche jaune), une tunique externe dense aux électrons (Oc, flèche orange) et un crust (Cr, flèche rouge). En comparaison, les spores de la souche *B. subtilis* natto Takahashi présentent aussi un cortex, et les deux tuniques mais pas de crust à leur surface. L'échelle correspond à 200nm.

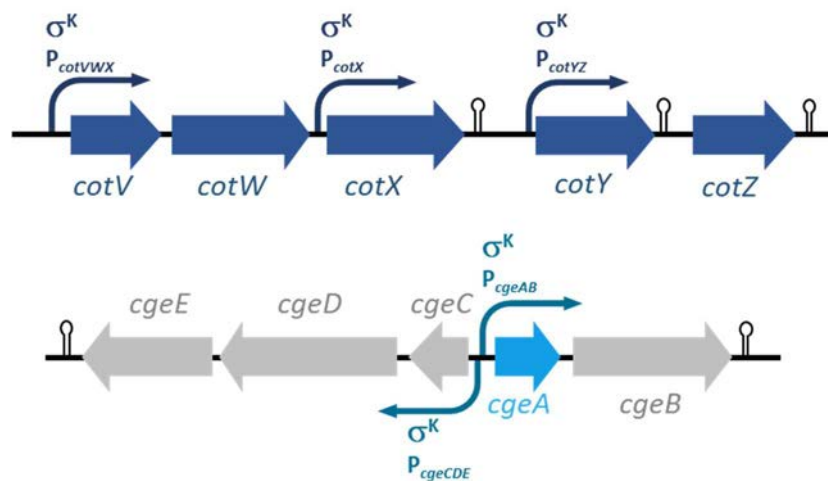


Chez *B. subtilis* le crust présente des filaments de type « hair-like nap » tandis que chez *B. clausii* les filaments s'assemblent pour former des pointes plus épaisses tout autour de la spore. Enfin, chez *B. licheniformis*, ces filaments sont plus longs et plus flexueux (**Figure 20A**) (Faille et al., 2014b). En revanche, les spores d'autres souches du groupe *B. subtilis* n'ont pas de crust observable en MET. Par exemple, la souche *B. subtilis* natto Takahashi, utilisée dans l'industrie agro-alimentaire, ne semble pas présenter de crust à sa surface (Shuster et al., 2019a) (**Figure 20B**).

Au même titre que l'exosporium de *B. cereus*, le crust des spores des bactéries du groupe *B. subtilis* est composé de protéines et de glucides.

#### a) Les protéines

Six protéines majeures ont été identifiées comme faisant parties du crust : CgeA, CotV, CotW, CotX, CotY et CotZ (Zhang et al., 1993; Imamura et al., 2010; McKenney et al., 2010). Les gènes codant les protéines CotV, CotW, CotX, CotY et CotZ font partie de deux opérons contigus sur le génome de *B. subtilis* tandis que le gène *cgeA* est situé dans un opéron situé en aval et qui contient des gènes codant notamment des glycosyltransférases (**Figure 21**) (Zhang et al., 1993; Roels and Losick, 1995).



**Figure 21 : Organisation des gènes codant les protéines du crust.** Les promoteurs des gènes sont sous la régulation du facteur  $\sigma^K$ .

Les protéines CotV, CotW, CotX, CotY et CotZ ont pendant longtemps été considérées comme appartenant à la tunique externe (Goldman and Tipper, 1978; Zhang et al., 1993). En effet, les protéines CotW, CotY, CotX et CotZ ont initialement été identifiées dans la fraction insoluble de la tunique. Cependant, il a ensuite été montré que l'inactivation des gènes *cotX*, *cotY* et *cotZ* n'entraîne pas de déstructuration de la tunique externe ou de modifications des propriétés de résistance des spores à la chaleur ou au lysozyme (Zhang et al., 1993). Plus récemment, des expériences de double hybride, de microscopie à force atomique (AFM) et de pull-down ont mis en évidence les interactions qui s'établissent entre les protéines du crust ainsi qu'entre les protéines du crust et les tuniques (Krajčiková et al., 2009, 2017; Jiang et al., 2015; Liu et al., 2015a, 2016a, 2016b). Des expériences utilisant des

protéines du crust fusionnées avec la Green Fluorescent Protein (GFP) ont également permis d'établir la localisation et l'interdépendance des protéines entre elles (McKenney et al., 2010; Bartels et al., 2019; Shuster et al., 2019a). L'ensemble de ces données sont reprises dans les **Tables 1 et 2**.

**Table 1 : Résumé des dépendances génétiques pour la localisation des protéines du crust et de la tunique externe d'après Shuster et al., 2019.** L'ensemble de ces données ont été obtenues selon les études de McKenzie et al., 2010; Wang et al., 2009; Eichenberger et al., 2003; Webb et al., 1995.

Fusion	Recrutement	Propagation	Maintient	Stabilisation
CgeA-GFP	<i>cotE</i> , <i>cotX</i> and <i>cotZ</i> (forte dépendance) <i>cotY</i> (moyenne)	<i>cotO</i>	<i>cotW</i>	
Pas de fusion pour CgeB	NA	NA	NA	NA
Pas de fusion pour CotV	NA	NA	NA	NA
CotW-GFP	<i>cotE</i> (forte dépendance)	<i>spoVID2</i> non dépendante de <i>cotO</i>		
CotX-GFP	<i>cotE</i> et <i>cotZ</i> (forte dépendance) <i>cotY</i> (moyenne)	<i>cotO</i>		<i>cotW</i>
CotY-GFP	<i>cotE</i> et <i>cotZ</i> (forte dépendance) <i>cotX</i> and <i>cotW</i> (moyenne)	<i>cotO</i>		
CotZ-GFP	<i>cotE</i> (forte dépendance)	<i>cotO</i> et <i>spoVID</i>		
CotO-GFP	<i>cotE</i> (forte dépendance)	<i>spoVID2</i>		
CotE-GFP	<i>spoIVA</i> (forte dépendance)	<i>spoVID2</i>		

**Table 2 : Résumé des interactions protéine-protéines d'après les essais en double hybride de Krajčiková et al., 2017.**

Protéine	Interaction Forte	Interaction Intermediaire
CgeA	CotY	CotO, CotW, CotZ
CgeB	ND	ND
CotV	CotW, CotY, CotZ	
CotW	CotV	CgeA, CotX
CotX		CotW
CotY	CgeA, CotV, CotZ	CotE, CotO
CotZ	CotV, CotY	
CotO	CgeA, CotY	
CotE		CotY

### 1. CotV et CotW

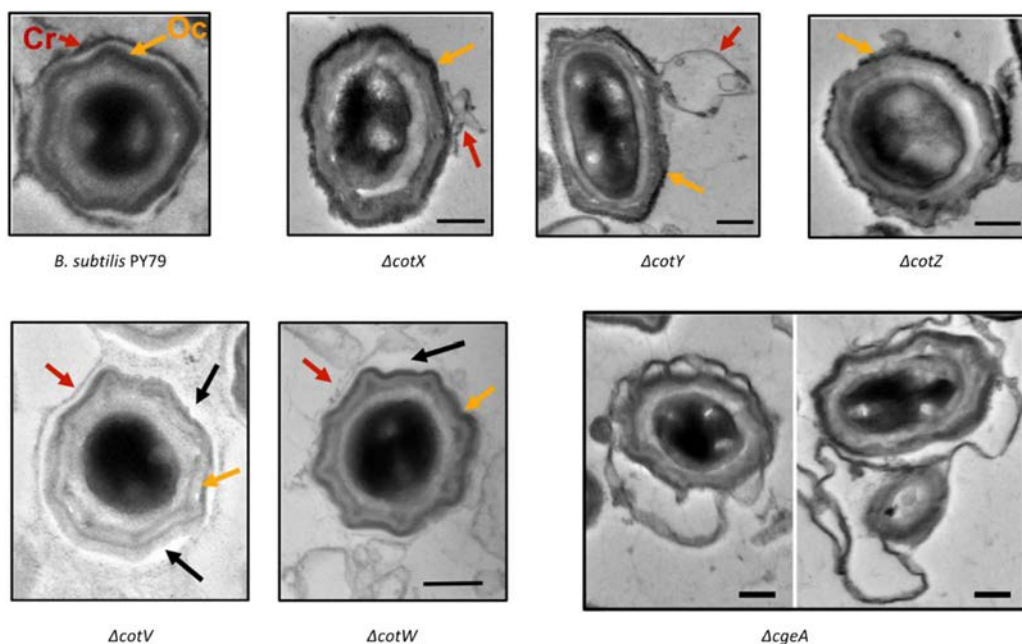
La protéine CotV est constituée d'une large proportion d'isoleucine (18%), de leucine (11%), et de valine (7%) qui lui confère un caractère hydrophobe (Zhang et al., 1993). Elle partage avec CotX des domaines de protéine communs (superfamille de CotX) (Bartels et al., 2019). La protéine CotW semble, quant à elle, être hydrophile en raison de sa composition très élevée en résidus chargés en lysine (18%), arginine (5%), acide glutamique (18%) ainsi qu'en acide aspartique (Zhang et al., 1993). De plus, il s'agit de la seule protéine du crust à avoir une charge positive à pH neutre (Dubois, communication personnelle). Des expériences de double hybride ont montré que CotV et CotW interagissent et que l'interaction entre ces deux protéines est la plus importante parmi toutes les protéines du crust (Krajčiková et al., 2017). La protéine CotV interagit également avec CotY, CotZ et CgeA ainsi qu'avec deux protéines de la tunique externe (YknT et CotM). La protéine CotW interagit avec CgeA, CotX et CoY ainsi qu'avec CotM et YtxO, deux protéines de la tunique externe. Par ailleurs, lorsque les protéines CotV et CotW sont surexprimées chez *E. coli*, elles s'auto-organisent en complexes et forment des fibres unidimensionnelles (Jiang et al., 2015). La localisation de la protéine CotW est complètement indépendante de la présence des autres protéines du crust, y compris de CotZ (Bartels et al., 2019; Shuster et al., 2019a). Enfin, l'observation en MET des spores des mutants  $\Delta cotV$  et  $\Delta cotW$  a montré que le crust de ces mutants est plus fin, moins structuré et moins bien ancré à la surface des spores que le crust des spores de la souche parentale (**Figure 22**) (Shuster et al., 2019a). L'ensemble de ces données suggère que les fibres formées par le complexe protéique CotV-CotW participent à la structure du crust et à son ancrage à la tunique externe.

### 2. CotZ

L'observation en microscopie à épifluorescence d'une protéine fusion entre CotZ et la Green Fluorescence Protein (GFP) a montré que CotZ se localise à la surface de la spore indépendamment des autres protéines du crust (Shuster et al., 2019a). De plus, la localisation correcte de toutes les autres protéines du crust (CotY, CotX, CotV et CgeA) est dépendante de CotZ, ce qui suggère que CotZ est une protéine morphogénétique majeure du crust (Imamura et al., 2010; Shuster et al., 2019a). La protéine CotZ est homologue à la protéine de structure CotY. En effet, elle présente 54% d'identité et 70% de similarité avec cette dernière (Zhang et al., 1993). Par ailleurs, la protéine CotZ contient un pourcentage élevé de résidus cystéine (6.7%) qui pourrait contribuer à la formation d'homo-multimères ou d'hétéro-multimères avec la protéine CotY. Des expériences de double hybride, d'AFM et de pull-down ont permis de confirmer l'existence d'une interaction entre CotZ et CotY (Krajčiková et al., 2009, 2017; Liu et al., 2015a). CotZ interagit également avec CotV et CgeA ainsi qu'avec des protéines de la tunique externe (CotA, CotO, CotE et YknT) (Liu et al., 2016b; Krajčiková et al., 2017). En microscopie électronique en transmission (MET), le crust des spores d'un mutant  $\Delta cotZ$  est attaché aux pôles de la spore mais il ne l'entoure plus et des altérations de la tunique externe sont observées (**Figure 22**) (Shuster et al., 2019a). L'ensemble de ces données indique que CotZ est une protéine de structure et une protéine morphogénétique majeure qui est au sommet de la hiérarchie de l'assemblage du crust.

### 3. CotY

L'observation en microscopie à épifluorescence de protéines fusions dans des mutants de gènes qui codent les protéines du crust, a permis de montrer que CotY est l'une des protéines morphogénétiques du crust (McKenney et al., 2010, 2013; Shuster et al., 2019a). La protéine CotY semble également être la protéine la plus abondante du crust (Bartels et al 2019). Comme CotZ, la protéine CotY est riche en cystéine (9.3%) et elle pourrait former des ponts disulfures intramoléculaires et intermoléculaires, notamment avec la protéine CotZ (Zhang et al., 1993). En accord avec les résultats précédents, des expériences de double hydride et d'AFM ont montré que la protéine CotY interagit fortement avec elle-même, ainsi qu'avec des protéines de la tunique externe (CotE, YknT, CotI, CotA, CotM et CotQ) et du crust (CotZ, CotV et CgeA) (Liu et al., 2016a; Krajčíková et al., 2017). Dans un hôte hétérologue, la protéine CotY s'auto-assemble en multimères homotypiques pour former des structures hexamériques qui peuvent ensuite s'associer pour former un cristal multicouche (Jiang et al., 2015). Enfin, en MET, les spores d'un mutant  $\Delta cotY$  ne présentent plus que quelques fragments de crust à leur surface (Figure 22) (Shuster et al., 2019a). L'ensemble de ces données indiquent que CotY est à la fois une protéine morphogénétique et la protéine de structure majeure du crust.



**Figure 22 : Observation du crust de spores chez les mutants des protéines du crust en microscopie électronique après coloration au rouge de ruthénium d'après Shuster *et al.*, 2019.** Les spores de la souche Wild Type *B. subtilis* PY79 présentent une tunique externe (Oc, indiquée par la flèche orange) ainsi qu'un crust (Cr, indiqué par la flèche en rouge). Les spores du mutant  $\Delta cotX$  présentent aussi un crust à leur surface. En revanche celui est moins bien accroché à la surface de la spore et peu se détacher lors de traitements trop vigoureux. Chez le mutant  $\Delta cotY$ , des lésions peuvent être observées à la surface de la tunique externe. Il n'y a pas de crust autour de la spore même si des fragments accrochés à la tunique peuvent être observés (flèche rouge). Les spores du mutant  $\Delta cotZ$  n'ont pas de crust présent à leur surface et présentent de plus des défauts au niveau de la tunique externe. Les mutants  $\Delta cotV$  et  $\Delta cotW$  présentent un crust à la surface de leurs spores. En revanche celui-ci semble moins bien ancré et est parfois séparé de la tunique externe (indiqué par des flèches noires). Les spores du mutant  $\Delta cgeA$  présentent un crust qui ballonne autour de la spore et qui semble ancré de façon plus lâche, avec moins de points de contact. L'échelle correspond à 200nm.

#### 4. CotX

CotX est la troisième protéine morphogénétique du crust. En effet, Il a été montré que CotX est essentielle à la localisation correcte de CotY et CgeA au sein du crust (Shuster et al., 2019a). CotX est riche en cystéine (4%), lysine (4.6 %) et glutamine (4.6 %) et elle pourrait former des complexes avec CotY et CotZ par l'intermédiaire de ponts disulfures et de liaisons de type isopeptidiques e-( $\gamma$ -glutamyl)lysine (Zhang et al., 1993). Des expériences de microscopie à force atomique suggèrent également que CotX interagit avec CotE (Liu et al., 2016a). Cependant, ces interactions sont infirmées par des expériences de double hybride qui indiquent que CotW est la seule protéine à interagir avec CotX (Krajčiková et al., 2017). De plus, des expériences de MET ont montré que le crust d'un mutant  $\Delta cotX$  est assemblé, mais faiblement attaché à la surface des spores, ce qui suggère que CotX joue un rôle dans l'ancrage du crust à la surface des spores (**Figure 22**) (Shuster et al., 2019a). L'ensemble de ces données suggère que CotX est une protéine morphogénétique mineure et une protéine de structure qui participe à l'ancrage du crust à la surface de la spore par son interaction avec les complexes fibrillaires CotV-CotW.

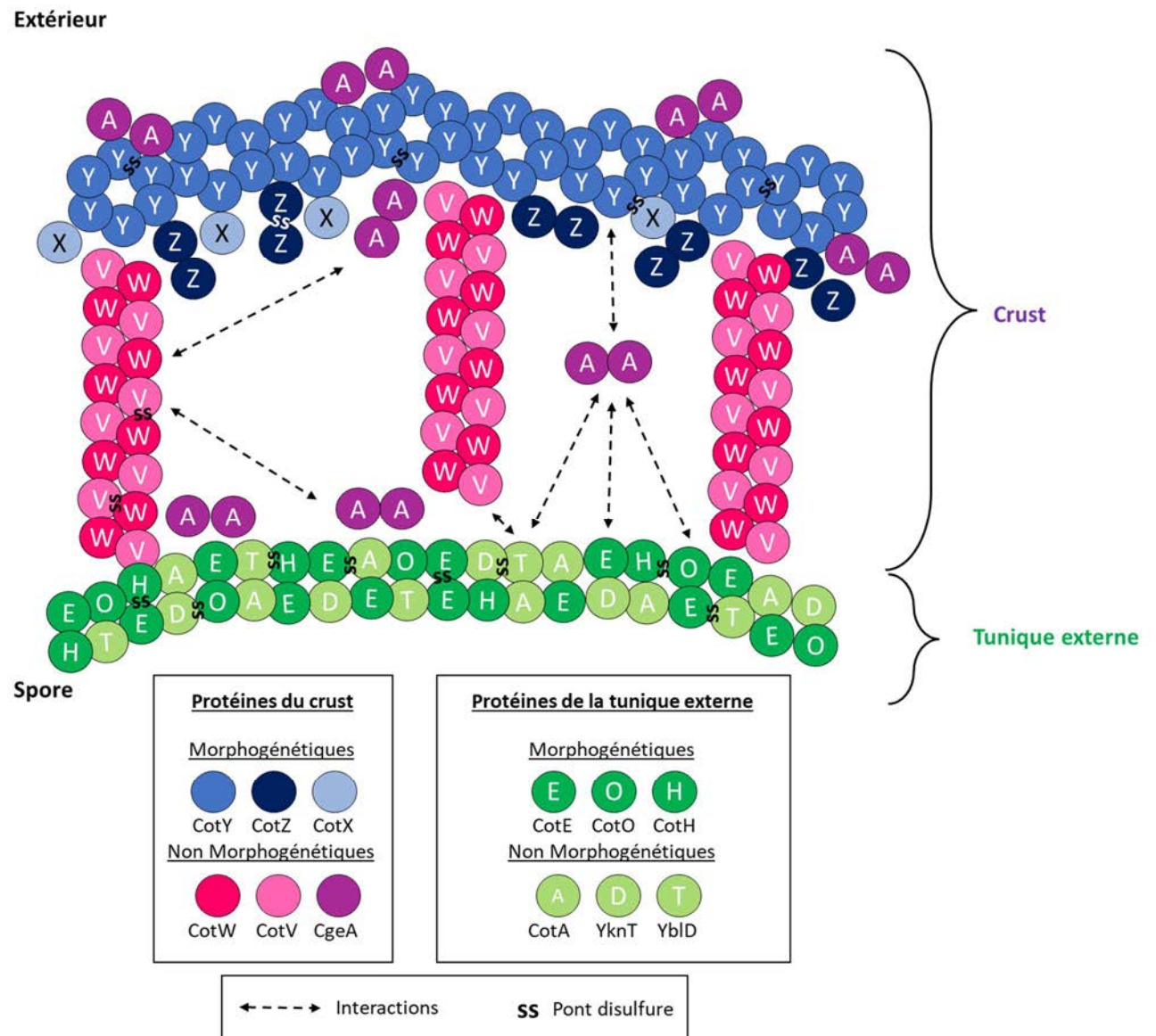
#### 5. CgeA

Des expériences de double hybride ont montré que la protéine CgeA forme des interactions fortes avec elle-même, ce qui suggère qu'elle forme des homo-multimères (Krajčiková et al., 2017). CgeA interagit également avec des protéines des tuniques (YnkT, YlbD, CotA, CotE, OxdD, CotO et GerQ) et du crust (CotY, CotZ, CotV et CotW). En microscopie électronique, les spores d'un mutant  $\Delta cgeA$  ont un crust correctement assemblé mais ancré de façon plus lâche à la surface des spores (**Figure 22**) (Shuster 2019). L'observation en microscopie à épifluorescence d'une protéine fusion entre CgeA et la Green Fluorescent Protein (GFP) a montré que la protéine CgeA est présente en faible quantité à la surface des spores et qu'elle est principalement localisée au niveau des pôles (Bartels, 2019). Il a également été montré que CgeA n'est pas nécessaire à l'assemblage ou à la localisation des autres protéines du crust (Imamura et al., 2011; Bartels et al., 2019; Shuster et al., 2019a). En revanche, son recrutement et/ou sa localisation à la surface de la spore est dépendant des protéines morphogénétiques CotX, CotY et CotZ (Shuster et al., 2019). Enfin, dans un mutant  $\Delta cotW$ , la protéine CgeA est bien localisée à la surface des spores à la fin de la sporulation. Cependant, elle se décroche progressivement de la surface des spores et elle est majoritairement localisée dans le milieu de culture deux jours après la fin de la sporulation (Shuster et al., 2019a). L'ensemble de ces données indiquent que i) CgeA n'est pas une protéine morphogénétique, ii) qu'elle est en bas de la hiérarchie de l'assemblage des protéines du crust et iii) qu'elle pourrait participer à l'ancrage du crust aux tuniques en interagissant avec CotY et les complexes fibrillaires CotV-CotW.

#### 6. Exemple de modèle de la structure protéique du crust.

En se basant sur l'ensemble de ces données nous pouvons proposer un modèle d'organisation de la partie protéique du crust représenté dans la **Figure 23**.

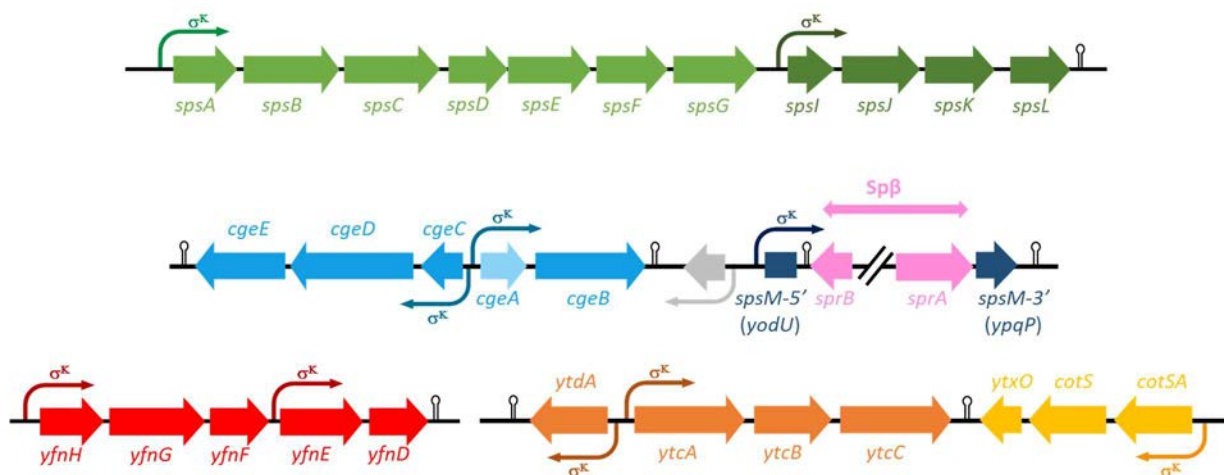
Les deux protéines CotV et CotW forment des complexes fibrillaires qui permettent l'ancrage du crust à la tunique externe. Cet ancrage est solidifié par la présence de CgeA qui interagit avec les protéines de la tunique externe, les complexes fibrillaires et CotY. CotY forme la structure principale du crust et interagit de plus avec CotZ et CotX.



**Figure 23 : Proposition d'un modèle quant à l'organisation de la fraction protéique du crust.** La structure principale du crust est formée majoritairement par CotY. Les protéines CotZ et CotX sont aussi intégrées dans cette structure. CotV et CotW interagissent ensemble pour former des fibres qui vont permettre d'ancrer le crust à la tunique externe. CgeA consolide cet ancrage en interagissant avec CotV et CoW ainsi qu'avec plusieurs protéines de la tunique externe et CotY au niveau du crust.

## b) Les glucides

Si la structure et la composition de la fraction protéique commencent à être élucidées, peu de données existent concernant les glucides du crust. Il a été montré que le crust contient du rhamnose, du quinovose, de la glucosamine, du glucose ainsi que de l'acide muramique (Faille et al., 2014b). Cependant, la localisation, la structure et l'ancrage de ces glucides à la surface des spores restent à définir. Plusieurs études récentes ont identifié dans le génome de *B. subtilis* des opérons de gènes codant des glycosyltransférases dont la transcription est dépendante de  $\sigma^E$  et  $\sigma^K$  (Bartels et al., 2019; Shuster et al., 2019b) (**Figure 24**). Ces études ont démontré l'implication de ces gènes candidats dans la synthèse du crust. En revanche, la fonction de ces gènes dans le processus de biosynthèse des glycanes n'a pas été étudiée, à l'exception notable des gènes *sps*. Dans ce chapitre, un état des lieux des connaissances actuelles du rôle de chaque loci dans le processus de biosynthèse des glycanes du crust est proposé.



**Figure 24** : Loci des gènes impliqués dans la biosynthèse de la partie glycanique du crust d'après Shuster et al., 2019. Les facteurs sigma impliqués dans la transcription des différents gènes sont indiqués.

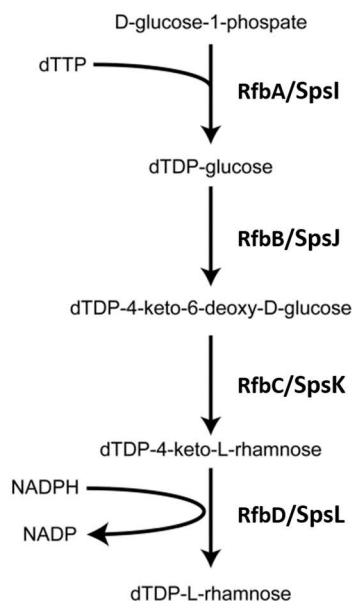
### 1. Les gènes *sps*

L'opéron *spsABCDEFGHIJKL* est constitué de 11 gènes transcrits à partir d'un promoteur dépendant de  $\sigma^K$  situé en amont du gène *spsA*. Le gène *spsM*, positionné en amont dans le génome est associé à cet opéron (**Figure 24**) (Cangiano et al., 2014). Ces gènes font de plus partie du régulon GerE. La délétion de l'opéron *spsABCDEFGHIJKL* n'affecte pas la formation de la tunique externe ou la structure protéique du crust (Cangiano et al., 2014). Les auteurs ont cependant noté une germination plus lente et moins efficace des spores de la souche PY79 produites en absence de cet opéron. De plus, les spores produites par ce mutant sont beaucoup plus hydrophobes que les spores d'une souche sauvage. Du fait de cette hydrophobicité élevée, les spores du mutant  $\Delta$ *spsABCDEFGHIJKL* forment des agrégats et montrent aussi une meilleure capacité d'adsorption de protéines hétérologues (Cangiano et al., 2014). Ces résultats démontrent donc un rôle des gènes *spsABCDEFGHIJKL* dans les propriétés de surface des

spores chez *B. subtilis*. Les fonctions des gènes *spsABCDEFG* lors de la biosynthèse du crust n'étaient cependant pas élucidées.

Le gène *spsA* code une glycosyltransférase putative (Tarbouriech et al., 2001; Cangiano et al., 2014). SpsA serait une invertile transférase qui possède un domaine GT2 (Tarbouriech et al., 2001). L'étude de sa structure cristallographique suggère que le rhamnose pourrait être le substrat de cette glycosyltransférase (Tarbouriech et al., 2001). Dans un mutant  $\Delta$ *spsA*, les spores produites sont plus hydrophobes et la structure protéique du crust n'est pas modifiée (Cangiano et al., 2014).

Les gènes *spsJKLM* codent quatre enzymes homologues aux enzymes RfbA, RfbB, RfbC et RfbD de *B. anthracis* (**Figure 25**). Ces enzymes constituent une voie de biosynthèse qui conduit à la production de dTDP-L-rhamnose à partir du D-glucose-1-phosphate. Les enzymes de cette voie ont largement été étudiées par des approches biochimiques et structurales (Mistou et al., 2016; Baumgartner et al., 2017; Law et al., 2017; Shornikov et al., 2017; Gokey et al., 2018).



**Figure 25 : Voie de biosynthèse du Rhamnose chez *B. anthracis* (Rfb) et chez *B. subtilis* (Sps) modifiée d'après Mistou et al., 2016.** Dans un premier temps RfbA, une glucose-1-phosphate thymidyltransférase, convertit le D-glucose-1-phosphate en dTDP-glucose. Le dTDP-glucose est ensuite oxydé et déshydraté par RfbB pour former du dTDP-4-keto-6-deoxy-D-glucose. Le produit de la réaction est pris en charge par RfbC qui catalyse alors une réaction de double épimérisation. Enfin, le produit de cette réaction est réduit par RfbD, une dTDP-4-dehydrorhamnosereductase pour former le dTDP-L-rhamnose.

Chez *B. subtilis*, la délétion du gène *spsI*, qui code la première enzyme de cette voie de biosynthèse, entraîne la production de spores plus hydrophobes (Shuster et al., 2019b). Dans ce mutant, la localisation des protéines du crust ne semble pas modifiée, mais l'observation des spores après une coloration à l'encre de chine met en évidence une absence de halo autour des spores. De plus, lors des observations en microscopie électronique des spores de ce mutant après coloration au rouge de ruthénium, le crust est à peine visible. L'ensemble de ces observations suggère que la délétion du gène *spsI* affecte seulement la synthèse des glycanes du crust. La structure et la localisation des glycanes



contenant du rhamnose à la surface des spores ne sont pas connues. Chez *B. amyloliquefaciens* 98/7, la sonication des spores décroche près de 90% du rhamnose du crust (Faille et al., 2014b). L'ensemble de ces données suggère que le rhamnose est constitutif de glycanes superficiels qui sont associés de façon non covalente à la surface des spores.

Chez la plupart des souches de *B. subtilis*, le gène *spsM* est interrompu par le prophage Sp $\beta$  formant ainsi deux pseudogènes, *ypqP* et *yodU*, dans le génome des cellules végétatives (Abe et al., 2014). Lors de la sporulation, ce prophage est excisé du chromosome de la cellule mère, permettant ainsi la reconstitution puis la transcription du gène *spsM*. Le mécanisme de lysogénie active du prophage sp $\beta$  n'est pas complètement connu. Cependant, une étude a démontré que l'excision du prophage sp $\beta$  fait intervenir l'intégrase à sérine SprA et le facteur directionnel de recombinaison SprB (Abe et al., 2017). La transcription du gène *sprA* est constitutive et dépendante de  $\sigma^A$ . En revanche, la transcription du gène *sprB* est dépendante de  $\sigma^K$ . Par ailleurs, les mêmes auteurs ont montré que des dommages à l'ADN induisent l'excision du prophage sp $\beta$  par un mécanisme inconnu mais qui implique un ou plusieurs gènes du prophage (Abe et al., 2014). De plus, une autre étude indique que le facteur sigma  $\sigma^Y$  favorise le maintien du prophage sp $\beta$  dans le chromosome de *B. subtilis* (Mendez et al., 2012). L'activité de  $\sigma^Y$  est régulée par un ou plusieurs stress. Ainsi, il a notamment été montré qu'une carence en azote augmente l'activité de  $\sigma^Y$  (Tojo et al., 2003). Lorsque le gène *spsM* est inactivé, les spores produites forment des agrégats et sont plus adhérentes au verre et au polypropylène (Abe et al., 2014). L'observation des spores de ces mutants en microscopie après coloration à l'encre de chine met en évidence une diminution du halo présent autour des spores, ce qui suggère une diminution de la quantité de glycanes à la surface de la spore. L'introduction d'une copie du gène *spsM* dans le génome de ces mutants entraîne la production de spores identiques à celles de la souche sauvage (Abe et al., 2014). Ces résultats suggèrent un rôle de *spsM* dans les propriétés de surface et d'adhésion des spores et donc possiblement dans la voie de biosynthèse du crust.

## 2. Les gènes *cge*

Les gènes *cgeBACDE* sont organisés en deux opérons adjacents orientés de manière divergente (**Figure 21 et 24**). Les deux opérons sont transcrits à partir de promoteurs dépendants de  $\sigma^K$  et leur transcription est activé par GerE (Roels and Losick, 1995). Les délétions des gènes *cgeAB*, ou *cgeD* ne semblent pas modifier la structure ou la composition des tuniques des spores. Les gènes *cge* ne sont pas impliqués dans les propriétés de résistance au lysozyme des spores mais ils participent à leurs propriétés de surface. En effet, la délétion des gènes *cgeAB* entraîne la production de spores ayant tendance à s'agglutiner entre elles, former un culot plus compact après centrifugation et à adhérer aux parois des tubes en verre et plastique utilisés lors des expériences (Roels and Losick, 1995). Lorsqu'une copie des gènes *cgeAB* est introduit dans le génome de ce mutant, les spores produites présentent des propriétés de surface identiques à celle de la souche sauvage. Les spores produites dans un mutant du gène *cgeD*, forment, quant à elles, des culots moins compacts que les spores produites par la souche sauvage PY79. Ces modifications des propriétés de surface et d'adhésion lors de la délétion des gènes *cge* suggèrent un

rôle de ces gènes dans la biosynthèse du crust, mais le rôle exact de ces gènes reste à définir. Cependant, lors des analyses de séquences réalisées dans l'étude de 1995, les auteurs ont mis en évidence une forte similarité de séquence entre les séquences protéiques de CgeD et SpsA (le gène *spsA* était alors identifié comme *ipa-63d*) (Glaser et al., 1993; Roels and Losick, 1995). Les séquences protéiques associées à ces deux gènes étaient similaires à celles de glycosyltransférases, ce qui suggère, dans le cas de *cgeD*, un rôle possible dans la biosynthèse des glycanes du crust.

### 3. Les gènes *yfn*

Les gènes *yfnDEFGH* forment un opéron transcrit à partir d'un promoteur  $\sigma^K$  en amont du gène *yfnH* (**Figure 24**). Un deuxième promoteur dépendant de  $\sigma^E$  et  $\sigma^K$  est de plus présent en amont de *yfnE* (Eichenberger et al., 2003; Nicolas et al., 2012). Ces gènes font de plus partie du régulon de GerE. Les gènes *yfnDEF* pourraient coder des glycosyltransférases. L'enzyme YfnH est un paralogue de SpsI et serait une glucose-1-P-nucleotidyltransférase (Arrieta-Ortiz et al., 2015; Shuster et al., 2019b). Ces deux enzymes utiliseraient des nucléosides triphosphates différents comme substrat. Ainsi, SpsI utiliserait de la désoxythymidine triphosphate (dTTP) tandis que YfnH utiliserait de la cytidine triphosphate (CTP). La délétion des gènes *yfnD*, *yfnF*, *yfnG* et *yfnH* chez *B. subtilis* PY79 n'entraîne pas de modification du caractère hydrophile des spores mais un crust plus étendu avec de long filaments en « toile d'araignée » (Shuster et al., 2019b). Ces résultats confirment le rôle des gènes *yfn* dans la biosynthèse des glycanes du crust. La fonction des gènes *yfn* dans ce processus reste à définir. Cependant, il est possible que ces gènes participent à la synthèse ou au transfert d'un ose qui empêche l'élongation de chaînes de glycanes en cours de synthèse à la surface des spores.

### 4. Le gène *ytdA* et les gènes *ytc*

Le gène *ytdA* est transcrit à partir d'un promoteur dépendant de  $\sigma^K$  et est adjacent, mais dans le sens inverse, à l'opéron *ytcABC*, sous le contrôle de  $\sigma^K$  ainsi que le facteur GerE (**Figure 24**) (Nicolas et al., 2012). Le gène *ytdA* code une potentielle glucose-1-P nucleotidyltransférase. YtdA serait un deuxième paralogue de SpsI dont le substrat serait l'uridine triphosphate (UTP) (Shuster et al., 2019b). Le gène *ytcA* coderait une UDP-glucose-déshydrogénase et les gènes *ytcB* et *ytcC* coderaient une NDP-glucose-déhydratase et une glycosyltransférase respectivement (Shuster et al., 2019b). Par ailleurs, il a été montré que des orthologues des gènes *ytcA* et *ytcB* chez *B. cereus* codent respectivement une UDP-glucose déshydrogénase et une épimérase qui synthétisent des acides uroniques à partir de glucose (Broach et al., 2012). La délétion des gènes *ytdA*, *ytcA*, *ytcB* et *ytcC* chez *B. subtilis* PY79 n'entraîne pas de modification du caractère hydrophile des spores (Shuster et al., 2019b). De ce fait, les gènes *ytdA* et *ytcABC* ne semblent pas impliqués, ou ont un rôle mineur, dans le processus de biosynthèse des glycanes du crust.

## D. Propriétés des spores de *Bacillus*

Les propriétés de résistance des spores à de nombreux paramètres physico-chimiques ainsi que leurs propriétés d'adhésion aux surfaces posent un problème important aussi bien au sein des industries agro-alimentaires que dans le secteur médical. De nombreuses études ont été menées afin de mieux comprendre comment la composition et la structure des spores participent à ces propriétés.

### a) Propriétés de résistance aux stress

#### 1. Résistance à la chaleur

La résistance à la chaleur est l'une des propriétés les plus remarquables des spores de *Bacillus*. En effet, les spores de *Bacillus* résistent à des températures plus élevées d'environ 40°C que les cellules végétatives en chaleur humide et d'environ 30°C en chaleur sèche (Nicholson et al., 2000; Setlow, 2014b). Les dommages causés aux spores par la chaleur humide et la chaleur sèche ainsi que les facteurs qui participent à la résistance à ces deux types de chaleur sont notablement différents.

Lorsque les spores sont exposées à une chaleur sèche, de 90 à 120°C, une accumulation de mutations et de dommages à l'ADN est détectée (Nicholson et al., 2000). La résistance des spores à la chaleur sèche s'explique principalement par la saturation de l'ADN par les SASPs. En effet, chez *B. subtilis*, les spores de mutants ne produisant plus de SASPs présentent une résistance à la chaleur sèche qui s'apparente à celle de cellules végétatives (Setlow and Setlow, 1995). Le dipicolinate de calcium semble également jouer un rôle puisqu'en absence de dipicolinate dans le cœur, les spores sont plus sensibles à la chaleur sèche (Setlow et al., 2006). En plus de cette résistance passive, il a été montré qu'une résistance active est initiée par les spores de *B. subtilis* lors de la germination (Setlow and Setlow, 1996). En effet, après une exposition des spores à une température de 120°C pendant 15 min, la transcription de gènes tels que *recA* et *uvrC* est fortement augmentée lors de la germination. Ces résultats indiquent que le système SOS est activé pendant la germination des spores ayant été exposées à la chaleur sèche.

L'exposition des spores de *B. subtilis* à la chaleur humide entraîne des dépurinations de l'ADN. Les protéines SASP protègent l'ADN de ces modifications (Setlow, 2014b). En maintenant une faible teneur en eau dans le cœur de la spore, le dipicolinate et les cations divalents participent également à la résistance des spores à la chaleur humide. De façon intéressante, la résistance à la chaleur humide des spores varie grandement entre les souches d'une même espèce (Berendsen et al., 2015). Ainsi, des spores issues de trois souches de *B. subtilis* isolées soit d'une soupe de crème de curry stérilisée en sachet, d'une sauce pour lasagnes pasteurisée en pot en verre ou d'une soupe de curry stérilisée en pot en verre présentent des temps de réduction décimale à 115°C, c'est-à-dire le temps requis pour tuer 90 % d'une population de bactéries à 115°C, de 1.18 min, 3.14 min et 9.64 min respectivement.

#### 2. Résistance aux rayonnements

Les radiations ultraviolettes (UV) correspondent à des radiations électromagnétiques dont la longueur d'onde est comprise entre 100 et 400 nm (Dai et al., 2012). Les radiations UV sont divisées en quatre zones : UV-A (315-400 nm), UV-B (280-315 nm), UV-C (200-280 nm) et UV-Vacuum (100-

200 nm). Le spectre UV-C est fortement absorbé par les acides nucléiques des micro-organismes ce qui entraîne des dommages de leur matériel génétique. Ils présentent de ce fait le pouvoir létal le plus important du spectre UV. Les UV à la longueur d'onde de 254 nm sont les plus utilisés contre les micro-organismes. Les spores de *Bacillus* sont jusqu'à 50 fois plus résistantes aux UV à 254 nm, que les cellules végétatives (Setlow, 2001). La résistance des spores aux rayonnements UV 254 nm fait intervenir les protéines SASPs et le mécanisme de réparation de l'ADN SOS pendant la germination (Setlow and Setlow, 1996). Chez un mutant de *B. subtilis* qui ne produit plus de protéines SASP, les spores sont plus sensibles aux rayonnements UV (Setlow and Setlow, 1996). Chez les cellules végétatives de *B. subtilis*, les radiations UV à 254 nm entraînent la production de photocomposés comme des dimères de cyclobutane ainsi que des modifications des pyrimidines qui sont létales pour les cellules. En revanche, lors de l'exposition des spores aux UV 254 nm, les SASP associés à l'ADN limitent la formation de ces composés toxiques. Les tuniques quant à elles protègeraient les spores des radiations UV-A et UV-B mais pas des UV-C (Riesenman and Nicholson, 2000).

Les spores sont aussi plus résistantes que les cellules végétatives aux rayonnements  $\gamma$  (Nicholson et al., 2000). Les éléments impliqués dans cette résistance n'ont cependant pas été identifiés, mais les SASPs ne semblent pas intervenir dans la résistance des spores à ces radiations. Il est possible que le niveau d'hydratation du cœur joue un rôle ainsi que des mécanismes de réparation de l'ADN, mais cela n'a pas encore été démontré.

### 3. Résistance aux produits chimiques

Les spores de *B. subtilis* présentent une résistance plus élevée que les cellules végétatives à de nombreux agents chimiques. Plusieurs facteurs sont impliqués dans cette résistance accrue. Les protéines SASP participent à la résistance des spores face à des agents oxydants comme le peroxyde d'hydrogène (Setlow and Setlow, 1996). La faible perméabilité de la membrane interne protège le cœur des spores de nombreux agents chimiques tels que le peroxyde d'hydrogène et l'acide nitreux. Ainsi, des variations de la perméabilité membranaire entraînent des variations des propriétés de résistance des spores aux agents chimiques (Cortezzo and Setlow, 2005). De plus, des enzymes, telles que des catalases et des superoxyde dismutases, ont été identifiées à la surface des spores du groupe *B. cereus* et pourraient également participer à la résistance des spores aux produits oxydants (Cybulski et al., 2009).

### 4. Résistance à la congélation et à la dessiccation

Contrairement aux cellules végétatives, les spores peuvent survivre à plusieurs cycles de dessiccation/réhydratation ainsi que des cycles de congélation/décongélation (Nicholson et al., 2000; Setlow, 2014b). La résistance des spores à ces traitements est liée à la présence des protéines SASP et du dipicolinate dans le cœur de la spore. En effet, des spores ne produisant pas de protéines SASP sont beaucoup plus sensibles à ces traitements.

#### b) Propriétés de surface et d'adhésion.

Les spores des bactéries du groupe *B. cereus* se caractérisent par un caractère hydrophobe prononcé. Plusieurs études ont mis en évidence cette propriété en utilisant des méthodes telles que la

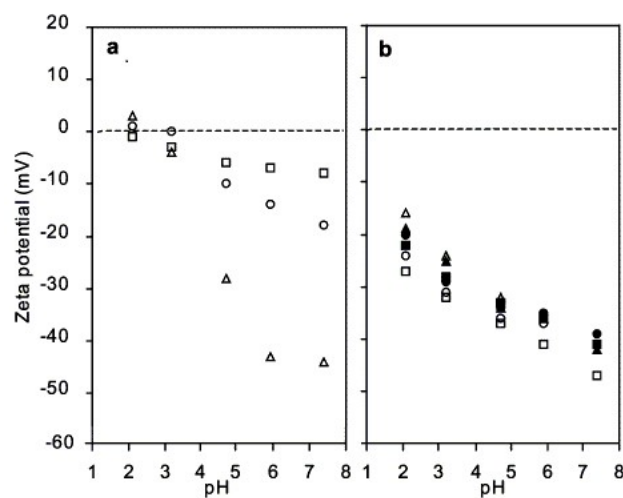
chromatographie d'interaction hydrophobe (Wiencek et al., 1990, Simmonds et al., 2003), la mesure d'angle de contact (Simmonds et al., 2003; Faille et al., 2019) ou l'affinité pour l'hexadécane (Doyle et al., 1984; Wiencek et al., 1990; Tauveron et al., 2006). Les spores des bactéries du groupe *B. cereus* sont également chargées négativement à pH neutre avec des potentiels zêta compris entre -17,61 mV et -38,98 mV en fonction des espèces (Faille et al., 2010a). Les spores des bactéries du groupe *B. cereus* adhèrent fortement aux surfaces et notamment à l'acier inoxydable (Tauveron et al., 2006; Faille et al., 2010a). Cependant, cette capacité d'adhésion varie en fonction des souches. La variabilité serait notamment due aux différences d'hydrophobicité des spores ainsi qu'à la taille des appendices observés à la surface. Il a également été montré que la glycoprotéine BclA joue un rôle clé dans ces propriétés de surface et d'adhésion des spores (Lequette et al., 2011). En l'absence de BclA, les spores de *B. cereus* sont plus hydrophobes, plus chargées négativement et se décrochent plus facilement des surfaces. La présence des appendices faciliterait l'adhésion des spores à l'acier inoxydable, car leur petite taille leur permet de pénétrer facilement la barrière de répulsion électrostatique, comme le suppose la théorie dite DLVO de Derjaguin–Landau–Verwey–Overbeek (van Loosdrecht et al., 1989).

Les spores des bactéries du groupe *B. subtilis* sont le plus souvent hydrophiles et chargées négativement à pH neutre (Faille et al., 2014b). En comparaison avec les spores de *B. cereus*, les spores de *B. subtilis* sont moins adhérentes aux surfaces (**Table 3**). Ces paramètres varient cependant en fonction des souches. Par exemple, l'évaluation des propriétés de surface de neuf souches de *B. subtilis* montre une grande variabilité dans les résultats en fonction des souches (Ahimou et al., 2001). Le potentiel zêta des spores des souches à différents pH permet de distinguer deux types de profils (**Figure 26**). Dans un premier cas les spores sont faiblement chargées pour des pH acides, tandis que dans l'autre les spores présentent un potentiel zeta négatif important à pH acide. Dans les deux cas, la charge négative à la surface des spores augmente avec le pH.

**Table 3 : Propriétés de surface et d'adhésion à des coupons en acier inoxydable de spores de différentes souches de *Bacillus* d'après Faille et al., 2010.**

	Exosporium length ( $\mu\text{m}$ )	Nap length (nm)	Spore volume ( $\mu\text{m}^3$ )	Number of appendages	Hydrophobicity (-R0)	Zeta potential (mV)	Adhesion (cells/coupon)
<i>B. cereus</i> 14579	2.01 (0,48) *	25	0.25 (0.04)	4.7 (1.7)	4.8	- 38.98	1.06E+04
<i>B. cereus</i> 98/4	2.59 (0.43)	25	0.56 (0.12)	18.3 (11.2)	9	- 26.33	2.03E+05
<i>B. cereus</i> 433	2.66 (0.40)	30	0.45 (0.07)	12.3 (3.9)	3.6	- 22.08	4.40E+04
<i>B. cereus</i> 5832	3.15 (0.49)	35	0.41 (0.09)	2.3 (1.5)	3.1	- 21.67	4.13E+03
<i>B. cereus</i> LM9	2.83 (0.47)	40	0.40 (0.09)	7.3 (2.2)	5.5	- 22.45	1.04E+04
<i>B. cereus</i> D1	2.66 (0.34)	35	0.41 (0.05)	9.9 (6.9)	4.4	- 29.75	1.75E+04
<i>B. cereus</i> D6	2.28 (0.42)	40	0.31 (0.06)	4.6 (1.6)	5.4	- 26.05	7.25E+04
<i>B. cereus</i> D17	nd	nd	0.32 (0.06)	nd	5.2	- 34.66	1.06E+04
<i>B. cereus</i> D31	2.89 (0.38)	35	0.45 (0.10)	5.7 (1.8)	4.2	- 17.61	7.57E+04
<i>B. anthracis</i> 9131	1.54 (0.17)	60	0.42 (0.09)	0	5.1	- 20.26	2.68E+04
<i>B. thuringiensis</i> 407	2.41 (0.72)	30	0.31 (0.07)	2.7 (1.3)	6.4	- 28.47	1.79E+04
<i>B. thuringiensis</i> 7138	2.13 (0.53)	40	0.31 (0.05)	1.6 (0.9)	5.5	- 26.00	1.78E+04
<i>B. licheniformis</i> 6933	-	-	0.20 (0.04)	0	5	- 18.65	1.41E+04
<i>B. pumilus</i> 98/6	-	-	0.13 (0.02)	0	4.3	- 44.80	1.88E+04
<i>B. sporothermodurans</i> MB581	-	-	0.28 (0.05)	0	1.1	- 40.49	6.39E+03
<i>B. subtilis</i> 98/7	-	-	0.33 (0.08)	0	0.5	- 24.26	1.56E+02
<i>B. subtilis</i> 7135	-	-	0.23 (0.04)	1	1	- 46.81	2.67E+03

\* Numbers in brackets represent the standard deviations



**Figure 26 : Potentiel zêta des spores de neuf souches de *B. subtilis* en fonction du pH d'après Ahimou et al., 2001. (a) spores présentant un potentiel zêta faible à pH acide. ○ ATCC 7058; △ ATCC 12432; □ ATCC 15811. (b) spores présentant un potentiel zêta négatif fort à pH acide. ○ ATCC 12695; ● ATCC 15129; △ ATCC 15476; ▲ ATCC 15561; □ B 213; ■ S 499.**

Le crust est la couche la plus externe des spores des bactéries du groupe *B. subtilis* et joue donc un rôle majeur dans les propriétés de surface et d'adhésion des spores. En effet, les souches *B. subtilis* 168 et PY79 qui présentent un crust à leur surface sont très hydrophiles tandis que les souches natto Takahashi et natto BEST195 qui ne possèdent pas de crust sont très hydrophobes (Shuster et al., 2019a). Pour confirmer l'influence du crust sur leurs propriétés de surface et d'adhésion, des spores de *B. subtilis* ont été soumise à un traitement à la presse de French. Ce traitement enlève le crust des spores sans endommager la tunique externe (Faille et al., 2014b). L'analyse des propriétés de surface de ces spores a montré que le crust contribue au caractère hydrophile des spores ainsi qu'à leur charge négative et limite l'adhésion des spores à des surfaces hydrophobes telles que l'acier inoxydable ou le polypropylène (Faille et al., 2014b; Dubois, communication personnelle).

### **III. Problématique des bactéries du genre *Bacillus* dans les industries agro-alimentaires**

L'organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) estime qu'environ 30% des aliments destinés à la consommation humaine sont perdus ou gaspillés dans le monde et que ces pertes représentent plus d'un milliard de tonnes de nourriture et 940 milliards de dollars de pertes économiques par an (US-EPA, n.d.). Une des raisons majeures de ce gaspillage est l'altération des aliments par des micro-organismes. On estime qu'environ 25 % de tous les aliments produits dans le monde sont perdus en raison de l'altération microbienne (Bondi et al., 2014). Les industries laitières constituent l'un des secteurs les plus touchés par le gaspillage alimentaire, puisque près de 20 % du lait est jeté avant consommation chaque année (Shemesh and Ostrov, 2020). En outre, la préférence des consommateurs pour les aliments frais à durée de conservation prolongée et pour les produits exempts de pesticides chimiques rend les aliments plus vulnérables à l'altération, tout en augmentant la diversité des micro-organismes responsables de ces altérations (Blackburn, 2006). Elle rend aussi plus difficile la maîtrise de la contamination par des bactéries pathogènes. La lutte contre les contaminations microbiennes représente donc un enjeu capital pour les industries agro-alimentaires aussi bien sur le plan sanitaire qu'économique.

Les contaminations par *Bacillus* sont particulièrement importantes au sein des industries boulangères et laitières et elles posent un problème majeur (Gopal et al., 2015; Vaičiulytė-Funk et al., 2015; Valerio et al., 2015; Elegbeleye and Buys, 2020). En effet, les spores de *Bacillus* sont résistantes aux traitements thermiques comme la pasteurisation ou l'upérisation à haute température (UHT) et certaines souches peuvent se développer entre 5 et 10°C, dans du lait pasteurisé par exemple (Saleh-Lakha et al., 2017). De plus, ces micro-organismes sont capables de contaminer les surfaces des équipements, sous forme de spores ou sous forme de biofilms.

### A. Origine des contaminations dues à *Bacillus*

Les spores de *Bacillus* sont omniprésentes dans l'environnement et elles sont trouvées dans de nombreux types de sols, sédiments, poussières et plantes. En raison de ce caractère ubiquitaire, les spores de *Bacillus* sont fréquemment isolées à partir de matières premières de l'industrie agroalimentaire comme les céréales, les légumes, le riz, les œufs, le lait ou encore la viande (Soni et al., 2016). Ainsi, la viande est généralement contaminée dès les abattoirs par des bactéries issues de la peau des animaux, des fèces ou des intestins (Gill, 1998). Dans l'industrie laitière, le lait est généralement contaminé dans les exploitations agricoles que ce soit à partir des litières, des pis ou encore des équipements de traite (Islam et al., 2018; Odeyemi et al., 2020). Enfin, les contaminations au sein des industries boulangères sont probablement liées à une contamination des épis de blé par les spores de *Bacillus* pendant la culture qui passent ensuite du blé à la farine pendant la mouture (Kirschner and von Holy, 1989). Les aliments crus sont souvent protégés des attaques des micro-organismes par des structures difficilement dégradables, comme la peau des fruits, les coquilles de noix, le son, le collagène du tissu musculaire, ou les coquilles d'œufs (Petruzzi et al., 2017). Ainsi, leur dégradation nécessite l'utilisation d'enzymes particulières telles que des pectinases ou des protéases. De ce fait, les aliments crus avant la récolte ne sont souvent contaminés qu'en surface. Cependant, au cours des étapes de transformation, cette protection disparaît et les aliments deviennent alors plus vulnérables à la propagation des micro-organismes.

Si les contaminations des aliments viennent en grande partie de la flore présente sur les matières premières, elles peuvent aussi provenir de contaminations croisées pendant ou après la transformation, par l'intermédiaire du personnel, de l'atmosphère environnante, ainsi que des surfaces des ateliers, comme les sols, les murs, les plans de travail, ou les surfaces des machines (Petruzzi et al., 2017). En effet, les installations de transformation des aliments sont fréquemment contaminées par des bactéries, le plus souvent sous forme de biofilms.

### B. Problèmes liés à la présence de *Bacillus* dans les aliments

Les bactéries du genre *Bacillus* sont responsables de l'altération de nombreux produits transformés et tout particulièrement des produits transformés par la chaleur. Cette capacité d'altération s'explique par la capacité de ces micro-organismes à produire des enzymes extracellulaires (chapitre I. C. b). C'est le cas notamment des produits laitiers, qui sont très sensibles aux contaminations par différentes espèces de *Bacillus*. *B. licheniformis* est la bactérie mésophile la plus retrouvée lors de la contamination de lait frais et de lait déshydraté en poudre (André et al., 2017; Sharma et al., 2021). Le lait UHT ou le lait en poudre peuvent être contaminés par des bactéries produisant des spores très thermorésistantes, mais l'altération du produit passe souvent inaperçue par le consommateur. En revanche, *B. weihenstephanensis* et *B. mycoides* sont responsables d'altérations dans le lait pasteurisé ou la crème, tels que le caillage, l'apparition d'un goût rance ou la production de gaz (Heyndrickx and Scheldeman, 2008). La contamination du yaourt par *B. cereus* ou *B. subtilis* provoque notamment la



formation de grumeaux, la séparation du lactosérum et l'apparition de saveurs amères désagréables (Heyndrickx and Scheldeman, 2008). Cette amertume est associée à l'action des protéases des bactéries. Dans les desserts lactés soumis à une température élevée au cours du processus de transformation, des espèces telles que *B. cereus*, *B. subtilis* ou *B. licheniformis* peuvent se développer (Moschonas et al., 2021). Ces auteurs ont par exemple montré que *B. subtilis* est le micro-organisme d'altération dominant des crèmes à la vanille. La détérioration des crèmes pâtisseries commerciales a aussi été associée à la présence de bactéries appartenant notamment au groupe *B. cereus* (Arakawa et al., 2008). L'étude de la diversité bactérienne de crèmes dessert de deux entreprises françaises a, par exemple, mis en évidence de nombreuses espèces bactériennes, dont des bactéries appartenant au groupe *B. cereus*, qui seraient responsables d'odeurs désagréables, à cause de la production de divers esters et composés dérivés du métabolisme des acides aminés et des sucres (Techer et al., 2020). Les micro-organismes du genre *Bacillus* sont également impliqués dans la dégradation des propriétés organoleptiques des fromages et ils peuvent produire des amines biogènes qui sont toxiques à forte dose (Gopal et al., 2015).

L'altération de produits de boulangerie par des espèces appartenant au groupe *B. subtilis* a également été beaucoup rapportée (Thompson et al., 1993; Pacher et al., 2022). *B. amyloliquefaciens* et *B. subtilis* sont notamment responsables du pain dit « filant » (Pereira et al., 2020; Sharma et al., 2021). Cette altération se manifeste en premier lieu par l'apparition d'une odeur fruitée désagréable suivie par la dégradation enzymatique de la mie. Cette dernière devient molle et collante en raison de la production de polysaccharides gluants extracellulaires (**Figure 27**). La relation entre la formation du pain filant et l'hydrolyse de l'amidon du pain par les amylases microbiennes a précédemment été mise en évidence (Pepe et al., 2003). Les enzymes produites par les souches bactériennes modifient la texture du pain en agissant sur ses glucides (Martínez Viedma et al., 2011; Valerio et al., 2012). L'utilisation de levain permet d'inhiber la croissance des bactéries principalement grâce à son pH acide (Li et al., 2020). Cependant, l'efficacité du levain est fortement liée à sa concentration en acides organiques et son pH qui peuvent varier d'une préparation à l'autre. De plus, un pH trop acide ou une concentration trop riche en acides organiques peuvent altérer les propriétés organoleptiques du pain.



Figure 27 : Les différents niveaux de production du pain filant d'après Pereira *et al.*, 2020.

Enfin, une étude récente a aussi mis en évidence un épisode impliquant l'altération gazeuse de sauce pour salade qui était causée par *B. amyloliquefaciens* dans une installation de production située au Brésil (Pereira et al., 2017).

Un autre problème majeur lié à la présence de bactéries du genre *Bacillus* dans les aliments est que certaines d'entre elles sont responsables d'intoxications alimentaires, le plus souvent bénignes. La plupart de ces intoxications sont associées à *B. cereus*. Cependant, des espèces du groupe *B. subtilis* sont parfois incriminées (Pavić et al., 2005; Logan, 2012). Si les mécanismes d'action de ces bactéries ne sont pas encore bien identifiés, leur capacité à produire des toxines a été mise en évidence. Ainsi, il a été montré que des souches de *B. subtilis* impliquées dans des cas d'intoxication alimentaires produisaient de l'amylosine (Apetroaie-Constantin et al., 2009). L'amylosine est une toxine peptidique thermostable (Rasmus-Sahari et al., 2015). Elle permet la formation de canaux ioniques perméables dans les membranes lipidiques. La présence de ces canaux entraîne la dépolarisation de la membrane plasmique et des mitochondries et perturbe les fonctions mitochondriales, le métabolisme énergétique et l'homéostasie ionique des cellules de l'organisme hôte. De même, l'analyse de souches de *B. licheniformis* issues de cas d'intoxications alimentaires a mis en évidence la production d'une toxine chimiquement proche du céréulide produit par *B. cereus* (Salkinoja-Salonen et al., 1999).

### C. Persistance des bactéries du genre *Bacillus* dans les industries agroalimentaires.

La persistance des bactéries du genre *Bacillus* à la surface des équipements des industries agroalimentaires est principalement due à leur capacité de produire des spores adhérentes et à former des biofilms. Les spores de *Bacillus* sont connues pour être adhérentes sur différents matériaux et résistantes aux procédures de nettoyage mises en place pour les éliminer, ce qui explique qu'elles soient souvent retrouvées sur les surfaces des équipements dans les industries agro-alimentaires (Faille et al., 2002a; Gopal et al., 2015). Lorsqu'elles ont adhéré aux surfaces, les spores peuvent germer et les nouvelles cellules végétatives peuvent retourner dans l'aliment ou se multiplier sur la surface pour former des biofilms, connus pour présenter des résistances élevées aux procédures d'hygiène et être à l'origine de recontaminations parfois très importantes des aliments en contact. Il est donc important de maîtriser au maximum la contamination des surfaces par des spores et des biofilms de *Bacillus* dans les industries agroalimentaires. Pour cela, il est important de comprendre les mécanismes impliqués dans l'adhésion des spores aux surfaces et de développer des processus de nettoyage et de désinfection qui permettent d'éliminer les spores adhérentes avant le développement des biofilms.

L'adhésion des spores aux surfaces est un processus séquentiel, qui se décompose en différentes étapes, à savoir le transport de la spore à proximité des surfaces, l'adhésion initiale réversible, puis l'adhésion irréversible. Les processus permettant aux spores de se rapprocher d'une surface sont le transport diffusif, actif et convectif (van Loosdrecht et al., 1989). Le transport convectif est induit par le flux de liquide et se produit, par exemple, dans les lignes de traitement de l'industrie alimentaire. L'adhésion aux surfaces résulte quant à elle d'interactions physicochimiques attractives et répulsives

incluant les interactions de van der Waals, acide-base de Lewis, hydrophobes, et électrostatiques. Selon la théorie DLVO, ou la théorie DLVO étendue (XDLVO) (van Oss, 1995; Wang et al., 2011), l'adsorption réversible met en jeu essentiellement les interactions de London-van der Waals (attractives) et des interactions électrostatiques, le plus souvent répulsives, car les surfaces en contact sont généralement chargées négativement, puis, lorsque la distance entre la spore et le matériau diminue, des interactions acide-base de Lewis (attractives ou répulsives). Cette étape initiale a été décrite comme un processus réversible caractérisé par un échange continu entre les populations planctoniques et adhérentes (Hermansson and Marshall, 1985). Les échanges, et par conséquent la quantité de biomasse à la surface, peuvent être directement influencés par les conditions d'écoulement du liquide de suspension (Boulangé-Petermann, 2009). Lorsque la distance entre les deux surfaces diminue, des forces à courte portée (hydrophobes, hydrogène) apparaissent, et la liaison devient plus forte et est souvent dite irréversible. Pourtant, la désorption reste possible mais est beaucoup plus difficile que lors de l'adhésion réversible. Les propriétés du milieu environnant peuvent aussi affecter ces interactions. C'est le cas par exemple de la force ionique du milieu. En effet, lorsque cette force ionique augmente, la répulsion électrostatique diminue en raison d'une diminution de l'épaisseur de la double couche électronique.

Les propriétés de surface des spores affectent elles aussi les interactions entre spores et matériaux. Parmi ces propriétés, le caractère hydrophile/hydrophobe des spores de *Bacillus* a été très étudié au laboratoire, soit avec des souches sauvages appartenant à différentes espèces, soit avec des mutants produisant des spores modifiées dans leurs structures superficielles, l'exosporium pour *B. cereus*, le crust pour *B. subtilis*. Ces études ont par exemple mis en évidence que les spores de *B. subtilis* ou de *B. amyloliquefaciens* rendues hydrophobes adhéraient en plus grande quantité aux surfaces et étaient plus résistantes à une procédure de nettoyage par de la soude ou par écoulement de mousse contenant du SDS (Faille et al., 2014b; Dallagi et al., 2022; Deleplace et al., 2022).

La résistance intrinsèque élevée des spores à la chaleur, aux désinfectants ainsi qu'à la dessiccation participe aussi largement à la persistance des spores dans les chaînes de transformation des produits alimentaires (Logan, 2012; Setlow, 2014b). De plus, chez *B. cereus* et *B. licheniformis*, il a été montré que les spores adhérentes à de l'acier inoxydable étaient plus résistantes à la chaleur humide (Simmonds et al., 2003). Ainsi, le temps de réduction décimale à 90°C peut être de deux à trois fois plus long selon les souches.

Les souches de *Bacillus* sont aussi fréquemment retrouvées sur les surfaces des environnements agro-industriels, sous forme de biofilms, le plus souvent composés de différentes espèces bactériennes. Des biofilms complexes abritant différentes espèces de *Bacillus* ont aussi été détectés dans les chaînes de transformation des produits laitiers notamment dans les différents segments des lignes de pasteurisation (Sharma and Anand, 2002). D'après ces auteurs, les biofilms à *Bacillus* seraient d'ailleurs considérés comme étant l'un des biofilms laitiers les plus dommageables. S'il est largement admis que les cellules végétatives sont moins adhérentes que les spores de *Bacillus* (Harimawan et al., 2013), la formation des biofilms induit une résistance accrue des cellules aux environnements hostiles, qui les fait

échapper aux mesures de contrôle appliquées dans les unités de transformation des aliments comme les procédures de nettoyage et de désinfection ou encore la dessiccation (Shaheen et al., 2010; Kumari and Sarkar, 2014; Ostrov et al., 2019). Cette résistance accrue s'explique par les nombreux avantages que lui confère notamment la matrice extracellulaire des biofilms. Le biofilm favorise par exemple la communication cellulaire et la coopération, la capture de ressources nutritives, et la résistance aux molécules antimicrobiennes (Flemming et al., 2016). De plus, il a été montré que les biofilms de *Bacillus* sont le siège d'une sporulation parfois intense (Faille et al., 2014a). Les biofilms pourraient donc jouer un rôle de réservoir qui favoriserait la contamination récurrente des chaînes de transformation des industries agroalimentaires par des cellules végétatives, mais aussi des spores. Ainsi, l'analyse des surfaces d'une chaîne de production de soupes a mis en évidence la présence de souches de *Bacillus*, tant sous forme de cellules végétatives que de spores (Oomes et al., 2007). De plus, les spores de *Bacillus* produites au sein du biofilm sont fortement résistantes au processus de nettoyage en place (Faille et al., 2014a). Les biofilms présentent un environnement particulier et les conditions environnementales lors de la sporulation influencent les propriétés des spores. Les spores produites au sein d'un biofilm présenteront donc des propriétés de résistances et potentiellement des propriétés de surface et d'adhésion, différentes des spores produites en laboratoire. Il en est probablement de même pour les spores produites au niveau des surfaces des installations et exposées aux divers processus de transformation des aliments et des processus de nettoyage et désinfection.

#### **IV. Effet de l'environnement sur les propriétés des spores**

En laboratoire, les spores sont produites dans des conditions mises au point pour favoriser la sporulation et obtenir des spores ayant des propriétés homogènes. De la même manière, les spores mûres sont conservées dans des conditions contrôlées (milieu, température, stérilité). Ces conditions de sporulation et de conservation des spores sont très éloignées des conditions rencontrées par les bactéries sporulantes et les spores de *Bacillus* dans des environnements agricoles ou agro-industriels et pourraient résulter en l'obtention de spores ayant des propriétés très différentes de celles des spores présentes dans les chaînes de transformation des aliments. Les conditions rencontrées par les spores mûres pourraient elles aussi modifier les propriétés des spores. Cette section traite de l'influence des conditions environnementales rencontrées par les bactéries sporulantes et les spores mûres sur les propriétés de surface et d'adhésion des spores.

##### **A. Influence de l'environnement sur les propriétés de surface et d'adhésion des spores mûres**

Les spores sont dans un état de dormance qui peut perdurer des années. Pendant cette phase de dormance, les spores sont susceptibles d'être exposées à des conditions environnementales qui modifient leurs propriétés. Au sein des installations de transformation des industries agroalimentaires, les spores

sont soumises aux procédés de transformation des aliments et aux procédures d'hygiène. De par leurs propriétés, les spores de *Bacillus* peuvent résister à certains procédés de transformation des aliments tels que la pasteurisation lente, la fermentation ou la cuisson, et ce, dans différentes matrices alimentaires (Almada-Érix et al., 2021). Lorsqu'ils sont mal maîtrisés, les procédés d'hygiène peuvent échouer à éliminer les spores de *Bacillus*. En revanche, de tels traitements, peuvent modifier les propriétés des spores et notamment leurs propriétés de surface et d'adhésion et ainsi favoriser la récurrence des contaminations par *Bacillus*.

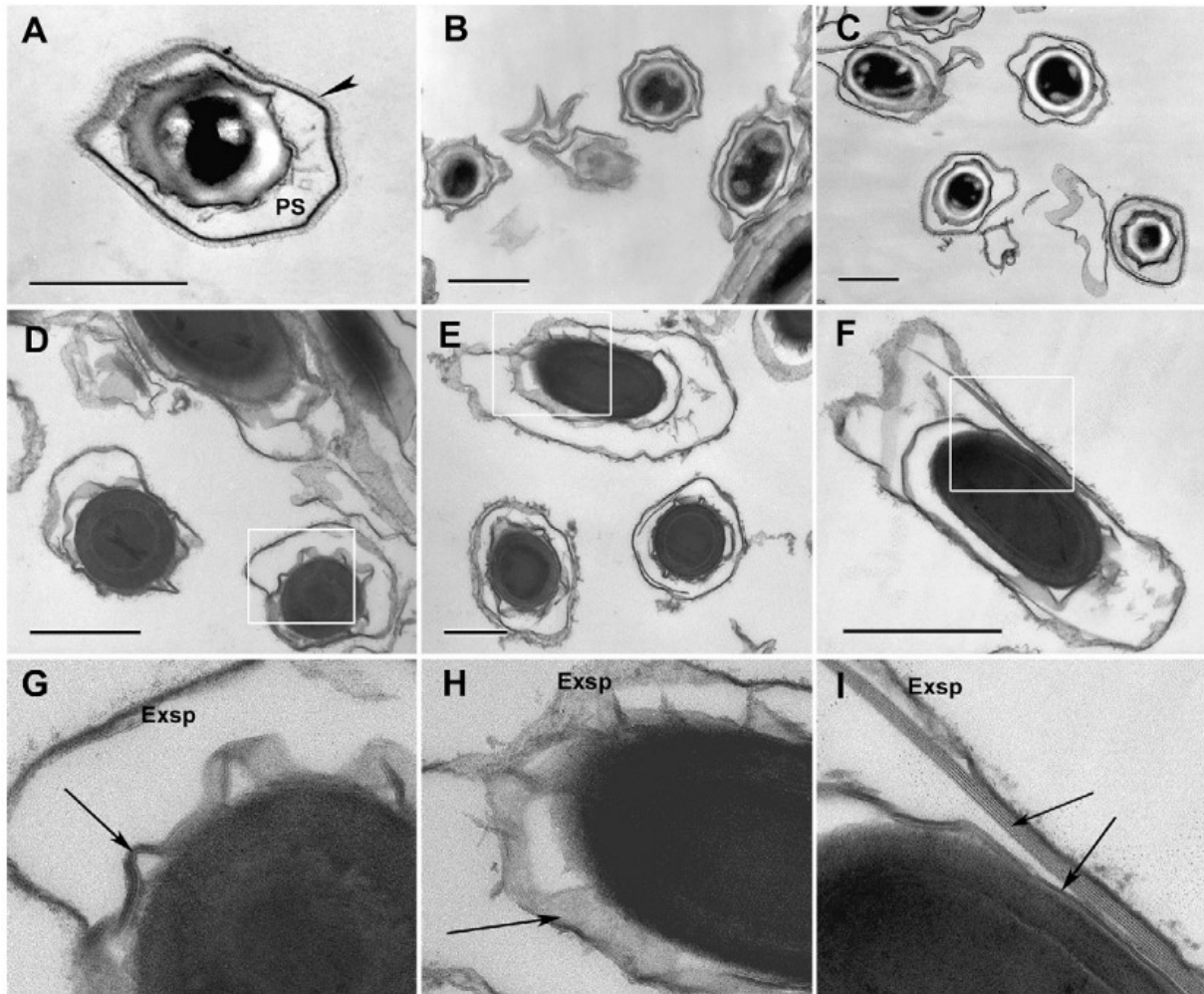
#### a) Influence de la température

Le traitement thermique est la technique la plus fréquemment utilisée dans les industries agroalimentaires pour la conservation longue durée des produits transformés. Il a été montré que des traitements thermiques qui ne détruisent pas les spores peuvent néanmoins modifier leur morphologie et leur physico-chimie de surface (Wiencek et al., 1990; Li et al., 2013). En utilisant un microscope à force atomique avec une pointe à la température contrôlée, il a été montré que la chaleur sèche modifie la structure de l'exosporium des spores de *B. anthracis* (Li et al., 2013). Des nanostructures en forme de vésicules d'environ 10 nm de diamètre se forment sur la surface des spores à environ 85°C et leur diamètre augmente avec la température de chauffage. La surface des spores semble aussi plus rigide après chauffage. Chez *B. subtilis*, il a également été montré que les spores deviennent plus hydrophobes après une exposition à une chaleur humide (entre 75°C et 100°C) (Wiencek et al., 1990). Des résultats similaires ont été mis en évidence plus récemment sur des spores de *B. subtilis* et sur des spores de différentes espèces dont *B. licheniformis* ayant subi un traitement de 10 min à 85°C (Faille et al., 2002b; Furukawa et al., 2005). Ces modifications de surface qui ont lieu à haute température affectent probablement les phénomènes aux interfaces spores/matériaux (nombre de spores adhérentes, force d'adhésion, résistance au décrochement), mais peu de données sont disponibles dans la littérature. Une faible augmentation du nombre de spores adhérentes et de leur résistance ultérieure à une procédure de nettoyage a par exemple été observée avec des spores de *B. subtilis* après 10 min à 85°C (Faille et al., 2002b). Chez *B. cereus*, *B. licheniformis* et *B. coagulans* l'exposition à la chaleur humide est aussi associée à une augmentation de l'hydrophobicité des spores (Furukawa et al., 2005). Cette augmentation de l'hydrophobicité des spores entraîne la formation d'amas de spores qui permettent aussi de protéger les spores de traitements thermiques ultérieurs. Ainsi, l'ajout de Tween 80 lors du chauffage permet d'empêcher la formation des agrégats de spores et ainsi d'améliorer le taux d'inactivation.

#### b) Influence d'un traitement à la soude

Un des principaux agents alcalins utilisés lors des procédures de nettoyage en place mise en œuvre dans les agro-industries est la soude à haute température. Une étude de 2010 s'est portée sur l'influence de la soude à haute température sur la structure de l'exosporium, le taux de survie et les propriétés de surface et d'adhésion des spores de *B. cereus* (Faille et al., 2010b). Le traitement d'une suspension de spores de *B. cereus* par 0.5% d'hydroxyde de sodium à 60°C pendant 30 minutes, entraîne de légères modifications de la morphologie des appendices de l'exosporium. Ces modifications ne sont

pas observées lorsque les spores sont exposées à de l'eau chaude ou à de la soude non chauffée. Le traitement des spores par de l'hydroxyde de sodium à 2% à 80°C entraîne quant à lui des modifications marquées de la surface des spores mais aussi du manteau et une perte des appendices présents à la surface des spores ainsi que de la majorité de la brosse superficielle de l'exosporium, majoritairement composée de la glycoprotéine BclA. Bien que l'exosporium reste toujours observable à la surface de plus de 90% des spores (**Figure 28**), les modifications superficielles (appendice, BclA) s'accompagnent d'une diminution de l'adhésion des spores aux surfaces.



**Figure 28 : Observations en microscopie électronique de l'impact d'un traitement à l'hydroxyde de sodium 2% à 80°C sur des spores de *B. cereus* après coloration au rouge de ruthénium d'après Faille et al. 2010 . Spores non traitées (A-C) ou traitées avec du NaOH à 2% à 80°C (D-I). *B. cereus* 98/4 (A, D, G), *B. cereus* ATCC 14579T (B, E, H), *B. cereus* D6 (C, F, I).**

### c) Influence des forces de cisaillement

Au cours des procédés de transformation mais aussi des procédures de nettoyage, les spores sont aussi soumises à des forces de cisaillement dues aux écoulements des aliments et des détergents/désinfectants. Chez *B. cereus*, il a été montré que lorsque des spores sont soumises à des contraintes de cisaillement, correspondant à une circulation dans un circuit à 300 l/h pendant 4 heures,

l'exosporium de près de 40% des spores de *B. cereus* ATCC 14579 est partiellement ou totalement déchiré (Faille et al., 2007). La sensibilité aux forces de cisaillement semble varier en fonction des souches puisque seulement 22% des spores de *B. cereus* 98/4 ont été affectées. Ces spores endommagées sont plus hydrophobes que les spores non traitées et sont moins adhérentes aux surfaces mais plus résistantes à une procédure de nettoyage.

d) Influence de la pression.

Des méthodes alternatives aux traitements thermiques sont explorées afin d'assurer l'élimination des micro-organismes sans modifier la saveur ou la teneur en nutriments des aliments. C'est le cas des traitements par dioxyde de carbone sous pression ou par pression hydrostatique. Lorsque des spores de *B. subtilis* sont exposées à ces traitements, une augmentation de leur hydrophobicité est observée, sans modification de leur charge (Noma et al., 2018). Cette augmentation de l'hydrophobicité est aussi accompagnée de la formation d'amas de spores comme observé lors des traitements à la chaleur humide.

L'ensemble de tous ces résultats suggère qu'au cours des procédés de transformations des aliments ou lors des processus de nettoyage et décontamination des surfaces dans les industries agroalimentaires, les traitements pourraient échouer à détruire la totalité des spores présentes et pourraient même entraîner des modifications de leurs propriétés de surface. Il est néanmoins important de noter que les spores ayant survécu à un traitement thermique sont parfois endommagées, ce qui résulte en une sensibilité accrue aux conditions environnementales (température, présence de sels...) qui peut induire un ralentissement, voire une inhibition de leur capacité à germer et à se multiplier ultérieurement (Faille et al., 1997, 1999).

B. Influence des conditions de sporulation sur les propriétés des spores

Dans des conditions de culture adaptées, la sporulation de *B. subtilis* est initiée lors de la phase de transition entre la phase exponentielle et la phase stationnaire de croissance et elle s'achève après 8 à 10 heures par la libération d'une spore mûre. Le processus de sporulation est donc relativement long et sa durée pourrait être augmentée dans des conditions de croissance suboptimales. Pendant le processus de sporulation, les bactéries sporulantes sont soumises aux conditions environnementales qui peuvent moduler les propriétés des spores (Bressuire-Isoard et al., 2018). Or, les spores contaminant les aliments peuvent provenir d'environnements très variés tels que le sol, la surface des végétaux, ou des environnements agro-industriels, comme les sites d'élevages, les abattoirs ou les ateliers de transformation. Au sein des chaînes de transformation, des cellules sporulantes de *Bacillus* sont présentes dans la matrice alimentaire ou sur les surfaces des équipements sous la forme de cellules isolées, de micro-colonies ou de biofilms (Oomes et al., 2007; Faille et al., 2014a). Ces cellules sporulantes sont donc exposées à des conditions environnementales très variées, souvent éloignées des conditions utilisées dans les laboratoires. Ces conditions suboptimales pourraient modifier les propriétés des spores libérées à l'issue de la sporulation. Plusieurs études ont ainsi évalué l'impact sur les spores

de certains paramètres importants lors de la sporulation, en se concentrant essentiellement sur les propriétés de résistance des spores.

#### a) Influence de la température

Que ce soit en environnement naturel ou dans les environnements agro-industriels, la sporulation peut se produire à des températures très différentes. De nombreuses études ont mis en évidence qu'une élévation de la température pendant la sporulation, dans une gamme raisonnable, se traduisait par une obtention de spores plus résistantes à un traitement thermique. Par exemple, chez *B. subtilis*, les propriétés de résistance à la chaleur de spores préparées à différentes températures ont été comparées (Melly et al., 2002). Les spores préparées à 37°C et 48°C présentent une meilleure résistance à la chaleur humide que les spores préparées à 22°C et 30°C. Des résultats similaires ont été obtenus sur des spores de *B. licheniformis* pour des températures de sporulation entre 30°C et 52°C (Raso et al., 1995). Les quantités de protéines SASP ne varient pas selon la température de sporulation, contrairement au niveau de déshydratation du cœur de la spore, qui augmente avec la température de sporulation (Melly et al., 2002). La forte déshydratation du cœur peut expliquer la résistance accrue des spores à la chaleur humide. Les spores préparées à une plus haute température sont également plus résistantes au peroxyde d'hydrogène, au glutaraldéhyde et à la bétadine. La résistance accrue des spores à ces agents chimiques a d'abord été imputé à une modification des tuniques. En effet, lorsque les bactéries sporulent à 48°C, la quantité de CotA dans la tunique externe des spores diminue fortement. Cependant, il a ensuite été montré que l'augmentation de la résistance aux agents chimiques est liée à une modification de la perméabilité de la membrane interne (Cortezzo and Setlow, 2005). Lorsque la sporulation se déroule à haute température, le ratio d'acide gras saturé en *antéiso/iso* augmente. Il en résulte une augmentation de la perméabilité de la membrane interne qui limite la diffusion des agents chimiques dans le cœur des spores.

Il a aussi été montré que la température de sporulation influence les propriétés de surface des spores de *B. subtilis* (Isticato et al., 2020). Ces auteurs ont montré que la protéine de tunique CotH est présente dans la tunique des spores lorsque la sporulation se déroule à 25 ou 37°C, alors qu'elle est absente à 42°C. Cette protéine est impliquée dans l'assemblage de protéines de la tunique externe et du crust (CotG, CotX, CotY, CotZ). En parallèle, le caractère hydrophobe des spores diminue quand la température de sporulation augmente. Lorsque la sporulation se déroule à 42°C, des expériences de Western Blot ont montré que la quantité de la protéine CotZ à la surface des spores est diminuée. CotZ est une protéine morphogénétique et une protéine de structure nécessaire à l'ancrage du crust à la surface des spores de *B. subtilis* (Chapitre II.C.a) (Bartels et al., 2019; Shuster et al., 2019a). Ainsi, l'absence de CotZ à la surface de spores est normalement associée à une diminution de l'hydrophilie, ce qui n'est pas le cas dans cette étude. Les différentes expériences de Western Blot indiquent aussi des modifications importantes de la composition du crust et de la tunique externe qui pourraient être responsables de l'augmentation de l'hydrophilie des spores. Une autre étude (Faille et al., 2007) a aussi montré que, lorsque des lots de spores de *B. cereus* ATCC 1459<sup>T</sup> sont produits à 40°C sur milieu gélosé



(Spo8-agar), 50% des spores ont un exosporium endommagé (voire pas d'exosporium) contre moins de 20% pour des lots de spores produits à 30°C. Chez une autre souche, *B. cereus* 5832, la taille de l'exosporium est plus faible quand les spores sont produites à 40°C (1,9 µm +/- 0,3 µm) que quand elles sont produites à 30°C (3,5 µm +/- 0,5 µm). Le caractère hydrophobe serait aussi affecté par la température de sporulation. Ainsi, selon une étude récente, des spores de *B. cereus* produites à température suboptimale de sporulation (25°C) sont plus hydrophobes que celles produites à leur température optimale de sporulation (42°C) (Vittoria et al., 2023). Selon ces auteurs, la température de sporulation affecterait aussi la germination des spores. En effet, les spores de *B. cereus* produites à 25°C germent plus efficacement que celles produites à 42°C.

#### b) Influence de la composition du milieu de sporulation

L'influence des matrices alimentaires en cours de sporulation sur les propriétés de surface a été peu étudiée. Une étude menée en 1990 sur des souches appartenant notamment aux espèces *B. subtilis* et *B. cereus* n'a pu mettre en évidence que des modifications mineures du caractère hydrophobe des spores produites dans différents milieux de culture (Wiencek et al., 1990). En revanche, il a été montré en laboratoire que le milieu de culture dans lequel les bactéries sporulent influence les propriétés de résistance des spores. Par exemple, *B. subtilis* produit des spores moins résistantes à l'hypochlorite de sodium ainsi qu'à la chaleur humide, mais plus riche en dipicolinate de calcium en milieu Luria-Bertani (LB) qu'en milieu 2xSG (Ghosh et al., 2019). Les différences de propriétés observées pourraient être liées à la composition en sels du milieu de sporulation. En effet, il a été montré que la disponibilité en cations divalents du milieu de culture pendant la sporulation pouvait influencer les propriétés de résistance des spores chez *B. subtilis* (Cazemier et al., 2001; Oomes and Brul, 2004; Oomes et al., 2009). Un milieu contenant du calcium, du magnésium, du manganèse, du fer et du potassium entraîne la production de spores plus résistantes à la chaleur humide chez *B. subtilis*, *B. licheniformis* et *B. coagulans* (Cazemier et al., 2001). La présence de ces ions minéraux diminuerait la teneur en eau du cœur de la spore. Par une approche transcriptomique, Oomes et ses collègues ont étudié l'effet de l'ajout de ces minéraux sur l'expression des gènes de *B. subtilis* pendant la sporulation (Oomes and Brul, 2004; Oomes et al., 2009). Ils ont montré qu'en présence de ces minéraux la transcription des gènes codant les SASP est augmentée. Ces résultats suggèrent que l'exposition des bactéries à une concentration élevée en minéraux pendant la sporulation provoque une augmentation de la concentration en protéines SASP dans le cœur des spores mûres, ce qui participerait à améliorer la résistance des spores à la chaleur humide. De plus, les auteurs ont montré que l'ajout de calcium dans le milieu entraînait l'induction de la transcription des gènes impliqués dans la sporulation. Il est intéressant de noter que dans cette condition la transcription des gènes *sps* et *cge* est activée. Ces résultats suggèrent que le calcium stimule la synthèse des glycanes du crust pendant la sporulation, ce qui pourrait avoir un impact sur les propriétés de surface et d'adhésion des spores. Mais aucune donnée concernant ces propriétés n'est disponible à ce jour dans la littérature.

La composition en acides aminés du milieu de sporulation peut également influencer les propriétés de résistance des spores (Moeller et al., 2011). Chez *B. subtilis* l'addition de cystéine, de cystine ou de thioproline lors de la sporulation conduit à la production de spores plus résistantes aux rayonnements UV-A et UV-B ainsi qu'au peroxyde d'hydrogène. L'élimination chimique des tuniques des spores produites en milieu supplémenté entraîne une résistance des spores aux radiations UV identique à celle de spores non supplémentées. Ces résultats suggèrent que ces acides aminés sont utilisés pendant la sporulation pour produire des tuniques plus résistantes, possiblement par l'intégration de ces éléments dans la tunique *via* des ponts disulfures.

Enfin, il a été montré que l'utilisation de milieux gélifiés ou de milieux liquides lors de la sporulation influence les propriétés de résistance des spores (Rose et al., 2007). Les spores de *B. subtilis* préparées en milieu liquide sont moins résistantes à la chaleur humide ainsi qu'à l'acide nitreux que des spores produites sur milieu gélifié. De façon intéressante, les proportions d'acide gras saturés *iso* et *antéiso* de la membrane interne de la spore sont différentes selon si les spores sont produites en milieu liquide ou sur milieu gélifié. Les spores produites sur milieu gélifié ont plus d'acide gras saturés de la forme *antéiso* que *iso*. La membrane interne est plus fluide et présente une meilleure perméabilité. Une autre étude a comparé des lots de spores de trois souches de *B. cereus* (ATCC 1459<sup>T</sup>, 98/4 et 5832) produits sur gélose (Spo8-agar) et en bouillon (bouillon Spo8) (Faille et al., 2007). Les auteurs ont mis en évidence la présence de nombreuses spores (53%, 45% et 26%, respectivement) présentant un exosporium endommagé dans des lots produits sur bouillon Spo8 contre moins de 20% lorsqu'ils étaient produits sur Spo8-agar. Lorsqu'il était encore présent, l'exosporium était aussi plus petit chez les spores produites en bouillon Spo8. Par exemple, la taille de l'exosporium de *B. cereus* 5832 était de 2,2 µm +/- 0,7 contre 3,5 µm +/- 0,5 µm lorsqu'elles étaient produites sur agar.

### c) Effet du pH

Dès 1997, il a été montré que la résistance thermique de spores de *B. cereus*, estimée par les valeurs de réduction décimale, augmente avec le pH, pour des valeurs comprises entre pH 6.0 et pH 8.1 (Mazas et al., 1997). Chez *B. subtilis* ATCC 31324, l'augmentation du pH de 8.0 à 10.0 pendant la sporulation provoque aussi une augmentation de la résistance thermique et aux hautes pressions des spores, alors que l'acidification du milieu à pH 6.0 n'a aucun effet (Nguyen Thi Minh et al., 2011). Chez *B. anthracis*, les spores produites à pH 5,0 sont plus résistantes à la chaleur humide que les spores produites à un pH 7,0, mais également plus résistantes à la soude et l'acide chlorhydrique (Baweja et al., 2008). Enfin, les auteurs ont montré qu'un pH basique favorise la sporulation de *B. anthracis*, et que les spores ainsi produites sont plus résistantes à la soude que les spores produites à un pH de 5,0 ou 7,0. Chez *B. subtilis* DSM 4181, le caractère hydrophobe des spores est aussi affecté par le pH du milieu de sporulation, puisqu'il augmente avec le pH pour des valeurs comprises entre 7.0 et 8.5 (Eschlbeck et al., 2017).

#### d) Effet de l'atmosphère

Peu d'informations sont disponibles dans la littérature sur l'influence de la présence en oxygène au cours de la sporulation sur les propriétés des spores. Chez *B. cereus*, il a été montré que le degré d'oxygénation du milieu de culture pendant la sporulation influence les propriétés des spores (Abbas et al., 2014). La sporulation en anaérobiose est très peu efficace chez *B. cereus*. Ainsi, les mêmes conditions de culture entraînent la production de  $8.10^8$  spores.mL<sup>-1</sup> en aérobiose et seulement  $5.10^4$  spores.mL<sup>-1</sup> en anaérobiose. Cependant, les spores produites dans cette condition sont plus résistantes à la chaleur humide que les spores produites en aérobiose. En effet, le cœur des spores produites en anaérobiose est plus riche en dipicolinate, ce qui entraîne une diminution de la teneur en eau du cœur de la spore. Les spores sont également plus résistantes à l'acide nitreux et à l'hydroxyde de sodium. Le degré d'oxygénation du milieu de culture pendant la sporulation ne semble pas influencer la taille des spores. En revanche, plus de deux tiers des spores produites en anaérobioses présentent un exosporium endommagés ou absent. Les spores ainsi produites sont donc probablement moins adhérentes aux surfaces comparées aux spores produites en aérobiose. Chez *B. atrophaeus* en revanche, la pression partielle d'oxygène pendant la sporulation n'a pas d'influence significative sur la résistance ultérieure des spores à H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Stier et al., 2020).

## Objectifs de la thèse

Comme nous venons de l'expliquer, les spores de *B. subtilis* présentent un problème majeur au sein des industries agro-alimentaires de par leur capacité à résister à des conditions environnementales extrêmes et leurs propriétés d'adhésion aux surfaces. Le crust est la couche la plus superficielle des spores et leur confère leurs propriétés de surface et d'adhésion. L'élucidation de la composition et de l'organisation du crust représente de ce fait un enjeu important dans la lutte contre ces contaminations. Si la partie protéique du crust commence à être bien décrite, ce n'est pas encore le cas de la partie glycanique. Ainsi, si plusieurs monosaccharides ont été identifiés, leur organisation exacte n'est toujours pas connue. De plus, plusieurs gènes impliqués dans la biosynthèse du crust ont été identifiés mais leur fonction doit encore être élucidée.

Ainsi, le premier objectif de cette thèse est de caractériser les gènes *sps* et *cge* impliqués dans la biosynthèse des glycanes du crust.

Le deuxième objectif est d'étudier l'influence des conditions de sporulations sur les propriétés de surface et d'adhésion des spores et de caractériser les modifications de la composition et/ou de la structure du crust des spores ainsi produites.

## Résultats

## I. Rôle des gènes *sps* et *cge* dans la biosynthèse du crust.

### A. Les gènes *sps* codent pour une voie originale de l'acide légionaminique nécessaire à l'assemblage du crust chez *Bacillus subtilis*

Afin de mieux définir le rôle des gènes *spsABCDEF* et *spsM* dans le processus de biosynthèse de la fraction glycanique du crust, des mutants des gènes *spsABCDEF* et *spsM* ont été construits dans la souche *B. subtilis* PY79. Des spores de ces mutants ont ensuite été produites et elles ont été analysées en MATH et en zétamétrie afin de mesurer leur degré d'hydrophobicité et leur charge. Les spores des deux mutants sont plus hydrophobes, moins électronégatives et plus adhérentes à l'acier inoxydable que celles de la souche PY79. Ces résultats montrent donc que les gènes *spsABCDEF* et *spsM* participent au processus de biosynthèse du crust et qu'ils ont un rôle majeur dans les propriétés physico-chimiques et d'adhésion des spores. L'observation des spores de ces mutants en MET après une coloration au rouge de ruthénium montre que le crust est absent ou beaucoup moins dense aux électrons en comparaison avec les spores de la souche PY79. Nous avons séparé et purifié le crust des spores des mutants  $\Delta$ *spsABCDEF* et  $\Delta$ *spsM*, et quantifié les oses neutres par la méthode phénol-sulfurique et analysé la composition en monosaccharides en GC-MS. La concentration en oses neutres du crust des mutants  $\Delta$ *spsABCDEF* et  $\Delta$ *spsM* est réduite de moitié par rapport à la souche parentale. En revanche, la composition en monosaccharides du crust de ces mutants est comparable à celle de la souche parentale. Ce dernier résultat indique que les gènes  $\Delta$ *spsABCDEF* et  $\Delta$ *spsM* participent à la synthèse d'un carbohydrate encore inconnu et qui est nécessaire à la formation du crust. Par une analyse bio-informatique avec le logiciel RaptorX, nous avons établi une structure tridimensionnelle prédictive des protéines SpsM, SpsA, SpsB, SpsC, SpsD, SpsE, SpsF et SpsG. Ces structures ont ensuite été comparées à des protéines de structures connues de la base de données Protein Data Bank. Sur la base de ces analyses, nous avons reconstruit une voie de biosynthèse qui présente des similitudes avec la voie de biosynthèse de l'acide pseudaminique (Pse) chez *Helicobacter pylori* et la voie de biosynthèse de l'acide légionaminique (Leg) chez *Campylobacter jejuni* (**Figure 29**) (Schoenhofen et al., 2006a, 2009). Le Pse et le Leg sont des acides nonulosoniques (NulOs), analogues des acides sialiques, qui sont essentiels à la glycosylation de la flagelline et à la virulence de *C. jejuni* et *H. pylori* (Thibault et al., 2001; Goon et al., 2003; Schirm et al., 2003; Guerry et al., 2006; Sulzenbacher et al., 2018). Pour vérifier que la surface des spores de *B. subtilis* contient des acides nonulosoniques, les glycanes du crust des spores de la souche PY79 ont été hydrolysés puis dérivés par le 1,2-diamino-4,5-méthylènedioxybenzène (DMB), un réactif fluorogène qui présente une grande spécificité pour les NulOs. L'analyse du produit de dérivaison en HPLC en phase inverse a permis de détecter un signal spécifique des NulOs. L'analyse en MS<sup>3</sup> a montré que ce composé a une masse moléculaire d'environ 450 Da, ce qui correspond à la masse

attendue du DMB-Leg ou du DMB-Pse. De plus, le temps de rétention du composé en HPLC correspond parfaitement à celui du Leg, ce qui indique que le crust des spores de *B. subtilis* contient du Leg. Par la même approche, nous avons montré que le Leg est absent du crust des spores des mutants  $\Delta spsM$  et  $\Delta spsABCDEF$ , ce qui indique que le gène *spsM* et au moins l'un des gènes *spsABCDEF* sont nécessaires à la biosynthèse du Leg.

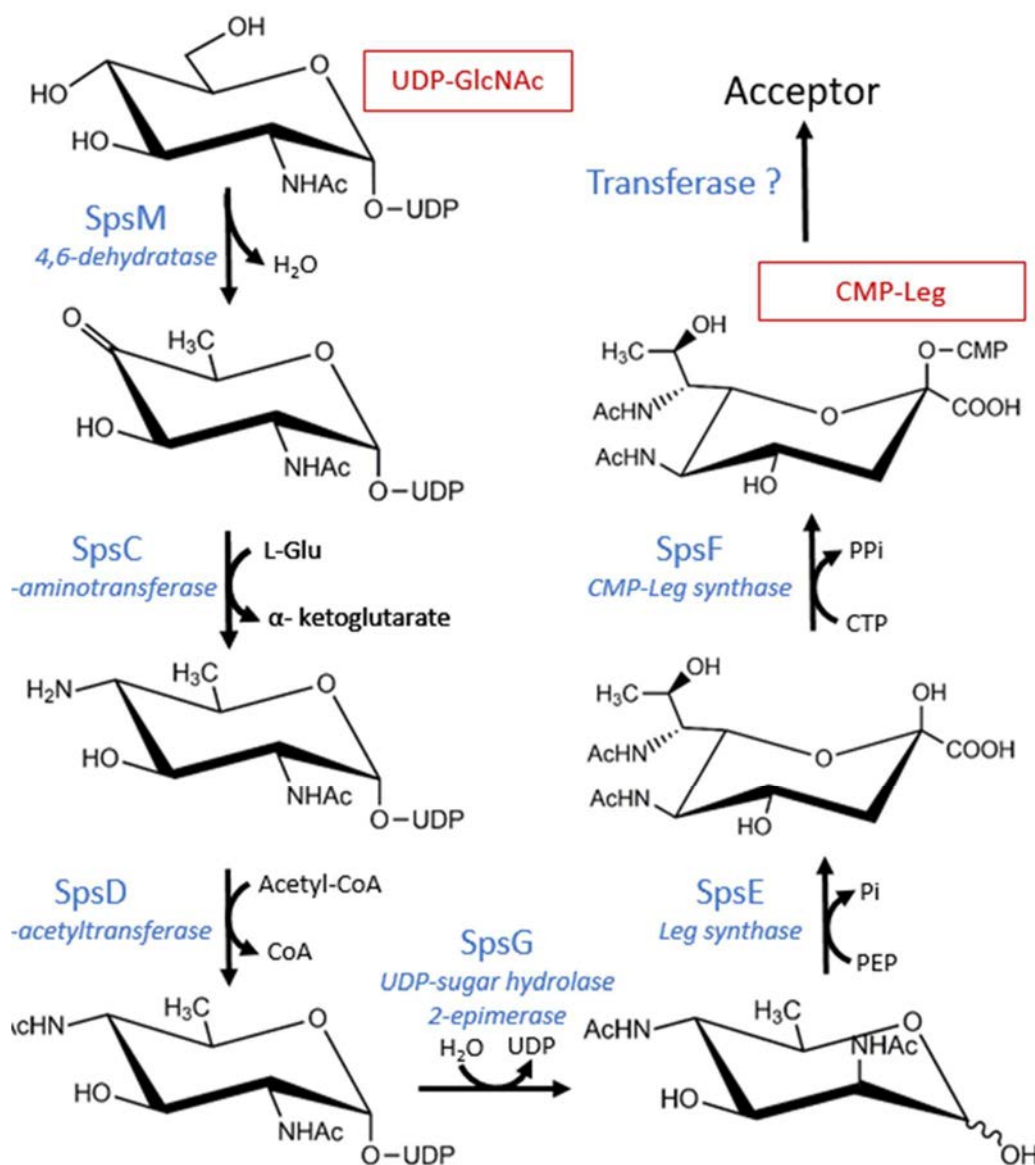


Figure 29 : Voie de biosynthèse de l'acide legionaminique chez *B. subtilis*.

Afin de valider la voie de biosynthèse du Leg proposée dans la **Figure 29**, nous avons caractérisé l'activité de l'enzyme SpsM qui est potentiellement la première enzyme de la voie du Leg. Par des expériences de mutagenèse dirigée, nous avons identifié le site actif de l'enzyme, qui est caractéristique des enzymes de la famille SDR (Short-chain dehydrogenase reductase). Ces enzymes ont en commun une activité C4/C6 déhydratase et elles ont pour substrat le GlcNAc activé par un nucléotide. Cependant,

l'activité des enzymes de la famille SDR varie d'une enzyme à l'autre. Chez *C. jejuni*, par exemple, l'enzyme PglF a seulement une activité C4/C6 déshydratase alors que l'enzyme PseB a une activité C5 épimérase supplémentaire (Schoenhofen et al., 2006b). Pour mieux définir l'activité de SpsM, des gènes issus de différents micro-organismes, codant des enzymes de la famille SDR, ont été introduits en trans dans le chromosome d'un mutant  $\Delta$ spsM. L'effet de l'ajout de ces gènes sur la synthèse du Leg a ensuite été mesurée. Cette approche a permis de montrer que SpsM catalyse la déshydratation en C4 et en C6 de l'UDP-GlcNAc pour produire de l'UDP-4-keto-6-deoxy-GlcNAc et elle confirme que SpsM est la première enzyme de la voie de biosynthèse du CMP-Leg chez *B. subtilis*. Nous avons ensuite voulu vérifier l'implication des gènes *spsC*, *spsD*, *spsG*, *spsE* et *spsF* dans le processus de biosynthèse du Leg. Nous avons montré que la synthèse du Leg est abolie dans les mutants  $\Delta$ spsC,  $\Delta$ spsD,  $\Delta$ spsG et  $\Delta$ spsE. En revanche, dans le cas du mutant  $\Delta$ spsF, le Leg est synthétisé dans la cellule mère des bactéries sporulantes mais il n'est pas transféré à la surface de la préspore. Ce résultat est en accord avec la fonction prédite de SpsF. En effet, SpsF est une potentielle cytidylyltransférase dont la fonction serait d'activer le Leg en CMP-Leg. Or, l'activation du Leg est indispensable à la prise en charge et au transfert du Leg à la surface des spores par la/les sialyltransférase(s). L'ensemble de ces données valide la voie de biosynthèse proposée dans la **Figure 29**.

Nous avons enfin cherché à identifier la/les sialyltransférase(s) qui transfèrent le Leg de la cellule mère à la surface de la préspore pendant la sporulation. Les gènes *spsA* et *spsB* codent des glycosyltransférases putatives. Les glycosyltransférases représentent une sous-classe d'enzymes qui catalysent la synthèse des liaisons glycosidiques par le transfert d'un monosaccharide d'un substrat donneur activé à un accepteur. Les protéines SpsA et SpsB sont donc des candidates pour le transfert du CMP-Leg à la surface de la préspore. Pour tester cette hypothèse, des spores des mutants  $\Delta$ spsA et  $\Delta$ spsB ont été produites. Les spores des deux souches mutantes sont moins hydrophiles et moins chargées négativement que les spores de la souche PY79. Cela indique que les gènes *spsA* et *spsB* sont impliqués dans la maturation de la surface des spores. En revanche, nos résultats indiquent que la quantité de Leg dans le crust des mutants  $\Delta$ spsA et  $\Delta$ spsB est similaire à celle de la souche PY79, ce qui indique que les gènes *spsA* et *spsB* ne sont pas nécessaires pour le transfert de Leg à la surface des spores de *B. subtilis*.

L'ensemble de ces résultats a permis de mettre en évidence, chez *B. subtilis*, une nouvelle voie de biosynthèse du Leg et de démontrer que cet acide nonulosonique est nécessaire pour un assemblage correct du crust. Ce travail contribue à la description de la structure et de la composition des spores de *Bacillus* qui est en cours depuis des décennies et il fournit des clés pour comprendre l'importance des glucides dans l'adhésion et la persistance de *Bacillus* dans l'industrie alimentaire. Ces travaux ont été publiés dans le journal mBio en 2020.





# The *sps* Genes Encode an Original Legionaminic Acid Pathway Required for Crust Assembly in *Bacillus subtilis*

Thomas Dubois,<sup>a</sup> Frederic Krzewinski,<sup>b</sup> Nao Yamakawa,<sup>c</sup> Christelle Lemy,<sup>a</sup> Audrey Hamiot,<sup>a</sup> Loïc Brunet,<sup>c</sup> Anne-Sophie Lacoste,<sup>c</sup> Yuri Knirel,<sup>d</sup> Yann Guerardel,<sup>b</sup> Christine Faille<sup>a</sup>

<sup>a</sup>University Lille, CNRS, INRAE, Centrale Lille, UMR 8207—UMET—Unité Matériaux et Transformations, Lille, France

<sup>b</sup>University Lille, CNRS, UMR 8576—UGSF—Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, Lille, France

<sup>c</sup>University Lille, CNRS, INSERM, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, US 41—UMS 2014—PLBS, Lille, France

<sup>d</sup>N.D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

**ABSTRACT** The crust is the outermost spore layer of most *Bacillus* strains devoid of an exosporium. This outermost layer, composed of both proteins and carbohydrates, plays a major role in the adhesion and spreading of spores into the environment. Recent studies have identified several crust proteins and have provided insights about their organization at the spore surface. However, although carbohydrates are known to participate in adhesion, little is known about their composition, structure, and localization. In this study, we showed that the spore surface of *Bacillus subtilis* is covered with legionaminic acid (Leg), a nine-carbon backbone nonulosonic acid known to decorate the flagellin of the human pathogens *Helicobacter pylori* and *Campylobacter jejuni*. We demonstrated that the *spsC*, *spsD*, *spsE*, *spsG*, and *spsM* genes of *Bacillus subtilis* are required for Leg biosynthesis during sporulation, while the *spsF* gene is required for Leg transfer from the mother cell to the surface of the forespore. We also characterized the activity of SpsM and highlighted an original Leg biosynthesis pathway in *B. subtilis*. Finally, we demonstrated that Leg is required for the assembly of the crust around the spores, and we showed that in the absence of Leg, spores were more adherent to stainless steel probably because of their reduced hydrophilicity and charge.

**IMPORTANCE** *Bacillus* species are a major economic and food safety concern of the food industry because of their food spoilage-causing capability and persistence. Their persistence is mainly due to their ability to form highly resistant spores adhering to the surfaces of industrial equipment. Spores of the *Bacillus subtilis* group are surrounded by the crust, a superficial layer which plays a key role in their adhesion properties. However, knowledge of the composition and structure of this layer remains incomplete. Here, for the first time, we identified a nonulosonic acid (Leg) at the surfaces of bacterial spores (*B. subtilis*). We uncovered a novel Leg biosynthesis pathway, and we demonstrated that Leg is required for proper crust assembly. This work contributes to the description of the structure and composition of *Bacillus* spores which has been under way for decades, and it provides keys to understanding the importance of carbohydrates in *Bacillus* adhesion and persistence in the food industry.

**KEYWORDS** *Bacillus subtilis*, bacterial adhesion, crust, legionaminic acid, nonulosonic acid, spores

The *Bacillaceae* are able to engage in a process of cellular differentiation called sporulation, which results in the formation of a mature spore capable of surviving adverse environmental conditions and of being dispersed into the environment. Because of these properties, *Bacillus* spores are ubiquitous in the environment and

**Citation** Dubois T, Krzewinski F, Yamakawa N, Lemy C, Hamiot A, Brunet L, Lacoste A-S, Knirel Y, Guerardel Y, Faille C. 2020. The *sps* genes encode an original legionaminic acid pathway required for crust assembly in *Bacillus subtilis*. mBio 11:e01153-20. <https://doi.org/10.1128/mBio.01153-20>.

**Editor** Eleftherios T. Papoutsakis, University of Delaware

**Copyright** © 2020 Dubois et al. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution 4.0 International license](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Address correspondence to Thomas Dubois, [thomas.dubois@inrae.fr](mailto:thomas.dubois@inrae.fr).

**Received** 5 May 2020

**Accepted** 6 July 2020

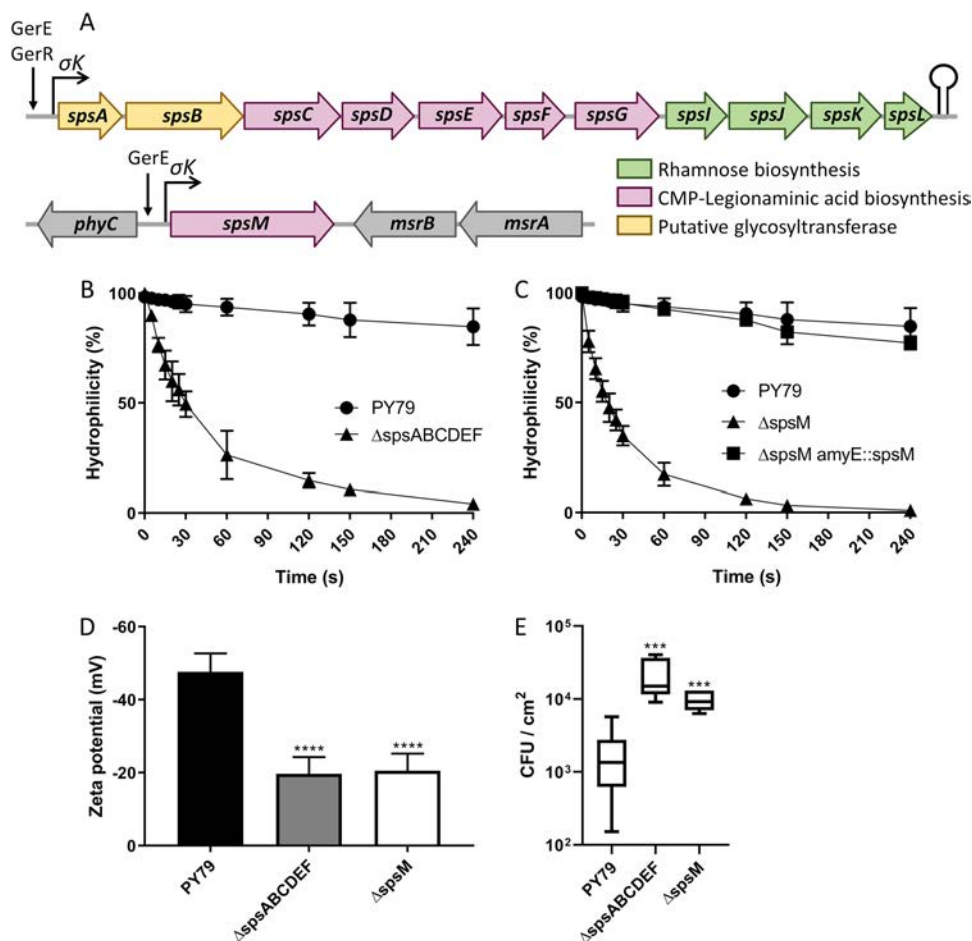
**Published** 18 August 2020

contaminate many raw materials of the food industry, e.g., in the dairy industry, causing heavy economic losses and a health risk to consumers (1).

The *Bacillus* spore consists of a series of concentric layers. Its core contains highly condensed DNA wrapped around proteins called “small soluble acid proteins,” which protect the DNA from physicochemical stresses. The core is surrounded by an inner membrane and a germ cell wall that are themselves covered by a spore-specific peptidoglycan called cortex (2, 3). The cortex is surrounded by an outer membrane, which is itself surrounded by the three-layered coat, composed of at least 80 different proteins (4). The coat proteins are recruited and assembled by morphogenetic proteins, with at least one morphogenetic protein per coat layer: SpoIVA for the basement layer, SafA for the inner coat, and CotE for the outer coat (5–8). In *Bacillus subtilis* and most of the *Bacillus* strains producing spores devoid of an exosporium, the outermost layer of spores is the crust (9). It is made of proteins and carbohydrates, and it plays a major role in the surface and adhesion properties of spores (9). Thus, the mechanical removal of the crust renders the spore less hydrophilic and more adherent to stainless steel (9). Therefore, the presence or absence of this outermost layer could determine the spreading properties of *B. subtilis* spores and their resistance to the cleaning-in-place procedures used in food industries (1, 10).

At least six proteins have been identified as constituents of the crust: CotV, CotW, CotX, CotY, CotZ, and CgeA (11–15). The crust structure is mainly provided by the CotV, CotX, and CotY proteins, among which, CotY would be the major structural component (15). Interestingly, CotV and CotX share homologue domains and putative *N*-glycosylation motifs, which make these proteins candidates for glycosylation (15). McKenney and colleagues suggested that CotX, CotY, and CotZ are the crust morphogenetic proteins (12), and recent studies have confirmed that these proteins play a major role in crust assembly (14, 15). CotZ could be the main morphogenetic protein, since it is involved in the proper localization of most of the crust proteins (14). CotV could also be involved in the crust assembly by propagating the crust structure from the polar cap-like structure to the middle part of the spore (15). CotZ, which required CotE and CotO but none of the crust proteins for localization, seems to have an important anchoring function for the crust in addition to its assembly function (15). CotW plays a role in maintaining the structural integrity of the crust and might play an anchoring role at the interface of crust and coat (14, 15). Finally, transmission electron microscopy (TEM) experiments showed that the crust of the *cotX* and *cgeA* mutants is assembled, but only loosely attached to spores, thus suggesting that CgeA and CotX play roles in the interaction of the crust with the coat (14).

While the crust protein interaction network begins to be better described, the localization, nature, and structure of the glycans on the spore surface remain mostly unknown. It was shown that the spore surface of *B. subtilis* contains at least rhamnose, galactose, quinovose, glucosamine, and muramic lactam (9, 16). Although the structure of the glycans composed of these monosaccharides is unknown, it was suggested that the spore surface contains at least two different glycans: one associated with the outer coat and at least one other linked to the crust (15, 17). The *spsM*, *spsABCDEFGHIJKL*, *yfnHGFED*, *ytdA-ytcABC*, and *cgeAB-cgeCDE* genes were identified as participating in the morphology and the surface properties of the crust (15–18). Mutations in the *sps* genes result in the production of less hydrophilic spores, devoid of perceivable halo after negative staining with India ink, thus suggesting these genes play a role in spore surface glycosylation (16–18). Contrastingly, mutations in each of the *yfnHGFED* genes do not affect the spore hydrophilicity but modify the crust structure and expand the glycan layer (15, 17). Finally, spores of a *cgeD* mutant strain are less hydrophilic and the superficial saccharide layer is expanded, just as it is with the mutants of the *yfnHGFED* genes (17). These data resulted in the identification of some of the enzyme-encoding genes that synthesize the superficial spore glycans. However, to date, both these genes' functions and the biosynthetic pathway in which they are involved remain unknown, with the notable exception of the *spsIJKL* genes, known to encode the biosynthesis pathway converting D-glucose-1-phosphate to dTDP-L-rhamnose (19–23).



**FIG 1** The *sps* genes participate in the surface and adhesion properties of *B. subtilis* spores. (A) Schematic representation of the *spsABCDEF* and *spsM* genes in *B. subtilis* PY79. Transcriptional activators and promoters are shown with arrows and broken arrows, respectively. Potential stem-loop structure is indicated with a lollipop. The annotation of the *sps* genes is presented in Table S1 in the supplemental material. (B) Surface hydrophilicity of spores of the PY79 and PY79  $\Delta$ *spsABCDEF* ( $\Delta$ *spsABCDEF*) strains evaluated by MATH assays. (C) Surface hydrophilicity of spores of the PY79, PY79  $\Delta$ *spsM* ( $\Delta$ *spsM*), and PY79  $\Delta$ *spsM amyE::spsM* ( $\Delta$ *spsM amyE::spsM*) strains. (D) Surface charge of spores evaluated by zetametry assays. (E) Adhesion of spores to stainless steel coupons. The results are expressed in CFU per square centimeter of stainless steel. The data are averages from at least three independent experiments performed with spores prepared independently. The error bars represent the standard deviations (SDs) of the means. \*\*\*,  $P \leq 0.001$ ; \*\*\*\*,  $P \leq 0.0001$  for  $\Delta$  versus PY79 by Mann-Whitney test.

Here, we sought to define the functions of the *sps* genes and their roles in crust biosynthesis. Through an approach that combines genetic and biochemical methods, we demonstrated that six of the *sps* genes encode an original CMP-legionaminic acid (CMP-Leg) pathway, and we showed that legionaminic acid (Leg) is required for proper crust assembly. This work contributes to a better understanding of the outermost spore layer composition and structure that influence the adhesion and spreading of *B. subtilis* in the environment.

## RESULTS

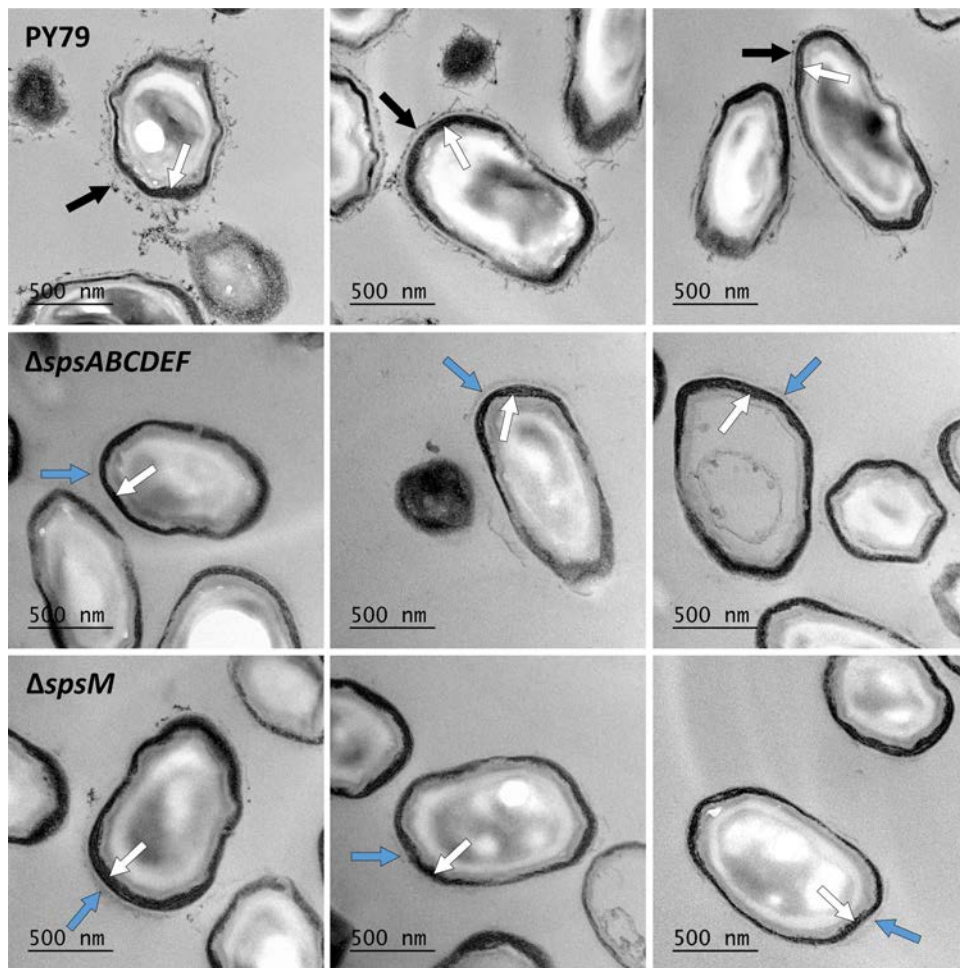
**The *sps* genes contribute to the surface and adhesion properties of *Bacillus subtilis* spores.** The *sps* genes are distributed in two loci on the *B. subtilis* chromosome (Fig. 1A). The first locus contains the *spsABCDEF* genes and the second contains the *spsM* gene. The two loci are transcribed in the mother cell from  $\sigma^K$ -dependent promoters located upstream from the *spsA* and *spsM* genes (16, 18, 24–26). This transcriptional regulation indicates that the products of the *sps* genes are produced concomitantly in the mother cell during the late stage of sporulation. To evaluate the role of the *sps* genes, mutant strains of the *spsABCDEF* and *spsM* genes were con-

structed in the *B. subtilis* PY79 strain (subsequently named PY79). Spores were produced, and their surface properties were characterized. The hydrophilicity of the spores was assessed through microbial-adhesion-to-hydrocarbons (MATH) (Fig. 1B and C). Most PY79 spores remained in the aqueous phase throughout the MATH experiment, which reflected a marked hydrophilic character. In contrast, the percentage of spores in the aqueous layer for the  $\Delta spsABCDEF$  and  $\Delta spsM$  mutant strains decreased over time and tended toward zero after 240 s of agitation. These results indicate that the  $\Delta spsABCDEF$  and  $\Delta spsM$  mutant strains are less hydrophilic than the PY79 strain, as is consistent with previous studies (16–18). In addition, the complementation of the  $\Delta spsM$  mutant strain restored the hydrophilic properties of the PY79 strain (Fig. 1C). This indicates that the phenotype observed with the  $\Delta spsM$  mutant strain is not due to a polar effect of the mutation on flanking genes expression. The overall spore charge at neutral pH was then evaluated using zetametry (Fig. 1D). The zeta potentials of the  $\Delta spsABCDEF$  and  $\Delta spsM$  spores were around  $-20$  mV, indicating that they are less charged than the PY79 spores ( $-46.4$  mV). These data demonstrate that the *spsABCDEF* and *spsM* gene products contribute to the hydrophilicity and the negative charge of spores that may lead to changes in spore adhesion properties. The role of the *sps* genes in the adhesion of spores to stainless steel coupons was therefore examined (Fig. 1E). With the PY79 strain, an average of  $1.8 \times 10^3$  spores adhered to the stainless-steel coupons, while 12 and 5 times more spores adhered with the  $\Delta spsABCDEF$  and  $\Delta spsM$  mutant strains, respectively, thus indicating that the *sps* gene products influence spore adhesion properties.

**The *sps* genes are required for crust assembly.** The surface and adhesion properties of spores of the  $\Delta spsABCDEF$  and  $\Delta spsM$  mutant strains were very similar to those of spores lacking the crust (see Fig. S1 in the supplemental material), which suggests that the *sps* genes are important for proper crust assembly. To test this assumption, the spore morphology of the PY79,  $\Delta spsABCDEF$ , and  $\Delta spsM$  strains was observed by TEM using spore sections contrasted with ruthenium red. This staining enables the observation of the carbohydrate-rich layer on the spore surface (27). The crust forms an exosporium-like structure that is clearly visible for PY79 spores (black arrows) (Fig. 2). This exosporium-like structure was no longer observed on the spore surfaces of the  $\Delta spsABCDEF$  and  $\Delta spsM$  mutant strains, thereby confirming that the *sps* genes are required for proper crust assembly. However, a loose low-contrast material was still visible, mostly at the spore poles (blue arrows). This could be reminiscent of a polar cap-like structure from which the crust propagates to the middle part of the spore. These observations suggest that the products of the *sps* genes participate in the propagation of the crust or in anchoring the crust to the outer coat.

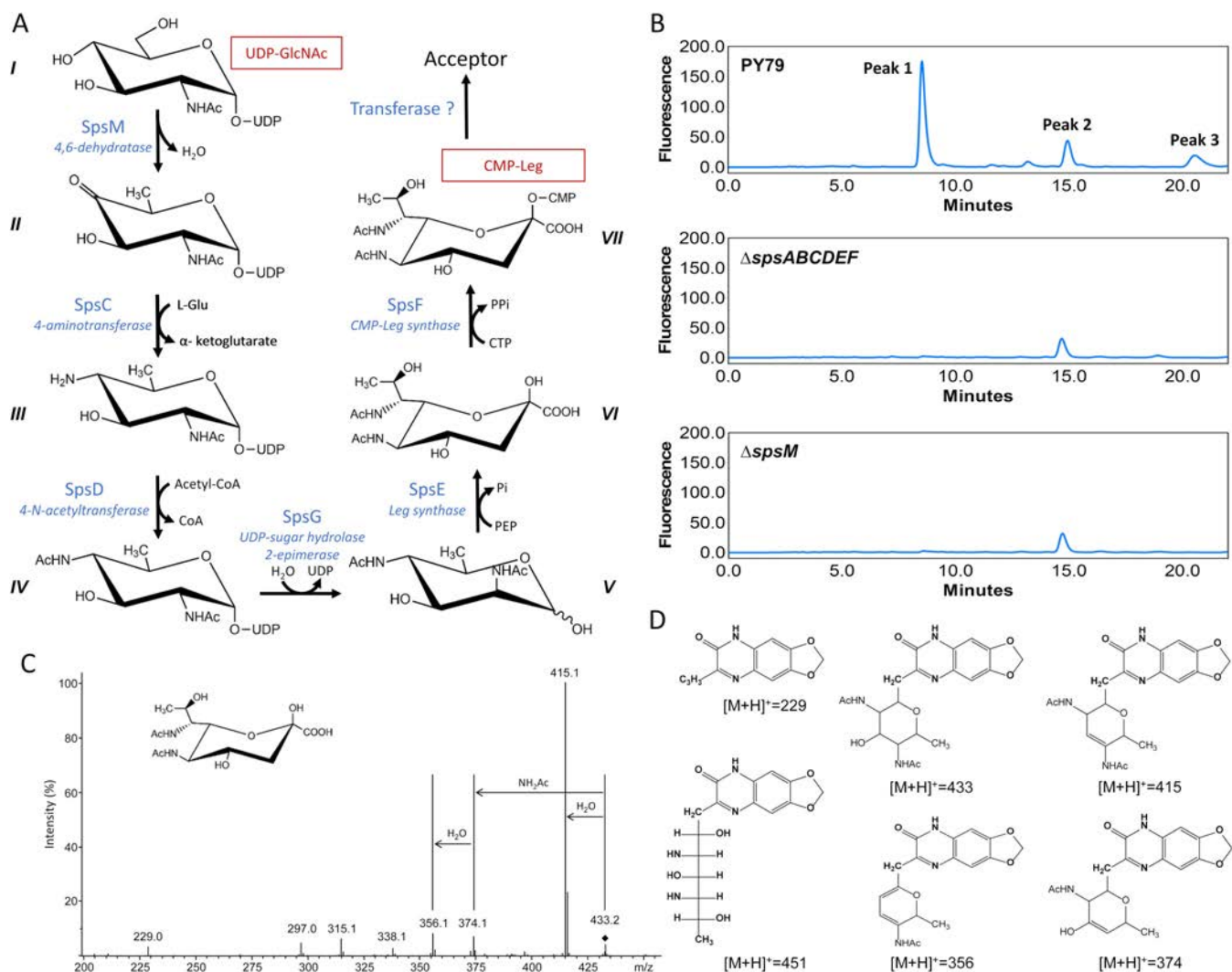
**The *sps* genes participate in spore surface glycosylation.** The function of the enzymes encoded by the *sps* genes and the biosynthetic pathways in which these enzymes are involved have not been described. To better define the role of the *sps* genes, the amount of neutral sugars on the PY79 spore surface was measured. For this purpose, spores were mechanically treated with a French press to remove their surface fraction without damaging the spore coat (9). This surface fraction contains the crust proteins and the potentially associated carbohydrates as well as the constituents located between the outer coat proteins and the crust. The amount of neutral sugars in the surface fraction was then measured by the phenol-sulfuric method (28) (see Fig. S2). It was significantly lower in the surface fraction of the  $\Delta spsABCDEF$  and  $\Delta spsM$  mutant strains than in the PY79 strain. Knowing the putative function of the *sps* genes (Table S1), this might indicate that the *spsABCDEF* and *spsM* genes are involved in the production or the attachment of one or several neutral sugars on the spore surface. However, given that the  $\Delta spsABCDEF$  and  $\Delta spsM$  mutant strains lack most of the crust (Fig. 2), it is also possible that the neutral sugar decrease was an indirect consequence of the crust assembly defect, such as the loss of one or several crust-linked glycan(s).

**The surface fraction of spores contains legionaminic acid.** Similar phenotypes being obtained with the  $\Delta spsABCDEF$  and  $\Delta spsM$  mutant strains, these genes probably



**FIG 2** The *sps* genes are required for crust assembly. TEM images of spore sections after ruthenium red staining. The experiments were performed with the spores of the PY79, PY79  $\Delta$ *spsABCDE* ( $\Delta$ *spsABCDE*), and PY79  $\Delta$ *spsM* ( $\Delta$ *spsM*) strains. White arrows, coat layers; black arrows, crust; blue arrows, cap-like structures.

participate in the same carbohydrate biosynthetic pathway. To better understand the role of the Sps proteins in the spore surface glycosylation, *in silico* analysis was performed using RaptorX software with the primary sequences of the SpsA-G and SpsM proteins (29). The RaptorX software predicts a tridimensional structure of a query sequence and compares this predicted structure to known protein structures from the Protein Data Bank. The outputs of this analysis are presented in Table S1 and they are further described in the discussion section. By using gene annotations and RaptorX predictions, a predictive biosynthetic pathway was constructed (Fig. 3A). This pathway is reminiscent of the pseudaminic acid (Pse) biosynthetic pathway of *Helicobacter pylori* and the Leg biosynthetic pathway of *Campylobacter jejuni* (30, 31). Pse and Leg are nine-carbon-backbone sialic acid analogs known to be crucial for flagellin glycosylation and virulence of *C. jejuni* and *H. pylori* (32–36). To ensure that the spore surface contains sialic acid-related compounds, the potential nonulosonic acids (NulOs) from the surface fraction of the PY79 strain were derivatized by 1,2-diamino-4,5-methylenedioxybenzene (DMB), a fluorogenic reagent that shows high specificity for NulOs, and analyzed by reverse-phase high-performance liquid chromatography coupled to fluorescence detector (RP-HPLC-FL) (Fig. 3B). RP-HPLC-FL analysis showed three peaks with retention times of ~8.5 min (peak 1), 14.9 min (peak 2), and 20.5 min (peak 3), which were then analyzed in liquid chromatography mass spectrometry (LC-MS). Unlike in peaks 2 and 3, an MS signal at  $m/z$  451 was identified in peak 1, corresponding to the  $[M+H]^+$  adduct of a compound with a molecular mass of 450.25 Da (data not shown).



**FIG 3** The *sps* genes encode a pathway required for legionaminic acid addition on the spore surface of *B. subtilis*. (A) Predicted Leg pathway in *B. subtilis*: I, UDP-*N*-acetyl- $\alpha$ -D-glucosamine (UDP-GlcNAc); II, UDP-2-acetamido-2,6-dideoxy- $\alpha$ -D-xylo-hexose-4-ulose (UDP-4-keto-6-deoxy-GlcNAc); III, UDP-4-amino-4,6-dideoxy-*N*-acetyl- $\alpha$ -D-glucosamine (UDP-4-amino-6-deoxy-GlcNAc); IV, UDP-2,4-diacetamido-2,4,6-trideoxy- $\alpha$ -D-glucose (UDP-2,4-diNac-6-deoxy-Glc); V, 2,4-diacetamido-2,4,6-trideoxy-D-mannose (2,4-diNac-6-deoxy-Man); VI, 5,7-diacetamido-3,5,7,9-tetrahydroxy- $\beta$ -D-glycero- $\beta$ -D-galactono-1,5-lactone (legionaminic acid or Leg); VII, CMP-5,7-diacetamido-3,5,7,9-tetrahydroxy- $\beta$ -D-glycero- $\beta$ -D-galactono-1,5-lactone (CMP-legionaminic acid or CMP-Leg). (B) Chromatograms of the RP-HPLC-FL experiments performed on the surface fractions of spores of the PY79, PY79  $\Delta$ *spsABCDE* ( $\Delta$ *spsABCDE*), and PY79  $\Delta$ *spsM* ( $\Delta$ *spsM*) strains. The RP-HPLC-FL experiments were carried out on at least three independent surface fractions for each strain. One representative chromatogram is presented. (C) Identification by LC/ESI-MS<sup>3</sup> of DMB-Leg5Ac7Ac. Representative MS<sup>3</sup> spectra of DMB-Leg5Ac7Ac, [M+H]<sup>+</sup> at *m/z* 451. The ion [M+H-18]<sup>+</sup> at *m/z* 433 is indicated by the black diamond. (D) Structure of DMB ([M+H]<sup>+</sup> = 229), DMB-Leg ([M+H]<sup>+</sup> = 541), and of the major structure fragments ([M+H]<sup>+</sup> = 433, [M+H]<sup>+</sup> = 415, [M+H]<sup>+</sup> = 374, [M+H]<sup>+</sup> = 356).

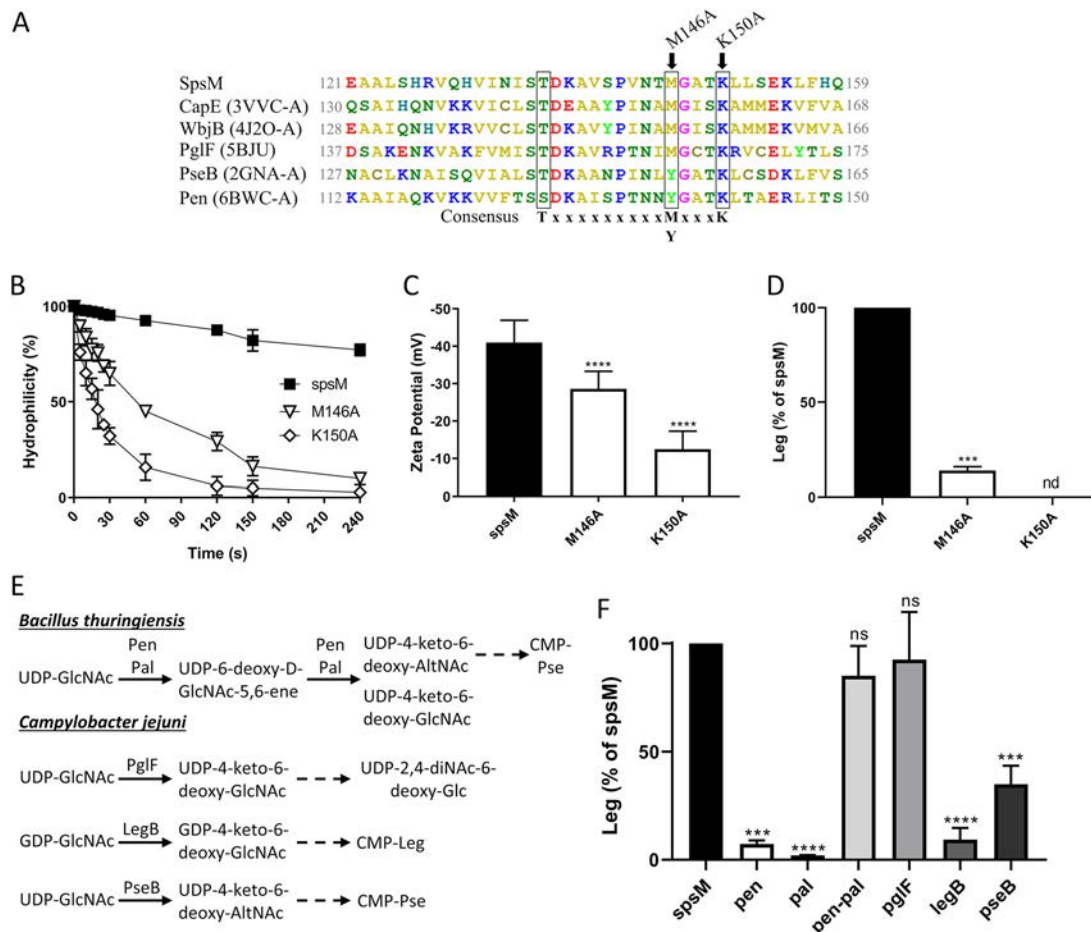
This signal corresponds to the expected mass of DMB-Leg, DMB-Pse, or one of their isomers that exhibits a [M+H]<sup>+</sup> value at *m/z* 451 (37, 38). The identification was then confirmed by MS<sup>3</sup> (Fig. 3C and D). MS<sup>3</sup> analysis showed recurrent losses of H<sub>2</sub>O (*m/z* 433, *m/z* 415, and *m/z* 356) and *N*-acetyl groups (*m/z* 374), which agrees with the fragmentation pattern previously obtained with *N*-acetylneuraminic acid (Neu5Ac) and other NulOs (36, 37). Furthermore, the retention time of peak 1 perfectly matched that of the Leg standard (see Fig. S3), thus indicating that the surface fraction of PY79 spores contains Leg.

**The *sps* genes expressed during the late stage of sporulation are required for legionaminic acid addition on the spore surface.** To determine whether the *sps* genes are involved in Leg biosynthesis, the surface fractions of the PY79,  $\Delta$ *spsABCDE*, and  $\Delta$ *spsM* spores were analyzed by RP-HPLC-FL (Fig. 3B). Interestingly, Leg (peak 1) was undetectable in the surface fraction of the  $\Delta$ *spsABCDE* and  $\Delta$ *spsM* mutant strains.

These results demonstrate that *spsM* and at least one of the *spsABCDEF* genes are required for Leg biosynthesis or transfer to the spore surface. To study the kinetics of the *sps* genes transcription, a chromosomal transcriptional fusion was constructed by inserting the promoter region of the *spsA* gene fused to a promoterless *mCherry* gene into the *amyE* gene, and the resulting strain was designated PY79 *amyE::P<sub>spsA</sub>-mCherry*. The kinetics of *sps* genes expression was then determined in the Spo8 sporulation medium (see Fig. S4A). The PY79 *amyE::P<sub>spsA</sub>-mCherry* strain displayed *mCherry* fluorescence 6 h after the transition to the stationary phase (t6) and peaked at t8, which is in agreement with a previous study (18). Transcription of the *sps* genes is under the control of  $\sigma^K$ , indicating that the Sps enzymes and their products are localized in the mother cell (16, 18, 24–26). To define the timing of Leg production in the mother cell, a kinetics analysis of Leg production was performed under the same growth conditions (Fig. S4B). Consistently with the transcription kinetics, the Leg was detectable in the PY79 strain at t8 and peaked at t10, approximately 2 h following the transcription peak. Together, these results indicate that Leg is produced in the mother cell of sporulating cells during the late stage of sporulation.

**SpsM is the first enzyme of the legionaminic acid biosynthesis pathway.** The predictive three-dimensional structure of SpsM is close to that of the enzymes CapE, WbjB, and PseB (Table S1). These enzymes catalyze the C-4/C-6 dehydration and C-5 epimerization of the UDP-GlcNAc to produce UDP-4-keto-6-deoxy-AltNAc, and they share a conserved catalytic domain with a distinctive T-(x)<sub>9</sub>-M/Y-(x)<sub>3</sub>-K catalytic triad (32, 39–41). In *Staphylococcus aureus*, the replacement of the methionine by an alanine in the catalytic triad of CapE causes a partial activity loss for this enzyme (42). To determine whether SpsM also shares this catalytic domain, a protein sequence alignment was performed (Fig. 4A). This analysis identified, in the SpsM protein sequence, a T-(x)<sub>9</sub>-M-(x)<sub>3</sub>-K catalytic triad in a well-conserved putative catalytic domain. Mutations were introduced into the coding sequence of the *spsM* gene by directed mutagenesis to replace methionine 146 or lysine 150 with an alanine (Fig. 4A). Both mutations caused a decrease in the hydrophilicity and global spore charge (Fig. 4B and C). In addition, M146A and K150A mutations led to a partial and a total loss of Leg in the surface fraction of spores (Fig. 4D). These results indicate that the M146 and K150 amino acids are in the SpsM catalytic site and are required for full SpsM activity. CapE, WbjB, PglF, PseB, and Pen-Pal share C-4/C-6 dehydratase activity and use a nucleotide-activated GlcNAc as the substrate (32, 39–41, 43), thus suggesting that SpsM shares these properties. However, the activity of these enzymes slightly varies from one to the other. For example, PglF only has a C-4/C-6 dehydratase activity, while PseB has an additional C-5 epimerase activity (40) (Fig. 4E). To better define SpsM activity, the *pen* or *pal* genes of *Bacillus thuringiensis* ATCC 35646 and the *pseB*, *legB*, and *pglF* genes of *Campylobacter jejuni* NCTC11168 were introduced downstream of the *spsM* promoter into the *amyE* locus of the PY79  $\Delta$ *spsM* mutant strain. The enzymatic reactions catalyzed by Pen-Pal, PglF, LegB, and PseB are summarized in Fig. 4E (30, 32, 40, 43). Then, the relative amounts of Leg in the mother cells of the  $\Delta$ *spsM* *amyE::P<sub>spsM</sub>-pen*,  $\Delta$ *spsM* *amyE::P<sub>spsM</sub>-pal*,  $\Delta$ *spsM* *amyE::P<sub>spsM</sub>-pen-pal*,  $\Delta$ *spsM* *amyE::P<sub>spsM</sub>-pseB*,  $\Delta$ *spsM* *amyE::P<sub>spsM</sub>-pglF*, and  $\Delta$ *spsM* *amyE::P<sub>spsM</sub>-legB* strains were evaluated at t10 by RP-HPLC-FL (Fig. 4F). The addition of the *pen*, *pal*, *legB*, or *pseB* gene to the  $\Delta$ *spsM* mutant strain did not restore, or only partially restored, Leg production in the mother cells. Contrastingly, the addition of the *pen-pal* or *pglF* gene fully restored Leg production, thus indicating that SpsM catalyzes the C-4/C-6 dehydration of the UDP-GlcNAc to produce UDP-4-keto-6-deoxy-GlcNAc. Together, these results also demonstrate that SpsM is the first enzyme of the CMP-Leg pathway in *B. subtilis* (Fig. 3A).

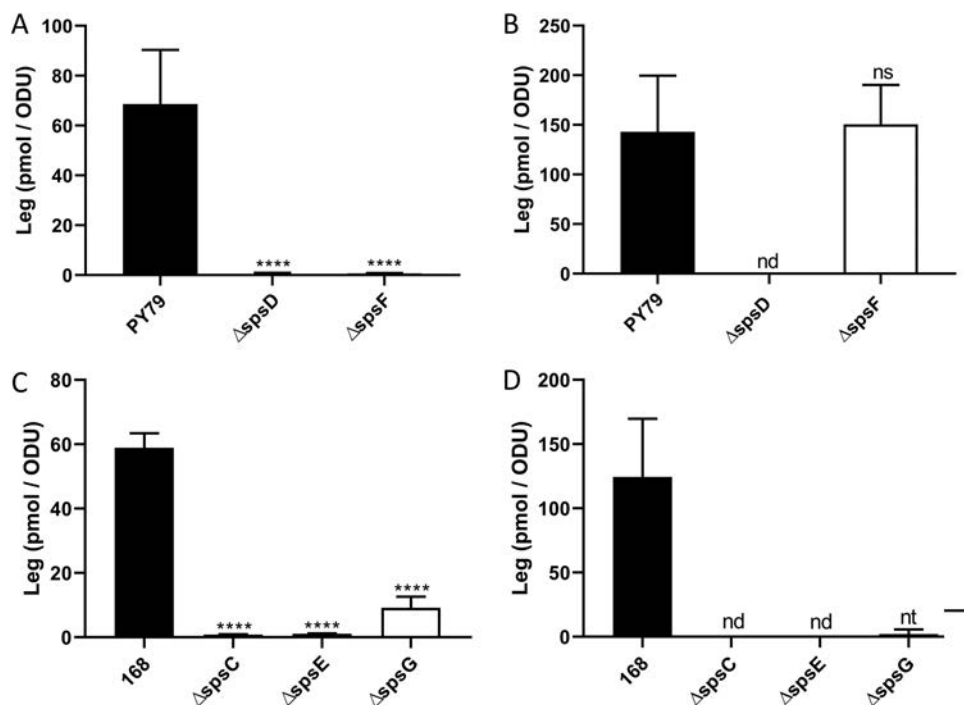
***spsC*, *spsD*, *spsE*, and *spsG* are required for Leg biosynthesis, while *spsF* is required for Leg transfer to the forespore surface.** In the CMP-Leg biosynthesis pathway of *B. subtilis* proposed in Fig. 3A, the SpsM product is successively processed by SpsC, SpsD, SpsG, SpsE, and SpsF. It was shown above that one or more of the *spsABCDEF* genes are involved in Leg biosynthesis or transfer to the forespore surface



**FIG 4** SpsM is a C-4/C-6 dehydratase using UDP-GlcNAc as a substrate. (A) Alignment of the protein sequence of SpsM with the protein sequences of CapE (*Staphylococcus aureus*), WbjB (*Acinetobacter baumannii*), PglF (*Campylobacter jejuni*), PseB (*Helicobacter pylori*), and Pen (*Bacillus thuringiensis*). The PDB number corresponding to each sequence is indicated in parentheses. The three conserved residues of the catalytic triad are black boxed. The arrows indicate residues modified by directed mutagenesis. The experiments presented in panels B, C, and D were carried out with PY79  $\Delta$ spsM amyE::spsM (*spsM*), PY79  $\Delta$ spsM amyE::spsM M146A (M146A), and PY79  $\Delta$ spsM amyE::spsM K150A (K150A) strains. (B) Surface hydrophilicity of spores evaluated by MATH assays. (C) Surface charge of spores evaluated by zetametry assays. \*\*\*\*,  $P \leq 0.0001$  for M146A or K150A versus *spsM* by Mann-Whitney test. (D) Relative amounts of Leg in the surface fractions of spores measured by RP-HPLC-FL. The results are relative to the amount of Leg of the PY79  $\Delta$ spsM amyE::spsM strain. nd, not detectable; \*\*\*,  $P \leq 0.001$  for M146A or K150A versus *spsM* by Welch's *t* test. (E) Enzymatic reactions catalyzed by Pen-Pal, PglF, LegB, and PseB in *B. thuringiensis* and *C. jejuni*. The solid arrows represent the enzymatic reactions catalyzed by the enzymes. The dotted arrows represent the remaining parts of the pathways and point to the final products. (F) Relative amounts of Leg in the mother cells of the PY79  $\Delta$ spsM amyE::spsM (*spsM*), PY79  $\Delta$ spsM amyE::pen (*pen*), PY79  $\Delta$ spsM amyE::pal (*pal*), PY79  $\Delta$ spsM amyE::pen-pal (*pen-pal*), PY79  $\Delta$ spsM amyE::pglF (*pglF*), PY79  $\Delta$ spsM amyE::legB (*legB*), and PY79  $\Delta$ spsM amyE::pseB (*pseB*) strains measured at t10 by RP-HPLC-FL. The results are relative to the amount of Leg in the PY79  $\Delta$ spsM amyE::spsM strain. ns, not significant; \*\*\*,  $P \leq 0.001$ ; \*\*\*\*,  $P \leq 0.0001$  for *pen*, *pal*, *pen-pal*, *pglF*, *legB*, or *pseB* versus *spsM* by Welch's *t* test. The error bars represent the SDs of the means.

(Fig. 3B). However, the involvement of each of these genes in the CMP-Leg pathway remained to be verified. To check the validity of the CMP-Leg pathway proposed in Fig. 3A, mutants of the *spsD* and *spsF* genes were constructed in the PY79 strain. The *spsD* and *spsF* genes encode a putative acetyltransferase and a putative cytidyltransferase, respectively (Table S1). The spores of both mutants were less hydrophilic and negatively charged than those of the PY79 strain (see Fig. S5A, B, and E). The complementation of the  $\Delta$ spsD mutant strain restored the hydrophilic properties of spores, while the complementation of the  $\Delta$ spsF mutant strain did not. The lack of complementation of the  $\Delta$ spsF mutant strain is discussed in Text S1. The surface fraction of spore was extracted and the Leg amount quantified (Fig. 5A). In parallel, the amounts of Leg in the mother cells of the PY79,  $\Delta$ spsD, and  $\Delta$ spsF strains were evaluated at t10 (Fig. 5B). Leg was absent from the surface fractions of the  $\Delta$ spsD and  $\Delta$ spsF mutant

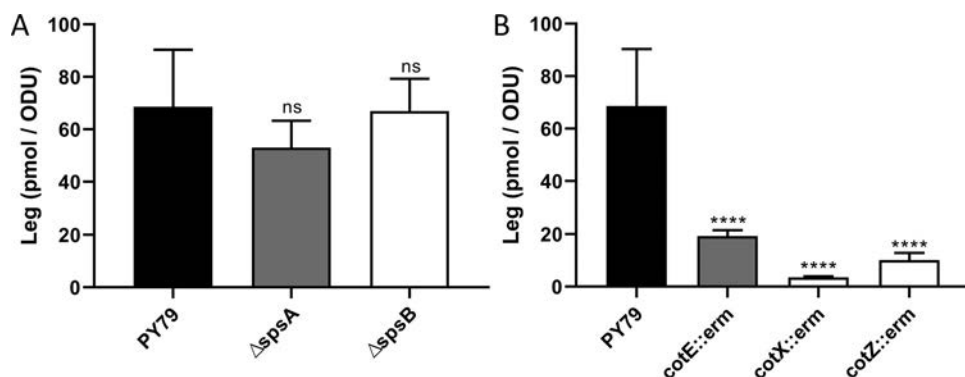




**FIG 5** The *spsC*, *spsD*, *spsE*, and *spsG* genes are required for Leg biosynthesis, while *spsF* is required for Leg transfer to the forespore surface. The amounts of Leg were measured in the surface fractions of spores (A and C) and the mother cells of sporulating *B. subtilis* cells at t10 (B and D) by RP-HPLC-FL. The experiments were performed with PY79, PY79  $\Delta$ spsD ( $\Delta$ spsD), and PY79  $\Delta$ spsF ( $\Delta$ spsF) strains (A and B) or 168, 168  $\Delta$ spsC ( $\Delta$ spsC), 168  $\Delta$ spsE ( $\Delta$ spsE), and 168  $\Delta$ spsG ( $\Delta$ spsG) strains (C and D). The results were standardized by the OD<sub>600</sub> of the spore preparations (A and C) or the OD<sub>600</sub> of the cultures at t10 (B and D). ns, not significant; nd, not detected; nt, not statistically tested because the data set did not pass the Shapiro-Wilk normality test (two values of three were equal to zero). The error bars represent the SDs of the means. \*\*\*\*,  $P \leq 0.0001$  for  $\Delta$  versus PY79 or 168 by Welch's *t* test.

strains and from the mother cell of the  $\Delta$ spsD mutant strain during sporulation. In contrast, the amount of Leg measured in the mother cell of the  $\Delta$ spsF mutant strain was comparable to that of the PY79 strain. These results demonstrate that the *spsD* gene is required for Leg production, while the *spsF* gene is required for Leg transfer from the mother cell to the forespore. To test whether the *spsC*, *spsE*, and *spsG* genes are also required for Leg biosynthesis, we used the  $\Delta$ spsC,  $\Delta$ spsE, and  $\Delta$ spsG mutants constructed in *B. subtilis* 168 strain (44). The SpsC, SpsE, and SpsG proteins of the 168 strain shared 100% of identity with the SpsC, SpsE, and SpsG proteins of the PY79 strain. In addition, the amount of Leg in the spore surface fraction of the 168 strain was similar to that of the PY79 strain (Fig. 5A and C and Fig. S3). Leg was absent from the spore surface fraction of the  $\Delta$ spsC and  $\Delta$ spsE mutant strains, and the Leg amount was strongly reduced in the  $\Delta$ spsG mutant strain (Fig. 5C). Moreover, the quantification of Leg in the mother cells of the  $\Delta$ spsC,  $\Delta$ spsE, and  $\Delta$ spsG mutant strains did not detect significant amounts of Leg (Fig. 5D). These data demonstrate that *spsC*, *spsE*, and *spsG* genes are required for Leg biosynthesis and are in accordance with the CMP-Leg pathway proposed in Fig. 3A.

**SpsA and SpsB are not the transferase of the CMP-Leg.** The final acceptor(s) of the Leg on the forespore surface as well as the enzyme(s) involved in the transfer of the Leg to the final acceptor(s) remained to be identified. The *spsA* and *spsB* genes encode putative glycosyltransferases (Table S1). Glycosyltransferases represent a subclass of enzymes that catalyze glycoside linkage synthesis by the transfer of a monosaccharide from an activated donor substrate to an acceptor. Therefore, the SpsA and SpsB proteins were candidates for transferring the Leg from the CMP-Leg to one or more acceptor(s) on the forespore surface. To test this hypothesis, spores of the PY79  $\Delta$ spsA and PY79  $\Delta$ spsB mutant strains were produced. Spores of both mutant strains were less



**FIG 6** Legionaminic acid is linked to the crust. The amounts of Leg were measured in the surface fractions of spores by RP-HPLC-FL. The experiments were performed with PY79, PY79  $\Delta$ spsA ( $\Delta$ spsA), and PY79  $\Delta$ spsB ( $\Delta$ spsB) strains (A) or PY79, PY79 *cotE::erm* (*cotE::erm*), PY79 *cotX::erm* (*cotX::erm*), and PY79 *cotZ::erm* (*cotZ::erm*) strains (B). The results were standardized by the OD<sub>600</sub> of the spore preparations. ns, not significant; \*\*\*\*,  $P \leq 0.0001$  for  $\Delta$  versus PY79 by Welch's *t* test. The error bars represent the SDs of the means.

hydrophilic and negatively charged than spores of the PY79 strain, and complementations restored the hydrophilic properties of spores of the PY79 strain (Fig. S5C, D, and E). This indicates that the *spsA* and *spsB* genes are involved in spore surface maturation. To determine whether the modifications of the surface properties of spores of the  $\Delta$ spsA and  $\Delta$ spsB mutant strains were due to a defect in Leg transfer to the forespore surface, the surface fraction of both mutants was analyzed in RP-HPLC-FL (Fig. 6A). Surprisingly, the amounts of Leg in the surface fractions of the  $\Delta$ spsA and  $\Delta$ spsB mutant strains were similar to that of the PY79 strain, indicating that *spsA* and *spsB* genes are not required for Leg transfer to the forespore surface.

**Legionaminic acid is linked to the crust.** To determine whether the Leg is linked to the crust or the outer coat, the spore surface fractions of the PY79 *cotE::erm*, PY79 *cotX::erm*, and PY79 *cotZ::erm* mutant strains were analyzed in RP-HPLC-FL (Fig. 6B). It was shown previously that spores of the *cotE* mutant strain lack both the outer coat and the crust, while spores of the *cotZ* mutant strains only lack the crust (14, 45). The *cotX* mutant strain has an assembled crust, but it is loosely attached to spores (14). However, in our hands, we observed that the hydrophilicity of spores of the *cotX* mutant strain decreased during the washing of the spore preparations, which would indicate that the crust is lost under our experimental conditions (data not shown). Therefore, if the Leg was linked to the crust, a decrease of the Leg amount was expected in the surface fractions of the *cotE*, *cotX*, and *cotZ* mutant strains by comparison with that of the PY79 strain. In contrast, if the Leg was linked to the outer coat, a decrease of the Leg amount was only expected in the surface fraction of the *cotE* mutant strain. The inactivation of the *cotE*, *cotX*, and *cotZ* genes strongly reduced the amount of Leg in the surface fraction of spores, indicating that Leg is linked to the crust.

## DISCUSSION

We previously showed in *B. subtilis* that the glycans of the crust are composed of rhamnose, quinovose, glucosamine and muramic lactam, this last being known to be part of the bacterial peptidoglycan (9). In this study, we showed that the surface of *B. subtilis* spores also contained Leg, a NuIO identified for the first time on the surface of bacterial spores. NuIOs are composed of nine-carbon-backbone monosaccharides differing by structural variations at the C-5, C-7, and C-9 positions (46). NuIOs notably encompass sialic acids, such as Neu5Ac and the ketodeoxynonulosonic acid, as well as nonsialic acids, such as Leg and Pse. Biosynthesis of NuIOs proceeds through a conserved enzymatic mechanism starting by the condensation of a 6-carbon monosaccharide with a 3-carbon pyruvate. The 9-carbon intermediate is then activated to a CMP-sugar, before being transferred to an acceptor. The CMP-Pse biosynthesis pathway of *H. pylori* is an example of a NuIO pathway that has been extensively studied (31, 47,

48). In *H. pylori*, the nucleotide activated Pse is synthesized from UDP-GlcNAc by six consecutive enzymes. The CMP-Leg pathway in *C. jejuni* is quite similar, except that the sugar precursors are GDP linked, rather than UDP linked. It also differs in the epimerization performed at C-2, C-4, and C-5 of the 6-deoxy-hexoses intermediates, resulting in stereochemical differences at C-5, C-7, and C-8 of the final nonulosonates (30). In contrast to that of *H. pylori*, the Pse pathway of *B. thuringiensis* involves seven enzymes (43). The two pathways differ by the enzymes catalyzing the first reaction of the pathway, i.e., the synthesis of the UDP-4-keto-6-deoxy-AltNAc from the UDP-GlcNAc. In *H. pylori* this reaction is catalyzed by PseB, while it is catalyzed by Pen and Pal in *B. thuringiensis*. Interestingly, it was shown that the coinubation of Pen and Pal with UDP-GlcNAc *in vitro* leads to the formation of UDP-4-keto-6-deoxy-AltNAc and UDP-4-keto-6-deoxy-GlcNAc (43).

By using gene annotation and RaptorX software, we identified SpsM as the putative enzyme catalyzing the first reaction of the CMP-Leg pathway in *B. subtilis*, and we demonstrated that the *spsM* gene is required for Leg biosynthesis. We also showed that the insertion of the *pen-pal* and *pglF* genes into the *amyE* locus of the  $\Delta$ *spsM* mutant strain restored Leg production. Pen-Pal and PglF were previously shown to convert UDP-GlcNAc to UDP-4-keto-6-deoxy-GlcNAc (43, 49). More surprisingly, the addition of the *legB* gene in the  $\Delta$ *spsM* mutant strain did not fully restore Leg production. LegB is the first enzyme of the CMP-Leg pathway in *C. jejuni*, and it catalyzes the C-4/C-6 dehydration of the GDP-GlcNAc (30). These data indicate that SpsM is a C-4/C-6 dehydratase, but unlike LegB, it preferentially uses UDP-GlcNAc as a substrate rather than GDP-GlcNAc. These results also imply that the following enzymes of the CMP-Leg pathway in *B. subtilis* use UDP-linked precursors, indicating that the CMP-Leg pathway of *B. subtilis* differs from the only complete CMP-Leg pathway described to date in *C. jejuni* (30). By a similar approach to that carried out with SpsM, we identified SpsC, SpsD, SpsG, SpsE and SpsF as the following enzymes of the pathway, we predicted their functions (see Text S2 and Fig. S6 in the supplemental material), and we reconstructed the CMP-Leg pathway of *B. subtilis* (Fig. 3A). These *in silico* data are consistent with our experimental results, which showed that the *spsC*, *spsD*, *spsG*, *spsE* and *spsF* genes are required for CMP-Leg biosynthesis. To summarize, this study identified an original CMP-Leg pathway in *B. subtilis* consisting of six enzymes and using UDP-linked sugars as precursors.

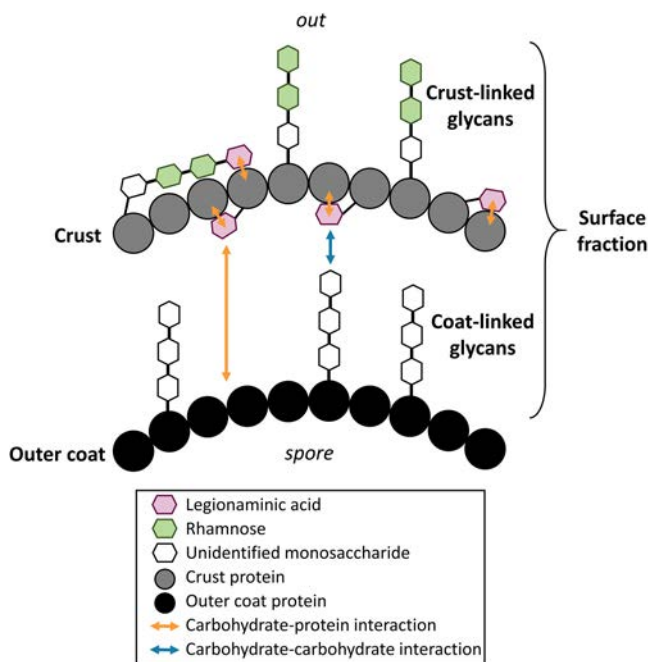
Once activated, the Leg must be transferred to the forespore surface by a specific transferase. There are currently no reports on the bacterial enzymes transferring Leg to cell surfaces. However, crystal structures of four bacterial sialyltransferases have been reported (50–54). These bacterial sialyltransferases have been classified into four carbohydrate-active enzyme database (CAZy) families, including GT38, GT42, GT52, and GT80, based on their amino acid sequence similarities (55, 56). However, in *B. subtilis*, no glycosyltransferase belongs to any of these four CAZy families. Due to their predicted glycosyltransferase function and the vicinity of the *spsA* and *spsB* genes to the genes of the CMP-Leg pathway, the SpsA and SpsB proteins were the most likely transferases of the CMP-Leg in *B. subtilis*. An analysis performed with the NCBI conserved domain database identified a putative TagB domain in the primary sequence of SpsB. The TagB protein is involved in the priming step of polyglycerol phosphate wall teichoic acid synthesis in *B. subtilis* (57). Interestingly, two enzymes containing a TagB domain have recently been identified as plausible candidates for a Pse and a Leg derivative transferase in the bacteria *Tannerella forsythia* (58). In addition, the protein sequence of SpsB contains one DEG and three HP domains. Both D/E-D/E-G and HP motifs are well conserved among different sialyltransferase families with otherwise little or no sequence identity, and these motifs were shown to be important for enzyme catalysis and CMP-Neu5Ac binding (59). Surprisingly, we showed that SpsB is not required for Leg transfer to the forespore surface. Nevertheless, at this stage, it is not possible to exclude that SpsB transfers another still unidentified NulO or that *spsB* deletion is compensated by another Leg transferase with another acceptor on the forespore surface. The SpsA protein is a transferase of the GT-2 glycosyltransferase

family whose three-dimensional structure has been resolved in complex with Mn-dTDP and Mg-DTP (60, 61). The protein sequence of SpsA contains an asparagine doublet, acting as the DxD motif frequently found in the active site of glycosyltransferases. The asparagine interacts both with the ribose moiety of the nucleotide sugar donor and the divalent cation, thus stabilizing the charged phosphate groups in the nucleotide sugar donor (61). Sialyltransferases usually lack a DxD motif and do not require divalent metal cations for enzymatic activity (62). Accordingly, we showed that SpsA is not required for the transfer of Leg to the forespore surface. These findings suggest that SpsA is not a CMP-Leg transferase. It is more likely that SpsA participates in the transfer of a monosaccharide to a glycan which is being synthesized.

In this study, we showed that the Leg on the spore surface is linked to the crust. Furthermore, we demonstrated that the abolition of Leg production leads to a crust assembly defect. It was shown elsewhere that Pse is essential for flagellar assembly in *Campylobacter* spp. and *H. pylori* (32, 34). In *H. pylori*, single Pse moieties are attached by *O*-linkages to the structural flagellar proteins FlaA and FlaB, at up to 7 and 10 Ser/Thr residues, respectively. In *C. jejuni*, the flagellum is also decorated, but with more complex pseudaminic acids, including one with acetamido groups (34, 35, 63). More recently, it was also shown that Leg is present on the flagellins of *C. jejuni* NCTC 11168 and that flagellin glycosylation is highly heterogeneous, with up to 6 different sugars singly present at a given site (64). Therefore, it is likely that several proteins of the crust of *B. subtilis* spores are *O*-glycosylated with Leg on one or several glycosylation sites, and we hypothesize that these *O*-linked Leg participate in the assembly or the stabilization of the interactions between the crust proteins and/or in the anchoring of the crust to the outer coat. The way by which Leg stabilizes the interactions between the spore surface proteins remains to be defined. However, NulOs are well known to participate in carbohydrate-protein interactions, e.g., mediation of cell-cell adhesion via lectins or cell-cell communication (63). NulOs are hydrophilic and negatively charged at neutral pH and they typically occur as the terminating units of *N*-glycans, *O*-glycans, and glycolipids, which could explain the multiplicity of biological functions they fulfill. In this study, we showed that the abolition of Leg production resulted in a decrease in the negative charge and hydrophilicity of *B. subtilis* spores, making them more adherent to stainless steel. However, similar surface modifications were obtained with spores of the  $\Delta$ *spsA* and  $\Delta$ *spsB* mutant strains that still produce Leg, suggesting that the hydrophilicity and the negative charge of spores are provided by a crust glycan, rather than by Leg.

The total amounts of neutral sugars in the surface fractions of the  $\Delta$ *spsABCDEF* and  $\Delta$ *spsM* mutant strains were halved compared to that of the wild-type strain. Given that most of the crust is lacking on the spore surfaces of both mutants, this result suggests that approximately one-half of the monosaccharides are located on the outer coat surface and the other half are linked to the crust, which agrees with previous studies (15, 17). The precise localization, structure, and composition of the glycans containing these monosaccharides remain to be defined. However, it has been suggested that one of these glycans contains rhamnose and another one contains galactose (15). It was shown previously that *spsM* deletion leads to a loss of rhamnose on the spore surface, and we confirmed this by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) experiments (data not shown) (16). Knowing the activity of SpsM, the loss of rhamnose in the  $\Delta$ *spsM* mutant strain is obviously an indirect consequence of Leg production abolition. Since Leg is required for crust assembly, it is therefore likely that rhamnose moieties are constitutive of a crust-linked glycan. Using the data from this study, we propose a speculative model for the organization of the *B. subtilis* spore surface (Fig. 7).

In most of the *B. subtilis* strains, the *spsM* gene is interrupted by the *sp $\beta$*  prophage. The prophage is excised from the chromosome both during sporulation and in response to stress (DNA damage), thus reconstituting a functional *spsM* gene (16). Another study indicates that the SigY sigma factor promotes the maintenance of *sp $\beta$*  in the chromosome of *B. subtilis* (65). As the other ECF-type sigma factors, SigY activity is regulated by stresses and nitrogen deficiency has been shown to increase SigY



**FIG 7** Hypothetical model of the *B. subtilis* spore surface organization. In this model, one or several crust proteins are glycosylated by Leg or by a crust-linked glycan containing Leg. Leg could participate in the assembly and/or the stabilization of the interactions between the crust proteins possibly through a carbohydrate-protein interaction. The crust proteins and the crust-linked glycan give the spores their hydrophilicity and negative charge that define the adhesion properties of *B. subtilis* spores. Leg might also participate in the anchoring of the crust proteins to the outer coat by interacting through a carbohydrate-protein interaction with the outer coat proteins or by a carbohydrate-carbohydrate interaction with a coat-linked glycan. The interactions presented in this model are speculative. They are extrapolated from current knowledge about NulOs in bacteria (see Discussion). In the absence of data about the structure of the coat-linked and crust-linked glycans, the number of monosaccharides that make up the glycans and the position of the bonds between monosaccharides are just indicative of a possible structure.

activity (66). Therefore, it is likely that stresses encountered by *B. subtilis* during sporulation modulate the excision of *spβ* and consequently the production of Leg. Knowing that Leg is required for crust formation and that presence or absence of crust determines the surface and adhesion properties of spores, it is likely that the environmental conditions encountered by *B. subtilis* during sporulation influence the adhesion properties of spores. In the context of food industries, this could mean that production, cleaning and disinfection processes encountered by the sporulating *Bacillus* cells contaminating the production lines might influence the adhesion properties of the resulting spores. This adaptive strategy would explain the high persistence of these microorganisms on food industry production lines.

## MATERIALS AND METHODS

**Bacterial strains and growth conditions.** The strains used in this study are described in Table 1. *Escherichia coli* K-12 strain TG1 was used as host for the construction of plasmids and cloning experiments. *B. subtilis* cells were transformed as described previously (67). *E. coli* strains were grown at 37°C in Luria Broth (LB). *Bacillus* strains were grown at 30°C or 37°C in LB, Nutrient Broth (NB), or Spo8, a sporulation medium (68). The following concentrations of antibiotic were used for bacterial selection: 100 μg/ml ampicillin and 20 μg/ml chloramphenicol for *E. coli*, and 1 μg/ml erythromycin and 5 μg/ml chloramphenicol for *Bacillus*. Spores were produced at 30°C on Spo8-agar as previously described (68). After a 10-day incubation period and when over 95% of spores were obtained, spores were harvested by scraping the surfaces of plates, washing them five times in chilled sterile water (1,500 × *g* for 15 min), and storing them in sterile water at 4°C until use. The titer of spore preparations was evaluated by plating on NB-agar and by measuring the optical density at 600 nm (OD<sub>600</sub>).

**DNA manipulations.** Total DNA was extracted from *B. subtilis* cells using the Puregene Yeast/Bact kit (Qiagen, France). Plasmid DNA was extracted from *E. coli* using a SmartPure plasmid kit (Eurogentec, Belgium). Restriction enzymes and T4 DNA ligase (New England BioLabs, USA) were used in accordance with the manufacturer's recommendations. Oligonucleotide primers were synthesized by Eurofins

**TABLE 1** Strains used in this study

Strain	Trait or relevant genotype	Reference or source
<i>B. subtilis</i> PY79		BGSC, 1A747
<i>B. subtilis</i> PY79 $\Delta$ <i>spsABCDEF</i>	<i>spsABCDEF</i> -deficient strain	This study
<i>B. subtilis</i> PY79 $\Delta$ <i>spsA</i>	<i>spsA</i> -deficient strain; markerless	This study
<i>B. subtilis</i> PY79 $\Delta$ <i>spsB</i>	<i>spsB</i> -deficient strain; markerless	This study
<i>B. subtilis</i> PY79 $\Delta$ <i>spsD</i>	<i>spsD</i> -deficient strain; markerless	This study
<i>B. subtilis</i> PY79 $\Delta$ <i>spsF</i>	<i>spsF</i> -deficient strain; markerless	This study
<i>B. subtilis</i> PY79 $\Delta$ <i>spsM</i>	<i>spsM</i> -deficient strain; markerless	This study
<i>B. subtilis</i> PY79 <i>cotE::erm</i>	<i>cotE</i> -inactivated strain; Ery <sup>r</sup>	This study
<i>B. subtilis</i> PY79 <i>cotX::erm</i>	<i>cotX</i> -inactivated strain; Ery <sup>r</sup>	This study
<i>B. subtilis</i> PY79 <i>cotZ::erm</i>	<i>cotZ</i> -inactivated strain; Ery <sup>r</sup>	This study
<i>B. subtilis</i> PY79 $\Delta$ <i>spsA</i> <i>amyE::spsA</i>	Complementation of the <i>spsA</i> -deficient strain; Cm <sup>r</sup>	This study
<i>B. subtilis</i> PY79 $\Delta$ <i>spsB</i> <i>amyE::spsB</i>	Complementation of the <i>spsB</i> -deficient strain; Cm <sup>r</sup>	This study
<i>B. subtilis</i> PY79 $\Delta$ <i>spsD</i> <i>amyE::spsD</i>	Complementation of the <i>spsD</i> -deficient strain; Cm <sup>r</sup>	This study
<i>B. subtilis</i> PY79 $\Delta$ <i>spsF</i> <i>amyE::spsF</i>	Complementation of the <i>spsF</i> -deficient strain; Cm <sup>r</sup>	This study
<i>B. subtilis</i> PY79 $\Delta$ <i>spsM</i> <i>amyE::spsM</i>	Complementation of the <i>spsM</i> -deficient strain; Cm <sup>r</sup>	This study
<i>B. subtilis</i> PY79 $\Delta$ <i>spsM</i> <i>amyE::spsM</i> M146A	M146A mutated allele of <i>spsM</i> in the <i>amyE</i> locus of the <i>spsM</i> -deficient strain; Cm <sup>r</sup>	This study
<i>B. subtilis</i> PY79 $\Delta$ <i>spsM</i> <i>amyE::spsM</i> K150A	K150A mutated allele of <i>spsM</i> in the <i>amyE</i> locus of the <i>spsM</i> -deficient strain; Cm <sup>r</sup>	This study
<i>B. subtilis</i> PY79 $\Delta$ <i>spsM</i> <i>amyE::pen</i>	<i>pen</i> gene in the <i>amyE</i> locus of the <i>spsM</i> -deficient strain; Cm <sup>r</sup>	This study
<i>B. subtilis</i> PY79 $\Delta$ <i>spsM</i> <i>amyE::pal</i>	<i>pal</i> gene in the <i>amyE</i> locus of the <i>spsM</i> -deficient strain; Cm <sup>r</sup>	This study
<i>B. subtilis</i> PY79 $\Delta$ <i>spsM</i> <i>amyE::pen-pal</i>	<i>pen</i> and <i>pal</i> genes in the <i>amyE</i> locus of the <i>spsM</i> -deficient strain; Cm <sup>r</sup>	This study
<i>B. subtilis</i> PY79 $\Delta$ <i>spsM</i> <i>amyE::legB</i>	<i>legB</i> gene in the <i>amyE</i> locus of the <i>spsM</i> -deficient strain; Cm <sup>r</sup>	This study
<i>B. subtilis</i> PY79 $\Delta$ <i>spsM</i> <i>amyE::pgIF</i>	<i>pgIF</i> gene in the <i>amyE</i> locus of the <i>spsM</i> -deficient strain; Cm <sup>r</sup>	This study
<i>B. subtilis</i> PY79 $\Delta$ <i>spsM</i> <i>amyE::pseB</i>	<i>pseB</i> gene in the <i>amyE</i> locus of the <i>spsM</i> -deficient strain; Cm <sup>r</sup>	This study
<i>B. subtilis</i> PY79 <i>amyE::P<sub>spsA</sub>-mCherry</i>	<i>P<sub>spsA</sub>-mCherry</i> transcriptional fusion in the <i>amyE</i> locus of the PY79 strain; Cm <sup>r</sup>	This study
<i>B. subtilis</i> 168		BGSC, 1A1
<i>B. subtilis</i> 168 $\Delta$ <i>spsC</i>	<i>spsC</i> -deficient strain; Km <sup>r</sup>	BGSC, BKK37890
<i>B. subtilis</i> 168 $\Delta$ <i>spsE</i>	<i>spsE</i> -deficient strain; Km <sup>r</sup>	BGSC, BKK37870
<i>B. subtilis</i> 168 $\Delta$ <i>spsG</i>	<i>spsG</i> -deficient strain; Km <sup>r</sup>	BGSC, BKK37850
<i>B. thuringiensis</i> serovar <i>israelensis</i> ATCC 35646		BGSC, 4Q12

Genomics (Germany). PCRs were performed in a SimpliAmp thermal cycler (Applied Biosystems, USA). Amplified fragments were purified using the SmartPure PCR kit (Eurogentec, Belgium). Digested DNA fragments were separated on 1% (w/v) agarose gels after digestion and extracted from gels using the SmartPure gel kit (Eurogentec, Belgium). Nucleotide sequences of plasmid inserts were determined by Sanger sequencing (Eurofins Genomics, Germany).

**Construction of the *B. subtilis* recombinant strains.** Gene deletion and gene interruption were performed by homologous recombination with pMAD and pMUTIN4, respectively, as previously described (69, 70). The deletion mutants were constructed by deleting the targeted genes from the ATG to the stop codon without introducing exogenous DNA to avoid disrupting downstream genes transcription. Complementation was introduced in the *amyE* gene using the plasmid pBS1C (67). The recombinant strains, oligonucleotides, and plasmids used in this study are described in Table 1 and Tables S2A and B in the supplemental material. Nucleotide sequences of the introduced chromosomal modifications were verified by Sanger sequencing (Eurofins Genomics, Germany).

**Surface and adhesion properties of spores.** Microbial-adhesion-to-hydrocarbons (MATH), zetame-try, and adhesion assays were performed as described previously (9).

**Electron microscopy.** To observe spore surface features, spores were fixed and stained as previously described (9). Ultrathin sections were cut on a Leica UC7 ultramicrotome and collected on 150-mesh copper grids. The sections were examined under a Jeol JEM-2100 transmission electron microscope at an accelerated voltage of 200 kV.

**Preparation of the intracellular extracts and spore surface fractions.** A cell pellet obtained by centrifugation (12,000 × *g*, 15 min, 4°C) and washed twice with cold sterile ultrapure water was resuspended in 3 ml of sodium citrate buffer (0.01 M, pH 5.5) and then transferred to a screw tube containing 400 mg of glass beads (acid-washed, G1277-500G; Sigma). The screw tube was shaken in a MiniBeadBeater-16 (Biospec Products) for 2 min and then cooled on ice. This treatment was repeated 4 times. The lysate was then centrifuged (6,000 × *g*, 15 min, 4°C), and 1 ml of the supernatant was ethanol precipitated. The precipitate was recovered in 500 μl of sterile ultrapure water and kept at −20°C for further analyses. The surface fraction of spores was removed by three successive passages of spore suspensions through a French press (SLM Instruments, Urbana, IL) at 20,000 lb/in<sup>2</sup>. Spores were separated from the surface fraction by two successive centrifugations (4,500 × *g*, 15 min, 4°C), and the supernatant was kept at −20°C until use.

**Dosage of neutral sugars.** The dosage of the neutral sugars in the surface fraction of spores was performed as described previously (28). The amounts of neutral sugars were standardized by the OD<sub>600</sub> of the spore preparations.

**Release and derivation of NulOs.** 500  $\mu$ l of spore surface fraction or intracellular extract was lyophilized. DMB-coupled NulOs were obtained as described previously (36). Shortly, dried glycoconjugates were hydrolyzed at 80°C for 2 h in 0.1 M trifluoroacetic acid to release the NulOs. NulOs were subsequently coupled to DMB by heating the samples at 50°C for 2 h in the dark in 7 mM DMB, 1 M  $\beta$ -mercaptoethanol, 18 mM sodium hydrosulfite in 0.02 M trifluoroacetic acid.

**Analysis of DMB derivatives on HPLC.** The NulO derivatives were separated isocratically on a  $C_{18}$  reverse-phase HPLC column (Waters, 4.6 mm by 150 mm, 3.5  $\mu$ m. or Wakopak Handy ODS, 4.6 mm by 250 mm, 6  $\mu$ m) using a solvent mixture of acetonitrile/methanol/water (7:9:84 [vol/vol/vol]), and they were detected by a fluorimeter (Waters 474, excitation wavelength [ $\lambda_{exc}$ ] = 373 nm, emission wavelength [ $\lambda_{em}$ ] = 448 nm). The Leg amount was estimated by measuring the area of peak 1 and by reporting this area to a standard range of Neu5Ac.

**Analysis of DMB derivatives on micro-LC/ESI-MS<sup>3</sup>.** Analyses were performed in positive ion mode on an amaZon speed ETD ion trap mass spectrometer equipped with the standard electrospray ionization (ESI) ion source and controlled by Hystar 3.2 software (Bruker Daltonics). DMB-coupled NulO separation was achieved on a micro-LC system (Prominence LC-20AB; Shimadzu, Kyoto, Japan). Samples were applied to a reverse-phase Luna  $C_{18}$ -2 column (150 mm by 1.00 mm, 3- $\mu$ m particles; Phenomenex), and they were separated using an isocratic elution of acetonitrile/methanol/water (6:4:90 [vol/vol/vol]) at a flow rate of 70  $\mu$ l/min. The targeted MS<sup>3</sup> scans for DMB-coupled NulO were performed using ultrascan mode (26,000 atomic mass units [amu]/s). NulO species were identified by referring to elution positions and MS<sup>3</sup> fragmentation of Leg and Pse standards.

## SUPPLEMENTAL MATERIAL

Supplemental material is available online only.

**TEXT S1**, DOCX file, 0.1 MB.

**TEXT S2**, DOCX file, 0.1 MB.

**FIG S1**, TIF file, 1.4 MB.

**FIG S2**, TIF file, 0.6 MB.

**FIG S3**, TIF file, 0.8 MB.

**FIG S4**, TIF file, 1.2 MB.

**FIG S5**, TIF file, 2.4 MB.

**FIG S6**, PDF file, 1.5 MB.

**TABLE S1**, DOCX file, 0.1 MB.

**TABLE S2**, DOCX file, 0.1 MB.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank A. Rossero and L. Benejat-Bruhl for providing the genomic DNA of *C. jejuni*. We also thank the Plateforme d'Analyse des Glycoconjugués (PAGés; <http://plateforme-pages.univ-lille1.fr/>) and the Bio Imaging Center Lille (BiCeL) of the US41-UMS 2014-PLBS for providing access to the instrumental facilities for carbohydrate analysis and electron microscopy.

We acknowledge the ANR (Agence Nationale de la Recherche) for funding the FEFS project (ANR-18-CE21-0010) and the region Hauts-de-France for funding the Interreg Veg-I-Tec project (program Interreg V France-Wallonia-Flanders, GoToS3NuTeX). Devices for TEM experiments were acquired through funding from the ANR (10-EQPX-0004).

## REFERENCES

- Gopal N, Hill C, Ross PR, Beresford TP, Fenelon MA, Cotter PD. 2015. The prevalence and control of *Bacillus* and related spore-forming bacteria in the dairy industry. *Front Microbiol* 6:1418. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01418>.
- Warth AD, Strominger JL. 1969. Structure of the peptidoglycan of bacterial spores: occurrence of the lactam of muramic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A* 64:528–535. <https://doi.org/10.1073/pnas.64.2.528>.
- Warth AD, Strominger JL. 1972. Structure of the peptidoglycan from spores of *Bacillus subtilis*. *Biochemistry* 11:1389–1396. <https://doi.org/10.1021/bi00758a010>.
- Driks A, Eichenberger P. 2016. The spore coat. *Microbiol Spectr* 4:TBS-0023-2016. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.TBS-0023-2016>.
- Driks A, Roels S, Beall B, Moran CP, Losick R. 1994. Subcellular localization of proteins involved in the assembly of the spore coat of *Bacillus subtilis*. *Genes Dev* 8:234–244. <https://doi.org/10.1101/gad.8.2.234>.
- Ozin AJ, Henriques AO, Yi H, Moran CP. 2000. Morphogenetic proteins SpoVID and SafA form a complex during assembly of the *Bacillus subtilis* spore coat. *J Bacteriol* 182:1828–1833. <https://doi.org/10.1128/jb.182.7.1828-1833.2000>.
- Roels S, Driks A, Losick R. 1992. Characterization of spoIV<sub>A</sub>, a sporulation gene involved in coat morphogenesis in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 174:575–585. <https://doi.org/10.1128/jb.174.2.575-585.1992>.
- Takamatsu H, Kodama T, Nakayama T, Watabe K. 1999. Characterization of the *yrbA* gene of *Bacillus subtilis*, involved in resistance and germination of spores. *J Bacteriol* 181:4986–4994. <https://doi.org/10.1128/JB.181.16.4986-4994.1999>.
- Faille C, Ronse A, Dewailly E, Slomianny C, Maes E, Krzewinski F, Guerardel Y. 2014. Presence and function of a thick mucous layer rich in polysaccharides around *Bacillus subtilis* spores. *Biofouling* 30:845–858. <https://doi.org/10.1080/08927014.2014.939073>.
- Faille C, Cunault C, Dubois T, Bénézech T. 2018. Hygienic design of food processing lines to mitigate the risk of bacterial food contamination with

- respect to environmental concerns. *Innov Food Sci Emerg Technol* 46:65–73. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2017.10.002>.
11. Zhang J, Fitz-James PC, Aronson AL. 1993. Cloning and characterization of a cluster of genes encoding polypeptides present in the insoluble fraction of the spore coat of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 175:3757–3766. <https://doi.org/10.1128/jb.175.12.3757-3766.1993>.
  12. McKenney PT, Driks A, Eskandarian HA, Grabowski P, Guberman J, Wang KH, Gitai Z, Eichenberger P. 2010. A distance-weighted interaction map reveals a previously uncharacterized layer of the *Bacillus subtilis* spore coat. *Curr Biol* 20:934–938. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2010.03.060>.
  13. Imamura D, Kuwana R, Takamatsu H, Watabe K. 2011. Proteins involved in formation of the outermost layer of *Bacillus subtilis* spores. *J Bacteriol* 193:4075–4080. <https://doi.org/10.1128/JB.05310-11>.
  14. Shuster B, Khemmani M, Abe K, Huang X, Nakaya Y, Maryn N, Buttar S, Gonzalez AN, Driks A, Sato T, Eichenberger P. 2019. Contributions of crust proteins to spore surface properties in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* 111:825–843. <https://doi.org/10.1111/mmi.14194>.
  15. Bartels J, Blüher A, López Castellanos S, Richter M, Günther M, Mascher T. 2019. The *Bacillus subtilis* endospore crust: protein interaction network, architecture and glycosylation state of a potential glycoprotein layer. *Mol Microbiol* 112:1576–1592. <https://doi.org/10.1111/mmi.14381>.
  16. Abe K, Kawano Y, Iwamoto K, Arai K, Maruyama Y, Eichenberger P, Sato T. 2014. Developmentally-regulated excision of the SPB prophage reconstitutes a gene required for spore envelope maturation in *Bacillus subtilis*. *PLoS Genet* 10:e1004636. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004636>.
  17. Shuster B, Khemmani M, Nakaya Y, Holland G, Iwamoto K, Abe K, Imamura D, Maryn N, Driks A, Sato T, Eichenberger P. 2019. Expansion of the spore surface polysaccharide layer in *Bacillus subtilis* by deletion of genes encoding glycosyltransferases and glucose modification enzymes. *J Bacteriol* 201:e00321-19. <https://doi.org/10.1128/JB.00321-19>.
  18. Cangiano G, Sirec T, Panarella C, Isticato R, Baccigalupi L, De Felice M, Ricca E. 2014. The *spc* gene products affect the germination, hydrophobicity, and protein adsorption of *Bacillus subtilis* spores. *Appl Environ Microbiol* 80:7293–7302. <https://doi.org/10.1128/AEM.02893-14>.
  19. Plata G, Fuhrer T, Hsiao TL, Sauer U, Vitkup D. 2012. Global probabilistic annotation of metabolic networks enables enzyme discovery. *Nat Chem Biol* 8:848–854. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1063>.
  20. Shornikov A, Tran H, Macias J, Halavaty AS, Minasov G, Anderson WF, Kuhn ML. 2017. Structure of the *Bacillus anthracis* dTDP-L-rhamnose-biosynthetic enzyme dTDP-4-dehydrorhamnose 3,5-epimerase (RfbC). *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun* 73:664–671. <https://doi.org/10.1107/S2053230X17015849>.
  21. Gokey T, Halavaty AS, Minasov G, Anderson WF, Kuhn ML. 2018. Structure of the *Bacillus anthracis* dTDP-L-rhamnose biosynthetic pathway enzyme: dTDP- $\alpha$ -D-glucose 4,6-dehydratase, RfbB. *J Struct Biol* 202:175–181. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2018.01.006>.
  22. Law A, Stergioulis A, Halavaty AS, Minasov G, Anderson WF, Kuhn ML. 2017. Structure of the *Bacillus anthracis* dTDP-L-rhamnose-biosynthetic enzyme dTDP-4-dehydrorhamnose reductase (RfbD). *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun* 73:644–650. <https://doi.org/10.1107/S2053230X17015746>.
  23. Baumgartner J, Lee J, Halavaty AS, Minasov G, Anderson WF, Kuhn ML. 2017. Structure of the *Bacillus anthracis* dTDP-L-rhamnose-biosynthetic enzyme glucose-1-phosphate thymidyltransferase (RfbA). *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun* 73:621–628. <https://doi.org/10.1107/S2053230X17015357>.
  24. Eichenberger P, Fujita M, Jensen ST, Conlon EM, Rudner DZ, Wang ST, Ferguson C, Haga K, Sato T, Liu JS, Losick R. 2004. The program of gene transcription for a single differentiating cell type during sporulation in *Bacillus subtilis*. *PLoS Biol* 2:e328. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020328>.
  25. Steil L, Serrano M, Henriques AO, Völker U. 2005. Genome-wide analysis of temporally regulated and compartment-specific gene expression in sporulating cells of *Bacillus subtilis*. *Microbiology* 151:399–420. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27493-0>.
  26. Nicolas P, Mäder U, Deryn E, Rochat T, Leduc A, Pigeonneau N, Bidnenko E, Marchadier E, Hoebeke M, Aymerich S, Becher D, Bisicchia P, Botella E, Delumeau O, Doherty G, Denham EL, Fogg MJ, Fromion V, Goelzer A, Hansen A, Härtig E, Harwood CR, Homuth G, Jarmer H, Jules M, Klipp E, Le Chat L, Lecointe F, Lewis P, Liebermeister W, March A, Mars RAT, Nannapaneni P, Noone D, Pohl S, Rinn B, Rügheimer F, Sappa PK, Samson F, Schaffer M, Schwikowski B, Steil L, Stülke J, Wiegert T, Devine KM, Wilkinson AJ, van Dijl JM, Hecker M, Völker U, Bessières P, Noirot P. 2012. Condition-dependent transcriptome reveals high-level regulatory architecture in *Bacillus subtilis*. *Science* 335:1103–1106. <https://doi.org/10.1126/science.1206848>.
  27. Faillle C, Lequette Y, Ronse A, Slomianny C, Garénaux E, Guerardel Y. 2010. Morphology and physico-chemical properties of *Bacillus* spores surrounded or not with an exosporium: consequences on their ability to adhere to stainless steel. *Int J Food Microbiol* 143:125–135. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.07.038>.
  28. Dubois M, Gilles K, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. 1951. A colorimetric method for the determination of sugars. *Nature* 168:167. <https://doi.org/10.1038/168167a0>.
  29. Källberg M, Wang H, Wang S, Peng J, Wang Z, Lu H, Xu J. 2012. Template-based protein structure modeling using the RaptorX web server. *Nat Protoc* 7:1511–1522. <https://doi.org/10.1038/nprot.2012.085>.
  30. Schoenhofen IC, Vinogradov E, Whitfield DM, Brisson J-R, Logan SM. 2009. The CMP-legionaminic acid pathway in *Campylobacter*: biosynthesis involving novel GDP-linked precursors. *Glycobiology* 19:715–725. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwp039>.
  31. Schoenhofen IC, McNally DJ, Brisson J-R, Logan SM. 2006. Elucidation of the CMP-pseudaminic acid pathway in *Helicobacter pylori*: synthesis from UDP-N-acetylglucosamine by a single enzymatic reaction. *Glycobiology* 16:8C–14C. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwl010>.
  32. Goon S, Kelly JF, Logan SM, Ewing CP, Guerry P. 2003. Pseudaminic acid, the major modification on *Campylobacter flagellin*, is synthesized via the Cj1293 gene. *Mol Microbiol* 50:659–671. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03725.x>.
  33. Guerry P, Ewing CP, Schirm M, Lorenzo M, Kelly J, Pattarini D, Majam G, Thibault P, Logan S. 2006. Changes in flagellin glycosylation affect *Campylobacter* autoagglutination and virulence. *Mol Microbiol* 60:299–311. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05100.x>.
  34. Schirm M, Soo EC, Aubry AJ, Austin J, Thibault P, Logan SM. 2003. Structural, genetic and functional characterization of the flagellin glycosylation process in *Helicobacter pylori*. *Mol Microbiol* 48:1579–1592. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03527.x>.
  35. Thibault P, Logan SM, Kelly JF, Brisson JR, Ewing CP, Trust TJ, Guerry P. 2001. Identification of the carbohydrate moieties and glycosylation motifs in *Campylobacter jejuni* flagellin. *J Biol Chem* 276:34862–34870. <https://doi.org/10.1074/jbc.M104529200>.
  36. Sulzenbacher G, Roig-Zamboni V, Lebrun R, Guérardel Y, Murat D, Mansuelle P, Yamakawa N, Qian X-X, Vincentelli R, Bourne Y, Wu L-F, Alberto F. 2018. Glycosylate and move! The glycosyltransferase Maf is involved in bacterial flagella formation. *Environ Microbiol* 20:228–240. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13975>.
  37. Lewis AL, Desa N, Hansen EE, Knirel YA, Gordon JI, Gagneux P, Nizet V, Varki A. 2009. Innovations in host and microbial sialic acid biosynthesis revealed by phylogenomic prediction of nonulosonic acid structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:13552–13557. <https://doi.org/10.1073/pnas.0902431106>.
  38. Ricaldi JN, Matthias MA, Vinetz JM, Lewis AL. 2012. Expression of sialic acids and other nonulosonic acids in *Leptospira*. *BMC Microbiol* 12:161. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-12-161>.
  39. Miyafusa T, Caaveiro JMM, Tanaka Y, Tsumoto K. 2013. Dynamic elements govern the catalytic activity of CapE, a capsular polysaccharide-synthesizing enzyme from *Staphylococcus aureus*. *FEBS Lett* 587:3824–3830. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.10.009>.
  40. Schoenhofen IC, McNally DJ, Vinogradov E, Whitfield D, Young NM, Dick S, Wakarchuk WW, Brisson J-R, Logan SM. 2006. Functional characterization of dehydratase/aminotransferase pairs from *Helicobacter* and *Campylobacter*: enzymes distinguishing the pseudaminic acid and bacillosamine biosynthetic pathways. *J Biol Chem* 281:723–732. <https://doi.org/10.1074/jbc.M511021200>.
  41. Mulrooney EF, Poon KKH, McNally DJ, Brisson J-R, Lam JS. 2005. Biosynthesis of UDP-N-acetyl-L-fucosamine, a precursor to the biosynthesis of lipopolysaccharide in *Pseudomonas aeruginosa* serotype O11. *J Biol Chem* 280:19535–19542. <https://doi.org/10.1074/jbc.M500612200>.
  42. Miyafusa T, Caaveiro JMM, Tanaka Y, Tanner ME, Tsumoto K. 2013. Crystal structure of the capsular polysaccharide synthesizing protein CapE of *Staphylococcus aureus*. *Biosci Rep* 33:e00043. <https://doi.org/10.1042/BSR20130017>.
  43. Li Z, Hwang S, Ericson J, Bowler K, Bar-Peled M. 2015. Pen and Pal are nucleotide-sugar dehydratases that convert UDP-GlcNAc to UDP-6-deoxy-D-GlcNAc-5,6-ene and then to UDP-4-keto-6-deoxy-L-AltNAc for CMP-pseudaminic acid synthesis in *Bacillus thuringiensis*. *J Biol Chem* 290:691–704. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.612747>.

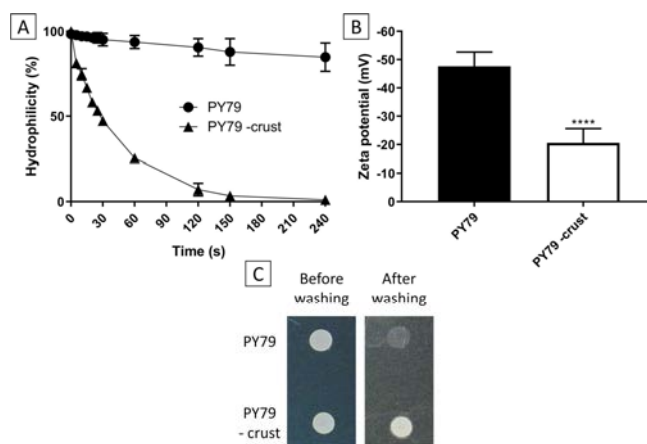


44. Koo B-M, Kritikos G, Farelli JD, Todor H, Tong K, Kimsey H, Wapinski I, Galardini M, Cabal A, Peters JM, Hachmann A-B, Rudner DZ, Allen KN, Tymas A, Gross CA. 2017. Construction and analysis of two genome-scale deletion libraries for *Bacillus subtilis*. *Cell Syst* 4:291.e7–305.e7. <https://doi.org/10.1016/j.cels.2016.12.013>.
45. Zheng LB, Donovan WP, Fitz-James PC, Losick R. 1988. Gene encoding a morphogenic protein required in the assembly of the outer coat of the *Bacillus subtilis* endospore. *Genes Dev* 2:1047–1054. <https://doi.org/10.1101/gad.2.8.1047>.
46. Varki A, Schnaar RL, Schauer R. 2017. Sialic acids and other nonulosonic acids. *Essentials of Glycobiology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
47. Ud-Din AI, Liu YC, Roujeinikova A. 2015. Crystal structure of *Helicobacter pylori* pseudaminic acid biosynthesis *N*-acetyltransferase PseH: implications for substrate specificity and catalysis. *PLoS One* 10:e0115634. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115634>.
48. Rangarajan ES, Proteau A, Cui Q, Logan SM, Potetinova Z, Whitfield D, Purisima EO, Cygler M, Matte A, Sulea T, Schoenhofen IC. 2009. Structural and functional analysis of *Campylobacter jejuni* PseG: a UDP-sugar hydrolase from the pseudaminic acid biosynthetic pathway. *J Biol Chem* 284:20989–21000. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.012351>.
49. Riegert AS, Thoden JB, Schoenhofen IC, Watson DC, Young NM, Tipton PA, Holden HM. 2017. Structural and biochemical investigation of PglF from *Campylobacter jejuni* reveals a new mechanism for a member of the short chain dehydrogenase/reductase superfamily. *Biochemistry* 56: 6030–6040. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.7b00910>.
50. Chiu CPC, Watts AG, Lairson LL, Gilbert M, Lim D, Wakarchuk WW, Withers SG, Strynadka NCJ. 2004. Structural analysis of the sialyltransferase CstII from *Campylobacter jejuni* in complex with a substrate analog. *Nat Struct Mol Biol* 11:163–170. <https://doi.org/10.1038/nsmb720>.
51. Chiu CPC, Lairson LL, Gilbert M, Wakarchuk WW, Withers SG, Strynadka N. 2007. Structural analysis of the  $\alpha$ -2,3-sialyltransferase Cst-I from *Campylobacter jejuni* in apo and substrate-analogue bound forms. *Biochemistry* 46:7196–7204. <https://doi.org/10.1021/bi602543d>.
52. Ni L, Chokhawala HA, Cao H, Henning R, Ng L, Huang S, Yu H, Chen X, Fisher AJ. 2007. Crystal structures of *Pasteurella multocida* sialyltransferase complexes with acceptor and donor analogues reveal substrate binding sites and catalytic mechanism. *Biochemistry* 46:6288–6298. <https://doi.org/10.1021/bi700346w>.
53. Ni L, Sun M, Yu H, Chokhawala H, Chen X, Fisher AJ. 2006. Cytidine 5'-monophosphate (CMP)-induced structural changes in a multifunctional sialyltransferase from *Pasteurella multocida*. *Biochemistry* 45: 2139–2148. <https://doi.org/10.1021/bi0524013>.
54. Kakuta Y, Okino N, Kajiwara H, Ichikawa M, Takakura Y, Ito M, Yamamoto T. 2008. Crystal structure of *Vibrionaceae Photobacterium* sp. JT-ISH-224 2,6-sialyltransferase in a ternary complex with donor product CMP and acceptor substrate lactose: catalytic mechanism and substrate recognition. *Glycobiology* 18:66–73. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwm119>.
55. Campbell JA, Davies GJ, Bulone V, Henrissat B. 1997. A classification of nucleotide-diphospho-sugar glycosyltransferases based on amino acid sequence similarities. *Biochemical J* 326:929–939. <https://doi.org/10.1042/bj3260929u>.
56. Coutinho PM, Deleury E, Davies GJ, Henrissat B. 2003. An evolving hierarchical family classification for glycosyltransferases. *J Mol Biol* 328: 307–317. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(03\)00307-3](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(03)00307-3).
57. Swoboda JG, Campbell J, Meredith TC, Walker S. 2010. Wall teichoic acid function, biosynthesis, and inhibition. *ChemBiochem* 11:35–45. <https://doi.org/10.1002/cbic.200900557>.
58. Tomek MB, Janesch B, Maresch D, Windwarder M, Altmann F, Messner P, Schäffer C. 2017. A pseudaminic acid or a legionaminic acid derivative transferase is strain-specifically implicated in the general protein *O*-glycosylation system of the periodontal pathogen *Tannerella forsythia*. *Glycobiology* 27:555–567. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwx019>.
59. Freiburger F, Claus H, Günzel A, Oltmann-Norden I, Vionnet J, Mühlhoff M, Vogel U, Vann WF, Gerardy-Schahn R, Stummeyer K. 2007. Biochemical characterization of a *Neisseria meningitidis* polysialyltransferase reveals novel functional motifs in bacterial sialyltransferases. *Mol Microbiol* 65:1258–1275. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05862.x>.
60. Charnock SJ, Davies GJ. 1999. Structure of the nucleotide-diphospho-sugar transferase, SpsA from *Bacillus subtilis*, in native and nucleotide-complexed forms. *Biochemistry* 38:6380–6385. <https://doi.org/10.1021/bi990270y>.
61. Tarbouriech N, Charnock SJ, Davies GJ. 2001. Three-dimensional structures of the Mn and Mg dTDP complexes of the family GT-2 glycosyltransferase SpsA: a comparison with related NDP-sugar glycosyltransferases. *J Mol Biol* 314:655–661. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2001.5159>.
62. Brockhausen I. 2014. Crossroads between bacterial and mammalian glycosyltransferases. *Front Immunol* 5:492. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00492>.
63. Logan SM, Kelly JF, Thibault P, Ewing CP, Guerry P. 2002. Structural heterogeneity of carbohydrate modifications affects serospecificity of *Campylobacter* flagellins. *Mol Microbiol* 46:587–597. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.03185.x>.
64. Zebian N, Merckx-Jacques A, Pittock PP, Houle S, Dozois CM, Lajoie GA, Creuzenet C. 2016. Comprehensive analysis of flagellin glycosylation in *Campylobacter jejuni* NCTC 11168 reveals incorporation of legionaminic acid and its importance for host colonization. *Glycobiology* 26:386–397. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwv104>.
65. Mendez R, Gutierrez A, Reyes J, Má R, Magaña L. 2012. The extracytoplasmic function sigma factor SigY is important for efficient maintenance of the Spb prophage that encodes sublancin in *Bacillus subtilis*. *DNA Cell Biol* 31:946–955. <https://doi.org/10.1089/dna.2011.1513>.
66. Tojo S, Matsunaga M, Matsumoto T, Kang C-M, Yamaguchi H, Asai K, Sadaie Y, Yoshida K-i, Fujita Y. 2003. Organization and expression of the *Bacillus subtilis* sigY operon. *J Biochem* 134:935–946. <https://doi.org/10.1093/jb/mvg225>.
67. Radeck J, Kraft K, Bartels J, Cikovic T, Dürr F, Emenegger J, Kelterborn S, Sauer C, Fritz G, Gebhard S, Mascher T. 2013. The Bacillus BioBrick Box: generation and evaluation of essential genetic building blocks for standardized work with *Bacillus subtilis*. *J Biol Eng* 7:29. <https://doi.org/10.1186/1754-1611-7-29>.
68. Faillie C, Bénézech T, Blé W, Ronse A, Ronse G, Clarisse M, Slomianny C. 2013. Role of mechanical vs. chemical action in the removal of adherent *Bacillus* spores during CIP procedures. *Food Microbiol* 33:149–157. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.09.010>.
69. Vagner V, Dervyn E, Ehrlich D. 1998. A vector for systematic gene inactivation in *Bacillus subtilis*. *Microbiology* 144:3097–3104. <https://doi.org/10.1099/00221287-144-11-3097>.
70. Arnaud M, Chastanet A, Débarbouillé M. 2004. New vector for efficient allelic replacement in naturally nontransformable, low-GC-content, Gram-positive bacteria. *Appl Environ Microbiol* 70:6887–6891. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.11.6887-6891.2004>.

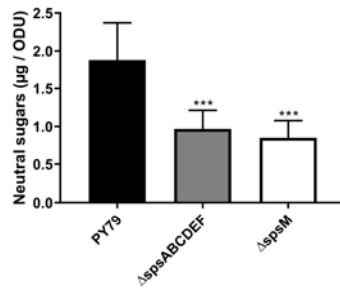
**TABLE S1.**

Annotation of the *sps* genes and RaptorX predictions. The putative function of the *sps* gene products are extracted from the MaGe genome browser (<http://www.genoscope.cns.fr/>). The structures from the PDB database that are the most similar to the RaptorX predicted structures of the Sps proteins are shown in the table.

Gene	putative function of the product	Protein	RaptorX prediction					
			P-value	Score	PDB Template	Organism	Protein	Activity
<i>spsA</i>	dTDP-glycosyltransferase	SpsA	8.64e-08	218	1H7L	<i>Bacillus subtilis</i>	SpsA	GT2 Glycosyltransferase
<i>spsB</i>	dTDP glycosyl/glycerophosphate transferase	SpsB	6.41e-18	257	3MBO	<i>Bacillus anthracis</i>	BaBshA	Glycosyltransferase
<i>spsC</i>	Glutamine-dependent sugar transaminase	SpsC	1.66e-09	348	1MDO	<i>Salmonella typhimurium</i>	ArnB	Aminotransferase
<i>spsD</i>	TDP-glycosamine N-acetyltransferase	SpsD	7.32e-07	213	5KF1	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	GlmA	GNAT superfamily N-acetyltransferase
<i>spsE</i>	Phosphoenolpyruvate sugar pyruvyltransferase	SpsE	3.20e-12	399	1VLI	<i>Bacillus subtilis</i>	SpsE	Unknown
<i>spsF</i>	glycosyltransferase	SpsF	2.41e-07	192	6OEW	<i>Leptospira borgpetersenii</i>	-	cytidyltransferase
<i>spsG</i>	glycosyltransferase	SpsG	1.14e-06	253	3S2U	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	MurG	UDP-sugar hydrolase
<i>spsM</i>	dehydratase	SpsM	4.17e-08	299	3VVC	<i>Staphylococcus aureus</i>	CapE	dehydrogenase/reductase
			8.81e-08	287	4J2O	<i>Acinetobacter baumannii</i>	WbjB	UDP-N-acetylglucosamine 4,6-dehydratase/5-epimerase
			2.00e-07	274	2GN4	<i>Helicobacter pylori</i>	PseB	UDP-GlcNAc C6 dehydratase

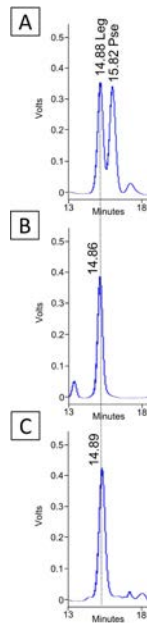
**FIG S1.**

Influence of the crust removal on the surface and adhesion properties of spores. Experiments were performed with spores of PY79 strain with crust (PY79) or crustless (PY79 –crust). The crust was removed using a French press as described in Materials and Methods. It was shown previously that the French press procedure does not damage the spore coat (9). (A) Surface hydrophilicity of spores evaluated by MATH assays (B) Surface charge of spores evaluated by zetametry assays. The error bars represent the SDs of the means. \*\*\*\*,  $P \leq 0.0001$  for PY79 –crust versus PY79 by Mann-Whitney test. (C) Evaluation of spore adhesion on stainless steel coupons. Drops of spores ( $5 \mu\text{l}$  at  $10^9$  CFU/ml) were deposited on stainless steel coupons and dried for 30 min at room temperature. The coupons were then washed three times in a water bath by immersion and emersion to remove loosely adhering spores. Pictures were taken before and after the washing step.



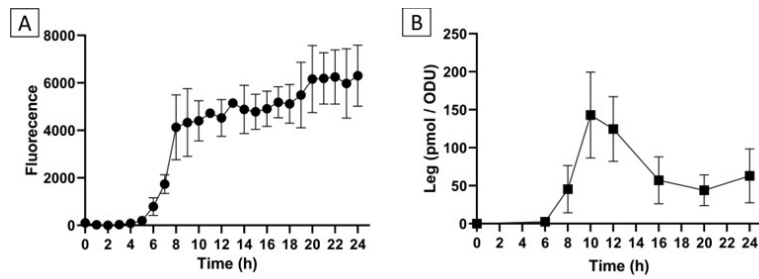
**FIG S2.**

Quantification of neutral sugars in the surface fraction of spores by the phenol-sulfuric method. The results were standardized by the OD<sub>600</sub> of the spore preparations. The error bars represent the SDs of the means. \*\*\*,  $P \leq 0.001$  for  $\Delta$  versus PY79 by  $t$  test.



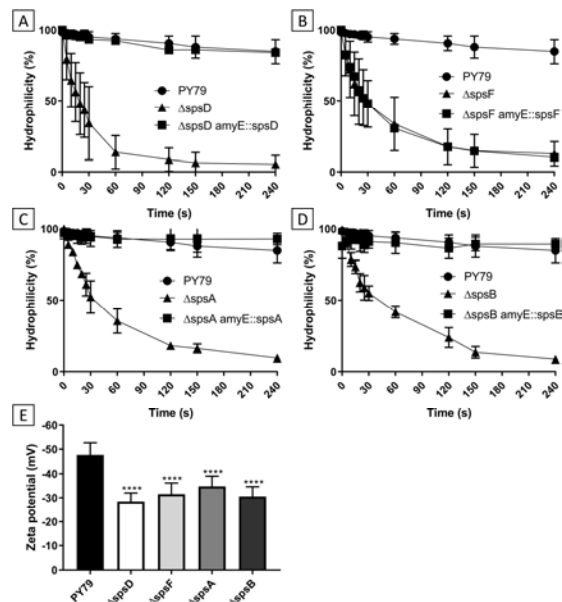
**FIG S3.**

Chromatograms of the RP-HPLC-FL experiments performed on a mix of Leg and Pse standards (A) and the surface fraction of spores of the PY79 (B) and 168 (C) strains. To discriminate between the standards, a C<sub>18</sub> Wakopak Handy ODS 4.6-mm by 250-mm column was used in this experiment. This column is longer than the one used in the other experiments, which explains the increase retention time of Leg ([Fig. 3B](#), peak 1 and [Fig. S3B](#)).



**FIG S4.**

The *sps* genes are expressed during the late stage of sporulation. (A) Expression kinetics of the  $P_{spsA}$ -*mCherry* transcriptional fusion in the PY79 strain. (B) Kinetics of Leg production in the mother cell of the PY79 strain. The amount of Leg was evaluated by RP-HPLC-FL. The results were standardized by the  $OD_{600}$  of the bacterial cultures. Growth for both kinetics were performed in Spo8 medium at 37°C. Time on the x axes is given relative to the transition to stationary phase. Error bars represent the SDs of the means.



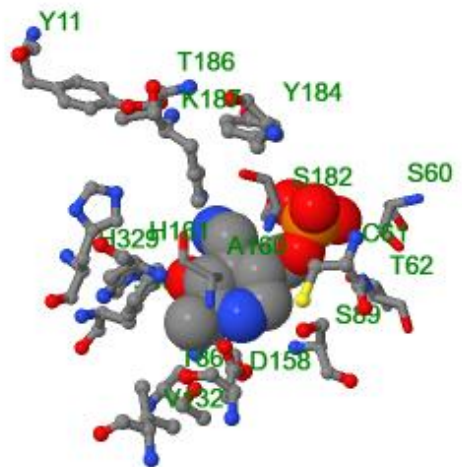
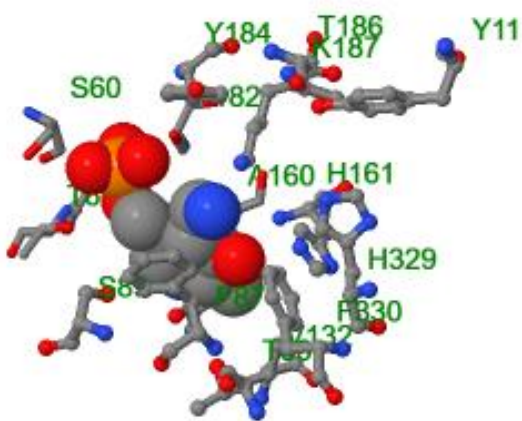
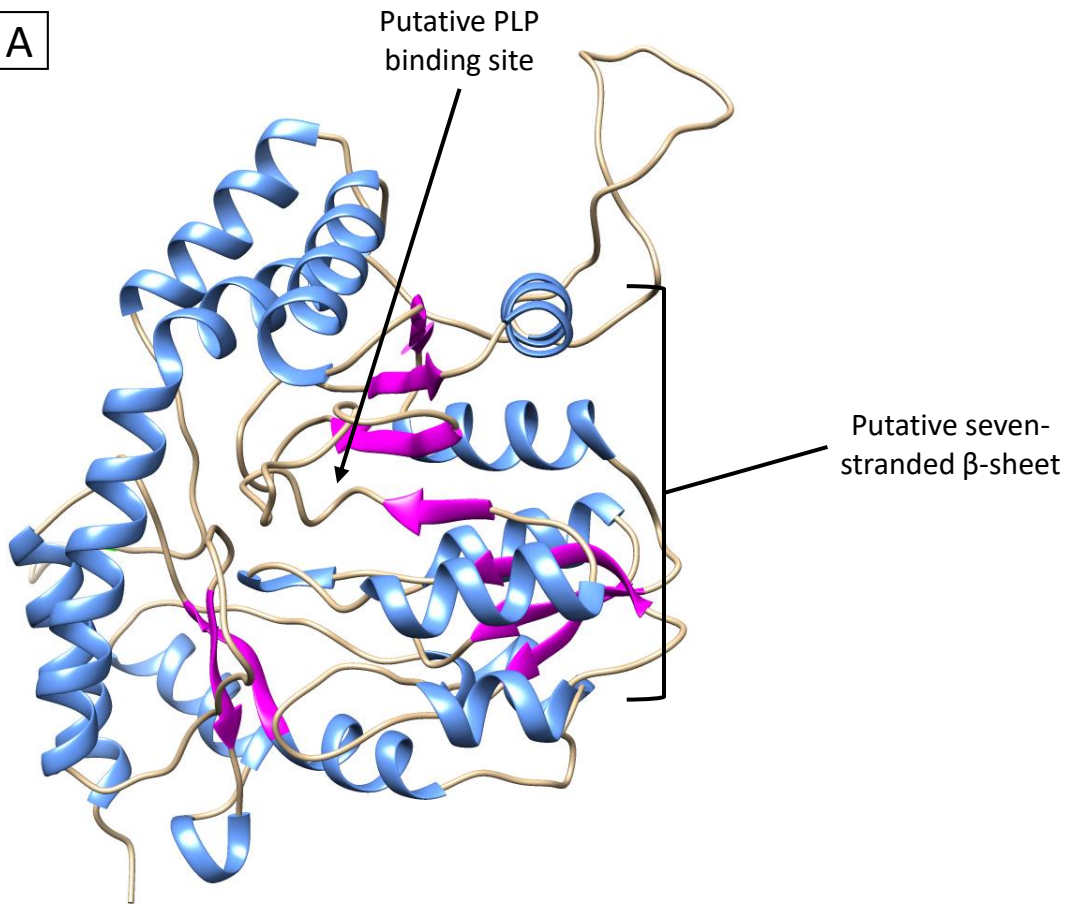
**FIG S5.**

Surface properties of spores of the *sps* mutants. Surface hydrophilicity of spores of the PY79  $\Delta$ spsD ( $\Delta$ spsD) and PY79  $\Delta$ spsD amyE::spsD ( $\Delta$ spsD amyE::spsD) (A), PY79  $\Delta$ spsF ( $\Delta$ spsF) and PY79  $\Delta$ spsF amyE::spsF ( $\Delta$ spsF amyE::spsF) (B), PY79  $\Delta$ spsA ( $\Delta$ spsA) and PY79  $\Delta$ spsA amyE::spsA ( $\Delta$ spsA amyE::spsA) (C), and PY79  $\Delta$ spsB ( $\Delta$ spsB) and *B. subtilis* PY79  $\Delta$ spsB amyE::spsB ( $\Delta$ spsB amyE::spsB) (D) strains evaluated by MATH assays. (E) Surface charge of spores evaluated by zetametry assays. The error bars represent the SDs of the means. \*\*\*\*,  $P \leq 0.0001$  for  $\Delta$  versus PY79 by Mann-Whitney test.

## TEXT S1.

Despite several attempts, we failed to complement the  $\Delta spsF$  mutant strain. However, with the data provided in this study, we believe that this lack of complementation does not question the conclusions about the role of *spsF* in CMP-Leg biosynthesis. To our knowledge, there are two reasons for complementing a mutant. The first is to verify that the introduced mutation does not disrupt the transcription of the flanking genes. The genes flanking the *spsF* gene are *spsE* (upstream) and *spsG* (downstream). We showed in this study that *spsF* and *spsE* genes are required for Leg biosynthesis (**Fig. 5**). Therefore, disruption of one of these genes in the  $\Delta spsF$  mutant strain should abolish Leg production. The PY79  $\Delta spsF$  mutant strain still produced Leg (**Fig. 5B**), indicating that flanking genes transcription is not disturbed in the  $\Delta spsF$  mutant strain. The second is to check that the phenotypes obtained with a mutant are not due to a mutation elsewhere on the chromosome. The  $\Delta spsF$  mutant strain and the complemented strain were constructed twice and we obtained twice the same result (negative complementation, data not shown). In addition, structure and function predictions indicated that SpsF is a putative cytidylytransferase (**Text S2** and **Fig. S6**). Cytidylytransferases activate the NulOs and they are required for NulOs transfer to their acceptors. The phenotypes obtained with the  $\Delta spsF$  mutant strain (Leg produced but not transferred to the forespore surface) perfectly match with the predicted cytidylytransferase activity of SpsF. Therefore, we are convinced of the veracity of the  $\Delta spsF$  mutant strain phenotypes we reported in this study, despite the lack of complementation.

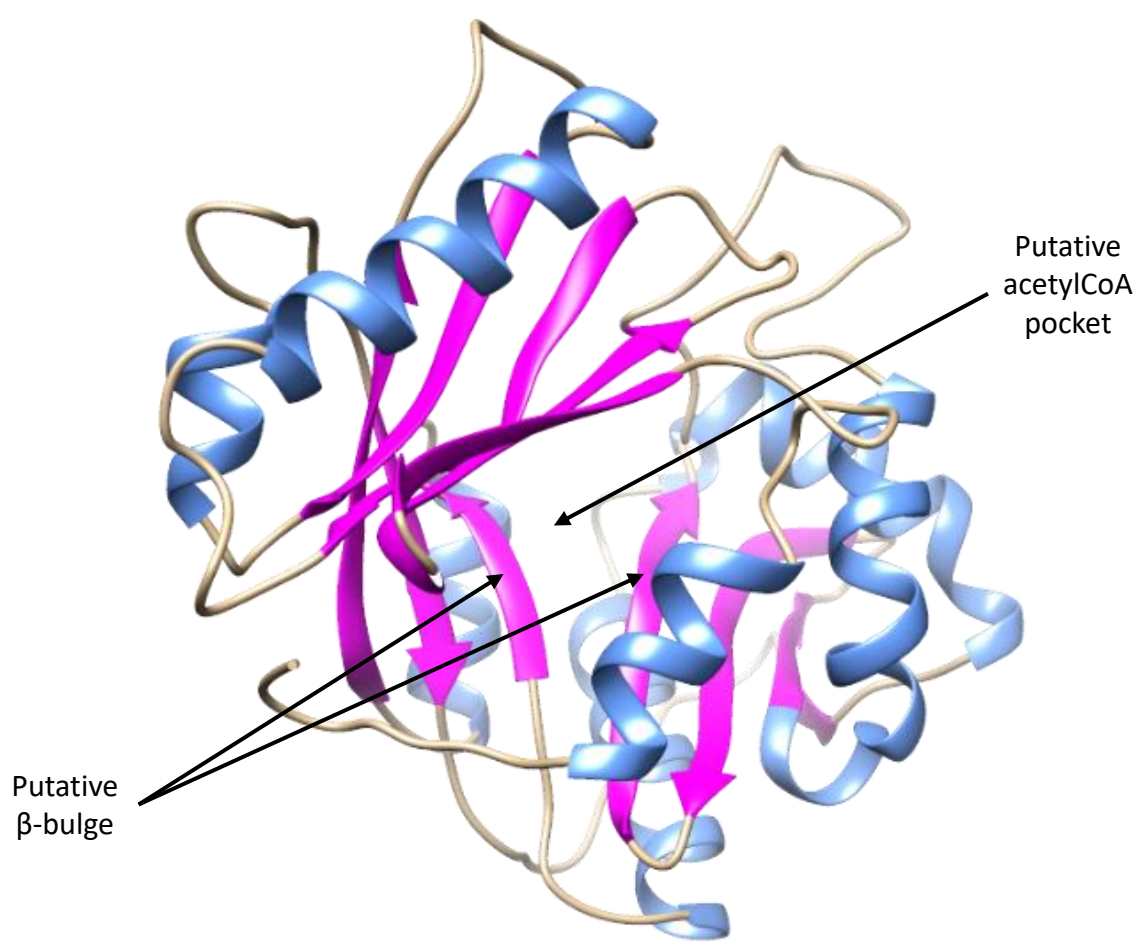
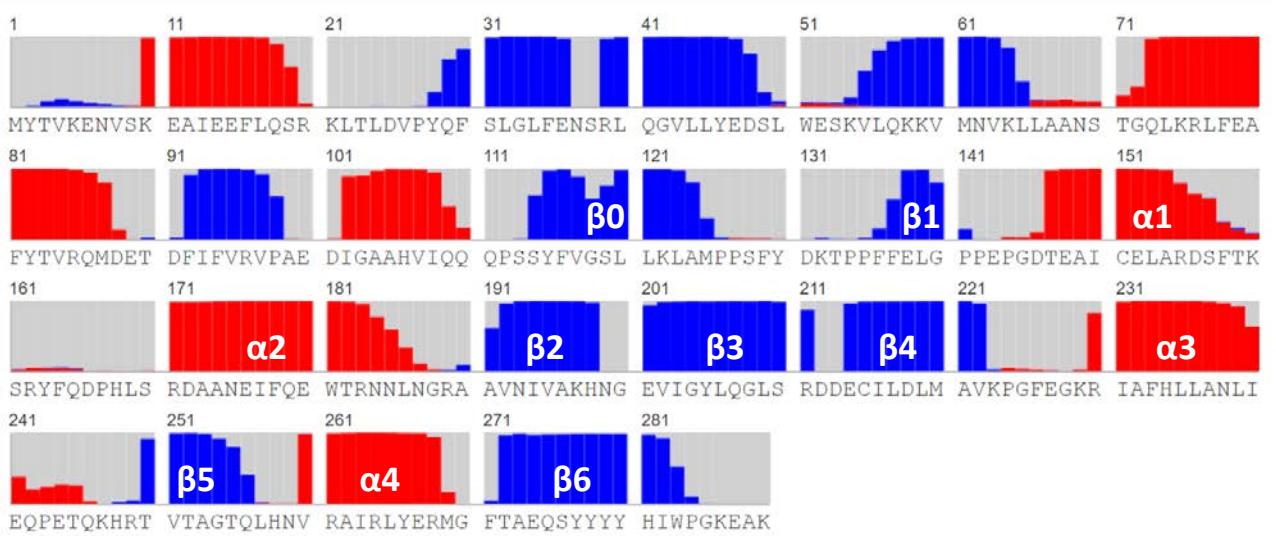
A



B

Legend for 3-class secondary structure (hovering over a residue will display the predicted distribution for that residue)

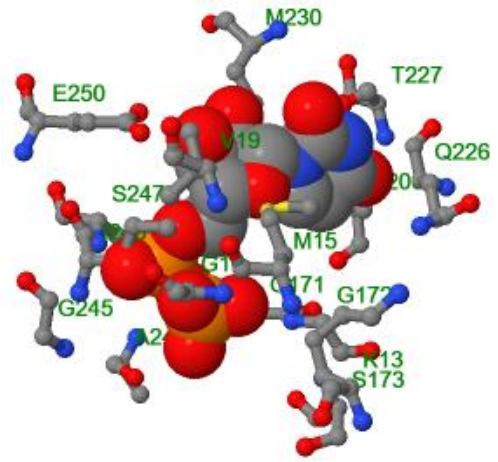
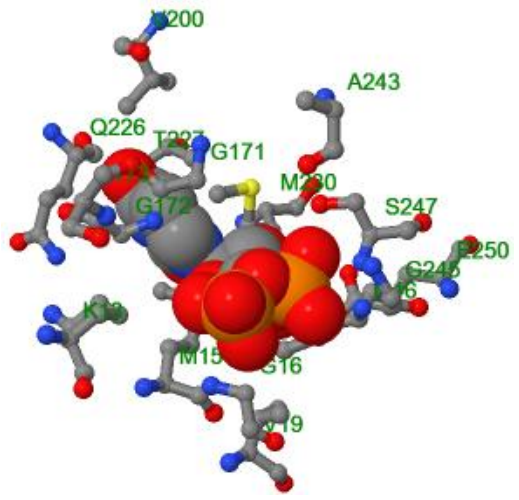
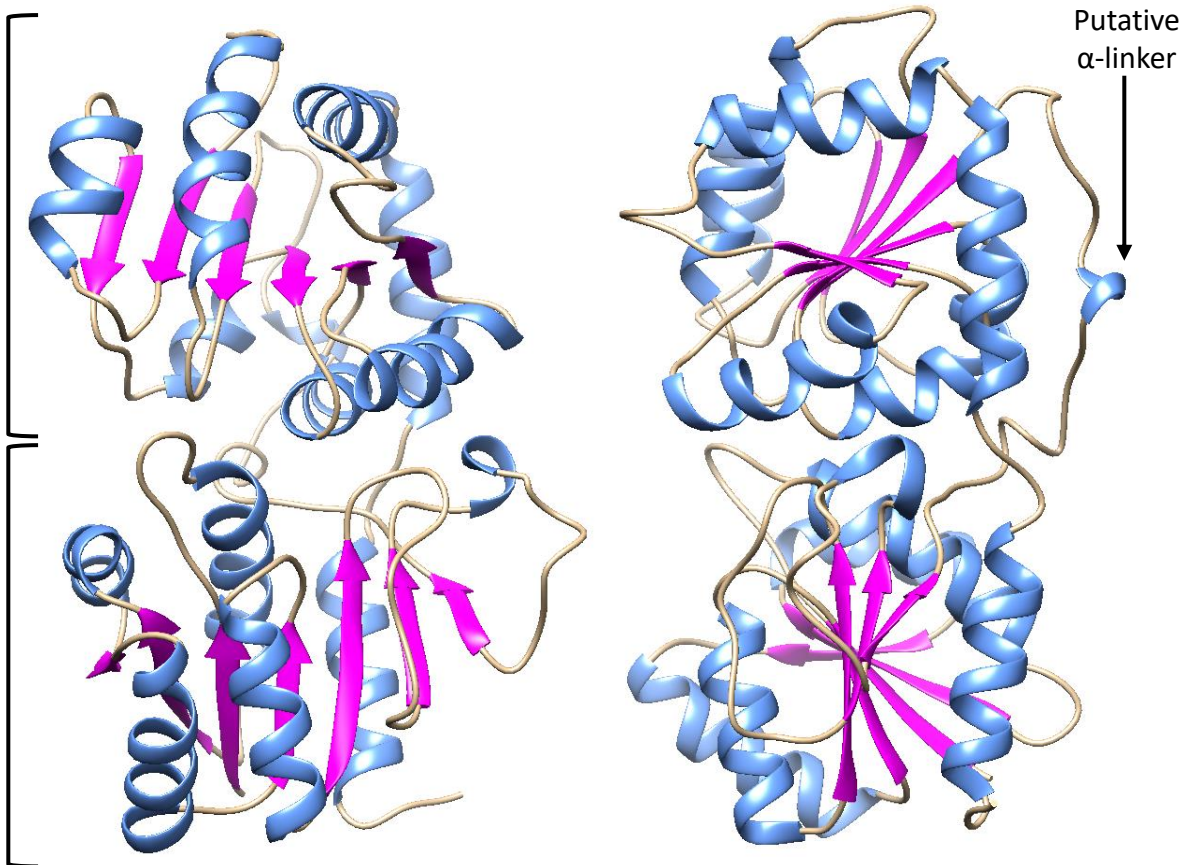
■ Helix ■ Beta ■ Coil



C

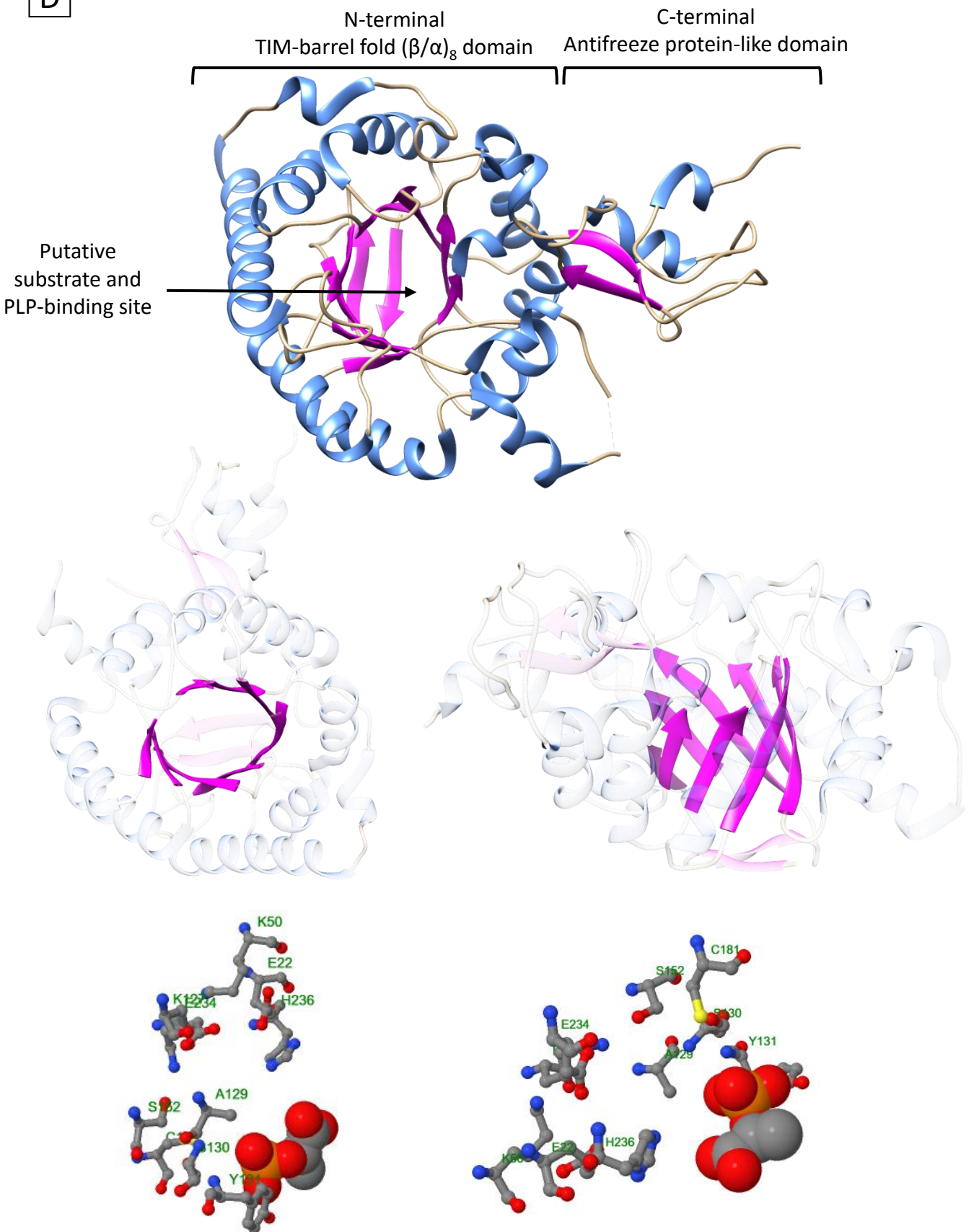
C-terminal domain  
6  $\beta$ -strands

N-terminal domain  
7  $\beta$ -strands



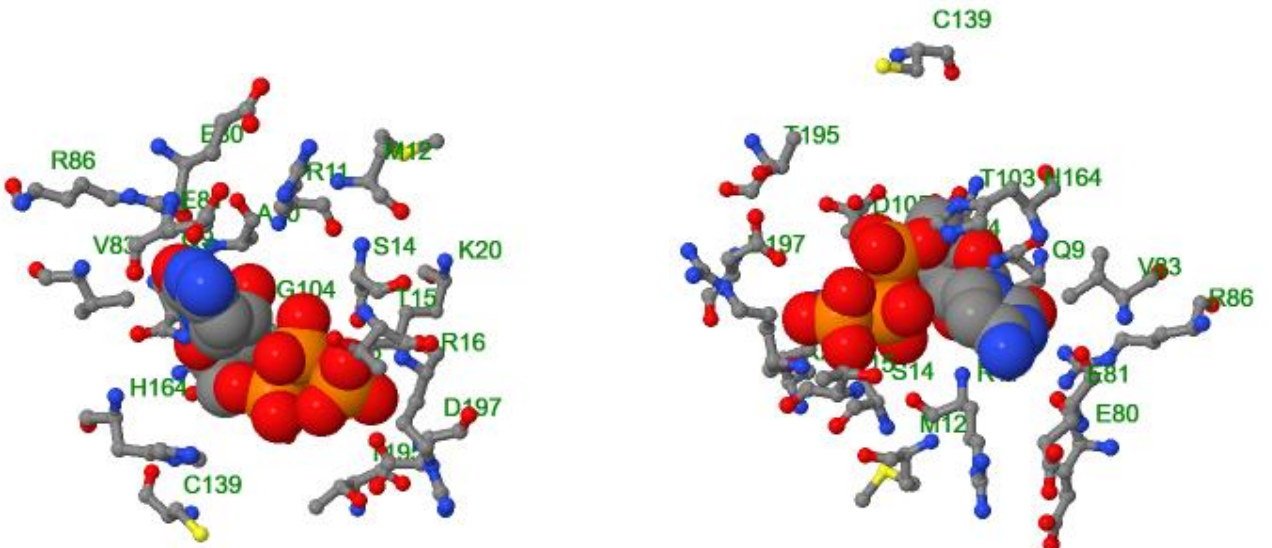
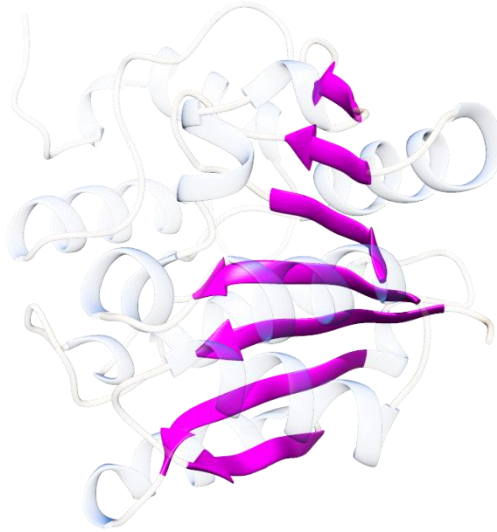
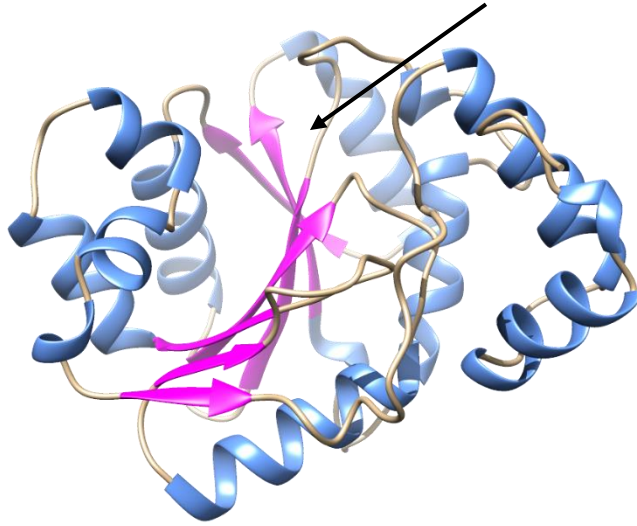


D



E

Putative CTP-binding site



**FIG S6.**

Structure or predicted structure of the Sps proteins. (A) Cartoon representation of the tertiary structure prediction of SpsC. (Top) Tertiary structure prediction. (Bottom) Putative pyridoxal-5'-phosphate pocket. (B) Predicted secondary and tertiary structures of SpsD. (Top) Secondary structure prediction. (Bottom) Cartoon representation of the tertiary structure prediction. Two  $\beta$ -strands form a V-like shape named " $\beta$ -bulge" that could constitute a binding site for acetyl coenzyme A (acetyl-CoA). (C) Cartoon representation of the tertiary structure prediction of SpsG. (Top) Tertiary structure prediction. (Bottom) Putative UDP binding pocket. (D) Cartoon representation of the tertiary structure of SpsE. Protein crystal structure was obtained by X-ray diffraction at a resolution of 2.38 Å by the Joint Center for Structural Genomics and was deposited in the PDB database under the reference 1VLI. (Top) Tertiary structure. (Middle) Focus on the 8  $\beta$ -strands of the triosephosphate isomerase (TIM)-barrel fold. The 8  $\beta$ -strands are highlighted in magenta. (Bottom) Putative PLP binding pocket. (E) Cartoon representation of the tertiary structure prediction of SpsF. (Top) Tertiary structure prediction. The SpsF monomer has an  $\alpha\beta\alpha$  three-layer sandwich architecture. (Middle) Focus on the seven  $\beta$ -strands with the topological order  $\uparrow\beta_3$ - $\uparrow\beta_2$ - $\uparrow\beta_1$ - $\uparrow\beta_4$ - $\downarrow\beta_8$ - $\uparrow\beta_5$ - $\uparrow\beta_9$  (from bottom to top). (Bottom) Putative CTP binding pocket. The tertiary structures and binding sites predictions were obtained with RaptorX software. The tertiary structure representations were performed with Chimera and Jmol software.  $\alpha$ -Helix,  $\beta$ -strand, and coil are represented in cyan, magenta, and brown, respectively.

## TEXT S2.

The second step of the putative CMP-Leg pathway in *B. subtilis* consists in the transfer of an amino group from the glutamate onto the C4 atom of the UDP-4-keto-6-deoxy-GlcNAc to produce UDP-4-amino-6-deoxy-GlcNAc (**Fig. 3A**). The comparison of the SpsC protein sequence to the TrEMBL database indicates that SpsC is a putative aminotransferase of the DegT family and the RaptorX software identified the structure of the ArnB aminotransferase of *Salmonella typhimurium* as the most related to SpsC (**Table S1**). Interestingly, ArnB catalysis amino group transfer from glutamic acid to the 4"-position of a UDP-linked ketopyranose molecule, which is exactly the presumed activity of SpsC (1). In addition, the predictive structure of SpsC showed similarity with the structure of PseC, the aminotransferase catalyzing the second step of the Pse biosynthetic pathway in *H. pylori* (2). Thus, the predictive structure of SpsC contains a PLP binding pocket and the N-Terminal domain of the protein has a seven-stranded  $\beta$ -sheet arranged in the topological order  $\uparrow\beta1-\downarrow\beta7-\uparrow\beta6-\uparrow\beta5-\uparrow\beta4-\uparrow\beta2-\uparrow\beta3$  (3) (**Fig. S6A**). These data make SpsC a good candidate for catalyzing the second step of the Leg biosynthesis pathway in *B. subtilis*. The third step consists in the conversion of the UDP-4-amino-6-deoxy-GlcNAc to UDP-2,4-diNAc-6-deoxy-Glc. In *H. pylori*, the GCN5-related N-Acetyltransferase (GNAT) PseH participating to the CMP-Pse pathway catalyzes the same reaction, but it uses UDP-4-amino-6-deoxy-AltNAc as a substrate (4). The enzymes of the GNAT family have been shown to catalyze the transfer of an acetyl group from acetyl-CoA to the primary amino group of a wide variety of substrates including proteins, mycothiol and aminoglycosides (5). In *B. subtilis*, the *spsD* gene encodes a putative N-Acetyltransferase of the GNAT family. The analysis of the predictive secondary and tertiary structure of SpsD confirms that this enzyme fulfills the characteristics of the GNAT family: a conserved  $\beta0-\beta1-\alpha1-\alpha2-\beta2-\beta3-\beta4-\alpha3-\beta5-\alpha4-\beta6$  fold and at least one V-like shape named " $\beta$ -bulge", that serves as a binding site for acetyl-CoA (**Fig S6B**). In addition, the enzyme with the most closely related tertiary structure to SpsD is GlnA, a GNAT N-Acetyltransferase catalyzing the transfer of an acetyl group from acetyl CoA to the primary amino group of glucosamine (**Table S1**) (6). Based on these elements, we assume that SpsD catalyzes the third step of the CMP-Leg pathway of *B. subtilis* (**Fig. 3A**). The fourth step of the putative CMP-Leg pathway in *B. subtilis* consists in the hydrolysis of the UDP-2,4-diNAc-6-deoxy-Glc to generate the nucleotide free sugar 2,4-diNAc-6-deoxy-Man. In the Pse biosynthesis pathway of *H. pylori*, the UDP hydrolysis of the UDP-2,4-diNAc-6-deoxy-Alt is catalyzed by the inverting nucleotide sugar hydrolase PseG that belongs to the glycosyltransferase B family (GT-B) (7,8). The structural analysis of PseG

showed that this protein has a N-terminal domain harboring seven  $\beta$ -strands in a parallel orientation, a short  $\alpha$ -helix linker and a C-terminal domain with six  $\beta$ -strands in a parallel orientation (8). In *B. subtilis*, the *spsG* gene encodes a putative glycosyltransferase with a predicted tertiary structure similar to PseG and harboring a putative UDP binding pocket (**Table S1, Fig. S6C**). The UDP-hydrolase activity of SpsG is supported by the RaptorX analysis which identifies MurG, a glycosyltransferase with a UDP-hydrolase activity, as the enzyme the most structurally related to SpsG (7) (**Table S1**). In the CMP-Leg biosynthesis pathway of *C. jejuni*, it has been suggested that the nucleotidase LegG performs a C2 epimerization resulting in NDP removal from the Leg precursor (9). Therefore, we propose that SpsG performed the C2-epimerization and the UDP-hydrolysis of the UDP-2,4-diNAc-6-deoxy-Glc to produced 2,4-diNAc-6-deoxy-Man (**Fig. 3A**). The crystal structure of SpsE was obtained by x-ray diffraction at a resolution of 2.38 Å and it was deposited in the PDB database by the Joint Center for Structural Genomics (unpublished data) (**Fig. S6D**). The protein was crystallized as the apo-enzyme with a divalent cation ( $Zn^{2+}$ ). The SpsE monomer contains a N-terminal triosephosphate isomerase (TIM)-barrel fold domain and a C-terminal antifreeze protein-like domain. The TIM-barrel of SpsE consists of eight  $\alpha$ -helices and eight parallel  $\beta$ -strands that alternate along the N-terminal part of the protein forming a cavity that contains a putative PEP-binding domain (**Fig S6D**). The structure of SpsE is similar to that of NeuB, a sialic acid synthase of *N. meningitidis* that converts phosphoenolpyruvate and N-acetylmannosamine to N-acetylneuraminic (10). Both proteins notably share a C-terminal antifreeze domain and a N-terminal TIM-barrel fold containing a PEP-binding domain and a divalent cation-binding site. These structural data provide a body of evidence suggesting that SpsE catalyzes the condensation between phosphoenolpyruvate and 2,4-diNAc-6-deoxy-Man to generate Leg. To be transferred onto their final acceptor by a specific transferase, nonulosonic acids must be activated with a nucleotide sugar. The *spsF* gene encodes a putative cytidylyltransferase that might play this role in the CMP-Leg pathway of *B. subtilis*. The predictive tertiary structure of the SpsF protein has an  $\alpha\beta\alpha$  three-layer architecture with seven  $\beta$ -strands in the topological order  $\uparrow\beta3-\uparrow\beta2-\uparrow\beta1-\uparrow\beta4-\downarrow\beta8-\uparrow\beta5-\uparrow\beta9$  and a putative CTP-binding site, all of which are structural features found in cytidylyltransferase (**Fig. S6E**) (11). In addition, we showed that Leg was not transferred from the mother cell to the surface of the forespore in a  $\Delta$ *spsF* mutant strain during sporulation, which is the expected outcome for a mutant unable to activate the Leg into CMP-Leg. These data support the hypothesis that SpsF is the cytidylyltransferase of the CMP-Leg pathway in *B. subtilis*.

## References

1. Noland BW, Newman JM, Hendle J, Badger J, Christopher JA, Tresser J, et al. Structural studies of *Salmonella typhimurium* ArnB (PmrH) aminotransferase: a 4-amino-4-deoxy-L-arabinose lipopolysaccharide-modifying enzyme. *Structure*. 2002 Nov 1;10(11):1569–80.
2. Salah Ud-Din AIM, Roujeinikova A. Flagellin glycosylation with pseudaminic acid in *Campylobacter* and *Helicobacter*: prospects for development of novel therapeutics. *Cell Mol Life Sci*. 2018 Apr 27 ;75(7):1163–78.
3. Schoenhofen IC, Lunin V V., Julien JP, Li Y, Ajamian E, Matte A, et al. Structural and functional characterization of PseC, an aminotransferase involved in the biosynthesis of pseudaminic acid, an essential flagellar modification in *Helicobacter pylori*. *J Biol Chem*. 2006 Mar 31;281(13):8907–16.
4. Ud-Din AI, Liu YC, Roujeinikova A. Crystal Structure of *Helicobacter pylori* Pseudaminic Acid Biosynthesis N-Acetyltransferase PseH: Implications for Substrate Specificity and Catalysis. Wlodawer A, editor. *PLoS One* . 2015 Mar 17;10(3):e0115634.
5. Favrot L, Blanchard JS, Vergnolle O. Bacterial GCN5-Related N-Acetyltransferases: From Resistance to Regulation. *Biochemistry*. 2016 Feb 23;55(7):989–1002.
6. Reith J, Mayer C. Characterization of a glucosamine/glucosaminide N-acetyltransferase of *Clostridium acetobutylicum*. *J Bacteriol*. 2011 Oct;193(19):5393–9.
7. Hu Y, Chen L, Ha S, Gross B, Falcone B, Walker D, et al. Crystal structure of the MurG:UDP-GlcNAc complex reveals common structural principles of a superfamily of glycosyltransferases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Feb 4;100(3):845–9.
8. Rangarajan ES, Proteau A, Cui Q, Logan SM, Potetinova Z, Whitfield D, et al. Structural and functional analysis of *Campylobacter jejuni* PseG. A UDP-sugar hydrolase from the pseudaminic acid biosynthetic pathway. *J Biol Chem*. 2009;284(31):20989–1000.
9. Schoenhofen IC, Vinogradov E, Whitfield DM, Brisson J-R, Logan SM. The CMP-legionaminic acid pathway in *Campylobacter*: Biosynthesis involving novel GDP-linked precursors. *Glycobiology*. 2009;19(7):715–25.
10. Gunawan J, Simard D, Gilbert M, Lovering AL, Wakarchuk WW, Tanner ME, et al. Structural and mechanistic analysis of sialic acid synthase NeuB from *Neisseria meningitidis* in complex with Mn<sup>2+</sup>, phosphoenolpyruvate, and N-acetylmannosaminol. *J Biol Chem*. 2005 Feb 4;280(5):3555–63.
11. Krapp S, Münster-Kühnel AK, Kaiser JT, Huber R, Tiralongo J, Gerardy-Schahn R, et al. The crystal structure of murine CMP-5-N-acetylneuraminic acid synthetase. *J Mol Biol*. 2003 Dec 5;334(4):625–37.

**TABLE S2.**

Oligonucleotides and plasmids. (A) Oligonucleotides used in this study (B) Plasmids constructed for this study.

A	Primers	Sequence	Restriction site (underlined)
	spsABCDEF-1	CG <u>GGATCC</u> GTTGAACCCATTCTTGCTTGA	<i>Bam</i> HI
	spsABCDEF-2	CACTTTTCCC <span style="text-decoration: underline;">CGAAGC</span> TTTTGGA <span style="text-decoration: underline;">ACTTCACAC</span> CCTGAACT	-
	spsABCDEF-3	AGTTTCAGGTGTGAAGTTCCAAAAGGCTTCCGGGAAAAGTG	-
	spsABCDEF-4	ACGC <u>GTCCGACT</u> TGGA <span style="text-decoration: underline;">ACTTCACAC</span> CCTGAACT	<i>Sal</i> I
	spsA-1	GACGC <u>CCATGG</u> AATATGGATAC	<i>Nco</i> I
	spsA-2	CTTAAATAGG <span style="text-decoration: underline;">CCGACA</span> AGCTCATCCTACACCTCCTTCTTGGA	-
	spsA-3	TTCCAAGAAGGAGGTGTAGGATGAGCTTGT <span style="text-decoration: underline;">CGGCCT</span> ATTTAAG	-
	spsA-4	CG <u>GGATCC</u> CCTGAGTGGCAATGAGCACAA	<i>Bam</i> HI
	spsB-1	CATG <u>CCATGG</u> CACCTTATGAGGCTGATGCTT	<i>Nco</i> I
	spsB-2	TTTCTTTGCGCTCCTATCATTGCTCTCACCC <span style="text-decoration: underline;">ATTCCA</span> AG	-
	spsB-3	CTT <u>GGAA</u> TGGGGT <span style="text-decoration: underline;">GAGAGCA</span> ATGATAGGAGCGCAAAGAAA	-
	spsB-4	CG <u>GGATCC</u> ACTTGCAGAACATATAGATGCCA	<i>Bam</i> HI
	spsD-1	CATG <u>CCATGG</u> GTCATTACCTCTCCGCTTACG	<i>Nco</i> I
	spsD-2	GCCCGGCCAAATATGATATTAATCAGCCC <span style="text-decoration: underline;">CTTTT</span> ACGAT	-
	spsD-3	ATCGTAAAAGGGGCTGATTAATATCATATTTGGCCGGGC	-
	spsD-4	CG <u>GGATCC</u> CGAAGCACTGCGATATTGTC	<i>Bam</i> HI
	spsF-1	CCGGAATTCGTAGGCAAAGACGCTCCTGT	<i>Eco</i> RI
	spsF-2	CGAAGATCCCAACATGCATGGGAAACGGGCTGTCTTCAGTA	
	spsF-3	TACTGAAGGACAGCCC <span style="text-decoration: underline;">GTTTCCC</span> ATGCATGTTGGGATCTTCG	
	spsF-4	CG <u>GGATCC</u> CATAGCTGTTACCCGATAATGCCTT	<i>Bam</i> HI
	spsM-1	CTGAGAAATCAACTTAAATTCACG	<i>Eco</i> RI
	spsM-2	CTAATGGATAGACAGGCTTGTTAACTCTCGTTTCTCTACCATGC	-
	spsM-3	GCATGGTAGAGAAACGAGAGTTAAACAAGCCTGTCTATCCATTAG	-
	spsM-4	CGCGGATCCAAGGAGGCACCAGTATGTCTG	<i>Bam</i> HI
	cotE-F	CCGGAATTCGAATACAGGGAAATTATTACGAAGGC	<i>Eco</i> RI
	cotE-R	CG <u>GGATCC</u> CAGTACCATACGTTTATATCATAATACCCCTTC	<i>Bam</i> HI
	cotZ-F	CCGGAATTCAGCCAGAAAACATCAAGCTG	<i>Eco</i> RI
	cotZ-R	CG <u>GGATCC</u> TTATCGAGTTCGCCGACAT	<i>Bam</i> HI
	cotX-F	CCGGAATTCCTGACTGTGACCATCCGT	<i>Eco</i> RI
	cotX-R	CG <u>GGATCC</u> GCTGTTACAACCTGATGTTACG	<i>Bam</i> HI
	spsA-comp-1	GCTCTAGACAAATCCCTGCTGTCCTTG	<i>Xba</i> I
	spsA-comp-2	AACTGCAGTCAACCCATTCCAAGCTTT	<i>Pst</i> I
	spsA-comp-3	CG <u>GGATCC</u> CAAATCCCTGCTGTCCTTG	<i>Bam</i> HI
	spsB-comp-1	GGAAATTCAACTTCACACCTGAAACTATCGTT	<i>Eco</i> RI
	spsB-comp-2	GGAAATTCGGAATGGGGT <span style="text-decoration: underline;">GAGAGCTT</span> G	<i>Eco</i> RI
	spsB-comp-4	GGACTAGTTTATTCAGTATCTTCCCGCCTG	<i>Spe</i> I
	spsD-comp-2	TAATCAGCCCCTTTTACGATATTTGGA <span style="text-decoration: underline;">ACTTCACAC</span> CCTGAACT	-
	spsD-comp-3	AGTTTCAGGTGTGAAGTTCCAAATATCGTAAAAGGGGCTGATTA	-
	spsD-comp-4	AACTGCAGCATTATTT <span style="text-decoration: underline;">CGCCTC</span> CTTG	<i>Pst</i> I
	spsF-comp-1	GGAAATTCGAAAGGACAGCCC <span style="text-decoration: underline;">GTTT</span> C	<i>Eco</i> RI
	spsF-comp-2	GGACTAGTCTAGTCAGCCTCTCGTTC	<i>Spe</i> I
	spsM-comp-1	GGAAATTCAGTGCTTAGCAGCATTGTTTT	<i>Eco</i> RI
	spsM-comp-4	TAACTAGTTAATAAATAAACTGTTAAAAACAGGCC	<i>Spe</i> I
	spsM-M146A-2	GATAACAGCTTGGTGGCACCCGCTGTGTTACAGGAGATAC	-
	spsM-M146A-3	GTATCTCCTGTGAACACAGCGGGT <span style="text-decoration: underline;">GCCACCA</span> AGCTGTTATC	-
	spsM-K150A-2	CAGCTTTTCAGATAACAGCGCGGTGGCACCCATTGTGTTT	-
	spsM-K150A-3	GAACACAATGGGTGGCACCCGCGCTGTTATCTGAAAAGCTG	-

Primers	Sequence	Restriction site (underlined)
PspM-F	CCG <u>GAAATTC</u> GCAGTGCTTAGCAGCATTGTT	<i>EcoRI</i>
PspM-R-pen	ACATGAAAATATATACCTCCTCATATTAACAACCTCTCGTTTCTC TACCATGC	-
pen-F	GCATGGTAGAGAAACGAGAGTTGTTTAATATGAGGAGGTATATA TTTTCATGT	-
pen-R	<u>AACTGCAGT</u> CATATTTTCTCCCCTCCTGTTA	<i>PstI</i>
PspM-R-pal	ATTTTCTCCCCTCCTGTTAATAGCCAACCTCTCGTTTCTCTACCATG C	-
pal-F	GCATGGTAGAGAAACGAGAGTTGGCTATTAACAGGAGGGGAGA AAAT	-
pal-R	<u>AACTGCAG</u> ACCATTACTCTTTCTCCTTAGGATTAA	<i>PstI</i>
PspM-R-legB	CAGCACCTGTAACATAAAATATTTCTCACGGCTTATCCTCCAACCTC TCGTT	
legB-F	AACGAGAGTTGGAGGATAAGCCGTGAGAAATATTTTAGTTACAG GTGCTG	
legB-R	<u>AAACTAGT</u> TAAACATTATAAAGCTCGCTTTTATAAT	<i>SpeI</i>
PspM-R-pglF	GCTAATCTTTTGCTTTTATAAAAAATCATGGCTTATCCTCCAAC CTCGTT	
pglF-F	AACGAGAGTTGGAGGATAAGCCATGATTTTTTATAAAAAGCAAAA GATTAGC	
pglF-R	<u>AAACTAGT</u> TATACACCTTCTTTATTGTGTTTAAATTC	<i>SpeI</i>
PspM-R-pseB	CGTGATTAAGATATTTTTTTGTTAAACATGGCTTATCCTCCAAC TCTCGTT	
pseB-F	AACGAGAGTTGGAGGATAAGCCATGTTTAAACAAAAAATATCT TAATCACG	
pseB-R	<u>AAACTAGT</u> TTAAAAACCTTCAGTATGATTGATGAT	<i>SpeI</i>
PspA-F	CG <u>GGATCC</u> CAAATCCCTGCTGTCCTTG	<i>BamHI</i>
PspA-R	CC <u>AAGCTT</u> AACTTCACACCTGAAACTATCGTT	<i>HindIII</i>



Plasmid name	Plasmid features
pMADΩ <i>spsABCDEF</i>	5' and 3' regions flanking the <i>spsABCDEF</i> operon were amplified by SOE-PCR using primers <i>spsABCDEF-1/spsABCDEF-2</i> and <i>spsABCDEF-3/spsABCDEF-4</i> . The PY79 chromosomal DNA was used as template. The resulting fragment was purified as a <i>Bam</i> HI- <i>Sal</i> I fragment and it was inserted between the <i>Bam</i> HI and <i>Sal</i> I sites of pMAD.
pMADΩ <i>spsA</i>	5' and 3' regions flanking the <i>spsA</i> gene were amplified by SOE-PCR using primers <i>spsA-1/spsA-2</i> and <i>spsA-3/spsA-4</i> . The PY79 chromosomal DNA was used as template. The resulting fragment was purified as a <i>Nco</i> I- <i>Bam</i> HI fragment and it was inserted between the <i>Nco</i> I and <i>Bam</i> HI sites of pMAD.
pMADΩ <i>spsB</i>	5' and 3' regions flanking the <i>spsB</i> gene were amplified by SOE-PCR using primers <i>spsB-1/spsB-2</i> and <i>spsB-3/spsB-4</i> . The PY79 chromosomal DNA was used as template. The resulting fragment was purified as a <i>Nco</i> I- <i>Bam</i> HI fragment and it was inserted between the <i>Nco</i> I and <i>Bam</i> HI sites of pMAD.
pMADΩ <i>spsD</i>	5' and 3' regions flanking the <i>spsD</i> gene were amplified by SOE-PCR using primers <i>spsD-1/spsD-2</i> and <i>spsD-3/spsD-4</i> . The PY79 chromosomal DNA was used as template. The resulting fragment was purified as a <i>Nco</i> I- <i>Bam</i> HI fragment and it was inserted between the <i>Nco</i> I and <i>Bam</i> HI sites of pMAD.
pMADΩ <i>spsF</i>	5' and 3' regions flanking the <i>spsF</i> gene were amplified by SOE-PCR using primers <i>spsF-1/spsF-2</i> and <i>spsF-3/spsF-4</i> . The PY79 chromosomal DNA was used as template. The resulting fragment was purified as a <i>Eco</i> RI- <i>Bam</i> HI fragment and it was inserted between the <i>Eco</i> RI and <i>Bam</i> HI sites of pMAD.
pMADΩ <i>spsM</i>	5' and 3' regions flanking the <i>spsM</i> gene were amplified by SOE-PCR using primers <i>spsM-1/spsM-2</i> and <i>spsM-3/spsM-4</i> . The PY79 chromosomal DNA was used as template. The resulting fragment was purified as a <i>Eco</i> RI- <i>Bam</i> HI fragment and it was inserted between the <i>Eco</i> RI and <i>Bam</i> HI sites of pMAD.
pMUTIN4 <i>cotE</i>	An internal fragment of the <i>cotE</i> gene was amplified by PCR using primers <i>cotE-F</i> and <i>cotE-R</i> . The PY79 chromosomal DNA was used as template. The resulting fragment was purified as a <i>Eco</i> RI- <i>Bam</i> HI fragment and it was inserted between the <i>Eco</i> RI and <i>Bam</i> HI sites of pMUTIN4.
pMUTIN4 <i>cotZ</i>	An internal fragment of the <i>cotZ</i> gene was amplified by PCR using primers <i>cotZ-F</i> and <i>cotZ-R</i> . The PY79 chromosomal DNA was used as template. The resulting fragment was purified as a <i>Eco</i> RI- <i>Bam</i> HI fragment and it was inserted between the <i>Eco</i> RI and <i>Bam</i> HI sites of pMUTIN4.
pMUTIN4 <i>cotX</i>	An internal fragment of the <i>cotX</i> gene was amplified by PCR using primers <i>cotX-F</i> and <i>cotX-R</i> . The PY79 chromosomal DNA was used as template. The resulting fragment was purified as a <i>Eco</i> RI- <i>Bam</i> HI fragment and it was inserted between the <i>Eco</i> RI and <i>Bam</i> HI sites of pMUTIN4.
pBS1CΩ <i>amyE</i> :: <i>spsA</i>	The <i>spsA</i> gene was amplified with its promoter region using primers <i>spsA-comp-1</i> and <i>spsA-comp-2</i> with PY79 chromosomal DNA as template. The resulting fragment was inserted between the <i>Xba</i> I and <i>Pst</i> I sites of pBS1C.
pBS1CΩ <i>amyE</i> :: <i>spsB</i>	The promoter region of <i>spsA</i> and the <i>spsB</i> gene were amplified with the primers <i>spsA-comp-3/spsB-comp-1</i> and <i>spsB-comp-2/spsB-comp-4</i> using the PY79 chromosomal DNA as template. The promoter region of <i>spsA</i> was purified as a <i>Bam</i> HI- <i>Eco</i> RI fragment and the <i>spsB</i> gene as a <i>Eco</i> RI/ <i>Spe</i> I fragment. Both fragments were then inserted between the <i>Bam</i> HI and <i>Spe</i> I sites of pBS1C.

Plasmid name	Plasmid features
pBS1CΩamyE :: <i>spsD</i>	The <i>spsD</i> gene was amplified with the promoter region of <i>spsA</i> by SOE-PCR using primers <i>spsA</i> -comp-1/ <i>spsD</i> -comp-2 and <i>spsD</i> -comp-3/ <i>spsD</i> -comp-4. The PY79 chromosomal DNA was used as template. The resulting fragment was purified as a <i>XbaI-PstI</i> fragment and it was inserted between the <i>XbaI</i> and <i>PstI</i> sites of pBS1C.
pBS1CΩamyE :: <i>spsF</i>	The promoter region of <i>spsA</i> and the <i>spsF</i> gene were amplified with primers <i>spsA</i> -comp-3/ <i>spsB</i> -comp-1 and <i>spsF</i> -comp-1/ <i>spsF</i> -comp-2 using the PY79 chromosomal DNA as template. The promoter region of <i>spsA</i> was purified as a <i>BamHI-EcoRI</i> fragment and the <i>spsF</i> gene as a <i>EcoRI-SpeI</i> fragment. Both fragments were then inserted between the <i>BamHI</i> and <i>SpeI</i> sites of pBS1C.
pBS1CΩamyE :: <i>spsM</i>	The <i>spsM</i> gene was amplified with its promoter region using primers <i>spsM</i> -comp1/ <i>spsM</i> -comp-4 with PY79 chromosomal DNA as template. The resulting fragment was purified as a <i>EcoRI-SpeI</i> fragment and it was inserted between the <i>EcoRI</i> and <i>SpeI</i> sites of pBS1C.
pBS1CΩamyE :: <i>spsM</i> *M146A	The M146A mutation was introduced by SOE-PCR using primers <i>spsM</i> -comp-1/ <i>spsM</i> -M146A-2 and <i>spsM</i> -M146A-3/ <i>spsM</i> -comp-4. The PY79 chromosomal DNA was used as template. The resulting fragment was purified as a <i>EcoRI-SpeI</i> fragment and it was inserted between the <i>EcoRI</i> and <i>SpeI</i> sites of pBS1C.
pBS1CΩamyE :: <i>spsM</i> *K150A	The K150A mutation was introduced by SOE-PCR using primers <i>spsM</i> -comp-1/ <i>spsM</i> -K150A-2 and <i>spsM</i> -K150A-3/ <i>spsM</i> -comp-4. The PY79 chromosomal DNA was used as template. The resulting fragment was purified as a <i>EcoRI-SpeI</i> fragment and it was inserted between the <i>EcoRI</i> and <i>SpeI</i> sites of pBS1C.
pBS1CΩamyE :: <i>pen</i>	The <i>pen</i> gene was amplified with the promoter region of <i>spsM</i> by SOE-PCR using primers <i>Psp</i> sM-F/ <i>Psp</i> sM-R- <i>pen</i> and <i>pen</i> -F/ <i>pen</i> -R. The PY79 and the <i>B. thuringiensis</i> ATCC35646 chromosomal DNA were respectively used as template. The resulting fragment was purified as a <i>EcoRI-PstI</i> fragment and it was inserted between the <i>EcoRI</i> and <i>PstI</i> sites of pBS1C.
pBS1CΩamyE :: <i>pal</i>	The <i>pal</i> gene was amplified with the promoter region of <i>spsM</i> by SOE-PCR using primers <i>Psp</i> sM-F/ <i>Psp</i> sM-R- <i>pal</i> and <i>pal</i> -F/ <i>pal</i> -R. The PY79 and the <i>B. thuringiensis</i> ATCC35646 chromosomal DNA were respectively used as template. The resulting fragment was purified as a <i>EcoRI-PstI</i> fragment and it was inserted between the <i>EcoRI</i> and <i>PstI</i> sites of pBS1C.
pBS1CΩamyE :: <i>pen-pal</i>	The <i>pen</i> and <i>pal</i> genes were amplified with the promoter region of <i>spsM</i> by SOE-PCR using primers <i>Psp</i> sM-F/ <i>Psp</i> sM-R- <i>pen</i> and <i>pen</i> -F/ <i>pal</i> -R. The PY79 and the <i>B. thuringiensis</i> ATCC35646 chromosomal DNA were respectively used as template. The resulting fragment was purified as a <i>EcoRI-PstI</i> fragment and it was inserted between the <i>EcoRI</i> and <i>PstI</i> sites of pBS1C.
pBS1CΩamyE :: <i>legB</i>	The <i>pen</i> and <i>pal</i> genes were amplified with the promoter region of <i>spsM</i> by SOE-PCR using primers <i>Psp</i> sM-F/ <i>Psp</i> sM-R- <i>legB</i> and <i>legB</i> -F/ <i>legB</i> -R. The PY79 and the <i>C. jejuni</i> NCTC11168 chromosomal DNA were respectively used as template. The resulting fragment was purified as a <i>EcoRI-SpeI</i> fragment and it was inserted between the <i>EcoRI</i> and <i>SpeI</i> sites of pBS1C.
pBS1CΩamyE :: <i>pglF</i>	The <i>pen</i> and <i>pal</i> genes were amplified with the promoter region of <i>spsM</i> by SOE-PCR using primers <i>Psp</i> sM-F/ <i>Psp</i> sM-R- <i>pglF</i> and <i>pglF</i> -F/ <i>pglF</i> -R. The PY79 and the <i>C. jejuni</i> NCTC11168 chromosomal DNA were respectively used as template. The resulting fragment was purified as a <i>EcoRI-SpeI</i> fragment and it was inserted between the <i>EcoRI</i> and <i>SpeI</i> sites of pBS1C.
pBS1CΩamyE :: <i>pseB</i>	The <i>pen</i> and <i>pal</i> genes were amplified with the promoter region of <i>spsM</i> by SOE-PCR using primers <i>Psp</i> sM-F/ <i>Psp</i> sM-R- <i>pseB</i> and <i>pseB</i> -F/ <i>pseB</i> -R. The PY79 and the <i>C.</i>

## Plasmid name

## Plasmid features

*jejuni* NCTC11168 chromosomal DNA were respectively used as template. The resulting fragment was purified as a *EcoRI-SpeI* fragment and it was inserted between the *EcoRI* and *SpeI* sites of pBS1C.

pBS1C $\Omega$ *amyE* ::*P**spsA*-*mCherry*

The promoter region of *spsA* gene was amplified with primers *P**spsA*-F /*P**spsA*-R using the PY79 chromosomal DNA as template. The promoterless *mCherry* gene was purified as a *XbaI-PstI* fragment from pSB1C3 *mCherry\_Bsu* (BGSC: ECE756). The promoter region of *spsA* was purified as a *BamHI-HindIII* fragment. Both fragments were then respectively inserted between the *XbaI-PstI* and *BamHI-HindIII* sites of pBS1C.

B. Les gènes *cge* influencent la composition en monosaccharides du crust et modulent les propriétés de surface et d'adhésion des spores chez *Bacillus subtilis*.

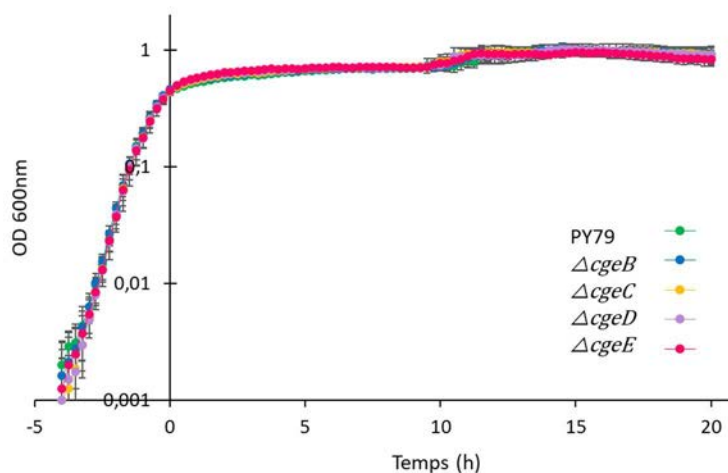
a) Introduction

L'objectif de ma thèse était initialement de comprendre comment sont synthétisés et structurés les glycanes du crust des spores de *B. subtilis* et leur rôle sur les propriétés de surface et d'adhésion des spores. En effet, parmi les gènes potentiellement impliqués dans la biosynthèse de la fraction glycanique du crust, les gènes *cgeABCDE* avaient fait l'objet de peu d'études, contrairement aux gènes *spsIJKL*, *spsCDEFG* et *spsM*. La seule étude disponible avait mis en évidence que la délétion d'une partie du locus *cgeBACDE* entraînait la production de spores plus adhérentes aux surfaces que la souche parentale, suggérant un rôle des protéines Cge dans la structure et/ou la biosynthèse du crust (Roels and Loisek 1995). La fonction exacte des gènes *cgeBACDE* ainsi que les voies de biosynthèse dans lesquelles ils sont impliqués restaient donc à définir.

J'ai focalisé cette étude sur la compréhension du rôle des gènes *cgeB*, *cgeC*, *cgeD* et *cgeE* dans la biosynthèse des glycanes du crust et sur les propriétés de surface et d'adhésion des spores. Dans ce but, j'ai construit des mutants des gènes *cgeB*, *cgeC*, *cgeD* et *cgeE* par double recombinaison homologue dans la souche *B. subtilis* PY79. J'ai ensuite étudié l'impact des mutations sur les propriétés de surface et d'adhésion des spores. Enfin, je devais caractériser la fonction précise de ces gènes. Malheureusement, avant d'avoir pu mener à bien la totalité de cette étude, l'équipe de Patrick Eichenberger (Center for Genomics and Systems Biology, Department of Biology, New York University) a publié deux articles (Shuster et al., 2019a, 2019b) sur les gènes codant des glycosyltransférases (notamment les clusters *cgeAB* et *cgeCDE*), et leur rôle sur les propriétés de surface des spores de *B. subtilis*. Devant l'impossibilité de publier ces résultats, nous avons donc décidé d'arrêter nos travaux avant leur terme. Mes travaux se sont donc limités à l'étude du rôle des gènes *cge* sur les propriétés de surface des spores et la composition en monosaccharides du crust.

b) Résultats

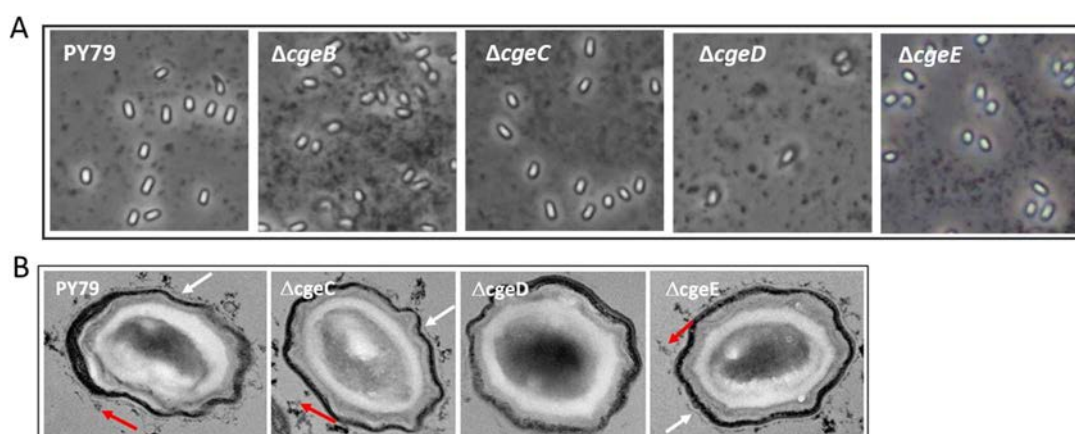
En premier lieu, j'ai vérifié que la délétion de ces gènes n'affectait pas la croissance et la sporulation de *B. subtilis*. Les courbes de croissance des différentes souches ont été réalisées en microplaques dans du bouillon nutritif. Comme le montre la **Figure 30**, la délétion des gènes *cgeB*, *cgeC*, *cgeD* et *cgeE* n'affecte pas la croissance de *B. subtilis*. La capacité des différentes souches à sporuler a été testée sur une gélose mise au point pour faciliter la sporulation des espèces de *Bacillus*, la gélose Spo8. Toutes les souches ont produit des spores réfringentes et viables.



**Figure 30 :** Courbes de croissance de *B. subtilis* PY79 et des mutants  $\Delta cgeB$ ,  $\Delta cgeC$ ,  $\Delta cgeD$  et  $\Delta cgeE$ . Les croissances ont été réalisées en microplaques en milieu Bouillon Nutritif à 37°C sous agitation. Les résultats représentent les moyennes de quatre répliques biologiques.

### 1. Influence des gènes *cge* sur la morphologie du crust des spores de *B. subtilis*.

Des spores des mutants ont été produites sur milieu gélosé Spo8. Les spores ont ensuite été colorées à l'encre de chine (**Figure 31A**) Cette coloration a tout d'abord été utilisée pour mettre en évidence la présence d'une capsule polysaccharidique autour de bactéries et peut aussi être utilisée pour mettre en évidence la présence de glycanes à la surface de la spore (Abe et al., 2014; Shuster et al., 2019a). Lorsque les glycanes du crust sont intacts, un halo blanc est observable autour des spores. C'est le cas des spores produites par la souche PY79 ainsi que par celles produites par les mutants  $\Delta cgeC$  et  $\Delta cgeE$ . Dans le cas des spores produites par les mutants  $\Delta cgeB$  et  $\Delta cgeD$  en revanche il n'y a plus de halo visible. Nous avons ensuite coloré des spores des mutants au rouge de ruthénium et des coupes de ces spores ont été observées au microscope électronique (**Figure 31B**).



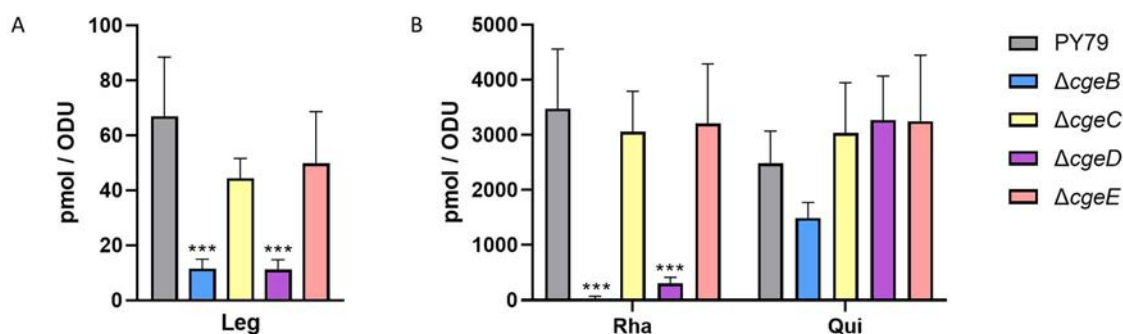
**Figure 31 :** Observation en microscopie des spores produites par *B. subtilis* PY79 et les mutants  $\Delta cgeC$ ,  $\Delta cgeD$  et  $\Delta cgeE$ . (A) Observation des spores après coloration à l'encre de chine. Le halo blanc autour des spores témoigne de la présence de polysaccharides à la surface des spores. (B) Observations en microscopie électronique des spores après coloration au rouge de ruthénium. Le crust apparaît sous forme d'une couche sombre à la superficie de la spore (flèches blanches). D'autres amas sont aussi présents de façon irrégulière à l'extérieur du crust (flèches rouges) et pourraient traduire le décrochement partiel d'une partie du crust.

Les observations ont montré la présence de crust (flèches blanches) autour des spores de la souche sauvage et sur les mutants  $\Delta cgeC$  et  $\Delta cgeE$ . Il est toutefois difficile de conclure, à partir de ces images, sur l'épaisseur du crust de ces souches. Par ailleurs, des amas sombres (flèches rouges) plus ou moins détachés des spores sont observables, ce qui suggère qu'une partie du crust s'est détachée des spores. En revanche, les spores du mutant  $\Delta cgeD$  sont dépourvues de crust, mais aussi du matériel situé en périphérie des spores des autres souches. Les observations en microscopie électronique après coloration au rouge de ruthénium de spores de  $\Delta cgeB$  ayant déjà été publiées, nous n'avons pas traité les spores de ce mutant. Les auteurs montraient une absence de crust à la surface des spores (Shuster et al., 2019a). Les observations en microscopie électronique sont concordantes avec nos premières observations après coloration à l'encre de chine : un crust endommagé dans le cas des spores produites par les souches  $\Delta cgeB$  et  $\Delta cgeD$  mais qui semble intact dans le cas des spores des mutants  $\Delta cgeC$  et  $\Delta cgeE$ .

## 2. Rôle des gènes *cge* dans la composition du crust en monosaccharides

J'ai étudié l'implication des gènes *cgeB*, *cgeC*, *cgeD* et *cgeE* dans la biosynthèse de la fraction glycanique du crust. Pour ce travail, j'ai analysé la composition en acide légionaminique et en oses neutres du crust de la souche sauvage et des mutants par HPLC. Cette méthode d'analyse consiste à hydrolyser les glycanes du crust en condition acide et à chaud puis à complexer les monosaccharides libérés avec une molécule fluorescente (dérivation). Le DMB (1,2-diamino-4,5-méthylendioxybenzene) et l'acide anthranilique sont les molécules fluorescentes qui permettent de détecter les acides nonulosoniques (ici, l'acide légionaminique) et les oses neutres (glucosamine, galactose, glucose, rhamnose et quinovose) respectivement. Les monosaccharides ainsi rendus fluorescents sont ensuite séparés en HPLC sur une colonne en phase inverse (C18).

La quantité d'acide légionaminique présente dans le crust des spores est diminuée suite à la délétion des gènes *cgeB*, *cgeC*, *cgeD* et *cgeE* (**Figure 32A**). Cette diminution est relativement faible avec les mutants  $\Delta cgeC$  et  $\Delta cgeE$ , mais beaucoup plus nette pour les mutants  $\Delta cgeB$  et  $\Delta cgeD$ , qui contiennent près de 6 fois moins d'acide légionaminique que la souche sauvage. Le test de comparaisons multiples de Tukey (**Table 4**) confirme que seules les délétions des gènes *cgeB* et *cgeD* entraînent une diminution significative de la quantité d'acide légionaminique dans le crust. Cette diminution de la quantité d'acide légionaminique pourrait être à l'origine des modifications des propriétés physicochimiques des spores des mutants  $\Delta cgeB$  et  $\Delta cgeD$ .

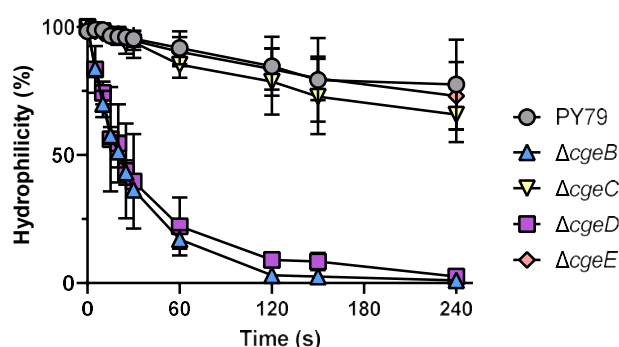


**Figure 32 : Dosage des monosaccharides du crust des spores de *B. subtilis* PY79 et des mutants des gènes *cge*.** A) Dosage de l'acide legionaminique après dérivation en présence de DMB. B) Dosage du rhamnose et du quinovose après dérivation en présence d'acide anthranilique. Les résultats représentent les moyennes de trois répliques biologiques.

Concernant les oses neutres, aucune différence de la composition en glucosamine, galactose et glucose n'a pu être observée entre les souches. En revanche, une diminution de la concentration en rhamnose a été observée chez les spores produites par les mutants  $\Delta cgeB$  et  $\Delta cgeD$  et une diminution de la concentration en quinovose chez les spores produites par le mutant  $\Delta cgeB$  (**Figure 32B**). Toutefois, le test de comparaisons multiples de Tukey (**Table 4**) met en évidence une différence significative uniquement pour la concentration en rhamnose.

### 3. Rôle des gènes *cge* dans les propriétés de surface et d'adhésion des spores de *B. subtilis*.

J'ai ensuite utilisé les mutants pour évaluer l'influence des gènes *cge* sur les propriétés de surface et d'adhésion des spores de *B. subtilis* PY79. Le caractère hydrophile ou hydrophobe des spores produites par les différentes souches a été évalué par un test d'affinité pour l'hexadécane, un solvant apolaire non miscible à l'eau (**Figure 33**) (Faille et al., 2014b). Une suspension aqueuse de spores a été mise en contact avec de l'hexadécane dans des tubes à hémolyse, qui ont été agités pendant différentes durées, puis laissés 30 minutes au repos pour permettre la séparation des deux phases. Plus les spores sont hydrophobes, plus elles ont tendance à rester à l'interface eau/hexadécane, ce qui se traduit par une diminution plus ou moins rapide de la densité optique de la phase aqueuse. En revanche les spores hydrophiles restent en majorité dans la phase aqueuse.

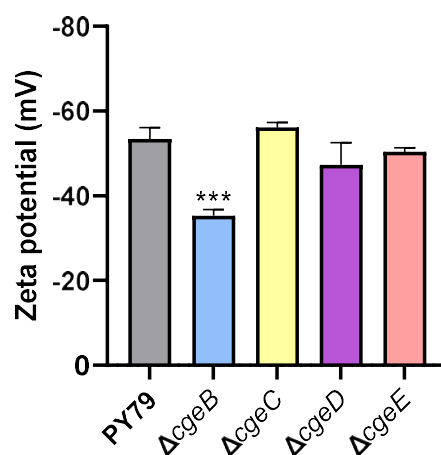


**Figure 33 : Propriété hydrophile/hydrophobe des spores de *B. subtilis* PY79 et des mutants *cge* évalué par MATH.** Les résultats représentent la moyenne de trois répliques biologiques.

Les spores produites par la souche sauvage sont hydrophiles avec près de 78% des spores encore présentes dans la phase aqueuse après quatre minutes d'agitation. Les spores produites par les mutants  $\Delta cgeC$  et  $\Delta cgeE$  présentent des profils proches de celui de la souche sauvage (respectivement 66% et 73% de spores résiduelles dans la phase aqueuse). Les spores produites par les mutants  $\Delta cgeB$  et  $\Delta cgeD$  sont quant à elles hydrophobes avec moins de 10% de spores encore présentes dans la phase aqueuse après deux minutes d'agitation et moins de 3% après 4 minutes.

Le caractère hydrophile/hydrophobe des spores a été évalué par l'énergie de partition de Gibbs ( $\Delta G_{par}$ ), obtenue à partir de la constante d'équilibre  $K$  ( $\Delta G_{par} = \ln K$ ), qui exprime le partage maximal des spores entre la phase aqueuse et l'hexadécane. Cette constante a été calculée à partir de l'équation  $K = [6(A_0 - A_{eq}) / A_{eq}]$ ,  $A_{eq}$  étant la valeur d'absorbance la plus faible dans les conditions expérimentales de l'essai. L'analyse de variance a indiqué que  $\Delta G_{par}$  était affectée par l'absence des gènes  $cgeB$ ,  $cgeC$ ,  $cgeD$  et  $cgeE$  ( $p < 0.0001$ ). Le test de comparaisons multiples de Tukey (**Table 4**) confirme les observations de la **Figure 33**, c'est-à-dire que les mutants  $\Delta cgeB$  et  $\Delta cgeD$  (Groupe A) sont significativement plus hydrophobes que la souche sauvage et les mutants  $\Delta cgeE$  et  $\Delta cgeC$  (Groupe B).

J'ai ensuite analysé la charge des spores des différentes souches, par la mesure du potentiel Zêta des spores à pH neutre (7,0). Les spores produites par *B. subtilis* PY79 sont chargées négativement avec un potentiel Zêta de -53,4 mV (**Figure 34**). Les spores des mutants  $\Delta cgeC$ ,  $\Delta cgeD$  et  $\Delta cgeE$  ont un potentiel Zêta proche de celui de la souche sauvage (entre -47,3 et -56,1 mV). Seules les spores produites par le mutant  $\Delta cgeB$  sont moins chargées avec un potentiel Zeta de -35 mV.

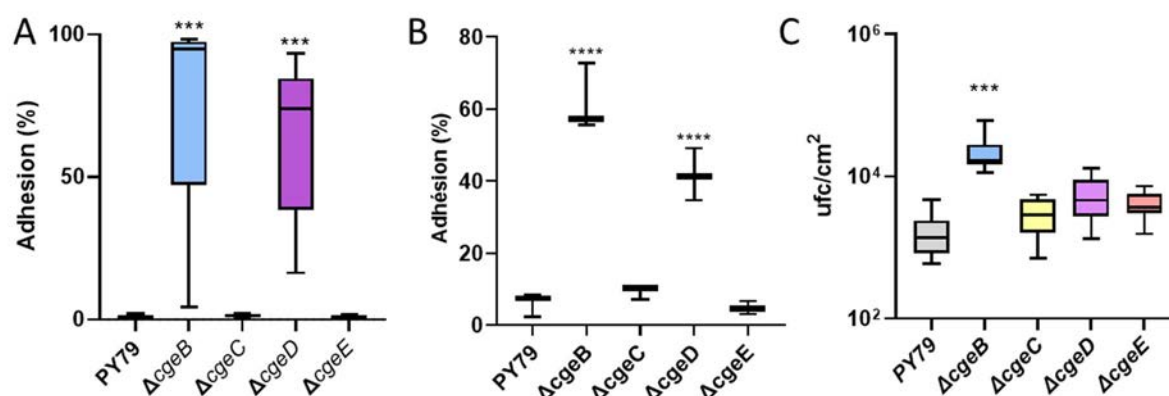


**Figure 34 : Potentiel Zêta à pH=7,0 des spores de *B. subtilis* PY79 et par des mutants des gènes *cge*.** Les résultats représentent les moyennes de quatre répliques biologiques.

L'analyse de variance confirme l'influence des gènes *cge* sur le potentiel Zêta des spores ( $p < 0,0001$ ). Le test de comparaisons multiples de Tukey (**Table 4**) indique que seules les spores du mutant  $\Delta cgeB$  ont une charge de surface significativement différente de celle de la souche sauvage. Par ailleurs, contrairement à ce qui était observé pour le caractère hydrophile/hydrophobe, des différences sont aussi observées entre les mutants ( $\Delta cgeB$ , groupe A ;  $\Delta cgeD$ , groupe B ;  $\Delta cgeE$ , groupe BC ;  $\Delta cgeC$ , groupe C).



Enfin, j'ai analysé l'aptitude des spores de *B. subtilis* PY79 et des mutants *cge* à adhérer à trois matériaux : le verre, l'acier inoxydable et le polypropylène. L'adhésion au verre et au polypropylène est évaluée en suivant l'évolution de la densité optique des préparations de spores après agitation (Abe et al., 2014). L'adhésion à l'acier inoxydable est déterminée en dénombrant le nombre de spores adhérentes à des coupons après 3 heures d'immersion dans une solution de spores (Faille et al., 2014b). Ces matériaux ont été choisis car ils ont des propriétés hydrophiles/hydrophobes très différentes, avec des angles de contact à l'eau respectivement de 17° (très hydrophile), 64° (moyennement hydrophile), et 100° (hydrophobe), (Jha et al., 2022). Sur la **Figure 35**, nous pouvons observer que les profils d'adhésion des différentes souches sont très proches sur le verre et le polypropylène, même si les pourcentages d'adhésion sont systématiquement plus élevés sur le verre que sur le polypropylène. Pour la souche PY79 par exemple, les pourcentages d'adhésion sont de 0,3% sur le polypropylène et de 6.0% pour le verre, et pour la souche la plus adhérente ( $\Delta cgeB$ ), ils sont de 42,6% et 61,9% sur ces mêmes matériaux. Les spores produites par la souche sauvage de *B. subtilis* PY79 sont relativement peu adhérentes à ces deux matériaux et la délétion des gènes *cgeC* et *cgeE* ne semble pas affecter l'aptitude des spores à adhérer sur les tubes. Les spores produites par les mutants  $\Delta cgeB$  et  $\Delta cgeD$  (les plus hydrophobes) sont en revanche plus adhérentes.



**Figure 35 : Adhésion des spores de *B. subtilis* PY79 et des mutants des gènes *cge* à différents matériaux.** A) Adhésion au polypropylène. Les suspensions de spores sont placées dans des tubes de polypropylène, vortexées pendant dix secondes. La DO de la suspension est mesurée avant (DO<sub>i</sub>) et après (DO<sub>f</sub>) agitation. Le pourcentage de spores adhérentes à la surface du tube est estimé par l'équation suivante :  $100 \times (DO_i - DO_f) / DO_i$ . B) Adhésion au verre. Les suspensions de spores sont placées dans des tubes de verre puis vortexées 30 secondes et analysées comme décrit ci-dessus. C) Adhésion à l'acier inoxydable. Des coupons en acier inoxydable (316, 2R) sont immergés dans une suspension de  $10^6$  spores/ml pendant 3h à température ambiante. Les spores adhérentes sont ensuite décrochées par sonication dans 10 ml d'eau, et la suspension est étalée sur gélose nutritive pour quantifier le nombre de spores décrochées. Les résultats représentent la moyenne d'au moins trois réplicas biologiques.

Le test de comparaisons multiples de Tukey (**Table 4**) confirme cette observation et met aussi en évidence que les spores produites par le mutant  $\Delta cgeB$  (Groupe A) sont significativement plus adhérentes que celles produites par le mutant  $\Delta cgeD$  (Groupe B), les trois autres souches appartenant au groupe C. Concernant l'adhésion à l'acier inoxydable, des tendances similaires sont observées. L'adhésion des spores hydrophobes, et surtout des spores du mutant  $\Delta cgeB$ , peu chargées, est plus

intense que celle des spores hydrophiles. Ce résultat est remarquable étant donné les conditions expérimentales fondamentalement différentes entre les essais d'adhésion sur l'acier, le verre et le polypropylène. Toutefois, le test de comparaisons multiples de Tukey (**Table 4**) a seulement permis d'identifier deux groupes, l'un pour les spores du mutant  $\Delta cgeB$ , l'autre pour les spores des quatre autres souches.

**Table 4 : Conséquences de la délétion des gènes  $cgeB$ ,  $cgeC$ ,  $cgeD$ ,  $cgeE$  sur les propriétés des spores.** Comparaisons multiples des moyennes selon Tukey pour chaque analyse (des groupes présentant une lettre commune ne sont pas significativement différents).

	PY79	$\Delta cgeB$	$\Delta cgeC$	$\Delta cgeD$	$\Delta cgeE$
Caractère hydrophile/hydrophobe ( $\Delta G_{par}$ )	B	A	B	A	B
Charge (Potentiel zêta)	BC	A	C	B	BC
Adhésion au polypropylène	C	A	C	B	C
Adhésion au verre	C	A	C	B	C
Adhésion à l'acier inoxydable	B	A	B	B	B
Acide legionaminique	A	B	AB	B	AB
Glucosamine	A	A	A	A	A
Galactose	A	A	A	A	A
Glucose	A	A	A	A	A
Rhamnose	A	B	A	B	A
Quinovose	A	A	A	A	A

## **II. Les conditions de sporulation influencent les propriétés de surface et d'adhésion des spores de *Bacillus subtilis***

De nombreuses études précédentes ont mis en évidence le rôle des conditions de sporulation sur les propriétés de résistance des spores de *Bacillus* à la chaleur ou à différents produits chimiques (Bressuire-Isoard et al., 2018). Ces modifications sont notamment dues à des modifications de la composition et/ou structure des différentes couches qui composent les spores. En revanche, peu d'études se sont portées sur l'effet des conditions de sporulations sur les propriétés de surface et d'adhésion des spores. Pourtant, ces dernières pourraient jouer un rôle majeur dans les problèmes de contaminations récurrentes des chaînes de transformation des industries agroalimentaires.

Dans cette étude, nous avons mesuré l'impact de treize conditions de sporulation différentes sur les propriétés de surface et d'adhésion des spores de *B. subtilis*. L'influence de la composition du milieu en cations divalent ( $\text{Ca}^{2+}$  ou  $\text{Mg}^{2+}$ ), de l'atmosphère [faible disponibilité en oxygène ( $-\text{O}_2$ ), faible disponibilité en oxygène et saturation de l'atmosphère en dioxyde de carbone ( $-\text{O}_2$  ou  $-\text{O}_2+\text{CO}_2$ )], du pH (pH 5 ou pH 9), de l'ajout d'un détergent (RBS), d'un désinfectant (chlorure de benzalkonium (BAC)), d'agents oxydants (acide peracétique, peroxyde d'hydrogène), de conservateurs (nitrites, acide benzoïque) et d'un traitement ultraviolet (Rayonnement à 254nm pendant 30min) ont été étudiés. Sur les treize conditions de sporulation testées, sept entraînent la production de spores plus adhérentes que dans la condition contrôle (condition sans stress), et cette augmentation de l'adhésion est corrélée à une augmentation de l'hydrophobicité des spores (**Table 5**). Ainsi, une carence en cations divalents ( $\text{Ca}^{2+}$  ou  $\text{Mg}^{2+}$ ) ou une faible disponibilité en oxygène ( $-\text{O}_2$  ou  $-\text{O}_2+\text{CO}_2$ ), la présence d'agents oxydants ( $\text{H}_2\text{O}_2$  ou acide peracétique) ou un environnement acide (pH 5) lors de la sporulation entraînent chez *B. subtilis* la production de spores plus adhérentes et plus hydrophobes. De plus, nous avons confirmé que ces modifications des propriétés de surface et d'adhésion des spores sont dues à une perturbation de la synthèse du crust pendant la sporulation plutôt qu'à un effet tardif de ces stress sur les spores matures.

Les modifications des propriétés de surface et d'adhésion suggèrent des modifications de la composition et/ou de la structure du crust. Nous avons donc ensuite étudié les conséquences des sept conditions de sporulation qui rendent les spores plus adhérentes sur la composition et la structure du crust. L'observation des spores en microscopie après coloration à l'encre de chine a montré que les glycanes du crust sont absents ou endommagés lorsque les spores sont produites dans un milieu carencé en  $\text{Ca}^{2+}$  ou  $\text{Mg}^{2+}$  ou dans des conditions de plus faible oxygénation. En revanche, pas d'effet observable sur la structure du crust après modification du pH ou lorsque les spores sont produites en présence d'agents oxydants, de détergents, de désinfectant, de conservateurs ou après un traitement aux rayons ultraviolets.

Afin de mieux comprendre l'effet des conditions de sporulation sur les glycanes du crust la composition en monosaccharides et en acide legionaminique du crust a été évaluée par chromatographie en phase inverse couplée à un détecteur fluorimétrique (RP-HPLC-FL). Cette méthode nous a permis

de détecter et de quantifier le Glucose (Glu), la glucosamine (GlcN), le rhamnose (Rha), le quinovose (Qui) et l'acide légionaminique (Leg) qui ont sont des constituants connus du crust. Couplé à la GC-MS, elle a également permis d'identifier le galactose (Gal) comme un monosaccharide du crust. La sporulation en présence d'agents oxydants ou à pH acide n'entraîne pas de modification de la composition en monosaccharides ou en Leg du crust. En revanche, lorsque la sporulation s'effectue dans un milieu carencé en cations divalents ou avec un faible niveau d'oxygénation les quantités de Rha et Leg à la surface des spores sont diminuées. Dans le cas d'une carence en ions calcium ou faible disponibilité en oxygène et saturation de l'atmosphère en dioxyde de carbone ( $-O_2+CO_2$ ) la quantité de quinovose est aussi plus faible. Ces résultats sont cohérents avec les observations microscopiques après coloration à l'encre de chine.

Nous avons également évalué l'impact des conditions de sporulation sur les protéines du crust. Pour cela, des constructions génétiques permettant l'expression de protéines fusions entre CotY ou CgeA et la GFP ont été construites et introduites dans le chromosome de la souche *B. subtilis* 168. La fusion CgeA-GFP a été utilisée comme un marqueur permettant de détecter toute modification des protéines du crust alors que la fusion CotY-GFP a été utilisée comme un marqueur de l'intégrité du squelette protéique du crust. La fluorescence des spores produites dans les différentes conditions de stress a ensuite été évaluée par cytométrie en flux. Par cette méthode, la fluorescence détectée à la surface des spores est proportionnelle à la quantité relative des protéines CgeA-GFP ou CotY-GFP. Nos résultats indiquent qu'une diminution du niveau d'oxygénation ou l'ajout de peroxyde d'hydrogène lors de la sporulation entraîne la production de spores contenant moins de CgeA et de CotY dans le crust en comparaison avec la condition contrôle (sans stress). Lorsque les spores sont produites dans un milieu carencé en ions  $Ca^{2+}$  ou en milieu acide, la quantité de CgeA à la surface est plus faible en comparaison avec la condition non traitée (sans stress). L'addition d'acide peracétique ou une carence en ions  $Mg^{2+}$  lors de la sporulation ne semble pas entraîner de modification de la composition protéique du crust.

Enfin, nous avons voulu déterminer si les modifications de composition en glucides et/ou protéines du crust s'expliquent par une régulation transcriptionnelle des gènes impliqués dans la synthèse du crust. Pour cela, des expériences de qRT-PCR ont été réalisées à partir d'ARN extraits en phase tardive de sporulation. Nous avons ciblé quatre gènes impliqués dans la biosynthèse du crust. Les gènes *cgeA* et *cotY* qui codent les protéines du crust CgeA et CotY, et les gènes *spsM* et *spsI* qui correspondent aux premiers gènes des voies de biosynthèse du Leg et du Rha respectivement. Dans les conditions de carence en cations divalents ou d'un pH acide il n'y a pas de modification de la transcription des quatre gènes ciblés. En revanche, la transcription d'un ou plusieurs de ces gènes est réduite lorsque la sporulation a lieu en condition de faible oxygénation ou à la suite d'un stress oxydant provoqué par le peroxyde d'hydrogène.

**Table 5 : Effet des conditions de sporulation sur les propriétés de surface et d'adhésion des spores et la composition du crust.**

Condition testée	Hydrophilie	Adhésion	Encre de Chine (halo)	Monosaccharides			Protéines		Effet transcriptionnel
				Leg	Rha	Qui	CgeA	CotY	
- Calcium	↘	↗	↘	↘	↘	↘	↘	=	Non
- Magnésium	↘	↗	↘	↘	↘	=	=	=	Non
-O <sub>2</sub>	↘	↗	↘	↘	↘	=	↘	↘	Oui
-O <sub>2</sub> + CO <sub>2</sub>	↘	↗	↘	↘	↘	↘	↘	↘	Oui
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	↘	↗	=	=	=	=	↘	↘	Oui
Acide Peracétique	↘	↗	=	=	=	=	=	=	Non
pH 5 (HCl)	↘	↗	=	=	=	=	↘	=	Non
pH 9 (NaOH)	=	=	=						
Acide benzoïque	=	=	=						
Nitrites	=	=	=						
RBS	=	=	=						
Ammonium quaternaire (BAC)	=	=	=						
UV 254 nm	=	=	=						

En résumé, un large éventail de conditions de sporulation entraîne la production de spores qui sont plus adhérentes que celles produites dans des conditions optimales. Il inclut la déplétion du milieu de sporulation en cations divalents, une oxygénation réduite, un stress oxydatif et un pH acide. Si ces conditions de sporulation ont un effet similaire sur l'hydrophobicité et l'adhésion des spores, leurs conséquences sur la composition du crust diffèrent. La carence en cations divalents pendant la sporulation entraîne une diminution de la quantité de glycanes à la surface des spores et cette diminution serait due à une régulation post-transcriptionnelle de la synthèse des glycanes. En revanche, la sporulation dans des conditions d'oxygénation limitée entraîne une diminution de la quantité de glycanes et de protéines dans le crust. Cette diminution est probablement due à la répression de la transcription des gènes impliqués dans la synthèse de ces composés au cours de la sporulation. Enfin, il n'y a pas de tendance claire quant aux conséquences des stress oxydatifs et du pH acide sur la composition du crust. Cependant, nos résultats suggèrent que ces stress affectent la composition et/ou la structure des protéines du crust plutôt que les glycanes. L'ensemble de ces travaux ont été soumis dans un article à *Frontiers in Microbiology* et seront publiés en 2023.



## OPEN ACCESS

## EDITED BY

Beatrix Stessl,  
University of Veterinary Medicine Vienna,  
Austria

## REVIEWED BY

Ezio Ricca,  
University of Naples Federico II, Italy  
Lei Rao,  
China Agricultural University, China  
Daniel R. Zeigler,  
The Ohio State University, United States  
Eduardo Robleto,  
University of Nevada, Las Vegas, United States

## \*CORRESPONDENCE

Thomas Dubois  
✉ thomas.dubois@inrae.fr

RECEIVED 23 May 2023

ACCEPTED 14 August 2023

PUBLISHED 01 September 2023

## CITATION

Hamiot A, Lemy C, Krzewinski F, Faille C and  
Dubois T (2023) Sporulation conditions  
influence the surface and adhesion properties  
of *Bacillus subtilis* spores.  
*Front. Microbiol.* 14:1219581.  
doi: 10.3389/fmicb.2023.1219581

## COPYRIGHT

© 2023 Hamiot, Lemy, Krzewinski, Faille and  
Dubois. 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.

# Sporulation conditions influence the surface and adhesion properties of *Bacillus subtilis* spores

Audrey Hamiot<sup>1</sup>, Christelle Lemy<sup>1</sup>, Frederic Krzewinski<sup>2</sup>,  
Christine Faille<sup>1</sup> and Thomas Dubois<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Univ. Lille, CNRS, INRAE, Centrale Lille, UMR 8207 - UMET - Unité Matériaux et Transformations, Lille, France, <sup>2</sup>Univ. Lille, CNRS, UMR 8576 - UGSF - Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, Lille, France

Spore-forming bacteria of the *Bacillus subtilis* group are responsible for recurrent contamination of processing lines in the food industry which can lead to food spoilage. The persistence of *B. subtilis* would be due to the high resistance of spores to extreme environmental condition and their propensity to contaminate surfaces. While it is well known that sporulation conditions modulate spore resistance properties, little is known about their effect on surface and adhesion properties. Here, we studied the impact of 13 sporulation conditions on the surface and adhesion properties of *B. subtilis* 168 spores. We showed that Ca<sup>2+</sup> or Mg<sup>2+</sup> depletion, lower oxygen availability, acidic pH as well as oxidative stresses during sporulation lead to the release of more hydrophobic and adherent spores. The consequences of these sporulation conditions on crust composition in carbohydrates and proteins were also evaluated. The crust glycans of spores produced in a sporulation medium depleted in Ca<sup>2+</sup> or Mg<sup>2+</sup> or oxygen-limited conditions were impaired and contained lower amounts of rhamnose and legionaminic acid. In addition, we showed that lower oxygen availability or addition of hydrogen peroxide during sporulation decreases the relative amount of two crust proteins (CgeA and CotY) and the changes observed in these conditions could be due to transcriptional repression of genes involved in crust synthesis in late stationary phase. The fact that sporulation conditions affect the ease with which spores can contaminate surfaces could explain the frequent and recurrent presence of *B. subtilis* spores in food processing lines.

## KEYWORDS

*Bacillus subtilis*, sporulation, spores, crust, adhesion, hydrophobicity, glycans

## 1. Introduction

Spore-forming bacteria of the *Bacillus subtilis* group, including *B. subtilis sensu stricto*, *B. amyloliquefaciens*, and *B. licheniformis*, are a major economic concern in the food industry. Indeed, these bacteria are among the most commonly identified species in spoiled heat-treated food. For example, *B. amyloliquefaciens* is commonly responsible for the contamination of bakery products, causing notably ropery bread spoilage while *B. licheniformis* is often involved in the contamination of dairy products (André et al., 2017). The raw materials (food, ingredients) but also the surfaces of the food processing lines would be the major sources of contamination by these spore-forming bacteria. *Bacillus* spores are known to be highly adherent to all types of surfaces and resistant to most transformation and hygiene procedures encountered in food

processing plants (André et al., 2017). Therefore, after cleaning and disinfection procedures, viable adherent *Bacillus* spores are still commonly found on equipment surfaces and thus potentially initiate new contaminations in subsequent processing cycles by germinating, multiplying, and then forming biofilms in which sporulation is often observed (Soni et al., 2016).

*Bacillus subtilis* spores are oval-shaped structures formed by concentric layers surrounding the core (McKenney et al., 2013; Driks and Eichenberger, 2016) that contain the chromosomal DNA wrapped around Small Acid Soluble Proteins. The core is surrounded, from innermost to outermost, by the inner membrane, the germ cell wall, the cortex, the outer spore membrane, and the coat. The coat contains more than 80 proteins and represents around 25% of total spore proteins. The coat is subdivided into three parts, the basement layer, the inner coat, and the outer coat. The coat assembly is guided by five morphogenetic proteins (SpoIVA, SafA, CotE, SpoIVM, and SpoVID) that play a key role in coat morphogenesis. Most of the spores of strains of the *B. subtilis* group are also surrounded by an outermost layer, called the crust (Zhang et al., 1994; McKenney et al., 2010; Faille et al., 2014). Faille and colleagues removed the crust of *B. subtilis* spores by a mechanical treatment with a French press. The removal of the crust changed these spores from hydrophilic to hydrophobic and increased their adhesion to stainless steel demonstrating that the crust gives *B. subtilis* spores their specific surface properties, notably a marked hydrophilic character. It was deduced that the crust could be the reason for the relatively low capacity of *B. subtilis* spores to contaminate surfaces, compared to other *Bacillus* species such as *B. cereus* (Faille et al., 2014).

The crust is composed of proteins and carbohydrates (Faille et al., 2014; Bartels et al., 2019; Shuster et al., 2019a,b; Dubois et al., 2020). So far, six proteins have been identified in the crust: CotV, CotW, CotX, CotY, CotZ, and CgeA (Bartels et al., 2019; Shuster et al., 2019a). CotX, CotY, and CotZ are the morphogenetic proteins of the crust and CotZ could be the major one, as the localization of all crust proteins, except CotW, depends on it (Bartels et al., 2019; Shuster et al., 2019a). These proteins are rich in cysteine residues and form an insoluble protein fraction suggesting the presence of disulfide cross-link between these proteins (Ursem et al., 2021). The protein backbone of the crust is predominantly formed by CotY and to a less extent by CotV and CotX (Bartels et al., 2019). When overexpressed in *Escherichia coli*, CotY self-assembles into crystal structures that tend to form multilayered stacks (Jiang et al., 2015). How the crust is anchored to the spore surface remains to be investigated. However, it was suggested that CotW is a linker protein at the interface of the outer coat and the crust (Bartels et al., 2019). Accordingly, it was shown by transmission electron microscopy that the crust of a  $\Delta cotW$  mutant is disorganized and separated from the coat (Shuster et al., 2019a). In a heterologous host, CotW and CotV were self-organized into fibrous assemblies of consistent diameter (Jiang et al., 2015). Therefore, it is likely that the fibrous assembly formed by the CotV-CotW complex participates in the anchoring of the crust to the spore surface. Finally, the function of CgeA is still to be determined but CgeA might be a target of glycosylation or a glycosylation hub playing a role in coordinating the glycosylation of crust proteins (Bartels et al., 2019; Shuster et al., 2019a). Carbohydrates are the other key components of the crust. The crust contains rhamnose (Rha), quinovose (Qui), glucose (Glc), glucosamine (GlcN), and muramic lactam which would play a significant role in spore surface properties

since mutations in genes expressed in late sporulation and encoding putative glycosyltransferase modify crust structure and/or spore surface hydrophilicity (Roels and Losick, 1995; Cangiano et al., 2014; Faille et al., 2014; Shuster et al., 2019b). Finally, the spore surface of *B. subtilis* is covered with legionaminic acid (Leg), a nine-carbon backbone nonulosonic acid, whose biosynthesis pathway is required for proper crust assembly (Dubois et al., 2020). Nevertheless, the structure and localization of crust carbohydrates remain poorly described.

Previous studies demonstrated that environmental conditions during sporulation can modulate spore resistance properties (Bressuire-Isoard et al., 2018). For example, it has been shown that supplementation of the sporulation medium with divalent cations such as  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ , or  $Fe^{2+}$  increases the resistance to wet heat of *B. subtilis* spores while the addition of some amino acids such as thioproline or cysteine improves *B. subtilis* spore resistance to UV-A, UV-B and peracetic acid (Cazemier et al., 2001; Moeller et al., 2011). Other parameters such as pH and temperature during sporulation can also affect spore resistance to wet heat or chemical denaturants (Melly et al., 2002; Baweja et al., 2008). In *B. anthracis*, spores produced at pH 5 are more resistant to wet heat, and sporulation at pH 9 leads to spores more resistant to sodium hydroxide, compared to spores produced at pH 7 (Baweja et al., 2008). Lastly, *B. subtilis* produced spores that are more resistant to wet heat when sporulation occurs at 37°C rather than 30°C (Melly et al., 2002). As illustrated by these few examples, most of the works on sporulation conditions have focused on spore resistance, while little is known about the effects of sporulation conditions on the surface and adhesion properties of spores. On *B. subtilis* spores, a study conducted in 1990 showed minor changes in the hydrophobic character of spores produced in different culture media (Wienczek et al., 1990). More recently, studies on *B. subtilis* spores have shown that pH and temperature during sporulation affect spore surface properties. Indeed, *B. subtilis* spores produced at 25°C are more hydrophobic than those produced at 37°C (Isticato et al., 2020). The hydrophobic character of the *B. subtilis* spores is also affected by the pH of the sporulation medium since it increases with pH for values between 7.0 and 8.5 (Eschlbeck et al., 2017).

In this study, we investigated the influence of environmental conditions encountered by *B. subtilis* 168 during sporulation on spore surface and adhesion properties. For sporulation conditions leading to an increase in spore adhesion, we investigated the crust structure and composition in carbohydrates and proteins to identify the changes responsible for the increased adhesion. Finally, we performed qRT-PCR experiments to determine whether the changes in crust composition can be explained by transcriptional regulation of genes involved in crust synthesis during the late sporulation phase.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Bacterial strains and growth conditions

Sporulation experiment were performed with the *B. subtilis* 168 strain (BGSC, 1A1). *Escherichia coli* K-12 strain TG1 was used as a host for the construction of plasmids and cloning experiments. *E. coli* strains were grown in Lysogeny Broth (LB, Sigma-Aldrich, L3022) at 37°C. *Bacillus* strains were grown at 30 or 37°C in LB, Nutrient Broth

(NB, Biokar, BK003HA) or Spo8, a sporulation medium composed of 12.3 g/L NB, 0.51 g/L MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O, 0.97 g/L KCl, 0.2 g/L CaCl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O, 3 mg/L MnCl<sub>2</sub> 4H<sub>2</sub>O and 0.55 mg/L FeSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O at pH 6.9 (Faillie et al., 2013). The following concentrations of antibiotic were used for bacterial selection: 100 µg/mL ampicillin or 20 µg/mL chloramphenicol for *E. coli* and 5 µg/mL chloramphenicol for *Bacillus*.

For sporulation experiments in the Spo8 condition (control), the following procedure was achieved. Sterile Spo8 medium was inoculated at an optical density at 600 nm of 0.05 with an overnight preculture of the *B. subtilis* 168 strain. Then, the culture was incubated at 30°C under agitation (220 rpm). After 5 days, spores were harvested by centrifugation (2500g for 15 min, 4°C), washed three times in chilled sterile water, and stored at 4°C. After 1 week, two additional washes were performed to remove the residual vegetative cell debris and spores were stored at 4°C in sterile water until use for up to 3 months. Spores were checked under microscope and spore preparations with more than 98% of spores were kept for further experiments. The other sporulation conditions are listed in Table 1. Most of the changes in sporulation conditions (addition of chemicals, UV treatment) were implemented 2 h after the transition to the stationary phase. Only the sporulation phase was therefore affected. The chemicals used are listed in Supplementary Table 1. UV treatment was performed by exposing the culture to 254 nm UV radiations (KINGRATE, UVC 6WT5, China) for 30 min while maintaining agitation and temperature. In -CaCl<sub>2</sub> and -MgSO<sub>4</sub> conditions, Spo8 medium depleted in CaCl<sub>2</sub> or MgSO<sub>4</sub> was inoculated and incubated as

described above. Therefore, the bacteria were subjected to these depletions from the beginning of the growth. Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> concentrations in Spo8 and Spo8 media depleted in CaCl<sub>2</sub> or MgSO<sub>4</sub> were determined using the Varian SpectrAA-55B atomic absorption spectrophotometer with a Varian SpectrAA Ca/Mg lamp. A standard range was used for each cation. Ca<sup>2+</sup> was detected at λ = 422.7 nm and Mg<sup>2+</sup> at λ = 285.2 nm. Before analysis, the three Spo8 growth media were diluted in a solution of lanthanum (III) chloride hexahydrate (10 g/L) and hydrochloric acid (84 mL/L of 37% solution).

## 2.2. Construction of recombinant strains

The plasmids pBS1CΩamyE::cgeA-GFP and pBS1CΩamyE::cotY-GFP were constructed as follows. The *gfp-λter* DNA fragment containing the *gfp* gene and the terminator of the λ prophage was obtained by SOE-PCR using the primers *gfp-1* / *gfp-2* and *λter-1* / *λter-2*. The plasmids pSB1C3-mGFPmut1-original and pMUTIN2 were respectively, used as templates (Vagner et al., 1998; Popp et al., 2017). Then, the *cgeA* or *cotY* genes with their respective promoters and *gfp-λter* fragment were amplified by SOE-PCR using primers *cgeA-1* / *cgeA-2* or *cotY-1* / *cotY-2* and *gfp-1* / *λter-2* (Supplementary Table 2). The *B. subtilis* 168 chromosomal DNA and the *gfp-λter* fragment were respectively, used as templates. The latter amplification also introduced a sequence encoding 5 glycines that act as a linker between CotY or CgeA and the GFP. The resulting

TABLE 1 Sporulation conditions.

Sporulation condition	Description	Consequence
Spo8	Control	-
<b>Modifications of Spo8 from the beginning of the growth</b>		
-CaCl <sub>2</sub>	Spo8 without CaCl <sub>2</sub> complementation	Depletion in Ca <sup>2+</sup> (Supplementary Figure 1A)
-MgSO <sub>4</sub>	Spo8 without MgSO <sub>4</sub> complementation	Depletion in Mg <sup>2+</sup> (Supplementary Figure 1B)
<b>Modifications of Spo8 during the stationary phase</b>		
-O <sub>2</sub>	The Erlenmeyer containing the bacterial culture was sealed with a rubber stopper	Modified atmosphere (progressive decrease in the O <sub>2</sub> availability)
-O <sub>2</sub> + CO <sub>2</sub>	-O <sub>2</sub> condition with the addition of 0.8% sodium bicarbonate	Modified atmosphere (progressive decrease in the O <sub>2</sub> availability and increased CO <sub>2</sub> concentration) and increase of pH (Supplementary Figure 1C)
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Addition of 0.005% of H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Oxidative stress
Peracetic acid	Addition of 0.005% of peracetic acid	Oxidative stress and decrease of pH (Supplementary Figure 1C)
pH 5	Acidification to pH 5 by the addition of HCl	pH decrease
pH 9	Alkalinization to pH 9 by the addition of NaOH	pH increase
Benzoic acid	Addition of 0.05% C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> CO <sub>2</sub> H, a food preservative (E210)	Antibacterial properties and decrease of pH (Supplementary Figure 1C)
Nitrites	Addition of 0.05% NaNO <sub>2</sub> , a food preservative (E250)	Antibacterial properties
RBS	Addition of 0.05% RBS 25, an alkaline detergent	Detergent effect without significant impact on pH (Supplementary Figure 1C)
BAC	Addition of 0.00025% Benzalkonium chloride, a quaternary ammonium disinfectant	Antibacterial properties
UV	Ultraviolet treatment at 254 nm	Antibacterial properties

This table summarizes the different sporulation conditions used in the study. Modifications of the sporulation conditions are made from the beginning of the growth or in the early stationary phase (2 h after the transition to the stationary phase). The concentrations in peracetic acid, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, benzoic acid, nitrites, RBS, and BAC used in these experiments correspond to the maximum concentrations of each of these agents that did not decrease the total number of CFU after 5 days of growth.



fragments (*cgeA-gfp- $\lambda$ ter* and *cotY-gfp- $\lambda$ ter*) were purified as *Xba*I-*Pst*I fragments and were inserted between the *Xba*I and *Pst*I sites of pBS1C (Radeck et al., 2013). The nucleotide sequences of the fragments inserted into pBS1C were verified by Sanger sequencing (Eurofins Genomics, Germany). *B. subtilis* 168 was then transformed with the plasmids pBS1C $\Omega$ *amyE::cgeA*-GFP or pBS1C $\Omega$ *amyE::cotY*-GFP and homologous recombination at the *amyE* locus was performed as described previously (Radeck et al., 2013). Nucleotide sequences of the introduced chromosomal modifications were verified by Sanger sequencing (Eurofins Genomics, Germany). The *B. subtilis* 168 pHT304-18 P<sub>*sspA*</sub>-*sspA*-GFP strain was obtained by transforming the *B. subtilis* 168 strain with the plasmid pHT304-18 P<sub>*sspA*</sub>-*sspA*-GFP (Richard et al., 2020).

### 2.3. Heat resistance and germination of spores

The percentage of heat-resistant spores was defined as the ratio of the number of colony-forming units (CFU) after heating to the number of CFU before heating. The number of CFU before heating was evaluated after plating the spore suspensions on NB-agar and incubation for 24 h at 37°C. The number of CFU after heating was evaluated by the same procedure after heat treatment of the spore suspensions for 12 min at 80°C. The ability of spores to germinate was assessed by monitoring the decrease in optical density at 580 nm (OD<sub>580</sub>) of spore suspensions which reflects the transition of spores from phase-bright to phase-dark during germination (Xing and Harper, 2020). Spores were heat activated at 70°C for 30 min and chilled on ice for 5 min. Then, the spore suspension was adjusted to an initial OD<sub>580</sub> of 1 in a 10 mM L-alanine solution in Tris buffer (Tris base 10 mM, NaCl 10 mM, pH 7.4) and the OD<sub>580</sub> was monitored with a microplate reader (Biotek, synergy HTX) for 2 h at 30°C with a measurement every 2 min following 5 s of stirring.

### 2.4. Adhesion, surface properties, and structure of spores

The adhesion of spores to polypropylene was measured as described previously with the following modifications (Abe et al., 2014). The spore suspension was adjusted to an OD<sub>600</sub> of about 0.6 in physiological water and 1 mL of the spore suspension was added to a polypropylene tube (2.0 mL Safe-lock tube, Eppendorf). The spore suspension was mixed with a vortex for 10 s to promote spore adhesion to the tube wall, then transferred to a new polypropylene tube. This step was repeated 9 times. The OD<sub>600</sub> of the spore suspension was measured after 2, 5, 8, and 10 adhesion steps. The adhesion percentage was calculated by following the formula:  $100 \times [OD_i - OD_n] / OD_i$ , where OD<sub>i</sub> is the initial OD<sub>600</sub> and OD<sub>n</sub> is the OD<sub>600</sub> after n steps.

The hydrophilic/hydrophobic property of spores was characterized by MATH, a partitioning method based on the affinity of spores to the apolar solvent hexadecane (Sigma-Aldrich, H6703), as described previously (Faille et al., 2019). The higher the affinity of the spores for hexadecane, the more hydrophobic the spores. Quickly, spores were suspended in physiological water at an OD<sub>600</sub> of 0.6 (A0). Three-milliliter aliquots of the spore suspension and 500  $\mu$ L of hexadecane were placed in glass tubes (10 mm  $\times$  75 mm), vortexed for times

ranging from 5 s to 240 s, and left to settle for 30 min to allow the two phases to separate. The OD<sub>600</sub> of the aqueous phase was then measured (At). Aeq is the asymptotic or lowest absorbance value obtained. The Gibbs energy of partitioning ( $\Delta G_{par}$ ) is obtained from the equilibrium constant *K* ( $\Delta G_{par} = \log K$ ), which expresses the partitioning of bacteria between the aqueous and hexadecane phases. It was calculated from the Equation  $K = [6(A0 - Aeq) / Aeq]$ .

To measure the global charge of the spore surface, zetametry experiments were performed as previously described (Faille et al., 2014).

Microscopic observations of spores were carried out as follows. *B. subtilis* spores were observed on agarose pads (1% Agarose in H<sub>2</sub>O) using a Zeiss Axioskop 2 microscope (Zeiss, Germany) configured for phase-contrast observation with a 100x immersion objective (Plan-NEOFLUAR, 100x/1,30 oil, Ph3). Spores were negatively stained with India ink as described previously (Abe et al., 2014) and they were observed in the configuration described above. Fluorescence and localization of CotY-GFP and CgeA-GFP fusion proteins on the spore surface were observed using the Zeiss Axioskop 2 microscope with the appropriate filter set (Filter set 09, BP 450–490 FT510 LP515) and a 100x immersion objective ( $\alpha$ Plan-APOCHROMAT, 100x/1,46 Oil).

### 2.5. Observation of sporulating cells by confocal microscopy

Sporulating cells were collected 8 and 24 h (t8 and t24) after the transition to the stationary phase. They were fixed in a 4% formaldehyde solution in phosphate buffer saline (PBS) for 7 min and washed in PBS before being suspended in GTE buffer (50 mM glucose, 10 mM EDTA at pH 8, and 20 mM tris-HCl at pH 8). After fixation, the cells were kept at 4°C until observations. The membranes of fixated cells were stained by adding FM 4–64 (SynaptoRed C2, Sigma-Aldrich, S6689) at a working concentration of 10  $\mu$ M for 30 min at room temperature in the dark. Then, the cells were washed, concentrated by centrifugation, and transferred on 1% agarose pads. Microscopic observations were performed by using the inverted confocal laser scanning microscope LSM780 (Zeiss, Germany) with an excitation wavelength of 514 nm, and by detecting the signal at 650–740 nm using a 63x immersion objective ( $\alpha$ Plan-APOCHROMAT, 63x/1,4 Oil).

### 2.6. Experiments on mature spores

To verify that the conditions tested affected the sporulating bacteria and not the mature spores, the same conditions were tested on mature spores. For this purpose, spores were first produced in optimal condition (Spo8) and then subjected to the -CaCl<sub>2</sub>, -MgSO<sub>4</sub>, -O<sub>2</sub>, -O<sub>2</sub> + CO<sub>2</sub>, peracetic acid, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> or pH 5 conditions, except that Spo8 was modified by removing the NB to prevent spore germination. Then, mature spores were incubated at 30°C under agitation (220 rpm). After 3 days, spores were harvested by centrifugation (2,500 g for 15 min, 4°C) and washed five times in chilled sterile water (2,500 g for 15 min, 4°C) before being stored at 4°C in sterile water until use. Spores were then tested for their surface hydrophilic/hydrophobic properties.

## 2.7. Crust extraction and analysis

The crust was removed from the spore surface by three successive passages of spore suspensions through a French press (SLM instruments, Urbana, IL) at 20000 psi. Spores were separated from the crust by centrifugation (6,000g, 15 min, 4°C) and the supernatant (the crust extract) was kept at -20°C until use.

Release and derivation of the crust monosaccharides were adapted from previous studies (Anumula, 1994; Windwarder et al., 2016). Crust extracts were dried by lyophilization and hydrolyzed at 100°C for 4 h in 4 M trifluoroacetic acid (TFA) to release the monosaccharides. Samples were dried under a nitrogen flow at 40°C in an evaporator (puriVap-6, Interchim) and the dried pellets were suspended in a 50:50 (v/v) mix of a fresh 1% sodium acetate solution in methanol and a fresh solution containing 30 mg of anthranilic acid (AA) and 20 mg of sodium cyanoborohydride in a solution of 2% boric acid and 4% sodium acetate in methanol. The monosaccharides were then coupled to the anthranilic acid by heating the samples at 80°C for 1 h. Release and derivation of Leg were performed as described previously (Dubois et al., 2020). Crust extracts were dried by lyophilization and hydrolyzed at 80°C for 2 h in 0.1 M TFA to release the nonulosonic acids. Nonulosonic acids were subsequently coupled to 1,2-diamino-4,5-methylenedioxybenzene (DMB) by heating the samples at 50°C for 2 h in the dark in 7 mM DMB, 1 M  $\beta$ -mercaptoethanol, 18 mM sodium hydrosulfite in 0.02 mM trifluoroacetic acid.

The monosaccharide derivatives were separated on a C18 reverse-phase HPLC column (Thermo Scientific, ODS Hypersil, 5  $\mu$ m, 4.6  $\times$  250 mm) at a flow rate of 1 mL/min following a protocol adapted from Windwarder et al. (2016). The solvent A was 80 mM formic acid adjusted to pH 3.4 with ammonia and the solvent B was a mixture of acetonitrile:solvent A (80:20, v/v). The elution program was a gradient from 9.5 to 16% of solvent B for 20 min followed by a second gradient from 16 to 36% for 20 min. Fluorescence was measured with a Waters 2,475 fluorimeter ( $\lambda_{exc}$  = 230 nm,  $\lambda_{em}$  = 425 nm). A standard containing GlcN, galactose (Gal), Glc, Rha, and Qui was used to estimate the amount of the different monosaccharides. The nonulosonic acid derivatives were separated isocratically at a flow rate of 0.8 mL/min on a C18 reverse phase HPLC column (Waters, 3.5  $\mu$ m, 4.6  $\times$  150 mm) using a solvent mixture of acetonitrile:methanol:water (7:9:84, v/v/v) and they were detected by a fluorimeter (Waters 2,475,  $\lambda_{exc}$  = 373 nm,  $\lambda_{em}$  = 448 nm). The Leg amount was estimated by measuring the area of peak 1 and by reporting this area to a standard range of Neu5Ac.

Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) experiments were performed as previously described (Faille et al., 2014).

The relative amount of CotY or CgeA in the crust was evaluated by using *B. subtilis* 168 *amyE::cotY*-GFP strain or *B. subtilis* 168 *amyE::cgeA*-GFP strain in the sporulation conditions described above. After washing in chilled water, spores were diluted in 1X PBS buffer and gently vortexed. Then, the fluorescence of spores was evaluated by flow-cytometry with the BD Acuri C6 Plus flow-cytometer (BD biosciences, USA) using a 488 nm laser and 585/40 bandpass filter to detect FITC fluorescence. The following voltage values were used: 200 V for the forward scatter, 250 V for the side scatter, and 400 V for the FITC channel according to the manufacturer's recommendations. The cytometer was programmed to count 40,000 events and the spore suspension was diluted to obtain less than 2,500 events per second.

## 2.8. Transcriptional analysis of genes involved in crust biosynthesis

The sporulating cells were collected and harvested by centrifugation (5,000g, 15 min at 4°C) 8 h after the transition to the stationary phase. RNA extraction, cDNA synthesis, amplification, and detection were performed as previously described (Dubois et al., 2016) except that the cell lysis was performed using screw tubes containing 150 mg of glass beads (acid-washed, Sigma-Aldrich, G1277-500G,) and a MiniBeadBeater-16 (Biospec Products). The tubes were shaken for 2 min and cooled on ice for 2 min. The previous step was repeated once and the lysates were centrifuged at 12,000g for 10 min at 4°C before transferring to a new 2 mL tube. The quantity of each cDNA was normalized to the quantity of the cDNA of the DNA polymerase III gene (*polC*, BSU16580) (Supplementary Table 2). The relative change in gene expression was recorded as the ratio to normalized target concentrations (threshold cycle [ $\Delta\Delta CT$ ]) (Livak and Schmittgen, 2001).

## 3. Results

To investigate the influence of the environmental conditions encountered by *B. subtilis* during sporulation on spore surface and adhesion properties, sporulation conditions were modified before bacteria inoculation or 2 h after the transition to the stationary phase (Table 1; Supplementary Figure 1). These 13 conditions were tested to evaluate the influence of depletion in divalent cations (-CaCl<sub>2</sub> or -MgSO<sub>4</sub>), oxidative stresses (peracetic acid or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), atmospheres (-O<sub>2</sub> or -O<sub>2</sub> + CO<sub>2</sub>), pH (pH 9 or pH 5), preservatives (benzoic acid or nitrites), UV as well as cleaning and disinfecting agents (RBS or Benzalkonium Chloride [BAC]). The chemicals added were used at the maximum concentration that did not reduce the total number of CFU at the end of sporulation to avoid major structural changes in the internal layers of spores.

### 3.1. Influence of sporulation conditions on refractivity, heat resistance, and germination rate of *Bacillus subtilis* 168 spores

It was first investigated whether the sporulation conditions affected the total number of CFU as well as some key characteristics of spores, i.e., their refractivity, heat resistance, and ability to germinate. The total number of CFU at the end of sporulation was increased in the -O<sub>2</sub>, -O<sub>2</sub> + CO<sub>2</sub>, peracetic acid, and pH 5 conditions while it was reduced by a logarithmic factor of 0.45 in the -CaCl<sub>2</sub> condition compared to the Spo8 condition (Supplementary Table 3). None of the sporulation conditions changed the spore characteristics except for those obtained in the -CaCl<sub>2</sub> condition (Supplementary Table 3; Supplementary Figure 2). In this latter condition, the percentage of heat resistant spores was unchanged but 35% of spores were non-refractive and the ability of spores to germinate was reduced by 40% compared to the Spo8 condition. These results suggest that in the -CaCl<sub>2</sub> condition, a part of the cells that engage in the sporulation process do not release viable spores.

However, the viable spores produced in this condition keep their heat resistance and most of them can germinate. Therefore, this condition was kept for subsequent experiments.

### 3.2. Divalent cations depletion, oxidative stresses, lower oxygen availability and acidic pH during sporulation promote spore adhesion

To evaluate the consequences of the sporulation conditions on spore adhesion, an adhesion test on polypropylene was performed. *B. subtilis* 168 spores produced in 7 of the 13 conditions tested were significantly more adherent to polypropylene than those produced in Spo8 (Figure 1; Supplementary Figure 3). This is particularly true for spores produced in  $-CaCl_2$  or  $-MgSO_4$  conditions. Replacement of  $CaCl_2$  or  $MgSO_4$  by  $NaCl$  or  $Na_2SO_4$  in the sporulation medium also led to the production of more adherent spores indicating that the low concentrations of  $Mg^{2+}$  or  $Ca^{2+}$  rather than the associated anions ( $SO_4^{2-}$  or  $Cl^-$ ) were responsible for the increased adhesion of spores. Bacteria that sporulated in a modified atmosphere ( $-O_2$  and  $-O_2 + CO_2$ ), at acidic pH (pH 5) and to a lesser extent those that were exposed to oxidative stress ( $H_2O_2$ , peracetic acid) also produced spores that were more adherent than spores produced in Spo8. Interestingly, there was no significant difference in adhesion between spores produced in  $-O_2$  and  $-O_2 + CO_2$  conditions, which would indicate that the decrease in  $O_2$  and not the increase in  $CO_2$  concentration during sporulation is responsible for this increase in adhesion. To verify that the increase in adhesion was not due to a delay in the sporulation process, sporulating cells were observed by confocal microscopy 8 and 24 h after the transition to the stationary phase. No delay in the sporulation process was observed (Supplementary Figure 4).

### 3.3. Increased spore adhesion is correlated with an increase of spore hydrophobicity

Since the spores are metabolically dormant, the increase in spore adhesion can only be explained by modifications of the spore surface properties including hydrophobicity and charge. Thus, the surface hydrophilic/hydrophobic property and the surface charge of spores were evaluated by MATH and zetametry (Table 2; Supplementary Figure 5). All the spores obtained under the sporulation conditions that led to an increase in spore adhesion were more hydrophobic, whereas no modification of this character could be demonstrated for spores whose adhesion was not affected. The correlation factor between spore hydrophobicity and spore adhesion to polypropylene was 0.71 indicating that the increased adhesion of spores is at least in part due to an increase of spore's hydrophobicity (Supplementary Figures 6A,C). By contrast, whatever the sporulation condition, the global charge of spores at a neutral pH was similar (around  $-50$  mV), except for spores produced at pH 5 and in the presence of benzoic acid (Table 2). However, the spore electronegativity would not play a significant role in their ability to adhere to polypropylene (correlation factor =  $-0.14$ ) (Supplementary Figures 6B,C). It is now well documented that alteration of the crust generally leads to an increased hydrophobicity and adhesion of spores (Faïlle et al., 2014; Shuster et al., 2019a,b; Dubois et al., 2020). Therefore, our results suggest that environmental conditions encountered during sporulation affect crust composition and/or structure.

### 3.4. The modification of the spore surface properties occurs during sporulation

We investigated whether the same environmental conditions applied to mature spores affected their surface properties, i.e., whether the changes in spore surface observed above were due to phenomena occurring during sporulation or after the release of the mature spores. For this purpose, mature spores produced in Spo8 condition were

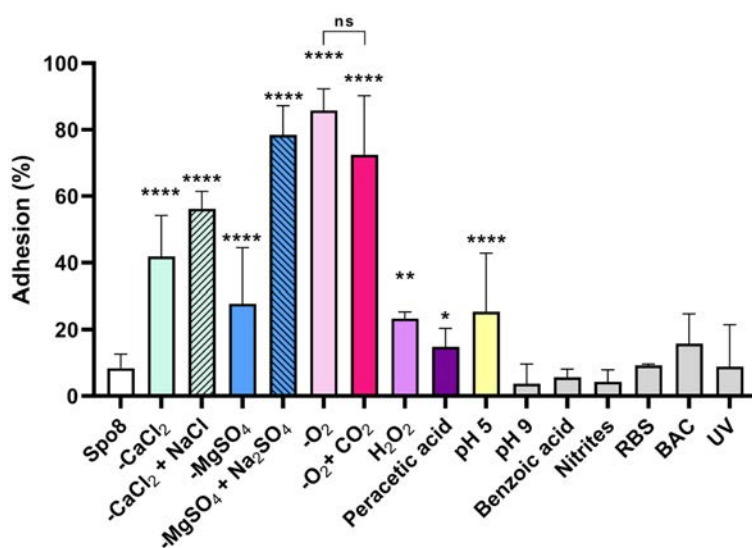


FIGURE 1

Influence of sporulation conditions on spore adhesion to polypropylene. Adhesion (%) was determined after 10 successive adhesion steps of the spores to polypropylene tubes. The whole adhesion kinetics are presented in Supplementary Figure 3. Error bars represent the SDs of the means. ns, not significant. \* $p \leq 0.05$ ; \*\* $p \leq 0.01$ ; \*\*\* $p \leq 0.001$ ; \*\*\*\* $p \leq 0.0001$  for each condition versus Spo8 by Mann-Whitney.

**TABLE 2** Influence of the sporulation conditions on surface properties of spores.

Sporulation condition	Hydrophobicity (LogK)	Zeta potential (mV)
Spo8	0.60 ± 0.96	-52.48 ± 5.22
-CaCl <sub>2</sub>	2.24 ± 0.80***	-49.48 ± 1.66
-MgSO <sub>4</sub>	2.32 ± 0.73***	-51.68 ± 0.83
-O <sub>2</sub>	3.60 ± 1.03****	-50.79 ± 1.06
-O <sub>2</sub> + CO <sub>2</sub>	4.30 ± 0.52****	-50.03 ± 2.36
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1.49 ± 0.83**	-55.98 ± 5.20
Peracetic acid	2.47 ± 1.30***	-50.98 ± 4.75
pH 5	2.54 ± 0.81****	-56.52 ± 3.17*
pH 9	1.00 ± 0.44	-49.89 ± 2.97
Benzoic Acid	1.22 ± 0.70	-50.30 ± 1.01*
Nitrites	0.29 ± 0.19	-50.59 ± 2.07
RBS	0.21 ± 0.44	-49.19 ± 3.69
BAC	0.85 ± 0.66	-55.06 ± 5.26
UV	1.23 ± 0.48	-56.37 ± 8.83

The surface hydrophilic/hydrophobic property and the surface charge of spores at pH 7.0 were evaluated by MATH and zetametry assays. The data presented in the table are the means with SDs. \* $p \leq 0.05$ ; \*\* $p \leq 0.01$ ; \*\*\* $p \leq 0.001$ ; \*\*\*\* $p \leq 0.0001$  for each condition versus Spo8 by Mann-Whitney or *t*-test.

**TABLE 3** Influence of environmental conditions on surface hydrophilic/hydrophobic property of mature spores.

Sporulation condition	Hydrophobicity (LogK)
Spo8 -NB	1.25 ± 1.04
-CaCl <sub>2</sub>	0.74 ± 1.14
-MgSO <sub>4</sub>	0.76 ± 1.21
-O <sub>2</sub>	0.68 ± 0.43
-O <sub>2</sub> + CO <sub>2</sub>	0.54 ± 0.59
Peracetic acid	1.70 ± 0.62
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1.53 ± 0.95
pH 5	1.52 ± 0.96

The conditions affecting the hydrophobicity and adhesion of spores when applied during sporulation were tested on mature spores. Spores were produced in optimal condition (Spo8), washed and suspended in a Spo8 medium modified by removing the NB to prevent spore germination (Spo8 -NB) and subjected to the -CaCl<sub>2</sub>, -MgSO<sub>4</sub>, -O<sub>2</sub>, -O<sub>2</sub> + CO<sub>2</sub>, peracetic acid, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, or pH 5 conditions. After 72 h of incubation, the surface hydrophilic/hydrophobic property of spores was evaluated by MATH assays. The data presented in the table are the means with SDs of at least three independent experiments. None of the conditions tested were significantly different from the Spo8 -NB condition.

subjected to the seven conditions shown to modify the adhesion and hydrophobicity of spores when applied during sporulation. Then, the hydrophobicity of spores was evaluated by MATH (Table 3). The seven conditions applied to the mature spores did not alter their hydrophobic character, which confirmed that the changes observed above were indeed the result of phenomena occurring during sporulation.

### 3.5. The crust glycans of spores produced in divalent cations depletion or oxygen-limited conditions are impaired

To evaluate the impact of the sporulation conditions on crust structure, spores were observed in phase-contrast microscopy after

India ink staining (Figure 2). Indeed, the India ink staining enables the observation of the crust glycans around *B. subtilis* spores. Spores produced in Spo8 (positive control) showed a white halo surrounding the outer coat of spores (white arrow), which reflects the presence of the crust glycans. Conversely, no white halo was observed when spores produced in Spo8 were passed through a French press, this treatment resulting in the removal of the crust without damaging the coat (negative control) (Faille et al., 2014). A white halo was observed around spores produced in the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, peracetic acid, pH 5, pH 9, benzoic acid, nitrites, BAC, RBS, and UV conditions. In contrast, no halo was observed around spores produced in the -CaCl<sub>2</sub>, -MgSO<sub>4</sub>, -O<sub>2</sub>, and -O<sub>2</sub> + CO<sub>2</sub> conditions indicating that the crust glycans are deeply impaired in these conditions.

### 3.6. Divalent cation depletion or lower oxygen availability during sporulation change the crust composition in monosaccharides

The monosaccharide composition of the crust was further investigated. Spores were mechanically treated with a French press to remove the crust. Then, the crust glycans were hydrolyzed and the released monosaccharides were derivatized by AA, a fluorogenic reagent that shows high specificity for monosaccharides. The AA-complexed monosaccharides were then analyzed by reverse-phase high-performance liquid chromatography coupled to a fluorescence detector (RP-HPLC-FL) (Anumula, 1994; Windwarder et al., 2016). In the Spo8 condition, the chromatogram of RP-HPLC-FL showed 12 major peaks (Supplementary Figure 7A). By performing co-injections with standards four peaks were associated with monosaccharides previously identified in the crust: GlcN with a retention time of about 11.8 min, Glc with a retention time of about 16.7 min, Rha with a retention time of about 20.8 min and Qui with a retention time of about 25.4 min (Supplementary Figure 7B; Faille et al., 2014). The peak with a retention of 15.9 min co-eluted with the Gal standard and GC-MS experiments confirmed the presence of Gal in the crust of *B. subtilis* spores (Supplementary Figures 7A–F). Using RP-HPLC-FL, the influence of the conditions shown to increase spore adhesion on the amount of the five monosaccharides identified in the crust was evaluated. In all the conditions tested, there was no significant change in the amounts of GlcN, Gal, and Glc compared to the Spo8 condition (Supplementary Figures 8A–G). The composition of Rha and Qui was also not modified in the crust of spores produced in the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, peracetic acid, and pH 5 conditions (Figures 3E–G). Conversely, the amount of Rha was lowered in the crust of spores produced in the -CaCl<sub>2</sub>, -MgSO<sub>4</sub>, -O<sub>2</sub> and -O<sub>2</sub> + CO<sub>2</sub> conditions, and the amount of Qui was lowered in the crust of spores produced in the -CaCl<sub>2</sub> and -O<sub>2</sub> + CO<sub>2</sub> conditions (Figures 3A–D).

### 3.7. Sporulating cells exposed to divalent cations depletion or lower oxygen availability produce spores with a lower amount of leg in the crust

To evaluate the impact of the sporulation conditions on the amount of Leg on the spore surface, crust samples were hydrolyzed,

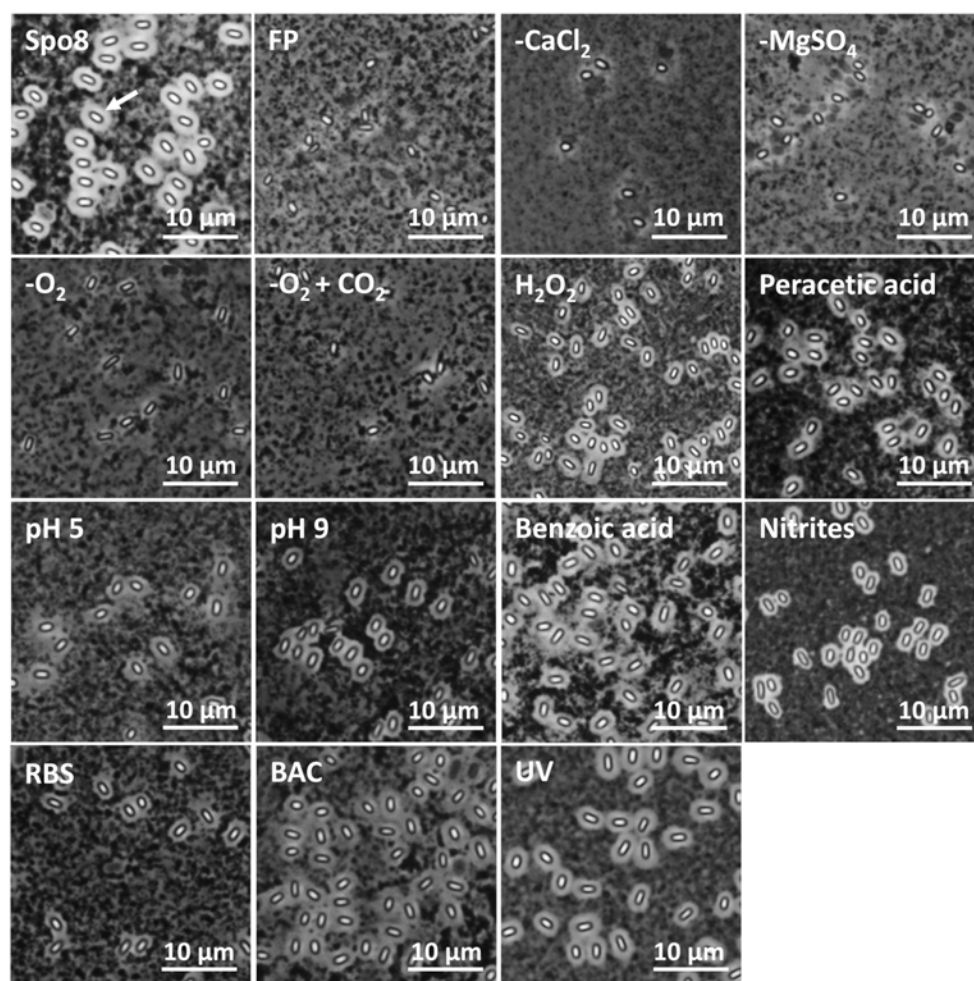


FIGURE 2

Observation of spores by phase contrast microscopy after India ink staining. FP: Spores after a French press treatment (negative control). A white halo around the spores (white arrow) indicates the presence of crust glycans.

and nonulosonic acids were derivatized by DMB before being analyzed by RP-HPLC-FL. The chromatogram obtained in the Spo8 condition showed three major peaks with retention times of ~8.3 min (peak 1), 14.5 min (peak 2), and 20.4 min (peak 3). The area of peak 1, which was previously identified as Leg, was used to estimate the Leg amount in the crust of *B. subtilis* spores (Supplementary Figure 9; Dubois et al., 2020). The amount of Leg was significantly reduced in the  $-\text{CaCl}_2$ ,  $-\text{MgSO}_4$ ,  $-\text{O}_2$ , and  $-\text{O}_2 + \text{CO}_2$  conditions compared to the Spo8 condition (Figures 3A–D). In contrast, it was not significantly different in the  $\text{H}_2\text{O}_2$ , peracetic acid, and pH 5 conditions (Figures 3E–G).

### 3.8. The protein backbone of the crust of spores produced in the oxygen-limited and $\text{H}_2\text{O}_2$ conditions is impaired

To assess the effect of the sporulation conditions on crust proteins, the *cotY* and *cgeA* genes with their respective promoter were fused to the gene encoding the green fluorescent protein (GFP). Fusions were then integrated at the *amyE* locus of the *B. subtilis* 168 strain to obtain

the *B. subtilis* 168 *amyE::cotY*-GFP and *B. subtilis* 168 *amyE::cgeA*-GFP. These two strains produced CotY-GFP and CgeA-GFP fusion proteins, respectively. The CotY-GFP fusion protein was used here as a marker of the integrity of the protein backbone of the crust while the CgeA-GFP fusion protein was used to detect any change in the composition and/or structure of the crust proteins. Spores of the *B. subtilis* 168, *B. subtilis* 168 *amyE::cotY*-GFP, and *B. subtilis* 168 *amyE::cgeA*-GFP strains were produced in the Spo8 condition and the fluorescence of spores was evaluated by fluorescence microscopy. Spores of the *B. subtilis* 168 strain were slightly auto-fluorescent at the excitation wavelength of GFP and a strong fluorescence signal was observed on the spore surface of the *B. subtilis* 168 *amyE::cotY*-GFP and *B. subtilis* 168 *amyE::cgeA*-GFP strains indicating that CotY-GFP and CgeA-GFP fusion proteins were properly expressed and localized (Supplementary Figure 10). Then, spores of the *B. subtilis* 168 *amyE::cotY*-GFP and *B. subtilis* 168 *amyE::cgeA*-GFP strains were produced in the seven sporulation conditions affecting surface properties and fluorescence of spores was measured by flow-cytometry (Figure 4; Supplementary Figures 11A,B). In the  $-\text{O}_2$ ,  $-\text{O}_2 + \text{CO}_2$ , and  $\text{H}_2\text{O}_2$  sporulation conditions, the fluorescence of spores of *B. subtilis* 168

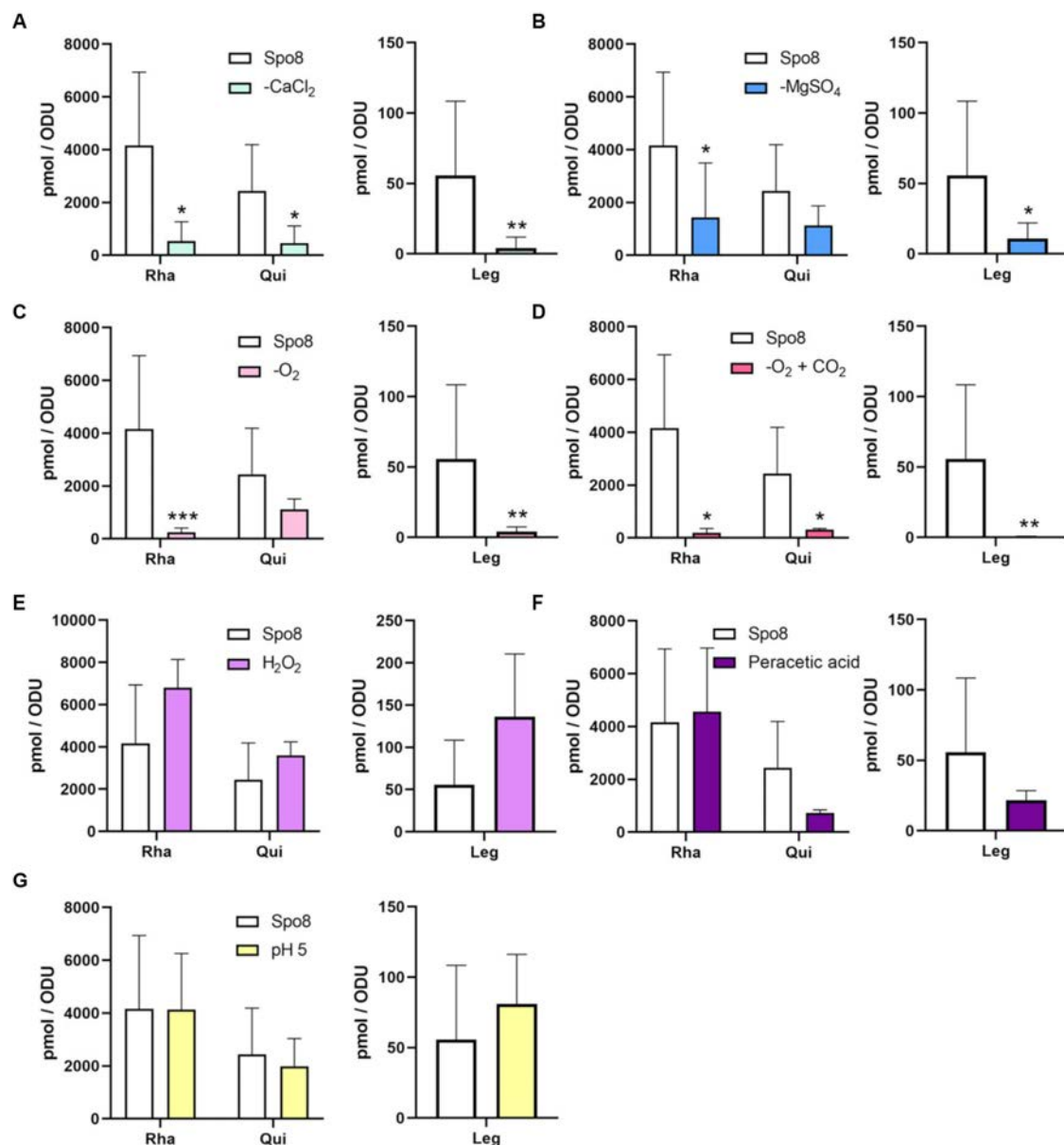


FIGURE 3

Influence of sporulation conditions on the monosaccharide composition of the crust. The relative amounts of Rha, Qui, and Leg in the crust were evaluated by RP-HPLC-FL. The experiments were performed on the crust of spores released from *B. subtilis* 168 cells produced in Spo8 and in the sporulation conditions shown to affect spore surface properties: -CaCl<sub>2</sub> (A), -MgSO<sub>4</sub> (B), -O<sub>2</sub> (C), -O<sub>2</sub> + CO<sub>2</sub> (D), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (E), peracetic acid (F), and pH 5 (G). The results were standardized by the OD<sub>600nm</sub> of the spore preparations. Error bars represent the SDs of the means. \**p* ≤ 0.05; \*\**p* ≤ 0.01; \*\*\**p* ≤ 0.001 for each condition versus Spo8 by Mann–Whitney.

*amyE::cotY*-GFP strain was significantly lower than that of spores of the same strain obtained in the Spo8 condition. These results indicate that these sporulation conditions lead to a decrease in the relative amount of CotY in the crust. The decrease in spore fluorescence in the -O<sub>2</sub> and -O<sub>2</sub> + CO<sub>2</sub> conditions was not due to a decrease in GFP fluorescence caused by a lower oxygen availability during sporulation (Supplementary Figure 11C). In the -CaCl<sub>2</sub>, -O<sub>2</sub>, -O<sub>2</sub> + CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, and pH 5 sporulation conditions, fluorescence of spores of the *B. subtilis* 168 *amyE::cgeA*-GFP strain was lower than that of spores of the same strain obtained in the Spo8 condition indicating a decrease in the relative amount of CgeA in the crust of spores produced in these conditions.

### 3.9. Transcription of genes involved in crust biosynthesis is decreased during late sporulation in oxygen-limited and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> conditions

We have shown above that -CaCl<sub>2</sub>, -MgSO<sub>4</sub>, -O<sub>2</sub>, -O<sub>2</sub> + CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, and pH 5 sporulation conditions modify the glycan and/or protein composition of the crust of the released spores. To determine whether these crust modifications are due to transcriptional regulation of genes involved in crust synthesis, qRT-PCR experiments were performed on RNA extracted from sporulating cells in the late stationary phase (8 h after the transition to the stationary phase). The genes encoding crust

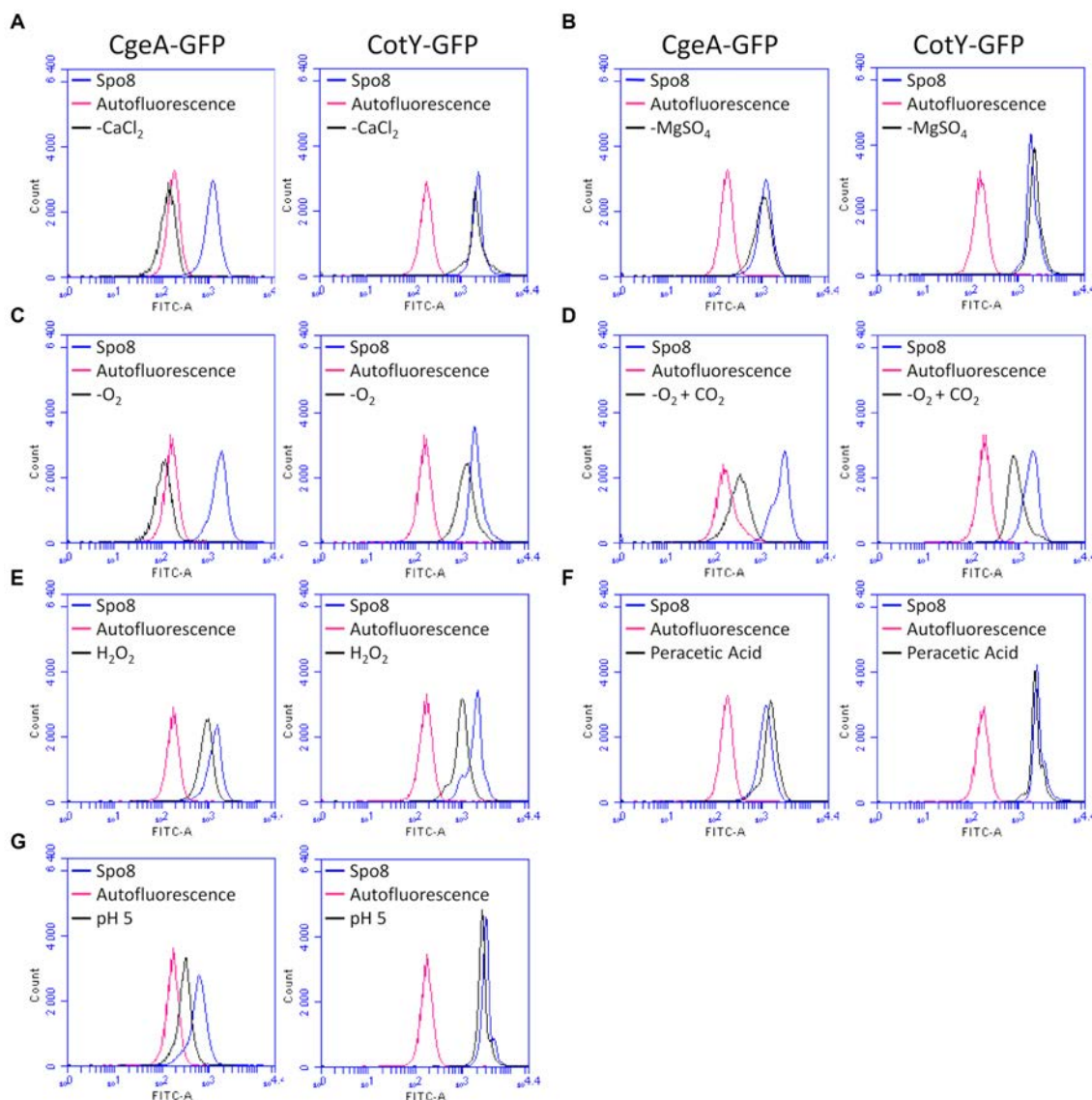


FIGURE 4

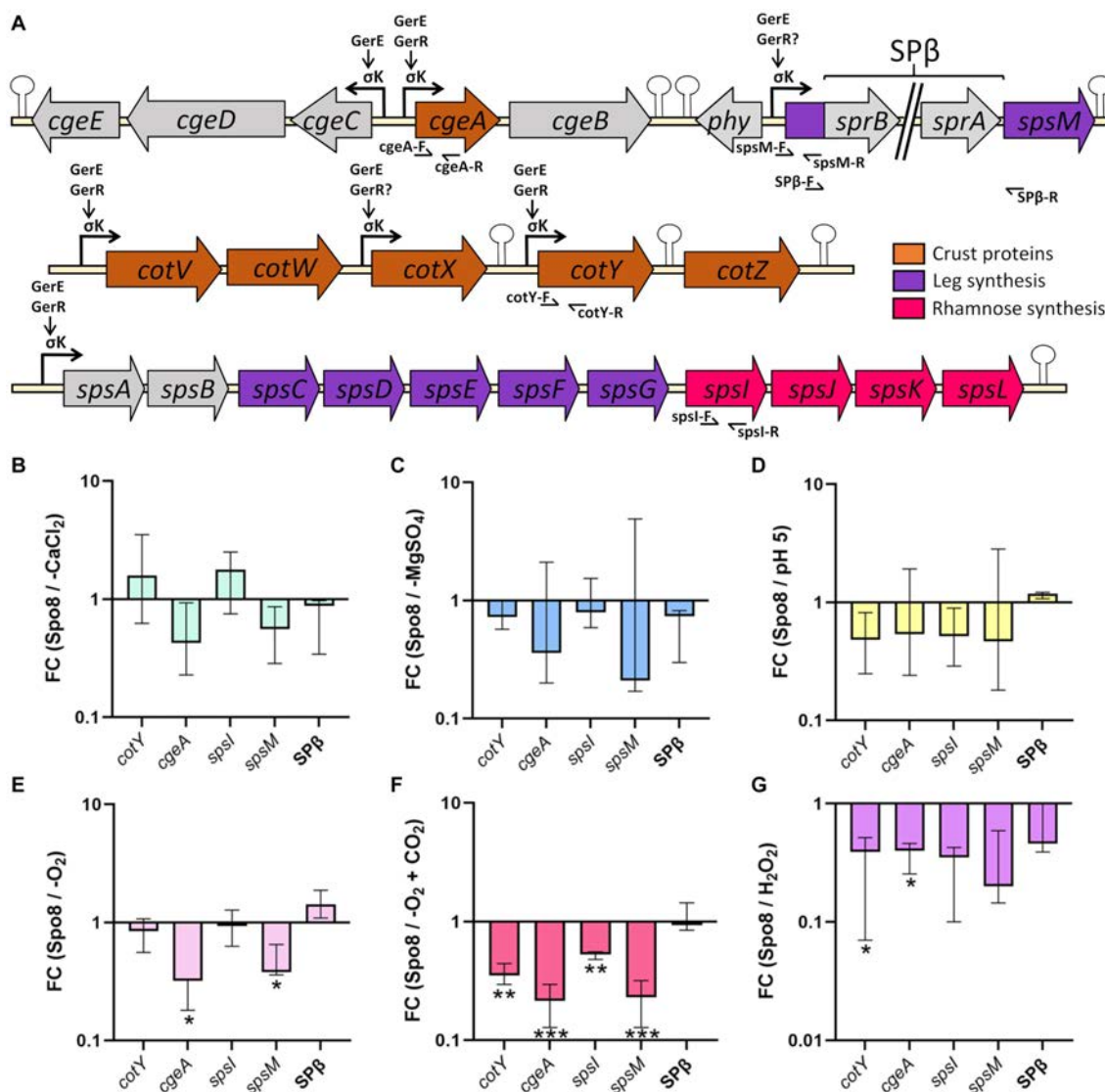
Influence of sporulation conditions on the relative amount of CgeA and CotY in the crust. Fluorescence of spores of the *B. subtilis* 168 amyE::cgeA-GFP and *B. subtilis* 168 amyE::cotY-GFP strains was measured by flow cytometry after sporulation of both strains in Spo8 and in the sporulation conditions shown to affect spore surface properties: -CaCl<sub>2</sub> (A), -MgSO<sub>4</sub> (B), -O<sub>2</sub> (C), -O<sub>2</sub> + CO<sub>2</sub> (D), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (E), peracetic acid (F) and pH 5 (G). The fluorescence of spores is proportional to the amount of CgeA-GFP and CotY-GFP fusion proteins on the spore surface. Autofluorescence of the *B. subtilis* 168 strain is represented in red in all the panels (negative control). The data are presented as overlaid histograms that represent the distribution of fluorescence per cell of the same number of events.

proteins (*cotY* and *cgeA*) and the genes encoding the first enzyme of the Rha and Leg biosynthesis pathway (*spsI* and *spsM*, respectively) were targeted (Figure 5A). In addition, a primer pair flanking the SPβ prophage was tested to evaluate the influence of sporulation conditions on SPβ prophage excision. In the -CaCl<sub>2</sub>, -MgSO<sub>4</sub>, and pH 5 conditions, transcription of the four genes was unchanged compared to the Spo8 condition (Figures 5B–D). In contrast, transcription of the *cgeA* and *spsM* genes was decreased in the -O<sub>2</sub> condition, and transcription of all the genes tested was reduced in the -O<sub>2</sub> + CO<sub>2</sub> condition (Figures 5E,F). Finally, in the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> condition, transcription of *cotY* and *cgeA* genes was decreased compared to the Spo8 condition (Figure 5G). Our results also showed that prophage excision is not changed whatever the condition tested. These results suggest that the changes in spore surface properties obtained in the -O<sub>2</sub>, -O<sub>2</sub> + CO<sub>2</sub>, and

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> conditions are, at least in part due to a decrease in the transcription of genes involved in crust synthesis during late sporulation.

## 4. Discussion

In optimized growth conditions, e.g., in laboratory conditions, sporulation of *B. subtilis* is triggered when the cells enter in the transition to the stationary phase, and it takes 8–10 h to complete with the release of a mature spore. Therefore, sporulation is a long process and its duration can be further extended in suboptimal growth conditions such as those found in natural and industrial environments. In these environments, spore-forming bacteria often encounter



**FIGURE 5** Influence of sporulation conditions on the transcription of genes involved in crust synthesis. (A) Schematic representation of the genetic organization of the *cge*, *cot*, and *sps* genes involved in crust synthesis. Broken arrows, arrows and stem-loop, respectively, represent the  $\sigma^k$  dependent promoters, direct or indirect activation of transcription by a transcriptional regulator and transcriptional terminators defined previously (Zhang et al., 1994; Roels and Losick, 1995; Eichenberger et al., 2004; Kuwana et al., 2005; Nicolas et al., 2012; Cangiano et al., 2014; Arrieta-Ortiz et al., 2015). Primers used for qRT-PCR are indicated by half arrows. Relative transcript levels of the *cotY*, *cgeA*, *spsI*, and *spsM* genes and *SP $\beta$*  prophage excision were evaluated by qRT-PCR in the late stationary phase (t8). *SP $\beta$*  prophage excision was assessed using primers flanking the prophage (*SP $\beta$ -F*/*SP $\beta$ -R*). Relative transcript levels were calculated as the ratio of the mRNA level (arbitrary units) of each gene in the sporulation conditions shown to affect spore surface properties: -CaCl<sub>2</sub> (B), -MgSO<sub>4</sub> (C), pH 5 (D), -O<sub>2</sub> (E), -O<sub>2</sub> + CO<sub>2</sub> (F) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (G), compared to that obtained in the Spo8 condition. The fold change (FC) was calculated by the  $\Delta\Delta CT$  method using the *polC* gene for normalization. Error bars represent the median with the interquartile range. \**p* ≤ 0.05; \*\**p* ≤ 0.01; \*\*\**p* ≤ 0.001 for each condition versus Spo8 by *t*-test.

unfavorable conditions for growth and sporulation, such as low or high temperatures and pH, which can modulate sporulation rate and length, but also the properties of mature spores (Bressuire-Isoard et al., 2018). Many works have been reported in the literature on the influence of sporulation conditions on spore resistance, notably to extreme temperatures and UV radiations. Other works have concerned the structure of the spores, e.g., the water or dipicolinic acid content, the cortex peptidoglycan structure, the fatty acid composition, or the coat protein profile, which are probably at least partly related to changes in spore resistance (Abhyankar et al., 2016; Setlow and Christie, 2023). Conversely, only a few works have been

reported on the surface properties of spores produced in different environmental conditions, despite their major role in surface contamination and therefore their possible role in the risk of further dissemination, e.g., in agri-food industries or medical environments.

This study evaluated the impact of 13 sporulation conditions likely to be encountered in real environments, on *B. subtilis* spore surface and adhesion properties. Some of these conditions, such as reduced cation availability, or acidic pH, have previously been shown to affect spore resistance (Cazemier et al., 2001; Baweja et al., 2008). In contrast, the conditions used to limit the growth and/or survival of bacteria, such as preservatives, detergents, and disinfectants seem not



to have been investigated in the literature. Out of the 13 sporulation conditions, 7 led to the release of spores that are more hydrophobic and adherent, while the other conditions did not affect these spore properties. Concerning the lack of effect of the detergent and antibacterial treatments, it can be assumed that this would be due to the selected relatively mild conditions, so as not to impede sporulation. Six of these seven sporulation conditions leading to more adherent spores can be categorized into three groups according to the nature of the stresses (Table 4): depletion in divalent cation (-CaCl<sub>2</sub> and -MgSO<sub>4</sub>), lower oxygen availability (-O<sub>2</sub> and -O<sub>2</sub> + CO<sub>2</sub>) and oxidative stress (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and peracetic acid). These results suggest that in their ecological niches and industrial environments, where growth and sporulation conditions are not optimal, the bacteria of the *B. subtilis* group probably produce spores that are often more hydrophobic and adherent than spores obtained in optimized laboratory conditions.

The surface and adhesion properties of spores depend on their outermost layer which is in contact with surfaces in the environment. In most strains of the *B. subtilis* group, the crust is the outermost layer of spores and it has been shown that its mechanical removal makes *B. subtilis* spores hydrophobic and more adherent to stainless steel (Faïlle et al., 2014; Dubois et al., 2020). Therefore, we investigated the impact of the sporulation conditions on the crust structure and composition. Spores produced in the different conditions shown to affect their surface properties were observed under microscope after staining with India ink, a stain that does not penetrate the mucous layer formed by the crust glycans, producing a white halo around the spores (Abe et al., 2014; Shuster et al., 2019b). In the divalent cation depletion (-CaCl<sub>2</sub> or -MgSO<sub>4</sub>) and oxygen-limited (-O<sub>2</sub> or -O<sub>2</sub> + CO<sub>2</sub>) conditions, the crust glycans were impaired confirming the negative impact of these sporulation conditions on crust glycans synthesis and/or assembly on the spore surface. In contrast, the crust glycans of spores obtained from sporulating cells exposed to oxidative stresses (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and peracetic acid) or low pH (pH 5) seemed unaffected.

To determine if these observations were related to a decrease in Leg or one or more monosaccharides, the composition of the crust of these spores was implemented. We first confirmed that the crust contains Rha, Glc, Qui, GlcN, and Leg (Faïlle et al., 2014; Dubois et al., 2020) and we also demonstrated the presence of Gal

(Supplementary Figure 7). A reduced amount of Rha, Qui, and Leg was observed on some spores, the alteration of the crust of which was revealed by staining with India ink, while no changes could be evidenced on the spores still surrounded with a clear halo. Interestingly, the relative amounts of Rha and Leg decreased concomitantly in divalent cations depletion as well as oxygen-limited conditions. This result is consistent with a previous study that showed that inactivation of the Leg biosynthesis pathway abolishes Leg production but also decreases the amount of Rha in the crust (Dubois et al., 2020). These data suggest that Rha and Leg are part of a same glycan. It was shown previously that the Leg biosynthesis pathway is required for crust assembly and spores from mutants of this pathway are more hydrophobic and adherent to stainless steel (Dubois et al., 2020). Similarly, it was shown by transmission electron microscopy that the crust of a rhamnose-deficient mutant ( $\Delta$ *spsI*) is present around *B. subtilis* spores but it is barely detectable and spores of this mutant were more hydrophobic than spores of a rhamnose producing strain (Shuster et al., 2019b). These data strongly suggest that Rha and Leg play an important role in spore surface and adhesion properties. Therefore, it seems likely that the increased adhesion of spores obtained after sporulation in divalent cations depletion or oxygen-limited conditions is due to a decrease in the amount of a glycan containing Rha and Leg in the crust. On the other hand, the increased adhesion of spores produced under oxidizing conditions cannot be explained by the modification of the crust glycans.

We also evaluated the impact of the sporulation conditions on the relative amount of the CotY and CgeA proteins in the crust. CotY is one of the morphogenetic proteins and the main structural protein of the crust of *B. subtilis* spores (Bartels et al., 2019). Indeed, expressed in *E. coli*, CotY can arrange intracellularly into highly stable honeycomb-like structures through processes of self-assembly (Jiang et al., 2015). Therefore, the CotY-GFP fusion protein was used as a marker of the integrity of the protein backbone of the crust. In contrast, CgeA is not required for the assembly or the correct localization of the other crust proteins and it relies on all other crust proteins for proper localization (Bartels et al., 2019; Shuster et al., 2019a). It was deduced that CgeA is at the bottom of the crust assembly hierarchy (Bartels et al., 2019; Shuster et al., 2019a). Therefore, the CgeA-GFP fusion protein was

TABLE 4 Summary table of the results.

Sporulation condition	Group	Adhesion	Hydrophobicity	Halo	Rha	Qui	Leg	CotY	CgeA	Transcription *
-CaCl <sub>2</sub>	Depletion in cation	↗	↗	↘	↘	↘	↘	-	↘	-
-MgSO <sub>4</sub>		↗	↗	↘	↘	-	↘	-	-	-
-O <sub>2</sub>	Lower oxygenation	↗	↗	↘	↘	-	↘	↘	↘	↘
-O <sub>2</sub> + CO <sub>2</sub>		↗	↗	↘	↘	↘	↘	↘	↘	↘
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Oxidative stress	↗	↗	-	-	-	-	↘	↘	↘
Peracetic acid		↗	↗	-	-	-	-	-	-	-
pH 5		↗	↗	-	-	-	-	-	↘	-

The column adhesion refers to the results of polypropylene adhesion tests, the column hydrophobicity refers to the results of MATH, the column Halo refers to microscopic observations of spores after India ink staining, the columns Rha, Qui, and Leg refer to RP-HPLC-FL experiments, the columns CgeA and CotY refer to the cytometry experiments and the column transcription refers to the qRT-PCR experiments. An upward arrow indicates an increase and a downward arrow indicates a decrease relative to the Spo8 condition.

\*: A downward arrow indicates that transcription of at least one of the 4 targeted genes decreased.

used to detect any change in the composition and/or structure of the crust proteins. Our results showed that all the sporulation conditions tested changed the protein composition of the crust except for  $-MgSO_4$  and peracetic acid conditions. In the  $-CaCl_2$  and pH 5 conditions, the changes in the crust appear to be moderate, as only the relative amount of CgeA decreased. In contrast, when sporulation was perturbed by hydrogen peroxide stress or oxygen-limited conditions, the relative amount of both CgeA and CotY decreased suggesting that the protein backbone is impaired. The underlying molecular mechanisms that explain the changes in crust composition and structure will have to be studied but they probably interfere with crust synthesis and/or assembly. Nevertheless, it is also possible that defects in crust assembly were the indirect consequence of defects in the inner layers of spores, especially the outer coat.

To determine whether environmental conditions regulate the transcription of genes involved in crust synthesis during sporulation we performed qRT-PCR experiments. Four genes were targeted: *cotY*, *cgeA*, *spsI*, and *spsM*. *spsI* is the first gene of the *spsIJKL* locus that encode the enzymes of a pathway converting D-glucose-1-phosphate to dTDP-L-rhamnose. The *spsM* gene encodes the first enzyme of the pathway that converts UDP-GlcNAc to Leg and it was shown that this pathway is required for proper crust synthesis and/or anchoring (Dubois et al., 2020). In the *B. subtilis* 168 strain, the *spsM* gene is interrupted by the prophage SP $\beta$ . Excision of SP $\beta$  occurs in the mother cell of sporulating cells during the middle-to-late stages of sporulation, thus reconstituting a functional *spsM* gene (Abe et al., 2014, 2017). Therefore, any change in prophage excision potentially causes a change in crust synthesis and spore surface properties. Depletion in calcium or magnesium during sporulation did not impact the transcription of the targeted genes indicating that these sporulation conditions prevent crust assembly or negatively regulate crust synthesis at a post-transcriptional level. Post-transcriptional regulation of crust synthesis by divalent cations remains unknown but it might be mediated by glycosyltransferases that participate in the assembly of crust glycans. Indeed, nine glycosyltransferases are potentially involved in the synthesis and/or the anchoring of crust glycans on the spore surface: SpsA, SpsB, YfnE, YfnF, YfnD, YtcC, CgeD, CgeB and CotSA (Shuster et al., 2019a,b; Dubois et al., 2020). At least three of them (SpsA, YfnE, and CgeD) are putative GT-A type glycosyltransferases, a class of enzymes that are dependent on divalent metal ions. The metal ion is coordinated by a highly conserved DXD motif of the active site and it aids leaving group departure by stabilizing the charged phosphate groups in the nucleotide sugar donor (Gloster, 2014). Therefore, a depletion in divalent cations during sporulation might inhibit the activity of the GT-A glycosyltransferases and ultimately the assembly of glycans on the spore surface. When sporulation occurs in oxygen-limited conditions, transcription of genes involved in crust protein and glycans synthesis is decreased indicating that a lower availability in oxygen during sporulation represses crust synthesis at a transcriptional level. Transcription of the *spsM* gene was decreased in the  $-O_2$  and  $-O_2 + CO_2$  conditions and transcription of *spsI* was also decreased in the  $-O_2 + CO_2$  condition. Therefore, it is likely that the decrease in the relative amount of Leg and Rha in the crust of spores obtained in the oxygen-limited conditions is a consequence of the downregulation of the *sps* genes transcription during sporulation. Similarly, the decreased transcription of the *cotY* and/or *cgeA* genes might also explain the decrease in the relative amount of CotY and/or CgeA in the crust of spores obtained in oxygen-limited conditions. In contrast, the acidic

pH did not modify transcription of the *cotY*, *cgeA*, *spsI*, and *spsM* genes suggesting that an acidic pH disrupts crust synthesis or assembly at a post-transcriptional level. It has been shown in *Bacillus* that acid stresses increase the intracellular amount of reactive oxygen species inducing secondary oxidative stress (Mols and Abee, 2011; Desriac et al., 2013). Therefore, the physiological changes and stress responses caused by acidic pH to sporulating cells may be similar to those induced by oxidizing molecules. It is well documented that oxidizing molecules can have a devastating effect on the structure and activity of proteins, especially those rich in sulfur amino acids (Ezraty et al., 2017). Moreover, it has been shown that the structural and morphogenetic proteins CotY and CotZ are rich in cysteines (9.3 and 6.7%, respectively) (Zhang et al., 1993). Therefore, an acidic pH during sporulation could induce a misfolding of CotY and/or CotZ, leading to the loss of their morphogenetic activity and ultimately to a defect in the crust proteins assembly. Transcription of all the genes targeted in qRT-PCR (*cotY*, *cgeA*, *spsI*, and *spsM*) is under the control of SigK and GerE and *cotY*, *cgeA*, and *spsI* genes transcription is also regulated by GerR (Figure 5A). Therefore, these transcriptional factors are potentially involved in the transcriptional regulation of these genes in response to sporulation conditions. Nevertheless, in the  $-O_2$  and  $-H_2O_2$  conditions, only two out of the four genes were significantly less transcribed, suggesting a more complex regulation involving other regulators.

The crust is quite well conserved within the *Bacillus subtilis* group, although it is polymorphic from one species to another. For example, long flexuous filaments were observed on the surface of *B. licheniformis* spores, whereas the filaments were assembled into spikes on spores of *B. clausii* (Faille et al., 2014). However, the differences in crust composition and structure that explain these differences have not yet been identified. In clostridia and bacteria of the *B. cereus* group, the outermost layer of spores is the exosporium (Bozue et al., 2015; Stewart, 2015). Across species, the basic design of the exosporium consists of a thin continuous proteinaceous layer. In *B. cereus*, this basal layer is mainly composed of ExsY and CotY which are orthologs of CotZ and CotY in *B. subtilis*. The external face of the basal layer may be surrounded by a hairy nap made of collagen-like glycoproteins. In *B. cereus*, the main collagen-like glycoprotein is BclA (Sylvestre et al., 2002; Lequette et al., 2011). There is no collagen-like glycoprotein in the crust of *B. subtilis* suggesting major structural differences between crust and exosporium, particularly about glycans localization and anchoring. However, it seems that sporulation conditions also influence the structure of the exosporium of *B. cereus* spores. Indeed, when produced at high temperature or in anaerobic conditions *B. cereus* spores showed a damaged exosporium (Faille et al., 2007; Abbas et al., 2014). Therefore, interesting perspectives of this study would be to better characterize the diversity of the outermost layers of spores and further investigate the consequences of sporulation conditions on these layers, which are so crucial to the adhesion properties of spores.

To summarize, in *B. subtilis* a wide range of sporulation conditions can result in the production of spores with surface and adhesion properties very different from those produced under optimal conditions (Table 4). These sporulation conditions include divalent cations depletion, reduced oxygenation, oxidative stress, and acidic pH. Despite a similar effect on spore hydrophobicity and adhesion, the effect on the crust composition differs depending on the type of stress. Divalent cations depletion during sporulation results in a decrease in the amount of glycans on the spore surface and this decrease would

be due to a crust assembly defect or a post-transcriptional regulation of glycan synthesis. By contrast, sporulation in oxygen-limited condition causes a decrease in the amount of glycans and proteins in the crust. This decrease is probably due to a repression of the transcription of genes involved in the synthesis of these compounds during sporulation. On the other hand, there is no clear trend in the consequences of oxidative stress and acidic pH during sporulation on the composition of the crust. Nevertheless, our results suggest that these categories of stresses affect the composition and/or structure of crust proteins rather than glycans.

The fact that sporulation conditions affect the ease with which spores can contaminate surfaces is therefore probably a major consideration in estimating the risk posed by *B. subtilis* spores in real environments. It could explain the frequent and recurrent presence of *B. subtilis* spores in food processing lines, despite laboratory results suggesting their low ability to contaminate surfaces. In view of these results, it could also be interesting to investigate the influence of environmental conditions encountered in the food industry during processing or cleaning operations on the surface properties of mature spores and their ability to adhere to all types of materials.

## Data availability statement

The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

## Author contributions

AH: investigation, methodology, data collection, analysis, and writing. CL: investigation, methodology, data collection, and analysis. FK: investigation, data collection, and analysis. CF: supervision and writing – review and editing. TD: project administration, funding acquisition, conceptualization, supervision, investigation, methodology, and writing–review and editing. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

## References

- Abbas, A. A., Planchon, S., Jobin, M., and Schmitt, P. (2014). Absence of oxygen affects the capacity to sporulate and the spore properties of *Bacillus cereus*. *Food Microbiol.* 42, 122–131. doi: 10.1016/j.fm.2014.03.004
- Abe, K., Kawano, Y., Iwamoto, K., Arai, K., Maruyama, Y., Eichenberger, P., et al. (2014). Developmentally-regulated excision of the SP $\beta$  prophage reconstitutes a gene required for spore envelope maturation in *Bacillus subtilis*. *PLoS Genet.* 10:e1004636. doi: 10.1371/journal.pgen.1004636
- Abe, K., Takamatsu, T., and Sato, T. (2017). Mechanism of bacterial gene rearrangement: SprA-catalyzed precise DNA recombination and its directionality control by SprB ensure the gene rearrangement and stable expression of spsM during sporulation in *Bacillus subtilis*. *Nucleic Acids Res.* 45, 6669–6683. doi: 10.1093/nar/gkx466
- Abhyankar, W. R., Kamphorst, K., Swarge, B. N., van Veen, H., van der Wel, N. N., Brul, S., et al. (2016). The influence of sporulation conditions on the spore coat protein composition of *Bacillus subtilis* spores. *Front. Microbiol.* 7:1636. doi: 10.3389/fmicb.2016.01636
- André, S., Vallaeys, T., and Planchon, S. (2017). Spore-forming bacteria responsible for food spoilage. *Res. Microbiol.* 168, 379–387. doi: 10.1016/j.resmic.2016.10.003
- Anumula, K. R. (1994). Quantitative determination of monosaccharides in glycoproteins by high-performance liquid chromatography with highly sensitive fluorescence detection. *Anal. Biochem.* 220, 275–283. doi: 10.1006/abio.1994.1338
- Arrieta-Ortiz, M. L., Hafemeister, C., Bate, A. R., Chu, T., Greenfield, A., Shuster, B., et al. (2015). An experimentally supported model of the *Bacillus subtilis* global transcriptional regulatory network. *Mol. Syst. Biol.* 11:839. doi: 10.15252/MSB.20156236
- Bartels, J., Blüher, A., López Castellanos, S., Richter, M., Günther, M., and Mascher, T. (2019). The *Bacillus subtilis* endospore crust: protein interaction network, architecture and glycosylation state of a potential glycoprotein layer. *Mol. Microbiol.* 112, 1576–1592. doi: 10.1111/mmi.14381
- Baweja, R. B., Zaman, M. S., Mattoo, A. R., Sharma, K., Tripathi, V., Aggarwal, A., et al. (2008). Properties of *Bacillus anthracis* spores prepared under various environmental conditions. *Arch. Microbiol.* 189, 71–79. doi: 10.1007/s00203-007-0295-9
- Bozue, J. A., Welkos, S., and Cote, C. K. (2015). The *Bacillus anthracis* exosporium: What's the big "hairy" Deal? *Microbiol. Spectr.* 3. doi: 10.1128/microbiolspec.tbs-0021-2015
- Bressuire-Isoard, C., Broussolle, V., and Carlin, F. (2018). Sporulation environment influences spore properties in bacillus: evidence and insights on underlying molecular and physiological mechanisms. *FEMS Microbiol. Rev.* 42, 614–626. doi: 10.1093/femsre/fuy021
- Cangiano, G., Sirec, T., Panarella, C., Isticato, R., Baccigalupi, L., De Felice, M., et al. (2014). The sps gene products affect the germination, hydrophobicity, and protein adsorption of *Bacillus subtilis* spores. *Appl. Environ. Microbiol.* 80, 7293–7302. doi: 10.1128/AEM.02893-14
- Cazemier, A. E., Wagenaars, S. F. M., and Ter Steeg, P. F. (2001). Effect of sporulation and recovery medium on the heat resistance and amount of injury of spores from spoilage bacilli. *J. Appl. Microbiol.* 90, 761–770. doi: 10.1046/j.1365-2672.2001.01302.x

## Funding

This work was supported by the Agence Nationale de la Recherche (SOGLOSSI project; ANR-21-CE21-0012). The Hauts-de-France region provided a Ph.D. grant to AH.

## Acknowledgments

The authors thank the Plateforme d'Analyse des Glycoconjugués (PAGés, <http://plateforme-pages.univ-lille1.fr/>) and the Bio Imaging Center Lille (BICeL) of the US 41 – UAR 2014 – PLBS for providing access to the instrumental facilities for carbohydrate analysis and confocal microscopy.

## 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.

## Supplementary material

The Supplementary material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2023.1219581/full#supplementary-material>

- Desriac, N., Broussolle, V., Postollec, F., Mathot, A. G., Sohier, D., Coroller, L., et al. (2013). *Bacillus cereus* cell response upon exposure to acid environment: toward the identification of potential biomarkers. *Front. Microbiol.* 4:284. doi: 10.3389/fmicb.2013.00284
- Driks, A., and Eichenberger, P. (2016). The spore coat. *Microbiol. Spectr.* 4, 179–200. doi: 10.1128/microbiolspec.TBS-0023-2016
- Dubois, T., Dancer-Thibonnier, M., Monot, M., Hamiot, A., Bouillaut, L., Soutourina, O., et al. (2016). Control of *Clostridium difficile* physiopathology in response to cysteine availability. *Infect. Immun.* 84, 2389–2405. doi: 10.1128/IAI.00121-16
- Dubois, T., Krzewinski, F., Yamakawa, N., Lemy, C., Hamiot, A., Brunet, L., et al. (2020). The sps genes encode an original legionaminic acid pathway required for crust assembly in *Bacillus subtilis*. *mBio* 11, 1–17. doi: 10.1128/mBio.01153-20
- Eichenberger, P., Fujita, M., Jensen, S. T., Conlon, E. M., Rudner, D. Z., Wang, S. T., et al. (2004). The program of gene transcription for a single differentiating cell type during sporulation in *Bacillus subtilis*. *PLoS Biol.* 2:e328. doi: 10.1371/journal.pbio.0020328
- Eschbeck, E., Bauer, S. A. W., and Kulozik, U. (2017). Effect of cultivation pH on the surface hydrophobicity of *Bacillus subtilis* spores. *AMB Express* 7:157. doi: 10.1186/s13568-017-0458-2
- Ezraty, B., Gennaris, A., Barras, F., and Collet, J. F. (2017). Oxidative stress, protein damage and repair in bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* 15, 385–396. doi: 10.1038/nrmicro.2017.26
- Faile, C., Bénézech, T., Blel, W., Ronse, A., Ronse, G., Clarisse, M., et al. (2013). Role of mechanical vs. chemical action in the removal of adherent bacillus spores during CIP procedures. *Food Microbiol.* 33, 149–157. doi: 10.1016/j.fm.2012.09.010
- Faile, C., Lemy, C., Allion-Maurer, A., and Zoueshtiagh, F. (2019). Evaluation of the hydrophobic properties of latex microspheres and bacillus spores. Influence of the particle size on the data obtained by the MATH method (microbial adhesion to hydrocarbons). *Colloids Surf. B. Biointerfaces* 182:110398. doi: 10.1016/j.colsurfb.2019.110398
- Faile, C., Ronse, A., Dewailly, E., Slomianny, C., Maes, E., Krzewinski, F., et al. (2014). Presence and function of a thick mucous layer rich in polysaccharides around *Bacillus subtilis* spores. *Biofouling* 30, 845–858. doi: 10.1080/08927014.2014.939073
- Faile, C., Tauveron, G., Le Gentil-Lelievre, C., and Slomianny, C. (2007). Occurrence of *Bacillus cereus* spores with a damaged exosporium: consequences on the spore adhesion on surfaces of food processing lines. *J. Food Prot.* 70, 2346–2353. doi: 10.4315/0362-028X-70.10.2346
- Gloster, T. M. (2014). Advances in understanding glycosyltransferases from a structural perspective. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 28, 131–141. doi: 10.1016/j.SBI.2014.08.012
- Isticato, R., Lanzilli, M., Petrillo, C., Donadio, G., Baccigalupi, L., and Ricca, E. (2020). *Bacillus subtilis* builds structurally and functionally different spores in response to the temperature of growth. *Environ. Microbiol.* 22, 170–182. doi: 10.1111/1462-2920.14835
- Jiang, S., Wan, Q., Krajcikova, D., Tang, J., Tzokov, S. B., Barak, I., et al. (2015). Diverse supramolecular structures formed by self-assembling proteins of the *Bacillus subtilis* spore coat. *Mol. Microbiol.* 97, 347–359. doi: 10.1111/MMI.13030
- Kuwana, R., Okumura, T., Takamatsu, H., and Watabe, K. (2005). The ylbO gene product of *Bacillus subtilis* is involved in the coat development and lysozyme resistance of spore. *FEMS Microbiol. Lett.* 242, 51–57. doi: 10.1016/j.femsle.2004.10.038
- Lequette, Y., Garénaux, E., Tauveron, G., Dumez, S., Perchat, S., Slomianny, C., et al. (2011). Role played by exosporium glycoproteins in the surface properties of *Bacillus cereus* spores and in their adhesion to stainless steel. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 4905–4911. doi: 10.1128/AEM.02872-10
- Livak, K. J., and Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods* 25, 402–408. doi: 10.1006/meth.2001.1262
- McKenney, P. T., Driks, A., and Eichenberger, P. (2013). The *Bacillus subtilis* endospore: assembly and functions of the multilayered coat. *Nat. Rev. Microbiol.* 11, 33–44. doi: 10.1038/nrmicro2921
- McKenney, P. T., Driks, A., Eskandarian, H. A., Grabowski, P., Guberman, J., Wang, K. H., et al. (2010). A distance-weighted interaction map reveals a previously uncharacterized layer of the *Bacillus subtilis* spore coat. *Curr. Biol.* 20, 934–938. doi: 10.1016/j.CUB.2010.03.060
- Melly, E., Genest, P. C., Gilmore, M. E., Little, S., Popham, D. L., Driks, A., et al. (2002). Analysis of the properties of spores of *Bacillus subtilis* prepared at different temperatures. *J. Appl. Microbiol.* 92, 1105–1115. doi: 10.1046/j.1365-2672.2002.01644.x
- Moeller, R., Wassmann, M., Reitz, G., and 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. *J. Appl. Microbiol.* 110, 1485–1494. doi: 10.1111/j.1365-2672.2011.05004.x
- Mols, M., and Abee, T. (2011). *Bacillus cereus* responses to acid stress. *Environ. Microbiol.* 13, 2835–2843. doi: 10.1111/j.1462-2920.2011.02490.x
- Nicolas, P., Mäder, U., Dervyn, E., Rochat, T., Leduc, A., Pigeonneau, N., et al. (2012). Condition-dependent transcriptome reveals high-level regulatory architecture in *Bacillus subtilis*. *Science* 335, 1103–1106. doi: 10.1126/SCIENCE.1206848
- Popp, P. F., Dotzler, M., Radeck, J., Bartels, J., and Mascher, T. (2017). The bacillus BioBrick box 2.0: expanding the genetic toolbox for the standardized work with *Bacillus subtilis*. *Sci. Rep.* 7, 1–13. doi: 10.1038/s41598-017-15107-z
- Radeck, J., Kraft, K., Bartels, J., Cikovic, T., Dürr, F., Emenegger, J., et al. (2013). The bacillus BioBrick box: generation and evaluation of essential genetic building blocks for standardized work with *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Eng.* 7, 1–17. doi: 10.1186/1754-1611-7-29
- Richard, E., Dubois, T., Allion-Maurer, A., Jha, P. K., and Faile, C. (2020). Hydrophobicity of abiotic surfaces governs droplets deposition and evaporation patterns. *Food Microbiol.* 91:103538. doi: 10.1016/j.FM.2020.103538
- Roels, S., and Losick, R. (1995). Adjacent and divergently oriented operons under the control of the sporulation regulatory protein GerE in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 177, 6263–6275. doi: 10.1128/jb.177.21.6263-6275.1995
- Setlow, P., and Christie, G. (2023). New thoughts on an old topic: secrets of bacterial spore resistance slowly being revealed. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 87:e0008022. doi: 10.1128/mmbr.00080-22
- Shuster, B., Khemmani, M., Abe, K., Huang, X., Nakaya, Y., Maryn, N., et al. (2019a). Contributions of crust proteins to spore surface properties in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* 111, 825–843. doi: 10.1111/mmi.14194
- Shuster, B., Khemmani, M., Nakaya, Y., Holland, G., Iwamoto, K., Abe, K., et al. (2019b). Expansion of the spore surface polysaccharide layer in *Bacillus subtilis* by deletion of genes encoding glycosyltransferases and glucose modification enzymes. *J. Bacteriol.* 201:e00321. doi: 10.1128/JB.00321-19
- Soni, A., Oey, I., Silcock, P., and Bremer, P. (2016). *Bacillus* spores in the food industry: a review on resistance and response to novel inactivation technologies. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 15, 1139–1148. doi: 10.1111/1541-4337.12231
- Stewart, G. C. (2015). The Exosporium layer of bacterial spores: a connection to the environment and the infected host. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 79, 437–457. doi: 10.1128/mmbr.00050-15
- Sylvestre, P., Couture-Tosi, E., and Mock, M. (2002). A collagen-like surface glycoprotein is a structural component of the *Bacillus anthracis* exosporium. *Mol. Microbiol.* 45, 169–178. doi: 10.1046/j.1365-2958.2000.03000.x
- Ursem, R., Swarge, B., Abhyankar, W. R., Buncherd, H., De Koning, L. J., Setlow, P., et al. (2021). Identification of native cross-links in *Bacillus subtilis* spore coat proteins. *J. Proteome Res.* 20, 1809–1816. doi: 10.1021/acs.jproteome.1c00025
- Vagner, V., Dervyn, E., and Ehrlich, S. D. (1998). A vector for systematic gene inactivation in *Bacillus subtilis*. *Microbiology* 144, 3097–3104. doi: 10.1099/00221287-144-11-3097
- Wienczek, K. M., Klapes, N. A., and Foegeding, P. M. (1990). Hydrophobicity of bacillus and clostridium spores. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 2600–2605. doi: 10.1128/AEM.56.9.2600-2605.1990
- Windwarder, M., Figl, R., Svehla, E., Mócsai, R. T., Farcet, J. B., Staudacher, E., et al. (2016). “Hypermethylation” of anthranilic acid-labeled sugars confers the selectivity required for liquid chromatography-mass spectrometry. *Anal. Biochem.* 514, 24–31. doi: 10.1016/j.ab.2016.09.008
- Xing, Y., and Harper, W. F. (2020). *Bacillus* spore awakening: recent discoveries and technological developments. *Curr. Opin. Biotechnol.* 64, 110–115. doi: 10.1016/j.copbio.2019.12.024
- Zhang, J., Fitz-James, P. C., and Aronson, A. I. (1993). Cloning and characterization of a cluster of genes encoding polypeptides present in the insoluble fraction of the spore coat of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 175, 3757–3766. doi: 10.1128/JB.175.12.3757-3766.1993
- Zhang, J., Ichikawa, H., Halberg, R., Kroos, L., and Aronson, A. I. (1994). Regulation of the transcription of a cluster of *Bacillus subtilis* spore coat genes. *J. Mol. Biol.* 240, 405–415. doi: 10.1006/JMBI.1994.1456

## *Supplementary Material*

### **Sporulation conditions influence the surface and adhesion properties of *Bacillus subtilis* spores**

**Audrey Hamiot<sup>1</sup>, Christelle Lemy<sup>1</sup>, Frederic Krzewinski<sup>2</sup>, Christine Faille<sup>1</sup> and Thomas Dubois<sup>1\*</sup>**

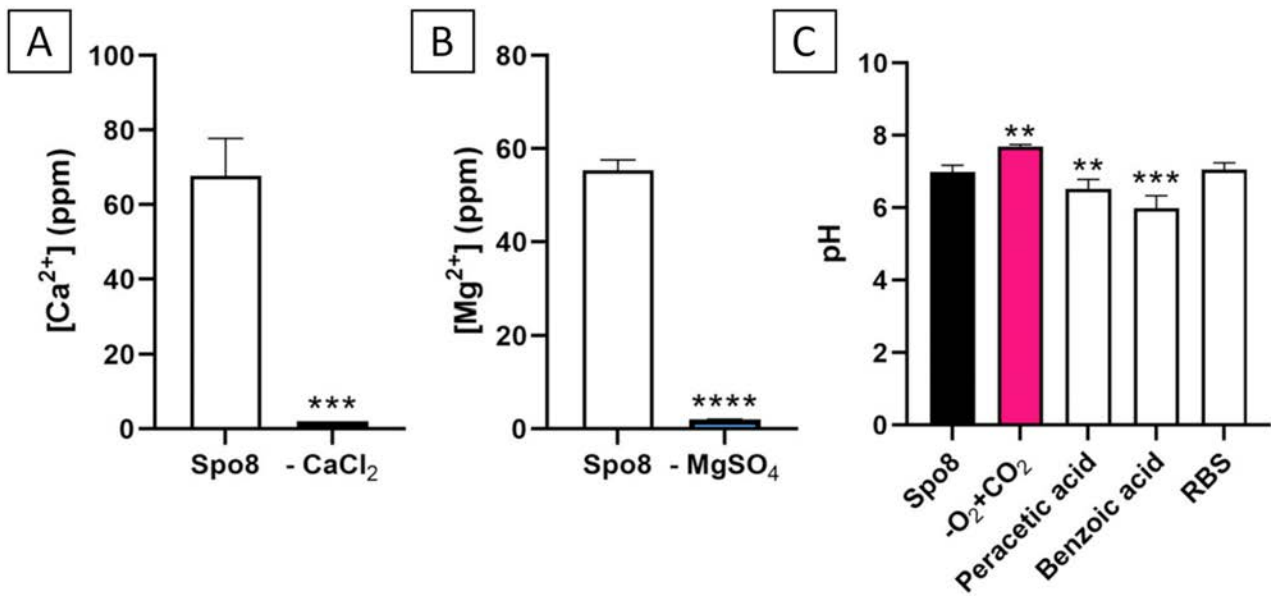
<sup>1</sup>Univ. Lille, CNRS, INRAE, Centrale Lille, UMR 8207 - UMET - Unité Matériaux et Transformations, F-59000 Lille, France

<sup>2</sup>Univ. Lille, CNRS, UMR 8576 - UGSF - Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, F-59000 Lille, France

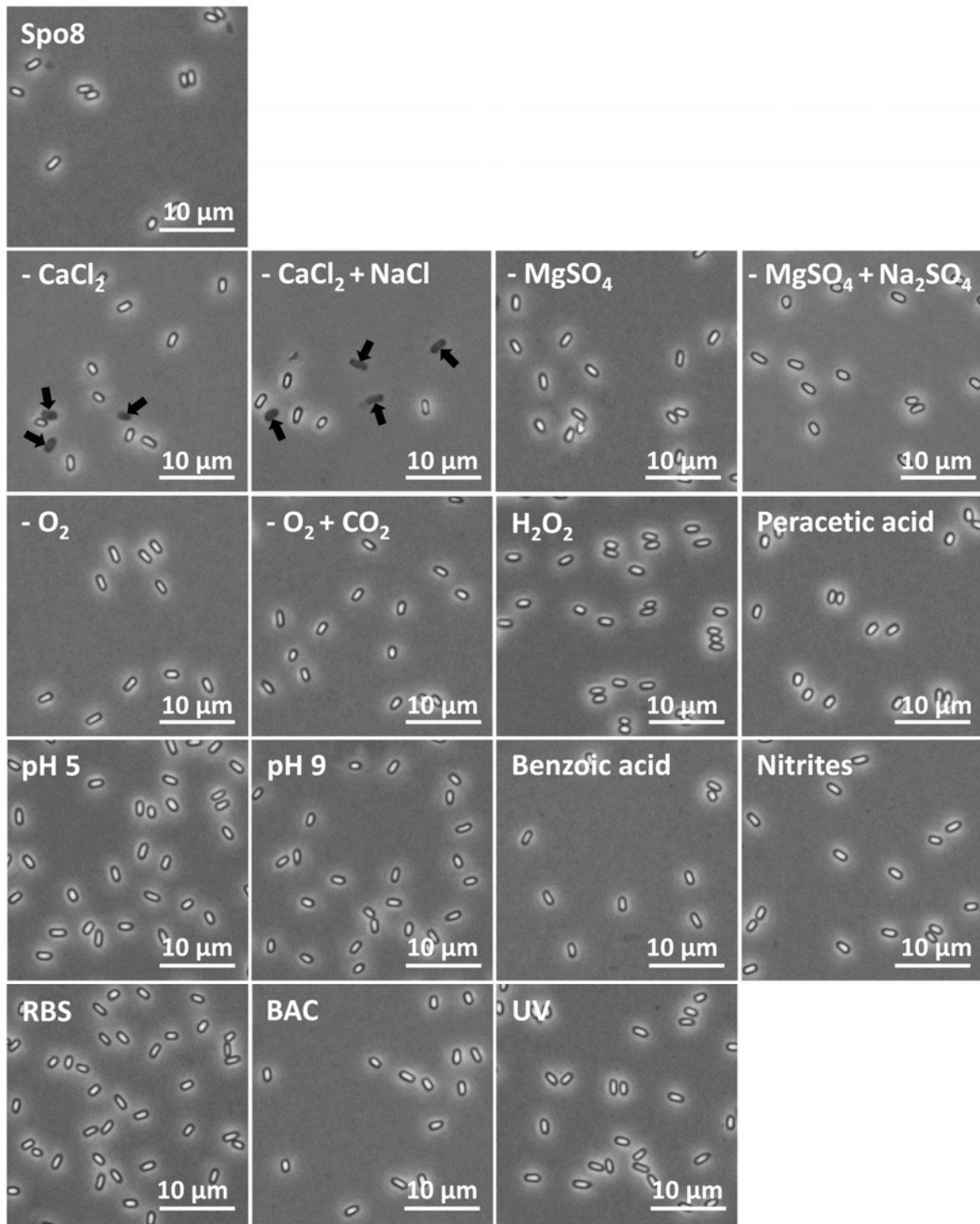
\* **Corresponding author:** Thomas Dubois:  
thomas.dubois@inrae.fr

## 1 Supplementary Figures and Tables

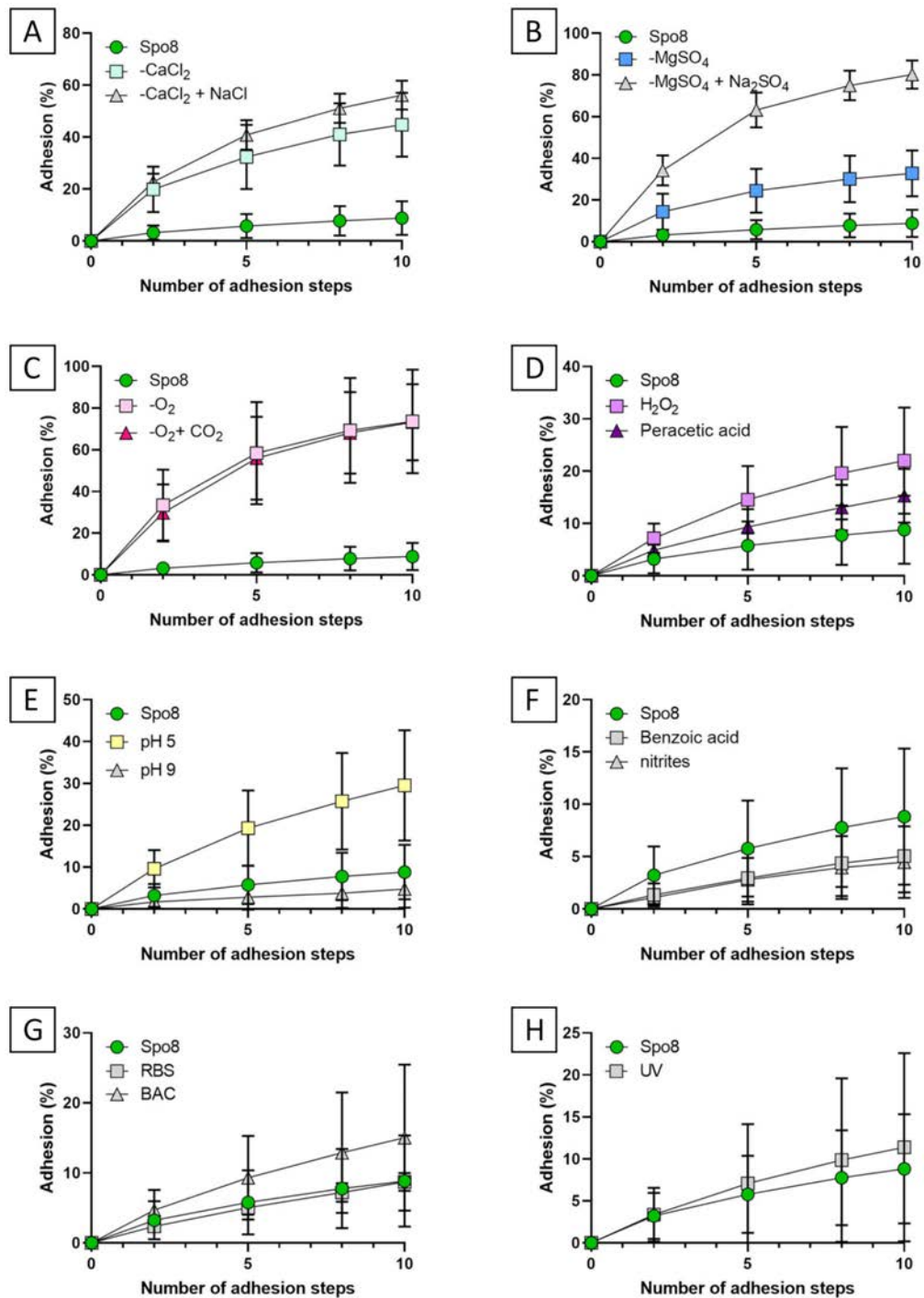
### 1.1 Supplementary Figures



**Supplementary Figure 1: Characterization of the chemical modifications resulting from changes in sporulation conditions.** Dosage of (A)  $Ca^{2+}$  in the Spo8 and -CaCl<sub>2</sub> conditions and (B)  $Mg^{2+}$  in the Spo8 and -MgSO<sub>4</sub> conditions by photoelectric flame photometer. Concentrations are given in parts per million (ppm). Error bars represent the SDs of the means. \*\*\*,  $p \leq 0.001$ ; \*\*\*\*,  $p \leq 0.0001$  for -CaCl<sub>2</sub> or -MgSO<sub>4</sub> versus Spo8 by Welch's t-test. (C) pH of the medium in Spo8, -O<sub>2</sub>+CO<sub>2</sub>, peracetic acid, benzoic acid, and RBS conditions. Error bars represent the SDs of the means. \*\*,  $p \leq 0.01$ ; \*\*\*,  $p \leq 0.001$  for each condition versus Spo8 by Mann-Whitney.

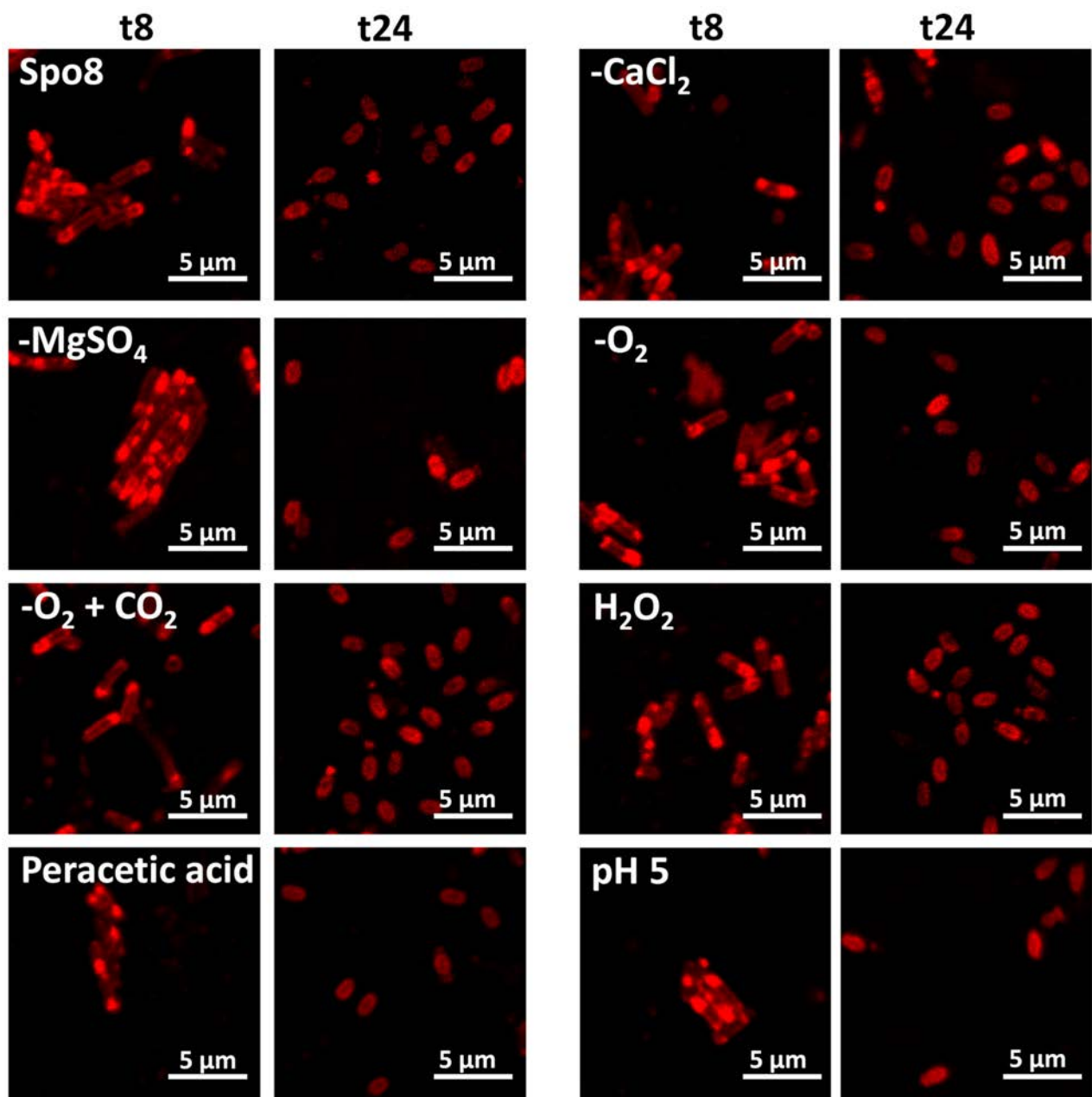


**Supplementary Figure 2: Observation of *B. subtilis* spores by phase contrast microscopy.** The black arrows point to non-refractive spores.

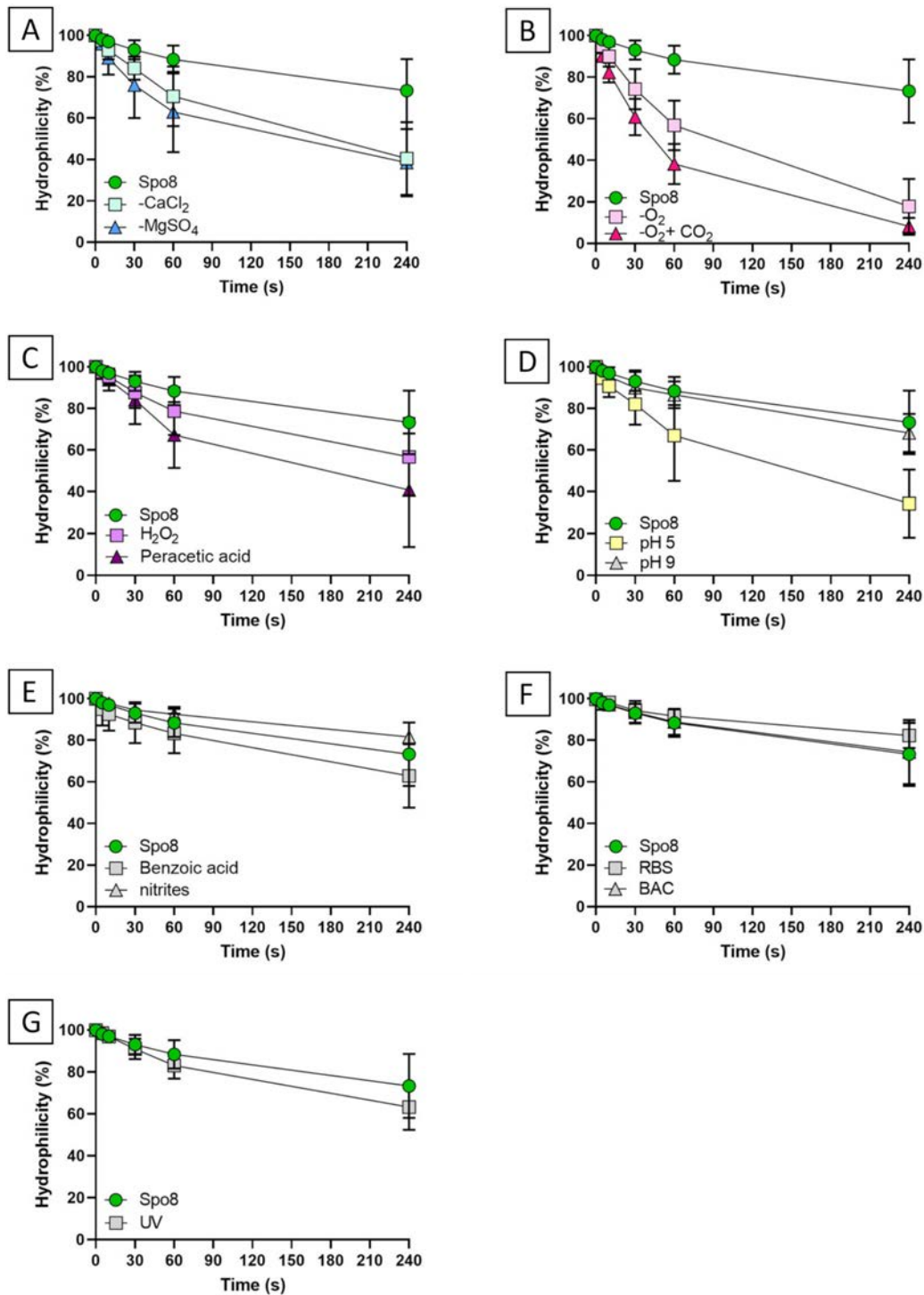


**Supplementary Figure 3: Kinetics of spore adhesion to polypropylene.** The adhesion of spores obtained after sporulation in Spo8, and the different sporulation conditions: -CaCl<sub>2</sub> or -CaCl<sub>2</sub> + NaCl (A), -MgSO<sub>4</sub> or -MgSO<sub>4</sub> + Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (B), -O<sub>2</sub> or -O<sub>2</sub>+CO<sub>2</sub> (C), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> or peracetic acid (D), pH 5 or pH 9 (E), benzoic acid or nitrites (F), RBS or BAC (G), and UV (H) was evaluated after 0, 2, 5, 8 and 10 adhesion steps. Error bars represent the SDs of the means.

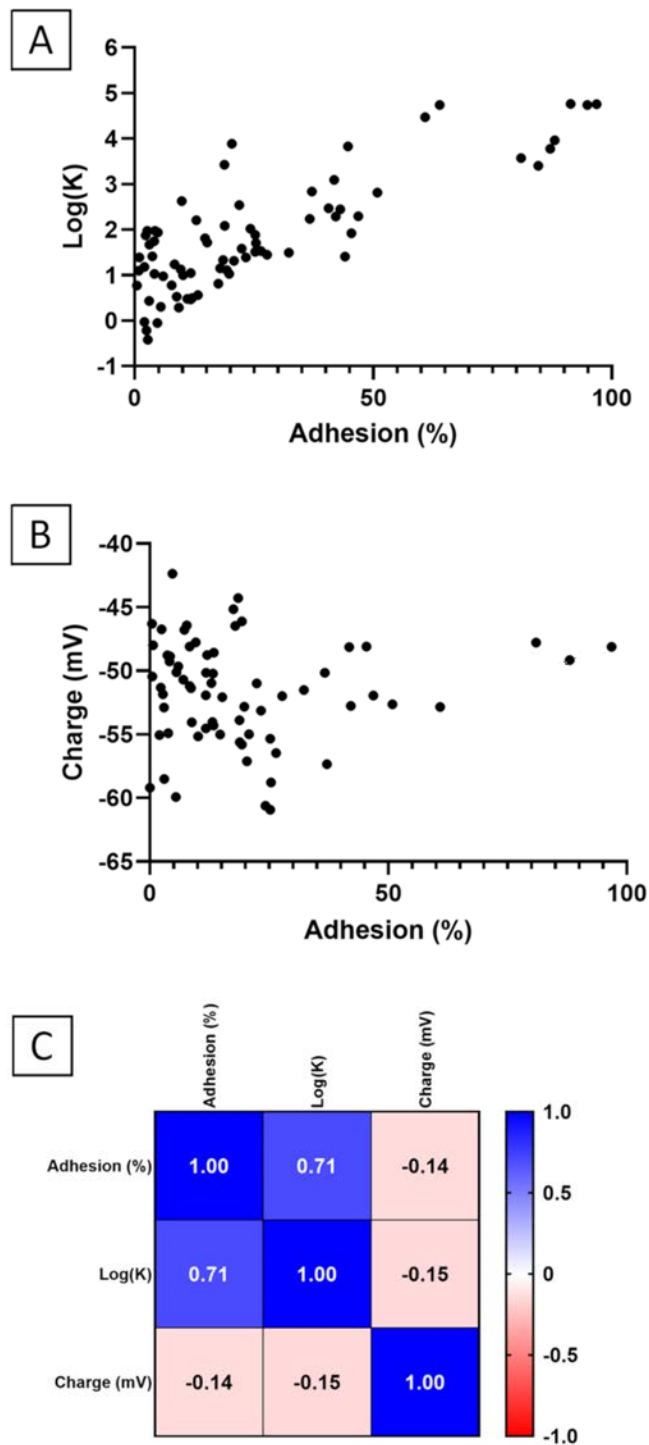




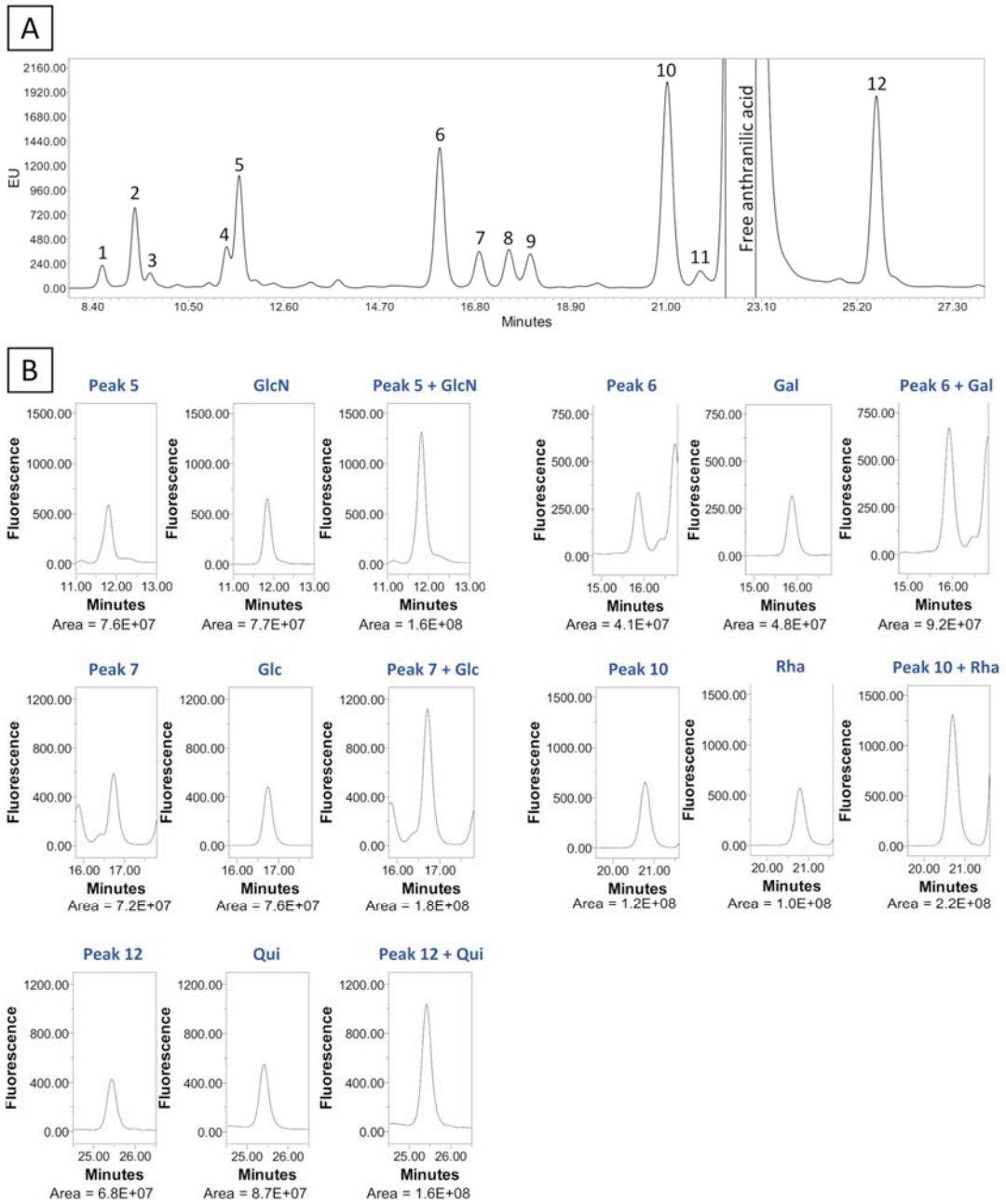
**Supplementary Figure 4: Observation of *B. subtilis* during sporulation by confocal microscopy after FM4-64 staining.** Sporulating cells were observed 8 hours and 24 hours after the transition to the stationary phase. FM 4-64 is a lipophilic dye staining membrane with red fluorescence.



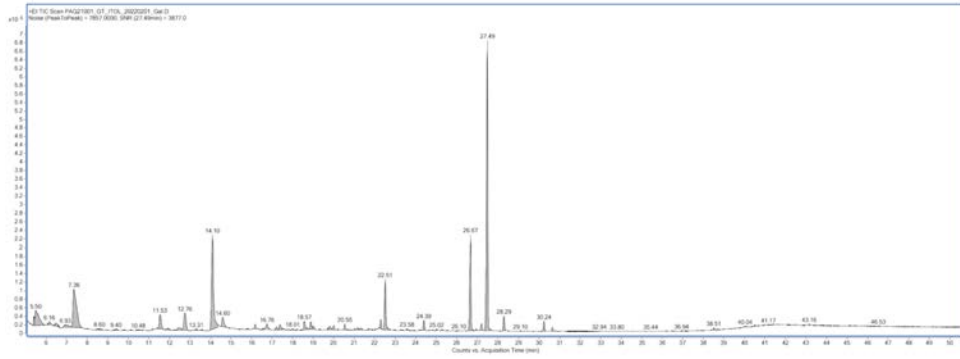
**Supplementary Figure 5: Kinetics of MATH experiments.** The percentage of hydrophilicity, given by the percentage of OD<sub>600</sub> of the aqueous suspension before and after mixing is plotted against the vortexing time (s). Spores were produced in Spo8, and the different sporulation conditions: -CaCl<sub>2</sub> or -MgSO<sub>4</sub> (A), -O<sub>2</sub> or -O<sub>2</sub>+CO<sub>2</sub> (B), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> or peracetic acid (C), pH 5 or pH 9 (D), benzoic acid or nitrites (E), RBS or BAC (F), and UV (G). Error bars represent the SDs of the means.



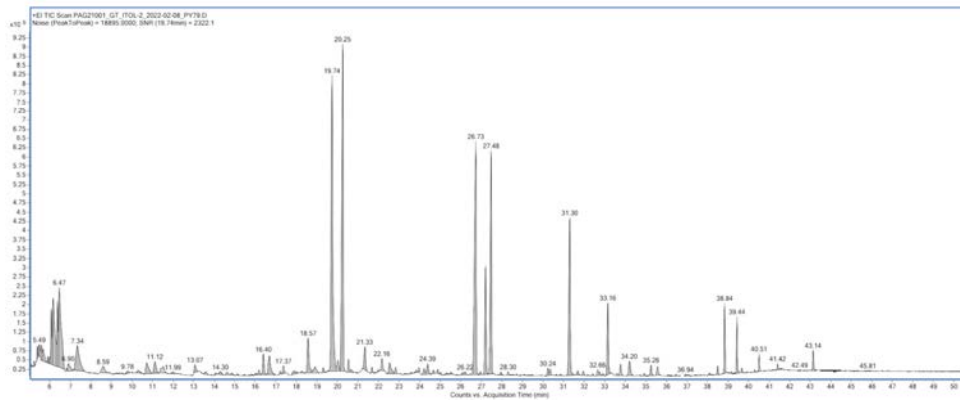
**Supplementary Figure 6: Correlation between spore adhesion, hydrophobicity, and charge.** (A) Scatter plot of the Log(K) as a function of the percentage of adhesion after ten binding reactions. (B) Scatter plot of the charge of spores as a function of the percentage of adhesion after ten binding reactions. (C) Correlation matrix. The correlation factors were calculated using the Spearman correlation method from the results obtained in the thirteen conditions tested and the control condition.

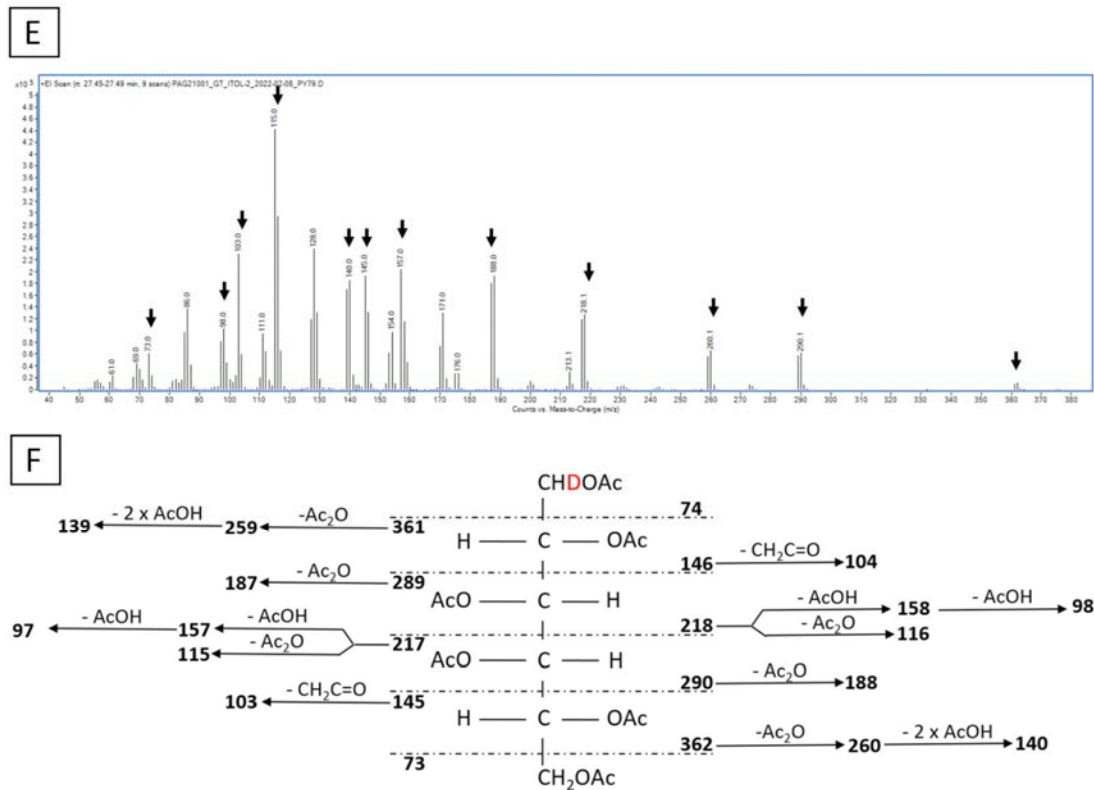


C

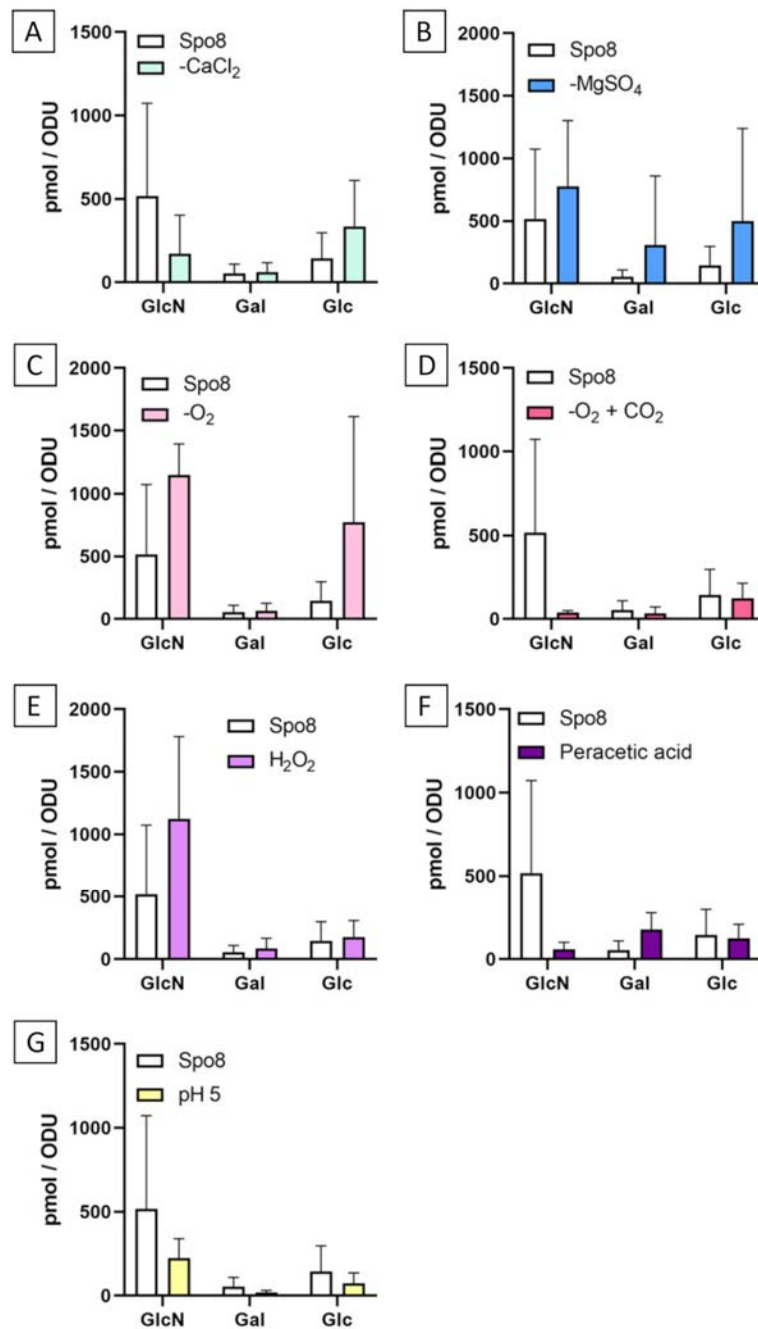


D

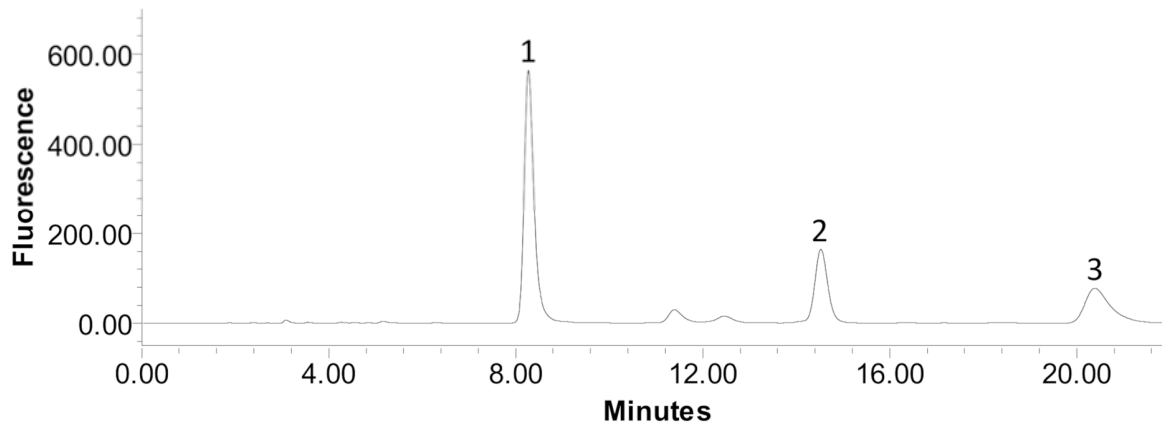




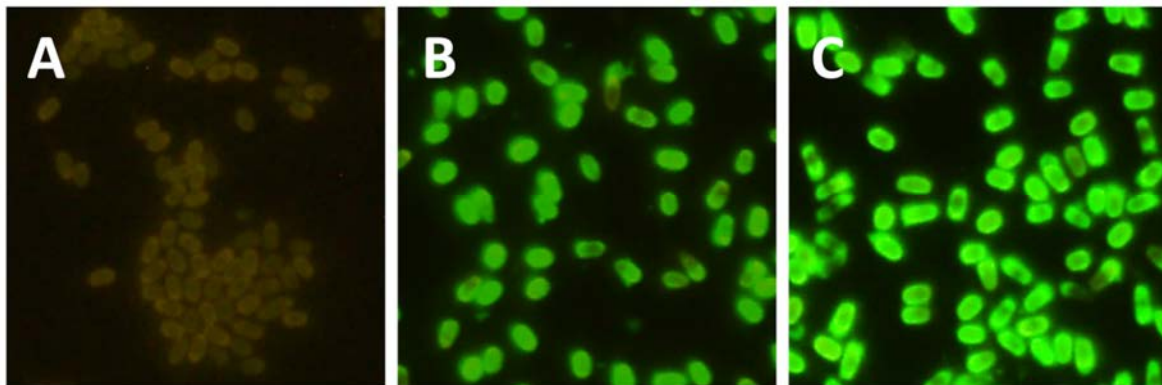
**Supplementary Figure 7: Composition in monosaccharides of the crust of *B. subtilis* spores.** (A) Chromatogram of the RP-HPLC-FL experiment performed on the crust of *B. subtilis* 168 spores obtained in the Spo8 condition after hydrolysis and derivatization by AA. Peaks corresponding to putative AA-sugars are numbered from 1 to 12. Peaks 1 to 3: putative disaccharides containing glycosidic linkages resistant to acid hydrolysis (Windwarder et al., 2016), peak 5: GlcN-AA, peak 6: Gal-AA, peak 7: Glc-AA, peak 10: Rha-AA, peak 12: Qui-AA. The molecules corresponding to peaks 4, 8, 9, and 11 are unknown. The large peak between 21.5 and 24 minutes corresponded to the excess of free anthranilic acid. (B) Chromatograms of RP-HPLC-FL experiments performed on a mix of monosaccharide standards and the crust of *B. subtilis* 168 spores. The retention times of peaks 5, 6, 7, 10, and 12 match those of GlcN-AA, Gal-AA, Glc-AA, Rha-AA, and Qui-AA standards, respectively (C) Chromatogram of the GC-MS experiments performed on hexa-acetate galactitol standard. (D) Chromatogram of the GC-MS experiments performed on the crust of *B. subtilis* 168 spores. (E) GC-MS spectra of hexa-acetate galactitol. The characteristics of ions are indicated by black arrows. (F) Structure of hexa-acetate galactitol and the prominent fragment ions. The reduction of sugars was performed with borodeuteride.



**Supplementary Figure 8: Influence of sporulation conditions on the crust composition in monosaccharides.** The relative amounts of GlcN, Gal, and Glc were evaluated by RP-HPLC-FL. The experiments were performed on the crust of spores released from *B. subtilis* 168 grown in Spo8, and in the sporulation conditions shown to affect spore surface properties: -CaCl<sub>2</sub> (A) -MgSO<sub>4</sub> (B), -O<sub>2</sub> (C), -O<sub>2</sub>+CO<sub>2</sub> (D), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (E), peracetic acid (F) and pH 5 (G). The results were standardized by the OD<sub>600nm</sub> of the spore preparations. Error bars represent the SDs of the means. \*,  $p \leq 0.05$ ; \*\*,  $p \leq 0.01$ ; \*\*\*,  $p \leq 0.001$  for each condition versus Spo8 by Mann-Whitney.

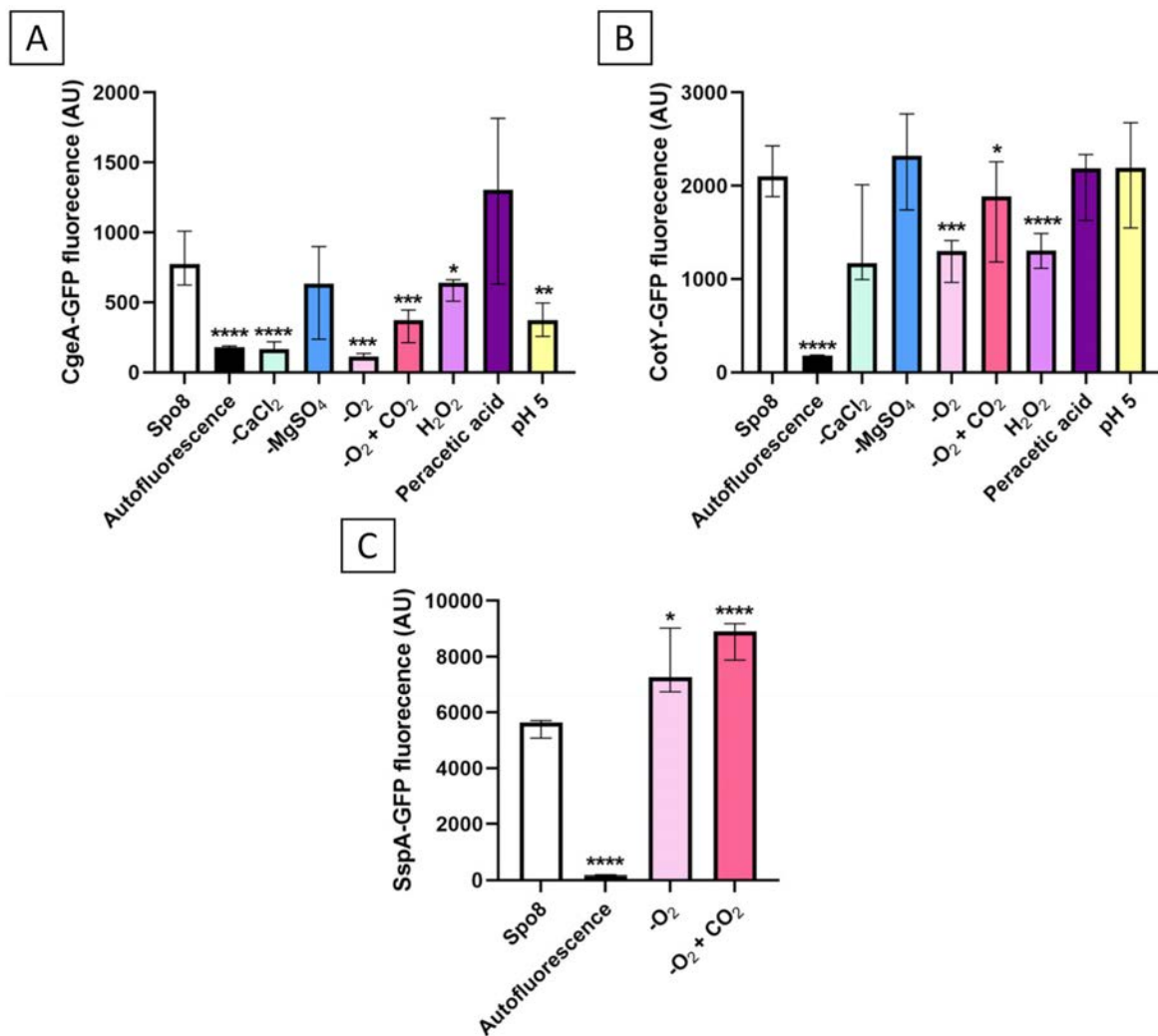


**Supplementary Figure 9: Chromatogram of a RP-HPLC-FL experiment performed after hydrolysis and DMB derivation of the crust of *B. subtilis* 168 spores prepared in the Spo8 condition. Peak 1: DMB-Leg, Peaks 2 & 3: unknown molecules.**



**Supplementary Figure 10: Observation of spores by fluorescence microscopy.** Spores of the *B. subtilis* 168 (A), *B. subtilis* 168 *amyE::cgeA*-GFP (B), and *B. subtilis* 168 *amyE::cotY*-GFP (C) obtained in the Spo8 condition were observed by fluorescence microscopy to evaluate fluorescence and localization of the CgeA-GFP and CotY-GFP fusion proteins. Spores of the *B. subtilis* 168 strain were used as a negative control to estimate the natural autofluorescence of *B. subtilis* at the excitation wavelength of GFP.





**Supplementary Figure 11: Evaluation of the relative amount of CgeA-GFP and CotY-GFP on the spore surface by flow-cytometry experiments.** Fluorescence of the CgeA-GFP (A) or CotY-GFP (B) fusion proteins on the spore surface was measured by flow cytometry after sporulation of the *B. subtilis* 168 *amyE::cotY*-GFP or *B. subtilis* 168 *amyE::cgeA*-GFP strain in the Spo8, and in the sporulation conditions shown to affect spore surface properties: -CaCl<sub>2</sub>, -MgSO<sub>4</sub>, -O<sub>2</sub>, -O<sub>2</sub>+CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, peracetic acid and pH 5. Autofluorescence: Fluorescence of spores of the *B. subtilis* 168 strain. (C) Control of the GFP fluorescence in the -O<sub>2</sub> or -O<sub>2</sub>+CO<sub>2</sub> condition. Fluorescence of the SspA-GFP fusion protein in the core of spores was measured by flow cytometry after sporulation of the *B. subtilis* 168 pHT304-18 P<sub>*sspA*</sub>-*sspA*-GFP in the Spo8, -O<sub>2</sub> and -O<sub>2</sub>+CO<sub>2</sub> conditions. SspA: small acid-soluble spore protein. This control was performed to ensure that GFP fluorescence is not decreased under conditions of lower oxygenation during sporulation. Indeed, GFP requires molecular oxygen for the maturation of fluorescence. Error bars represent the median with the interquartile range. \*,  $p \leq 0.05$ ; \*\*,  $p \leq 0.01$ ; \*\*\*,  $p \leq 0.001$ ; \*\*\*\*,  $p \leq 0.0001$  for each condition versus Spo8 by t-test, Welch's t-test, or Mann-Whitney, depending on the result of the normality test and F-test.

## 1.2 Supplementary Tables

**Supplementary Table 1: Chemicals used for this study.**

<b>Chemical</b>	<b>Supplier</b>	<b>Reference number</b>
Sodium bicarbonate	Acros Organics	123360010
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Sigma-Aldrich	H1009
Peracetic acid	Acros Organics	257751000
HCl	PanReac	211020.1611
NaOH	Fisher Chemical	S/4950/PB15
Benzoic acid	Acros Organics	423475000
Nitrites	Fisher Chemical	S/5600/53
RBS	RBS	T105
Benzalkonium Chloride	Acros Organics	215411000

**Supplementary Table 2: Primers used for this study.** Restriction sites are in bold and underlined. Overlapping sequences used for SOE PCRs are in bold and colored in green, blue, or orange. Sequences in green encode linkers consisting of five glycines that were introduced between CgeA or CotY and GFP.

Primer	Sequence	Restriction site
gfp-1	<b>GGAGGCGGAGGTGGA</b> AAGTAAAGGAGAAGAAGCTTTTCACTG	
gfp-2	GATGCCTCAAGCTAGAGAGTCA <b>CGGCCGCTACTAGTATTTGTAG</b>	
$\lambda$ ter-1	<b>CTACAAATACTAGTAGCGGCCGTGACTCTCTAGCTTGAGGCATC</b>	
$\lambda$ ter-2	A <b>ACTGCAGGTTAACAAGAGTTTGTAGAAAACGC</b>	<i>Pst</i> I
cgeA-1	G <b>CTCTAGAATCATCCCTCTCCCTTATCCT</b>	<i>Xba</i> I
cgeA-2	<b>TCCACCTCCGCCTCCT</b> GAAAAGAACGTAACGCTTTCT	
cotY-1	G <b>CTCTAGAACGTCACAACAGTAGATGCC</b>	<i>Xba</i> I
cotY-2	<b>TCCACCTCCGCCTCCT</b> TCCATTGTGATGATGCTTTTTATC	
polC-F	AGGACTTGATGCTTCACCGA	
polC-R	CTCTCACACATCTCAAGCGC	
spsM-F	AGGACCATCCATTTGAAGCG	
spsM-R	ACATTTTGTCCGCCGATGAG	
SP $\beta$ -R	GACGTGGCGGTTTGTCTGA	
SP $\beta$ -F	CACACCGAGTGCAGCATGT	
cgeA-F	GCCTTGCTTGATGCTGCCAT	
cgeA-R	GGCGTAATTCTGGCAAAAATCC	
cotY-F	GTCCGACTGGCTGCTATAC	
cotY-R	CCCTACGTTTCCGAATGTGG	
spsI-F	GCCTTATACAGAACGCTTTGAAC	
spsI-R	CTTGTTTTTCTCATCAATCTCAGCA	

**Supplementary Table 3: Influence of sporulation conditions on the number of CFU, the percentage of heat-resistant spores, and the germination rate.** The data presented in the table are the means with SDs. \*,  $p \leq 0.05$ ; \*\*,  $p \leq 0.01$ ; \*\*\*,  $p \leq 0.001$ ; \*\*\*\*,  $p \leq 0.0001$  for each condition versus Spo8 by t-test, Welch's t-test, or Mann-Whitney, depending on the result of the normality test and F-test.

Sporulation condition	N CFU / mL before heating ( $\times 10^8$ )	Heat- resistant spores (%)	Germination (%)
Spo8	6.38 $\pm$ 1.62	88.1 $\pm$ 11.1	46.8 $\pm$ 5.7
-CaCl <sub>2</sub>	2.22 $\pm$ 0.30****	82.9 $\pm$ 8.8	28.0 $\pm$ 6.6****
-MgSO <sub>4</sub>	7.24 $\pm$ 2.40	94.9 $\pm$ 4.8	48.1 $\pm$ 3.6
-O <sub>2</sub>	10.1 $\pm$ 2.16****	96 $\pm$ 6.4	39.0 $\pm$ 11.7
-O <sub>2</sub> +CO <sub>2</sub>	8.64 $\pm$ 0.48**	84.7 $\pm$ 14.6	47.6 $\pm$ 4.1
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	6.13 $\pm$ 1.53	86.4 $\pm$ 13.4	44.1 $\pm$ 9.1
Peracetic Acid	7.91 $\pm$ 2.51*	84.7 $\pm$ 14	47.0 $\pm$ 1.7
pH 5	8.24 $\pm$ 1.86****	87.6 $\pm$ 12.1	45.4 $\pm$ 8.7
pH 9	7.16 $\pm$ 2.28	95.1 $\pm$ 6.3	43.0 $\pm$ 6.5
Benzoic Acid	6.51 $\pm$ 1.50	88.4 $\pm$ 4.7	41.2 $\pm$ 7.2
Nitrites	6.05 $\pm$ 2.74	90.9 $\pm$ 8.8	38.1 $\pm$ 11.7
RBS	6.47 $\pm$ 3.25	86.0 $\pm$ 17.0	41.5 $\pm$ 1.2
BAC	7.68 $\pm$ 2.66	85.32 $\pm$ 10.9	40.1 $\pm$ 9.6
UV	5.99 $\pm$ 0.79	82.1 $\pm$ 11.9	41.7 $\pm$ 9.5

## Reference

Windwarder, M., Figl, R., Svehla, E., Mócsai, R. T., Farcet, J. B., Staudacher, E., et al. (2016). "Hypermethylation" of anthranilic acid-labeled sugars confers the selectivity required for liquid chromatography-mass spectrometry. *Anal. Biochem.* 514, 24-31. doi: 10.1016/j.ab.2016.09.008.

## Discussion

## **I. Biosynthèse, composition et organisation du crust**

### **A. L'acide légionaminique**

La présence d'acide légionaminique, un acide nonulosonique, a été mise en évidence dans le crust et son importance pour la structure et/ou l'ancrage du crust à la surface de la spore a été démontrée. Les enzymes qui forment sa voie de biosynthèse sont codées par les gènes *spsM* et *spsCDEFG*. Il a précédemment été montré chez *C. jejuni* et *H. pylori* que l'acide pseudaminique, un autre acide nonulosonique, était nécessaire à l'assemblage des flagellines (Thibault et al., 2001; Schirm et al., 2003). Le flagelle est constitué de trois composants : un corps basal, intégré à la membrane, un crochet et le filament (Salah Ud-Din and Roujeinikova, 2018). La protéine FlaA est le constituant majeur du filament et s'auto-assemble pour former le flagelle. Cette protéine est O-glycosylée par de l'acide pseudaminique. Cette glycosylation est préalable et nécessaire à l'assemblage des filaments de flagelline (Goon et al., 2003). Ainsi, en absence d'acide pseudaminique ou de glycosylation de FlaA, le corps basal et le crochet sont correctement formés mais pas le filament, et de la flagelline non glycosylée s'accumule dans le milieu intracellulaire. Un processus similaire pourrait être à l'œuvre lors la synthèse du crust. En effet, il a déjà été montré que 3 protéines (CotY, CotV, CotW) du crust sont capables de s'auto-assembler et de former des ultrastructures (Jiang et al., 2015). Il est donc possible que la glycosylation d'une ou plusieurs de ces protéines soit nécessaire à leur assemblage.

Si l'acide légionaminique est impliqué dans la glycosylation des protéines du crust, il est fort probable qu'il s'agisse d'O-glycosylation, comme pour FlaA. A ce jour, il n'existe pas de motif connu de O-glycosylation. En revanche, il a été montré que ces sites de O-glycosylation sont généralement sur des résidus sérine/thréonine et près d'une région hydrophobe. Ainsi, la séquence protéique de FlaA est constituée d'environ 20% de résidus sérine/thréonine. Nous avons regardé le pourcentage de résidus sérine/thréonine dans les séquences protéiques des protéines du crust (**Table 6**). Les protéines CgeA et CotV sont les plus riches avec respectivement 20 et 17% de leur composition totale, ce qui conforte l'hypothèse d'une O-glycosylation. De façon intéressante, les protéines formant la tunique externe (CotE, CotO, CotH, YknT ou encore CotA) ne contiennent environ que 10% de résidus sérine/thréonine.

**Table 6 : Proportion des résidus sérines/thréonines dans la composition en acides aminés des protéines du crust.**

	Nombre d'acides aminés	Nombre de résidus S/T	% Résidus S/T
CgeA	133	26	20
CotV	128	22	17
CotW	105	8	8
CotX	172	25	15
CotY	162	17	10
CotZ	148	22	15

En se basant sur des données de bio-informatique, une voie de biosynthèse de l'acide légionaminique chez *B. subtilis* a été proposée. En revanche, la ou les glycosyltransférases permettant le transfert de l'acide légionaminique activé au niveau des protéines du crust et/ou des chaînes de glycanes n'a (ont) pas été identifiées. Chez *Aeromonas cavia*, l'acide pseudaminique est présent à la fois au niveau du flagelle et du lipopolysaccharide (LPS) et plusieurs glycosyltransférases sont impliquées (Tabei et al., 2009; Palmisano et al., 2010). Les enzymes Lsg et Lst permettent le transfert de l'acide pseudaminique au niveau du LPS tandis que MafI est impliquée dans la glycosylation de la flagelline. Il a été montré chez *Magnetospirillum magneticum* et *H. pylori* que la glycosyltransférase permettant la glycosylation de FlaA par l'acide pseudaminique appartenait à la famille des Maf (motility-associated factor) (Sulzenbacher et al., 2018; Yang et al., 2021). Ces glycosyltransférases sont caractérisées par un domaine central MAF\_flag10 (numéro d'accès Pfam : PF01973) qui présente une structure similaire à celle des sialyltransférases Cst-I et Cst-II de *C. jejuni* (Meier and Söding, 2015). Ce domaine Maf consiste en sept feuillets  $\beta$  torsadés centraux et bordés de part et d'autre par quatre et trois hélices  $\alpha$  et coiffés par une dernière hélice  $\alpha$  à l'extrémité N-terminale (Sulzenbacher et al., 2018). Dans le génome de *B. subtilis* 168, nous n'avons pas trouvé de gène codant une protéine contenant un domaine Maf et transcrit en phase tardive de sporulation sous le contrôle de  $\sigma^K$ .

Les gènes *spsA* et *spsB* sont les deux premiers gènes de l'opéron *spsABCDEFG*. Les spores produites par les mutants  $\Delta$ *spsA* et  $\Delta$ *spsB* produisent des spores plus hydrophobes confirmant le rôle de ces gènes dans la biosynthèse du crust. L'analyse de la structure cristallographique de SpsA a permis de mettre en évidence qu'il s'agissait d'une glycosyltransférase de type GT2, utilisant les ions manganèse ou magnésium comme co-facteurs et présentant un motif DxD, souvent associé aux glycosyltransférases, qui prend ici la forme xDD (Charnock and Davies, 1999; Tarbouriech et al., 2001). Les GT2 sont des glycosyltransférases avec une structure de type GT-A et qui catalysent le transfert de l'ose en inversant la configuration du carbone glycosidique (*inverting*) (Banque de donnée CAZy : (Drula et al., 2022)). L'analyse de la séquence protéique de SpsB permet de mettre en évidence un domaine TagB putatif ainsi qu'un motif DEG et trois motifs HP. Le domaine TagB est associé à la famille des glycéro-phosphotransférases. Chez *B. subtilis*, TagB permet le transfert d'un phosphoglycérol lors de la synthèse de la paroi d'acides téichoïques (Swoboda et al., 2010). Chez *Tannerella forsythia* deux enzymes contenant un domaine TagB ont été identifiées comme des transférases possibles de l'acide pseudaminique et de l'acide légionaminique (Tomek et al., 2017). De plus, les motifs DEG et HP sont conservés parmi différentes familles de sialyltransférases (Freiberger et al., 2007). Ces résultats, associés à la localisation du gène *spsB* en opéron avec les gènes *spsCDEFG*, suggèrent un rôle de SpsB dans le transfert de l'acide légionaminique. Cependant nos résultats expérimentaux révèlent que la délétion du gène *spsB* n'affecte pas le transfert de l'acide légionaminique à la surface des spores. Il est possible que SpsB soit effectivement une sialyltransférase mais que son substrat soit un autre acide nonulosonique que nous n'avons pas encore identifié ou bien qu'il existe une redondance fonctionnelle avec une autre sialyltransférase non identifiée à ce jour.

## B. Les gènes *cge* et leur rôle dans la biosynthèse du crust

### a) CgeD

Nos travaux ont montré que les spores du mutant  $\Delta cgeD$  sont plus adhérentes aux surfaces et plus hydrophobes que les spores de la souche parentale. Ces résultats sont cohérents avec les observations microscopiques. En effet, il n'a pas été possible d'observer la présence de crust autour de ces spores, que ce soit en microscopie optique après coloration des spores par de l'encre de chine (absence de halo blanchâtre) ou sur des coupes de spores colorées au rouge de ruthénium et observées en microscopie électronique. Ces résultats sont en contradiction avec les résultats publiés récemment (Shuster et al., 2019b), qui montrent que bien que les spores du mutant  $\Delta cgeD$  sont moins hydrophiles que celles de la souche sauvage, le crust est encore observé par microscopie optique et électronique. De plus, selon ces auteurs, il serait formé de filaments plus longs que sur les spores de la souche sauvage, et semble moins bien ancré à la surface de la spore. Ces résultats divergents pourraient s'expliquer par des différences de modes opératoires lors de la préparation des spores. En effet, nos conditions de lavage des spores sont plus drastiques que celles de Shuster et ses collègues, avec des temps de centrifugation plus longs et cinq lavages au lieu de trois, ce qui pourrait entraîner le décrochement du crust du mutant  $\Delta cgeD$  s'il est effectivement moins bien ancré à la surface de la spore.

L'analyse de la séquence protéique de CgeD, identifie un domaine spécifique des glycosyltransférases de type GT2. De plus, le gène *cgeD* est un paralogue du gène *spsA*. L'alignement des séquences protéiques de CgeD et SpsA permet d'identifier le même motif xD98D99. Le motif DxD est retrouvé chez la plupart des enzymes de types GT-A et correspond au site de fixation d'un ion métallique (Rini et al., 2022). La comparaison de la structure tridimensionnelle prédite de CgeD avec la base de données PDB indique que CgeD a une structure tertiaire proche de celle de la protéine GlnU de *Mycobacterium tuberculosis* (Table 7) (Zhang et al., 2009). GlnU est une *N*-acetylglucosamine-1-phosphate-uridylyltransférase. Elle possède donc une double fonction acétyl- et uridylyltransférase qui permet la synthèse d'UTP-GlcNAc à partir de GlcN-1-phosphate en présence d'acétyl-CoA et d'UTP (Zhang et al., 2009). Son activité nécessite l'utilisation de cations  $Mg^{2+}$  (Vithani et al., 2014). L'ensemble de ces données suggère que CgeD est une glycosyltransférase de type GT2 qui participerait au transfert de monosaccharides sur les chaînes de glycanes du crust en cours de synthèse. Dans nos conditions de culture, le crust des spores du mutant  $\Delta cgeD$  contient moins de rhamnose et d'acide légionaminique que le crust de la souche parentale. Les sialyltransférases bactériennes identifiées jusqu'à ce jour n'appartiennent pas à la classe des GT2 et elles ne présentent pas de domaine DxD (Brockhausen, 2014). Il est donc peu probable que CgeD participe au transfert du Leg. En revanche, les glycosyltransférases de type GT2 sont connues pour transférer des monosaccharides préalablement activés sur des chaînes de glycanes en cours de synthèse (Lairson et al., 2008). La protéine CgeD pourrait donc transférer le rhamnose à la surface du crust. Cependant, la délétion du gène *cgeD* ne conduit pas à la disparition totale du rhamnose dans le crust, ce qui indique qu'il existe une redondance fonctionnelle pour le transfert du rhamnose. Chez les bactéries, les acides nonulosoniques sont généralement en position terminale des



chaines de glycanes (Li and Chen, 2012; Lewis et al., 2022). La diminution de la quantité de Leg dans le crust du mutant  $\Delta cgeD$  pourrait s'expliquer par le fait que la synthèse d'un ou plusieurs glycanes du crust est interrompue en l'absence de CgeD. De ce fait, l'accepteur finale du Leg ne serait plus présent. Le mesure de la quantité de Leg dans la cellule pourrait permettre de vérifier cette hypothèse. Si la délétion de CgeD entraîne une perte de l'accepteur final du Leg, celui-ci devrait s'accumuler dans le milieu.

**Table 7 : Prédiction de domaines et structures pour les protéines Cge après analyse bio-informatique.** Les prédictions de domaine ont été réalisées en utilisant le logiciel InterproScan. Les prédictions de structure 3D ont été obtenues sur AlphaFold et ont ensuite été utilisées avec le logiciel Madoka afin d'identifier les protéines présentant des structures voisines. \*Tous les résultats représentent la protéine la plus proche sauf dans le cas de CgeE dont le Hit correspondait à une protéine de fonction inconnue.

	Taille (aa)	Poids Moléculaire (kDa)	Domaine (InterproScan)		Structure 3D voisine (AlphaFold et Madoka)				
					PDB ref	Score	Fonction	Protéine	Organisme
CgeB	317	36,7	PF13524	Glycosyl-transférases groupe 1	2IUU	0,79	Glycosyltransférase	AviGT4	<i>Streptomyces viridochromogenes</i>
CgeC	101	11,24	-	-	2ZDI	0,77	Prefoldin (chaperon)	Prefoldin	<i>Pyrococcus horikoshii</i>
CgeD	426	49,91	PF00535	Glycosyl-transférase 2	3D8V	0,61	bifonction : acétyl- et uridyl-transférase	GlmU	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
CgeE*	259	29,41	IPR000182	Domaine GNAT	3FRM	0,78	N-acétyltransférase (GCN5)	-	<i>Staphylococcus epidermidis</i>

#### b) CgeB

Nos travaux ont montré que le caractère hydrophobe des spores du mutant  $\Delta cgeB$ , ainsi que l'absence de halo autour de ces spores après coloration à l'encre de Chine, ce qui est en accord avec les résultats obtenus par Shuster et collègues (Shuster et al., 2019a). Nous avons aussi mis en évidence que ces spores sont moins chargées à pH neutre et plus adhérentes que celles de la souche parentale. Ces résultats indiquent que CgeB participe à la synthèse du crust et que cette protéine est nécessaire à l'assemblage et/ou au maintien du crust à la surface des spores. L'analyse par InterProScan de la séquence protéique de CgeB indique la présence d'un domaine glycosyltransférase (Pfam : PF13524). Ce domaine est caractéristique de glycosyltransférases de type GT1. Les GT1 présentent un domaine GT-B et elles se distinguent par mécanisme d'inversion de la configuration du carbone glycosidique (banque de données

Cazy (Drula et al., 2022)). Deux domaines HP sont également présents sur la séquence protéique de CgeB, mais pas de domaine DEG. La prédiction de structure tertiaire identifie la protéine AviGT4 comme un analogue structural de CgeB (**Table 7**). AviGT4 est une enzyme produite par *Streptomyces viridochromogenes* et qui contribue à la synthèse de l'antibiotique avilamycine A (Martinez-Fleites et al., 2006). Il a été montré qu'AviGT4 transfère l'eurekanate, un pentose atypique, sur le L-lyxose pendant la synthèse de l'avilamycine A (Martinez-Fleites et al., 2006). Comme son nom l'indique, AviGT4 appartient à la famille des GT4 glycosyltransférases. Les glycosyltransférases GT4 sont des glycosyltransférases avec une structure de type GT-B et qui catalysent le transfert de l'ose en conservant la configuration du carbone glycosidique (*retaining*) (Drula et al., 2022). Nos résultats expérimentaux sont en accord avec un rôle de CgeB dans la biosynthèse des glycanes du crust. En effet, nous avons montré que le crust du mutant  $\Delta cgeB$  contient moins de rhamnose et de Leg que le crust des spores de la souche parentale.

Les sialyltransférases d'origine bactérienne sont retrouvées dans cinq familles d'enzymes : GT4, GT38, GT42, GT52 et GT80 (Li and Chen, 2012). Ainsi, les sialyltransférases impliquées dans la synthèse de la capsule polysaccharidique de différents sérogroupes de *Neisseria meningitidis*, comme SiaD<sub>W135</sub> et SiaD<sub>Y</sub> sont classées comme des GT4 (Coutinho et al., 2003; Drula et al., 2022). Il est donc possible que CgeB soit une transférase du Leg.

#### c) CgeC et CgeE

En accord avec les résultats rapportés par Shuster et ses collègues. (Shuster et al., 2019b), nos travaux n'ont pas permis de mettre en évidence de phénotypes associés à la délétion des gènes *cgeC* et *cgeE*. En effet, les spores des mutants  $\Delta cgeC$  et  $\Delta cgeE$  ont des propriétés de surface et d'adhésion comparables à celles de la souche parentale, et nos observations après coloration à l'encre de chine ou en microscopie électronique après coloration au rouge de ruthénium n'ont pas mis en évidence de différences morphologiques du crust par rapport aux spores de la souche sauvage. Enfin, la composition en monosaccharides du crust des spores des mutants des gènes  $\Delta cgeC$  et  $\Delta cgeE$  est comparable à celle des spores d'une souche sauvage. L'absence de phénotype ne signifie pas pour autant que les protéines CgeC et CgeE ne participent pas à la synthèse du crust. Elles pourraient en effet participer à des fonctions non explorées comme la résistance à des températures élevées ou au lysozyme ou à des modifications structurales du crust sans incidence sur les propriétés de surface et d'adhésion des spores.

Le gène *cgeC* code une petite protéine de 11.2 kDa L'analyse de sa séquence protéique suggère la présence d'un peptide signal en position N-terminale. La protéine dont la structure 3D s'approche le plus de la structure 3D prédite de CgeC, correspond à une protéine chaperon, Prefoldin, impliquée dans le bon repliement des polypeptides chez une archée (**Table 7**). Ainsi, CgeC pourrait être une protéine chaperon qui interviendrait dans la maturation du crust ou de la tunique externe, mais son effet resterait marginal.

Le gène *cgeE* code une N-acétyltransférase putative, avec un domaine GNAT et qui utilise l'acétyl-CoA comme substrat (**Table 7**). Ainsi, CgeE serait de la même famille que SpsD, qui permet le

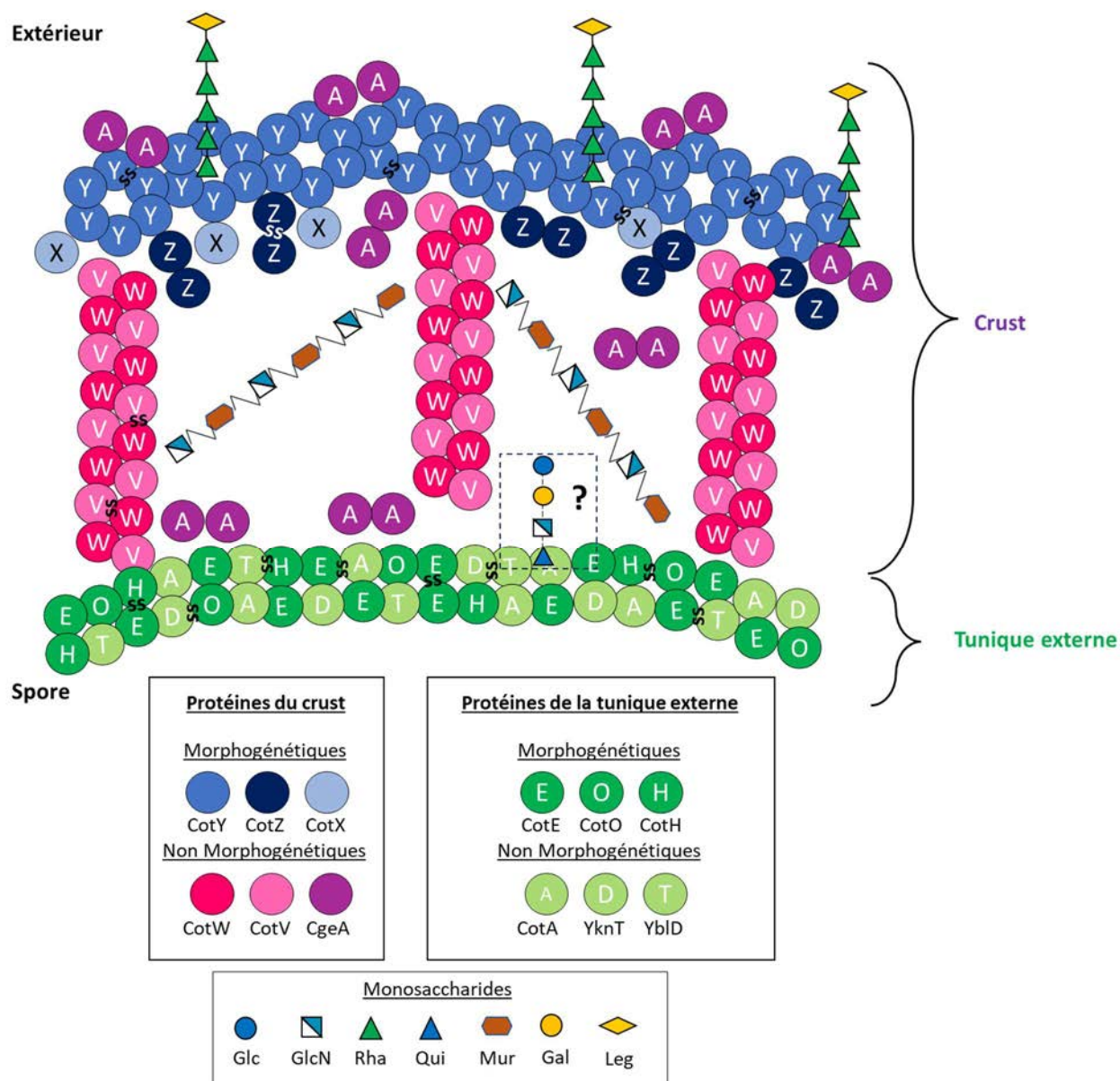
transfert d'un groupement acétyle à partir de l'acétyl-CoA lors de la biosynthèse de l'acide légionaminique. Nous avons mis en évidence la présence de glucosamine dans le crust. Nous ne savons pas, en revanche, si ce que nous détectons correspond, originellement, à de la glucosamine, du N-acétylglucosamine ou un mélange des deux. En effet, l'utilisation d'une hydrolyse acide lors de la préparation des échantillons entraîne la perte des fonctions acétyles. Ainsi, il est possible que CgeE joue un rôle dans la biosynthèse de N-acétylglucosamine présent dans le crust. Mais nous ne pouvons pas voir de différence de niveau de méthylation des glycanes du crust avec nos méthodes de RP-HPLC-FL. Les acétyltransférases de type GNAT peuvent aussi effectuer des Ne-acétylations (Linda I. et al., 2010; Jones and O'Connor, 2011). Ces acétylations sont effectuées sur des Lysines et sont réversibles. Ce sont des modifications post-traductionnelles qui vont jouer un rôle de régulateur. La présence de ces Ne-acétylations peuvent entraîner des modifications de charge ou encore de conformation des protéines et ainsi influencer la stabilité des protéines, leur localisation ou encore leurs interactions avec d'autres protéines. Il est possible qu'un tel système soit mis en place lors de la sporulation. Ainsi CgeE, pourrait avoir une influence sur les interactions entre les protéines du crust ou l'activité des enzymes impliquées dans sa biosynthèse. S'agissant d'un système de régulation dynamique, il est possible que les conditions que nous avons testées ne nécessitent pas son activation. L'utilisation d'Acetyl-CoA marqué lors de la sporulation pourrait nous donner des informations sur les cibles de CgeE. Evaluer les propriétés de résistances des spores du mutant *ΔcgeE* pourrait peut-être nous donner plus d'informations sur le rôle de CgeE dans la biosynthèse du crust.

### C. Proposition d'organisation de la structure du crust.

Comme expliqué précédemment, le crust est majoritairement composé de protéines et de glycanes. La **Figure 36** propose une organisation du crust à partir de nos derniers résultats. Les protéines CotW et CotV s'assemblent en des filaments de diamètre constant, et CotW est nécessaire au bon ancrage du crust à la tunique extérieure (Jiang et al., 2015; Bartels et al., 2019). Ainsi les filaments formés par le complexe CotW-CotV permettent l'ancrage de la structure principale du crust, formée majoritairement par CotY (Bartels et al., 2019). CotY s'auto-assemble pour former des structures cristallines en nid d'abeilles (Jiang et al., 2015). CotZ joue de plus un rôle dans l'ancrage du crust au niveau des côtés de la spore (Bartels et al., 2019).

La partie glycanique du crust est composée, au moins en partie, de glucose, glucosamine, galactose, rhamnose, quinovose et d'acide légionaminique (Faille et al., 2014b; Dubois et al., 2020). La quantification de ces différents monosaccharides dans le crust des spores de différents mutants de gènes impliqués dans la biosynthèse du crust suggère la présence d'au moins deux glycanes différents. Un premier à la surface de la spore composé majoritairement de Rhamnose et d'acide légionaminique et un deuxième, plus en profondeur, composé de glucose, galactose, de glucosamine et de quinovose. La détection à la fois d'acide muramique et de glucosamine suggère la présence de peptidoglycane au sein du crust. Cette hypothèse est renforcée par la modification de la morphologie du crust après un traitement

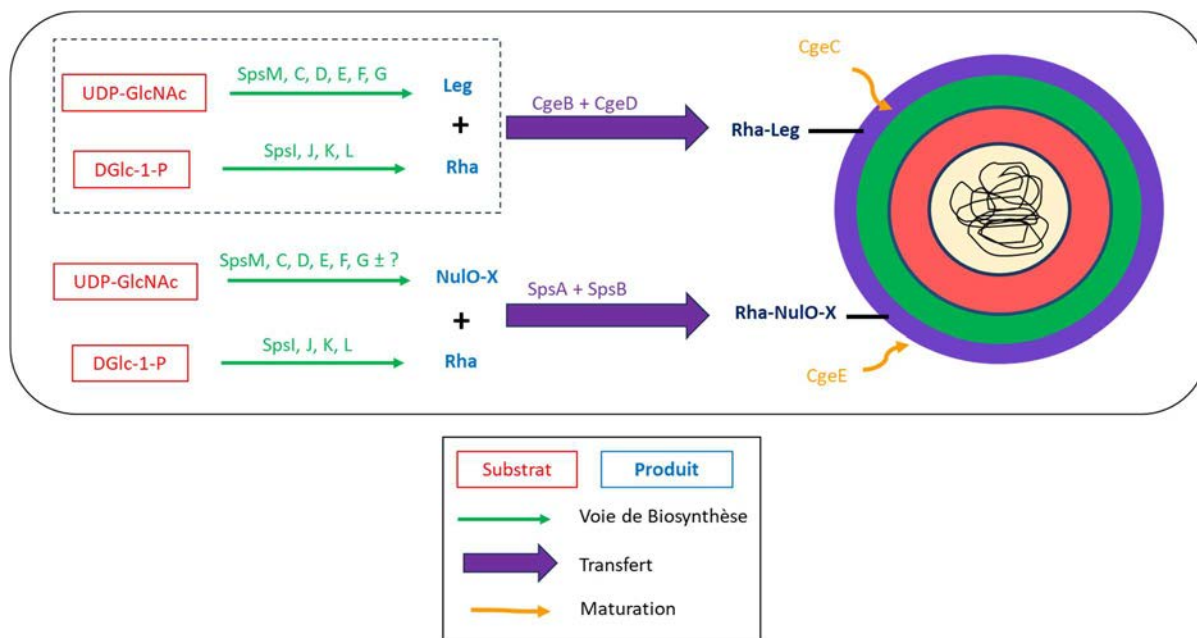
au lysozyme (Faille et al., 2014b). L'acide légionaminique pourrait de plus être directement fixé sur certaines protéines du crust.



**Figure 36 : Proposition d'organisation du crust à partir des dernières données bibliographiques et des résultats.** La protéine CotY forme la structure principale du crust. CotZ et CotX participent à l'ancrage et la propagation de cette structure. Des filaments formés par le complexe CotV/CotW permettent le lien entre la structure majeure du crust et la tunique externe. Les monosaccharides du crust sont répartis en au moins deux glycanes de compositions différentes. Un à la surface de la spore constitué majoritairement de Leg et de Rha et un deuxième à l'interface entre la tunique extérieure et le crust composé de Glc, Gal, GlcN et Qui. Du peptidoglycane serait également présent au sein du crust.

Les enzymes formant la voie de biosynthèse de l'acide légionaminique et celle du rhamnose sont codées par les gènes *spsM*, *spsCDEFG* et *spsIJKL* respectivement (Plata et al., 2012; Dubois et al., 2020). Nous proposons que la glycosyltransférase CgeD permette le transfert d'un dTDP-Rhamnose sur l'acide légionaminique, avant que ce groupement ne soit transféré à la surface de la spore par la sialyltransférase CgeB. Un deuxième acide nonulosonique non identifié pour le moment serait de plus

présent dans le crust. Le rhamnose serait transféré à cet acide nonulosonique par SpsA, puis ce groupement serait ensuite transféré à la surface de la spore par SpsB. Les protéines CgeC et CgeE seraient quant à elles impliquées dans les différents processus de maturation plus tardifs du crust (**Figure 37**).



**Figure 37 : Proposition du rôle des gènes *sps* et *cge* dans la biosynthèse du crust.** Les informations dans le cadre en pointillés correspondent aux données connues à ce jour (Plata et al., 2012; Dubois et al., 2020). Les gènes *spsIJKL* codent les enzymes formant la voie de biosynthèse du Rhamnose (Rha). Les gènes *spsM* et *spsCDEFG* codent les enzymes formant la voie de biosynthèse de l'acide legionaminique (Leg). Un deuxième acide nonulosonique non identifié (NulO-X) est présent et est fait intervenir une voie de biosynthèse non identifiée. Les glycosyltransférases de type GT2 CgeD et SpsA permettent le transfert de Rha sur le Leg et NulO-X respectivement. Ces disaccharides sont ensuite transférés à la surface de la spore par CgeB et SpsB respectivement. CgeC et CgeE sont impliquées dans la maturation du crust.

## II.L'influence des conditions de sporulation sur la composition et/ou l'organisation du crust.

Après nous être intéressés à la structure du crust et aux voies de biosynthèses impliquées, nous avons cherché à mieux comprendre comment les conditions environnementales, pendant la sporulation, influencent les propriétés de surface des spores et la structure du crust.

### A. Influence des cations divalents

Nous avons montré qu'une carence en calcium ou en magnésium lors de la sporulation provoque une augmentation de l'hydrophobicité et de l'adhésion des spores. Nous avons également montré que dans ces conditions, les quantités relatives de Rha et Leg dans le crust diminuent. En revanche, l'influence de la carence en cations sur les protéines du crust semble limitée. Nous avons seulement identifié une diminution de la quantité de CgeA dans la condition carencée en calcium, ce qui indique une modification de structure sans déstabilisation du squelette protéique du crust.

Dans des travaux antérieurs, il a été montré que l'inactivation des gènes *spsM* et *spsI*, qui codent respectivement des enzymes des voies de synthèse du Leg et du Rha, conduit *B. subtilis* à produire des spores très hydrophobes (Shuster et al., 2019b; Dubois et al., 2020). De façon comparable, les spores d'un mutant du gène *cgeA* sont plus hydrophobes que les spores de la souche parentale. (Shuster et al., 2019a). Par conséquent, il est probable que l'augmentation du caractère hydrophobe et de l'adhésion des spores obtenues dans des conditions de carence en cations s'explique par les altérations du crust que nous avons mises en évidence. Cependant, il est notable que les spores obtenues en conditions de carence en cations sont moins hydrophobes que les spores des mutants  $\Delta$ *spsM* et  $\Delta$ *spsI*. En effet, les expériences de MATH réalisées sur ces mutants montre une hydrophilie de seulement 20% après 1 minute d'agitation contre 40% après 4 minutes dans nos conditions carencées en calcium ou en magnésium (Shuster et al., 2019b; Dubois et al., 2020). Cette différence s'explique par le fait que dans les conditions de carence en cations, la synthèse du Leg et du Rha est seulement réduite. La présence, en quantité réduite, de Leg et de Rha pourrait donc expliquer que les spores obtenues dans nos conditions soient moins hydrophobes et adhérentes que les spores obtenues avec les mutants des gènes *sps*.

Il a précédemment été mis en évidence que l'ajout de calcium dans le milieu de culture de *B. subtilis* pendant la sporulation entraînait une augmentation de la transcription des gènes *sps* et *cge* (Oomes et al., 2009). Notre étude indique qu'il n'y a pas d'effet de la carence en calcium ou en magnésium sur la transcription de gènes *cgeA*, *spsI* et *spsM* en phase tardive de sporulation. Il est donc probable que dans nos conditions expérimentales, le calcium et le magnésium jouent un rôle à un niveau post-transcriptionnel lors de la biosynthèse du crust. Les acteurs et les mécanismes de cette régulation ne sont pas connus. Cependant, nous avons identifié trois gènes (*spsA*, *yfnE* et *cgeD*) transcrits en phase tardive de sporulation sous le contrôle de sigma K qui codent des glycosyltransférases putatives de type GT-A. L'activité de ces enzymes est dépendante de la présence d'ions métalliques divalents dans leur site actif (Lairson et al., 2008). Par conséquent, en absence de  $\text{Ca}^{2+}$  ou de  $\text{Mg}^{2+}$ , l'activité de ces enzymes pourrait être inhibée, entraînant une synthèse incomplète des glycanes du crust. Chez les bactéries à Gram négatif, il a été démontré que les cations divalents tels que  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Mg}^{2+}$  sont directement impliqués dans la structure des lipopolysaccharidiques (LPS) (Clifton et al., 2015). Les cations interagissent avec les oligosaccharides négativement chargés du LPS par des liaisons électrostatiques et ils participent au maintien de la structure de la membrane externe. Il est donc possible que des cations divalents soient impliqués dans le maintien de la structure du crust par l'intermédiaire d'interactions électrostatiques. En effet, à pH neutre, le Leg est chargé négativement, ainsi que la plupart des protéines du crust (toutes sauf CotW). Ainsi, les cations divalents pourraient intervenir dans des interactions électrostatiques entre deux glycanes et/ou entre des glycanes et des protéines. Par conséquent, dans un environnement carencé en calcium ou en magnésium, les glycanes du crust pourraient être moins bien ancrés les uns aux autres et avec les protéines du crust entraînant la destruction du crust.

## B. Effet de la présence d'agents oxydants

Lorsque les spores sont produites en présence d'acide peracétique ou de peroxyde d'hydrogène, les spores sont également plus hydrophobes et adhérentes. Cependant, nous n'avons pas pu mettre en évidence de modifications du crust communes à ces deux agents oxydants. En effet, Les deux agents oxydants n'entraînent pas de modification détectable des monosaccharides et du Leg dans le crust. Le peroxyde d'hydrogène conduit à une diminution des quantités de CgeA et de CotY à la surface des spores alors que l'ajout d'acide peracétique ne semble pas affecter ces deux protéines.

Nous ne sommes pas parvenus à détecter de modifications de la composition en protéine ou en glycanes dans la condition acide peracétique. Il est possible que les méthodes que nous avons utilisées n'étaient pas assez sensibles pour détecter les changements provoqués par ce stress. Une autre possibilité est que la concentration d'acide peracétique utilisée pour provoquer le stress pendant la sporulation ne soit pas assez élevée pour détecter des modifications.

Néanmoins, les résultats obtenus dans la condition peroxyde d'hydrogène suggèrent que les agents oxydants modifient la structure des protéines du crust. Acide peracétique et peroxyde d'hydrogène peuvent entraîner la production de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS). A faible concentration, l'acide peracétique se décompose naturellement en acide acétique et en peroxyde d'hydrogène. En présence de fer libre dans le milieu, le peroxyde d'hydrogène est converti, selon les réactions de Fenton et Haber-Weiss, en anion hydroxyle (HO<sup>-</sup>), qui possède le plus fort pouvoir oxydant parmi les ROS (Collin, 2019). L'ion hydroxyle peut entraîner le clivage de la chaîne principale d'une protéine ou l'oxydation des chaînes latérales d'acides aminés (Sharma, 2012; Davies, 2016). Ainsi, certains acides aminés tels que l'arginine, la lysine, la proline ou encore la thréonine sont carbonylés, c'est-à-dire qu'une molécule de monoxyde de carbone est ajoutée au niveau de la chaîne latérale de ces acides aminés. Cette carbonylation peut entraîner l'inactivation d'une enzyme ou la dégradation de la protéine. Les atomes de soufre des résidus cystéines et méthionines sont également sensibles à l'oxydation des ROS (Ezraty et al., 2017). Il en résulte que la formation et le maintien des ponts disulfures des protéines peut être perturbé. Or, il a été montré que les protéines du crust sont très riches en cystéines et forment des ponts disulfures qui pourraient être essentiels à la structuration du squelette protéique du crust (Zhang et al., 1993; Ursem et al., 2021). L'oxydation incontrôlée des cystéines du crust lors de la présence d'agents oxydants pourrait ainsi résulter en un assemblage incorrect des protéines du crust pendant la sporulation. De plus, nos données indiquent qu'en condition peroxyde d'hydrogène la transcription des gènes *cgeA* et *cotY* est diminuée en phase tardive de sporulation. Ces résultats suggèrent que la diminution de CgeA et CotY dans le crust est au moins en partie due à un effet au niveau de la régulation transcriptionnelle. Chez *B. subtilis*, la réponse aux stress oxydatifs fait intervenir le facteur sigma  $\sigma^B$  (Mols and Abee, 2011a, 2011b). L'induction du gène *sigB* entraîne l'inhibition de l'initiation de la sporulation en inhibant la phosphorylation de Spo0A (Reder et al., 2012). En effet, un promoteur de type  $\sigma^B$  est présent en amont du gène *spo0E*. En présence d'un stress oxydatif la phosphatase Spo0E est ainsi activée. Ainsi, les modifications de la composition en protéines du crust

observées pourraient résulter d'une mise en place tardive de l'activation des gènes de sporulation suite à l'activation du facteur  $\sigma^B$ .

### C. Effet d'un environnement acide

Un environnement acide lors de la sporulation entraîne la production de spores plus adhérentes et plus hydrophobes qu'à pH neutre. Cette modification du pH ne semble pas affecter la composition du crust en monosaccharides ou en Leg, en revanche une diminution de la protéine CgeA à la surface des spores a été mise en évidence ce qui suggère une modification de la composition et/ou de l'organisation en protéine du crust, sans en déstabiliser le squelette protéique. En absence de protéine CgeA à la surface des spores, le crust est moins bien ancré à la surface des spores, les spores sont très hydrophobes et une coloration à l'encre de chine met en évidence une absence de halo autour des spores (Shuster et al., 2019a). Les spores obtenues après sporulation à pH 5 sont moins hydrophobes que celles d'un mutant  $\Delta cgeA$  et les glycanes du crust ne semblent pas endommagés. Ces résultats suggèrent une persistance de la protéine CgeA à la surface des spores en condition pH 5.

Nous n'avons pas observé d'effet d'un environnement acide lors de la sporulation sur la transcription des gènes *cgeA*, *cotY*, *spsI* ou *spsM*. Les modifications de la composition en protéine du crust seraient donc dues à un effet post transcriptionnel. Le pH joue un rôle clé dans le repliement des protéines et leurs interactions entre elles (McAllister et al., 2005). Il est donc possible qu'un pH acide lors de la sporulation entraîne des mauvais repliements de certaines protéines du crust altérant ainsi leurs interactions. Cependant, dans ce cas, l'exposition de spores mûres à un pH acide pourrait entraîner des modifications de conformation des protéines du crust et modifier leurs propriétés de surface et d'adhésion, ce que nous n'avons pas observé. Une autre possibilité est qu'un pH acide entraîne un changement de conformation, et de ce fait une inactivation, de certaines enzymes impliquées dans la biosynthèse du crust. En effet, l'oxydation des protéines affecte tout particulièrement les protéines riches en acides aminés sulfurés (Ezraty et al., 2017). Les protéines morphogénétiques CotY et CotZ sont riches en cystéines et il est donc possible qu'un pH acide lors de la sporulation soit responsable d'un changement de conformation ou d'un mauvais repliement de ces protéines entraînant ainsi une diminution ou une perte de leur fonction morphogénétique résultant en un mauvais assemblage des protéines du crust.

### D. Effet d'une diminution de l'oxygénation

Lorsque la disponibilité en oxygène est diminuée pendant la sporulation les spores sont plus hydrophobes et plus adhérentes que les spores produites dans la condition contrôle. Nous avons montré que les spores ainsi produites contiennent moins de Rha et de Leg à leur surface. Une diminution de l'oxygénation associée à une saturation en dioxyde de carbone ( $-\text{O}_2 + \text{CO}_2$ ) entraîne aussi une diminution du Qui dans le crust. Nous avons aussi mis en évidence une diminution des quantités des protéines CgeA et CotY dans le crust ce qui suggère une modification importante de sa structure protéique. Enfin, nos résultats indiquent qu'une faible oxygénation lors de la sporulation entraîne une diminution de la



transcription des gènes *cgeA*, *cotY*, *spsI* et *spsM*. Les modifications de composition en Rha, Leg et en protéines du crust seraient donc, au moins en partie, liées à un effet au niveau de la régulation transcriptionnelle.

Une étude de 2011 a comparé l'expression des gènes de *B. subtilis* en présence d'une forte oxygénation et à faible oxygénation (Yu et al., 2011). Dans cette étude, les auteurs ont montré une augmentation de l'expression des gènes des régulateurs  $\sigma^E$  et  $\sigma^F$  qui correspondent aux facteurs sigma responsables des étapes précoces de la sporulation. En revanche, les auteurs n'ont pas observé la formation de spores dans cette condition. Ces observations suggèrent un possible blocage de la sporulation à un stade plus tardif, d'autant plus que l'expression du gène codant la protéine morphogénétique de la tunique externe, CotE, est diminuée (Yu et al., 2011; McKenney et al., 2013). Chez *B. cereus*, la sporulation en anaérobiose est peu efficace et environ 70% des spores ainsi produites présentent un exosporium endommagé ou complètement détaché des spores (Abbas et al., 2014). La protéine CotE participe à l'ancrage de l'exosporium via des interactions protéine/protéine (Lablaine et al., 2021). Il est donc possible qu'en absence d'oxygène lors de la sporulation de *B. cereus* l'expression du gène *cotE* soit aussi diminuée, résultant ainsi en un mauvais ancrage de l'exosporium à la surface de la spore.

Une diminution de l'oxygénation entraîne aussi l'activation du facteur sigma  $\sigma^B$ , du régulateur transcriptionnel FNR et du système à deux composants ResD/ResE (Yu et al., 2011). L'induction du gène *sigB* entraîne la répression de l'initiation de la sporulation et ResD se fixe aux niveaux des sites de recombinaison du phage SP $\beta$  et du *skin* (Reder et al., 2012; Chumsakul et al., 2017). L'effet sur l'excision du prophage ou du *skin* n'est cependant pas connu. Cependant, nos expériences de qRT-PCR ne mettent pas en évidence de modification de l'efficacité d'excision du prophage SP $\beta$ .

Dans nos conditions, une diminution de l'expression des gènes impliqués dans la biosynthèse du crust est observée. Des expériences plus approfondies sur l'expression des gènes impliqués dans la sporulation seraient nécessaires afin de mieux comprendre l'effet de l'oxygénation sur la régulation de la sporulation.

## Références Bibliographiques

- Abbas, A. A., Planchon, S., Jobin, M., and Schmitt, P. (2014). Absence of oxygen affects the capacity to sporulate and the spore properties of *Bacillus cereus*. *Food Microbiol.* 42, 122–131. doi: 10.1016/j.fm.2014.03.004.
- Abe, K., Kawano, Y., Iwamoto, K., Arai, K., Maruyama, Y., Eichenberger, P., et al. (2014). Developmentally-regulated excision of the SP $\beta$  prophage reconstitutes a gene required for spore envelope maturation in *Bacillus subtilis*. *PLoS Genet.* 10, e1004636. doi: 10.1371/journal.pgen.1004636.
- Abe, K., Takamatsu, T., and Sato, T. (2017). Mechanism of bacterial gene rearrangement: SprA-catalyzed precise DNA recombination and its directionality control by SprB ensure the gene rearrangement and stable expression of *spsM* during sporulation in *Bacillus subtilis*. *Nucleic Acids Res.* 45, 6669–6683. doi: 10.1093/nar/gkx466.
- Ahimou, F., Paquot, M., Jacques, P., Thonart, P., and Rouxhet, P. G. (2001). Influence of electrical properties on the evaluation of the surface hydrophobicity of *Bacillus subtilis*. *J. Microbiol. Methods* 45, 119–126. doi: 10.1016/S0167-7012(01)00240-8.
- Alexander, K. A., Lewis, B. L., Marathe, M., Eubank, S., and Blackburn, J. K. (2012). Modeling of wildlife-associated zoonoses: Applications and caveats. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* 12, 1005–1018. doi: 10.1089/vbz.2012.0987.
- Almada-Érix, C. N., Almada, C. N., Souza Pedrosa, G. T., dos Santos, P., Schmiele, M., Clerici, M. T. P. S., et al. (2021). Quantifying the impact of eight unit operations on the survival of eight *Bacillus* strains with claimed probiotic properties. *Food Res. Int.* 142, 110191. doi: 10.1016/J.FOODRES.2021.110191.
- Almeida, N. F., Shuangchun, Y., Rongman, C., Clarke, C. R., Morris, C. E., Schaads, N. W., et al. (2010). PAMDB, a multilocus sequence typing and analysis database and website for plant-associated microbes. *Phytopathology* 100, 208–215. doi: 10.1094/PHYTO-100-3-0208.
- André, S., Vallaey, T., and Planchon, S. (2017). Spore-forming bacteria responsible for food spoilage. *Res. Microbiol.* 168, 379–387. doi: 10.1016/j.resmic.2016.10.003.
- Angeles, D. M., and Scheffers, D. J. (2020). The Cell Wall of *Bacillus subtilis*. *Curr. Issues Mol. Biol.* 2021, Vol. 41, Pages 539-596 41, 539–596. doi: 10.21775/CIMB.041.539.
- Apetroaie-Constantin, C., Mikkola, R., Andersson, M. A., Teplova, V., Suominen, I., Johansson, T., et al. (2009). *Bacillus subtilis* and *B. mojavensis* strains connected to food poisoning produce the heat stable toxin amyloisin. *J. Appl. Microbiol.* 106, 1976–1985. doi: 10.1111/J.1365-2672.2009.04167.X.
- Arakawa, K., Kawai, Y., Iioka, H., Tanioka, M., Nishimura, J., Kitazawa, H., et al. (2008). Microbial Community Analysis of Food-Spoilage Bacteria in Commercial Custard Creams Using Culture-Dependent and Independent Methods. *J. Dairy Sci.* 91, 2938–2946. doi: 10.3168/JDS.2007-0677.
- Argôlo-Filho, R. C., and Loguercio, L. L. (2014). *Bacillus thuringiensis* is an environmental pathogen and host-specificity has developed as an adaptation to human-generated ecological niches. *Insects* 5, 62–91. doi: 10.3390/insects5010062.
- Arkipova, T. N., Veselov, S. U., Melentiev, A. I., Martynenko, E. V., and Kudoyarova, G. R. (2005). Ability of bacterium *Bacillus subtilis* to produce cytokinins and to influence the growth and endogenous hormone content of lettuce plants. *Plant Soil* 2005 272/1 272, 201–209. doi: 10.1007/S11104-004-5047-X.
- Arrieta-Ortiz, M. L., Hafemeister, C., Bate, A. R., Chu, T., Greenfield, A., Shuster, B., et al. (2015). An experimentally supported model of the *Bacillus subtilis* global transcriptional regulatory network. *Mol. Syst. Biol.* 11, 839. doi: 10.15252/MSB.20156236.

- Ash, C., Farrow, J. A. E., Dorsch, M., Stackebrandt, E., and Collins, M. D. (1991). Comparative analysis of *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and related species on the basis of reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 41, 343–346. doi: 10.1099/00207713-41-3-343.
- Auch, A. F., Klenk, H. P., and Göker, M. (2010). Standard operating procedure for calculating genome-to-genome distances based on high-scoring segment pairs. *Stand. Genomic Sci.* 2, 142–148. doi: 10.4056/sigs.541628.
- Azrin, N. A. M., Ali, M. S. M., Rahman, R. N. Z. R. A., Oslan, S. N., and Noor, N. D. M. (2022). Versatility of subtilisin: A review on structure, characteristics, and applications. *Biotechnol. Appl. Biochem.* doi: 10.1002/BAB.2309.
- Ball, D. A., Taylor, R., Todd, S. J., Redmond, C., Couture-Tosi, E., Sylvestre, P., et al. (2008). Structure of the exosporium and sublayers of spores of the *Bacillus cereus* family revealed by electron crystallography. *Mol. Microbiol.* 68, 947–958. doi: 10.1111/J.1365-2958.2008.06206.X.
- Bartels, J., Blüher, A., López Castellanos, S., Richter, M., Günther, M., and Mascher, T. (2019). The *Bacillus subtilis* endospore crust: protein interaction network, architecture and glycosylation state of a potential glycoprotein layer. *Mol. Microbiol.*, mmi.14381. doi: 10.1111/mmi.14381.
- Baumgartner, J., Lee, J., Halavaty, A. S., Minasov, G., Anderson, W. F., and Kuhn, M. L. (2017). Structure of the *Bacillus anthracis* dTDP-l-rhamnose-biosynthetic enzyme glucose-1-phosphate thymidyltransferase (RfbA). *Acta Crystallogr. Sect. FStructural Biol. Commun.* 73, 621–628. doi: 10.1107/S2053230X17015357/DP5104SUP1.PDF.
- Bavykin, S. G., Lysov, Y. P., Zakhariyev, V., Kelly, J. J., Jackman, J., Stahl, D. A., et al. (2004). Use of 16S rRNA, 23S rRNA, and *gyrB* gene sequence analysis to determine phylogenetic relationships of *Bacillus cereus* group microorganisms. *J. Clin. Microbiol.* 42, 3711–3730. doi: 10.1128/JCM.42.8.3711-3730.2004.
- Baweja, R. B., Zaman, M. S., Mattoo, A. R., Sharma, K., Tripathi, V., Aggarwal, A., et al. (2008). Properties of *Bacillus anthracis* spores prepared under various environmental conditions. *Arch. Microbiol.* 189, 71–79. doi: 10.1007/s00203-007-0295-9.
- Beauregard, P. B., Chai, Y., Vlamakis, H., Losick, R., and Kolter, R. (2013). *Bacillus subtilis* biofilm induction by plant polysaccharides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, E1621. doi: 10.1073/pnas.1218984110.
- Beecher, D. J., and Wong, A. C. L. (2000). Cooperative, synergistic and antagonistic haemolytic interactions between haemolysin BL, phosphatidylcholine phospholipase C and sphingomyelinase from *Bacillus cereus*. *Microbiology* 146, 3033–3039. doi: 10.1099/00221287-146-12-3033.
- Berendsen, E. M., Zwietering, M. H., Kuipers, O. P., and Wells-Bennik, M. H. J. (2015). Two distinct groups within the *Bacillus subtilis* group display significantly different spore heat resistance properties. *Food Microbiol.* 45, 18–25. doi: 10.1016/J.FM.2014.04.009.
- Bernheimer, A. W., and Grushoff, P. (1967). Cereolysin: production, purification and partial characterization. *J. Gen. Microbiol.* 46, 143–150. doi: 10.1099/00221287-46-1-143.
- Berry, C., O’Neil, S., Ben-Dov, E., Jones, A. F., Murphy, L., Quail, M. A., et al. (2002). Complete sequence and organization of pBtoxis, the toxin-coding plasmid of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 5082–5095. doi: 10.1128/AEM.68.10.5082-5095.2002.
- Bhattacharyya, P. N., and Jha, D. K. (2011). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2011 284 28, 1327–1350. doi: 10.1007/S11274-011-0979-9.
- Blackburn, C. (2006). “Managing microbial food spoilage: An overview,” in *Food spoilage microorganisms*

- (Woodhead Publishing Ltd), 147–170. doi: 10.1533/9781845691417.2.147.
- Blackburn, J. K., Van Ert, M., Mullins, J. C., Hadfield, T. L., and Hugh-Jones, M. E. (2014). The necrophagous fly anthrax transmission pathway: Empirical and genetic evidence from wildlife epizootics. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* 14, 576–583. doi: 10.1089/vbz.2013.1538.
- Blake, C., Christensen, M. N., and Kovacs, A. T. (2021). Molecular aspects of plant growth promotion and protection by *Bacillus subtilis*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 34, 15–25. doi: 10.1094/MPMI-08-20-0225-CR/ASSET/IMAGES/LARGE/MPMI-08-20-0225-CRF2.JPEG.
- Bondi, M., Messi, P., Halami, P. M., Papadopoulou, C., and De Niederhausen, S. (2014). Emerging Microbial Concerns in Food Safety and New Control Measures. *Biomed Res. Int.* 2014. doi: 10.1155/2014/251512.
- Boulangé-Petermann, L. (2009). Processes of bioadhesion on stainless steel surfaces and cleanability: A review with special reference to the food industry. <http://dx.doi.org/10.1080/08927019609386287> 10, 275–300. doi: 10.1080/08927019609386287.
- Boydston, J. A., Yue, L., Kearney, J. F., and Turnbough, C. L. (2006). The ExsY Protein Is Required for Complete Formation of the Exosporium of *Bacillus anthracis*. *J. Bacteriol.* 188, 7440. doi: 10.1128/JB.00639-06.
- Bressuire-Isoard, C., Broussolle, V., and Carlin, F. (2018). Sporulation environment influences spore properties in *Bacillus*: evidence and insights on underlying molecular and physiological mechanisms. *FEMS Microbiol. Rev.* 42, 614–626. doi: 10.1093/femsre/fuy021.
- Broach, B., Gu, X., and Bar-Peled, M. (2012). Biosynthesis of UDP-glucuronic acid and UDP-galacturonic acid in *Bacillus cereus* subsp. cytotoxis NVH 391-98. *FEBS J.* 279, 100–112. doi: 10.1111/J.1742-4658.2011.08402.X.
- Brockhausen, I. (2014). Crossroads between bacterial and mammalian glycosyltransferases. *Front. Immunol.* 5, 492. doi: 10.3389/FIMMU.2014.00492/BIBTEX.
- Burbulys, D., Trach, K. A., and Hoch, J. A. (1991). Initiation of sporulation in *B. subtilis* is controlled by a multicomponent phosphorelay. *Cell* 64, 545–552. doi: 10.1016/0092-8674(91)90238-T.
- Caccia, S., Di Lelio, I., La Storia, A., Marinelli, A., Varricchio, P., Franzetti, E., et al. (2016). Midgut microbiota and host immunocompetence underlie *Bacillus thuringiensis* killing mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113, 9486–9491. doi: 10.1073/pnas.1521741113.
- Camp, A. H., and Losick, R. (2008). A Novel Pathway of Intercellular Signaling in *Bacillus subtilis* Involves a Protein with Similarity to a Component of Type III Secretion Channels. *Mol. Microbiol.* 69, 402. doi: 10.1111/J.1365-2958.2008.06289.X.
- Camp, A. H., and Losick, R. (2009). A feeding tube model for activation of a cell-specific transcription factor during sporulation in *Bacillus subtilis*. *Genes Dev.* 23, 1014. doi: 10.1101/GAD.1781709.
- Cangiano, G., Sirec, T., Panarella, C., Isticato, R., Baccigalupi, L., De Felice, M., et al. (2014). The *sps* gene products affect the germination, hydrophobicity, and protein adsorption of *Bacillus subtilis* spores. *Appl. Environ. Microbiol.* 80, 7293–7302. doi: 10.1128/AEM.02893-14.
- Castaing, J. P., Nagy, A., Anantharaman, V., Aravind, L., and Ramamurthi, K. S. (2013). ATP hydrolysis by a domain related to translation factor GTPases drives polymerization of a static bacterial morphogenetic protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, E151. doi: 10.1073/PNAS.1210554110/
- Cazemier, A. E., Wagenaars, S. F. M., and Ter Steeg, P. F. (2001). Effect of sporulation and recovery medium on the heat resistance and amount of injury of spores from spoilage bacilli. *J. Appl. Microbiol.* 90, 761–770.

- doi: 10.1046/j.1365-2672.2001.01302.x.
- Ceuppens, S., Boon, N., and Uyttendaele, M. (2013). Diversity of *Bacillus cereus* group strains is reflected in their broad range of pathogenicity and diverse ecological lifestyles. *FEMS Microbiol. Ecol.* 84, 433–450. doi: 10.1111/1574-6941.12110.
- Charlton, S., Moir, A. J. G., Baillie, L., and Moir, A. (1999). Characterization of the exosporium of *Bacillus cereus*. *J. Appl. Microbiol.* 87, 241–245. doi: 10.1046/j.1365-2672.1999.00878.x.
- Charnock, S. J., and Davies, G. J. (1999). Structure of the Nucleotide-Diphospho-Sugar Transferase, SpsA from *Bacillus subtilis*, in Native and Nucleotide-Complexed Forms<sup>†,‡</sup>. *Biochemistry* 38, 6380–6385. doi: 10.1021/BI990270Y.
- Chen, H., Xiao, X., Wang, J., Wu, L., Zheng, Z., and Yu, Z. (2008). Antagonistic effects of volatiles generated by *Bacillus subtilis* on spore germination and hyphal growth of the plant pathogen, *Botrytis cinerea*. *Biotechnol. Lett.* 30, 919–923. doi: 10.1007/S10529-007-9626-9.
- Chen, Y., Cao, S., Chai, Y., Clardy, J., Kolter, R., Guo, J. H., et al. (2012). A *Bacillus subtilis* sensor kinase involved in triggering biofilm formation on the roots of tomato plants. *Mol. Microbiol.* 85, 418–430. doi: 10.1111/j.1365-2958.2012.08109.x.
- Christie, G., and Setlow, P. (2020). *Bacillus* spore germination: Knowns, unknowns and what we need to learn. *Cell. Signal.* 74, 109729. doi: 10.1016/J.CELLSIG.2020.109729.
- Chumsakul, O., Anantsri, D. P., Quirke, T., Oshima, T., Nakamura, K., Ishikawa, S., et al. (2017). Genome-Wide Analysis of ResD, NsrR, and Fur Binding in *Bacillus subtilis* during Anaerobic Fermentative Growth by In Vivo Footprinting. *J. Bacteriol.* 199. doi: 10.1128/JB.00086-17.
- Clark, M. A., Shorr, R. G. L., and Bomalaski, J. S. (1986). Antibodies prepared to *Bacillus cereus* phospholipase C crossreact with a phosphatidylcholine preferring phospholipase C in mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 140, 114–119. doi: 10.1016/0006-291X(86)91065-X.
- Clarkson, J., Campbell, I. D., and Yudkin, M. D. (2004). Physical Evidence for the Induced Release of the *Bacillus subtilis* Transcription Factor,  $\sigma_F$ , from its Inhibitory Complex. *J. Mol. Biol.* 340, 203–209. doi: 10.1016/J.JMB.2004.04.061.
- Clifton, L. A., Skoda, M. W. A., Le Brun, A. P., Ciesielski, F., Kuzmenko, I., Holt, S. A., et al. (2015). Effect of divalent cation removal on the structure of gram-negative bacterial outer membrane models. *Langmuir* 31, 404–412. doi: 10.1021/LA504407V
- Collin, F. (2019). Chemical Basis of Reactive Oxygen Species Reactivity and Involvement in Neurodegenerative Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* 20. doi: 10.3390/IJMS20102407.
- Cortezzo, D. E., and Setlow, P. (2005). Analysis of factors that influence the sensitivity of spores of *Bacillus subtilis* to DNA damaging chemicals. *J. Appl. Microbiol.* 98, 606–617. doi: 10.1111/J.1365-2672.2004.02495.X.
- Coutinho, P. M., Deleury, E., Davies, G. J., and Henrissat, B. (2003). An Evolving Hierarchical Family Classification for Glycosyltransferases. *J. Mol. Biol.* 328, 307–317. doi: 10.1016/S0022-2836(03)00307-3.
- Cybulski, R. J., Sanz, P., Alem, F., Stibitz, S., Bull, R. L., and O'Brien, A. D. (2009). Four superoxide dismutases contribute to *Bacillus anthracis* virulence and provide spores with redundant protection from oxidative stress. *Infect. Immun.* 77, 274–285. doi: 10.1128/IAI.00515-08.
- Dai, T., Vrahas, M. S., Murray, C. K., and Hamblin, M. R. (2012). Ultraviolet C irradiation: An alternative

- antimicrobial approach to localized infections? *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* 10, 185–195. doi: 10.1586/eri.11.166.
- Dallagi, H., Faille, C., Bouvier, L., Deleplace, M., Dubois, T., Aloui, F., et al. (2022). Wet foam flow: A suitable method for improving surface hygiene in the food industry. *J. Food Eng.* 322, 110976. doi: 10.1016/J.JFOODENG.2022.110976.
- Dammak, I., Dammak, M., and Tounsi, S. (2015). Histopathological and combinatorial effects of the metalloprotease InhA1 and Cry proteins of *Bacillus thuringiensis* against *Spodoptera littoralis*. *Int. J. Biol. Macromol.* 81, 759–762. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2015.09.006.
- Davies, M. J. (2016). Protein oxidation and peroxidation. *Biochem. J.* 473, 805. doi: 10.1042/BJ20151227.
- Delbrück, A. I., Zhang, Y., Heydenreich, R., and Mathys, A. (2021). *Bacillus* spore germination at moderate high pressure: A review on underlying mechanisms, influencing factors, and its comparison with nutrient germination. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 20, 4159–4181. doi: 10.1111/1541-4337.12789.
- Deleplace, M., Dallagi, H., Dubois, T., Richard, E., Ipatova, A., Bénézech, T., et al. (2022). Structure of deposits formed by drying of droplets contaminated with *Bacillus* spores determines their resistance to rinsing and cleaning. *J. Food Eng.* 318, 110873. doi: 10.1016/J.JFOODENG.2021.110873.
- Didier, A., Dietrich, R., and Märklbauer, E. (2016). Antibody binding studies reveal conformational flexibility of the *Bacillus cereus* non-hemolytic enterotoxin (Nhe) A-component. *PLoS One* 11. doi: 10.1371/journal.pone.0165135.
- Dietrich, R., Jessberger, N., Ehling-Schulz, M., Märklbauer, E., and Granum, P. E. (2021). The Food Poisoning Toxins of *Bacillus cereus*. *Toxins* 2021, Vol. 13, Page 98 13, 98. doi: 10.3390/TOXINS13020098.
- Doan, T., Morlot, C., Meisner, J., Serrano, M., Henriques, A. O., Moran, C. P., et al. (2009). Novel Secretion Apparatus Maintains Spore Integrity and Developmental Gene Expression in *Bacillus subtilis*. *PLOS Genet.* 5, e1000566. doi: 10.1371/JOURNAL.PGEN.1000566.
- Doyle, R. J., Nedjat-Haiem, F., and Singh, J. S. (1984). Hydrophobic characteristics of *Bacillus* spores. *Curr. Microbiol.* 10, 329–332. doi: 10.1007/BF01626560.
- Driks, A., and Eichenberger, P. (2016). The Spore Coat. *Microbiol. Spectr.* 4, 179–200. doi: 10.1128/microbiolspec.TBS-0023-2016.
- Drula, E., Garron, M. L., Dogan, S., Lombard, V., Henrissat, B., and Terrapon, N. (2022). The carbohydrate-active enzyme database: functions and literature. *Nucleic Acids Res.* 50, D571–D577. doi: 10.1093/NAR/GKAB1045.
- Dubois, T., Krzewinski, F., Yamakawa, N., Lemy, C., Hamiot, A., Brunet, L., et al. (2020). The *sps* genes encode an original legionaminic acid pathway required for crust assembly in *Bacillus subtilis*. *MBio* 11, 1–17. doi: 10.1128/mBio.01153-20.
- Eggert, T., Brockmeier, U., Dröge, M. J., Quax, W. J., and Jaeger, K. E. (2003). Extracellular lipases from *Bacillus subtilis*: regulation of gene expression and enzyme activity by amino acid supply and external pH. *FEMS Microbiol. Lett.* 225, 319–324. doi: 10.1016/S0378-1097(03)00536-6.
- Eggert, T., Van Pouderoyen, G., Pencreac'h, G., Douchet, I., Verger, R., Dijkstra, B. W., et al. (2002). Biochemical properties and three-dimensional structures of two extracellular lipolytic enzymes from *Bacillus subtilis*. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 26, 37–46. doi: 10.1016/S0927-7765(02)00033-4.
- Ehling-Schulz, M., Frenzel, E., and Gohar, M. (2015). Food-bacteria interplay: Pathometabolism of emetic

- Bacillus cereus*. *Front. Microbiol.* 6. doi: 10.3389/fmicb.2015.00704.
- Ehling-Schulz, M., Fricker, M., Grallert, H., Rieck, P., Wagner, M., and 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. doi: 10.1186/1471-2180-6-20.
- Ehling-Schulz, M., Lereclus, D., and Koehler, T. M. (2019). The *Bacillus cereus* Group: *Bacillus* Species with Pathogenic Potential. *Microbiol. Spectr.* 7. doi: 10.1128/microbiolspec.gpp3-0032-2018.
- Eichenberger, P., Jensen, S. T., Conlon, E. M., Van Ooij, C., Silvaggi, J., González-Pastor, J. E., et al. (2003). The  $\sigma E$  Regulon and the Identification of Additional Sporulation Genes in *Bacillus subtilis*. *J. Mol. Biol.* 327, 945–972. doi: 10.1016/S0022-2836(03)00205-5.
- Elegbeleye, J. A., and Buys, E. M. (2020). Molecular characterization and biofilm formation potential of *Bacillus subtilis* and *Bacillus velezensis* in extended shelf-life milk processing line. *J. Dairy Sci.* doi: 10.3168/jds.2019-17919.
- Eschlbeck, E., Bauer, S. A. W., and Kulozik, U. (2017). Effect of cultivation pH on the surface hydrophobicity of *Bacillus subtilis* spores. 7, 157. doi: 10.1186/s13568-017-0458-2.
- Ezraty, B., Gennaris, A., Barras, F., and Collet, J. F. (2017). Oxidative stress, protein damage and repair in bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* 2017 157 15, 385–396. doi: 10.1038/nrmicro.2017.26.
- Fagerlund, A., Ween, O., Lund, T., Hardy, S. P., and Granum, P. E. (2004). Genetic and functional analysis of the *cytK* family of genes in *Bacillus cereus*. *Microbiology* 150, 2689–2697. doi: 10.1099/MIC.0.26975-0/CITE/REFWORKS.
- Faille, C., Bénézech, T., Midelet-Bourdin, G., Lequette, Y., Clarisse, M., Ronse, G., et al. (2014a). Sporulation of *Bacillus* spp. within biofilms: A potential source of contamination in food processing environments. *Food Microbiol.* 40, 64–74. doi: 10.1016/j.fm.2013.12.004.
- Faille, C., Fontaine, F., and Membré, J. M. (1999). Factors Influencing Recovery of Heat-injured *Bacillus thuringiensis* Spores. Statistical Approach. *J. Food Sci.* 64, 363–366. doi: 10.1111/J.1365-2621.1999.TB15901.X.
- Faille, C., Jullien, C., Fontaine, F., Bellon-Fontaine, M. N., Slomianny, C., and Benezech, T. (2002a). Adhesion of *Bacillus* spores and *Escherichia coli* cells to inert surfaces: role of surface hydrophobicity. *Can. J. Microbiol.* 48, 728–738. doi: 10.1139/W02-063.
- Faille, C., Jullien, C., Fontaine, F., Parent, S., and Bénézech, T. (2002b). Influence of heat treatments on the surface properties and adhesion of *B. Cereus* and *B. Subtilis* spores. in *Fouling, Cleaning and Disinfection in Food Processing Session II: Attachment and Surfaces* (Cambridge, UK).
- Faille, C., Leuret, V., Gavini, F., and Maingonnat, J. F. (1997). Injury and Lethality of Heat Treatment of *Bacillus cereus* Spores Suspended in Buffer and in Poultry Meat. *J. Food Prot.* 60, 544–547. doi: 10.4315/0362-028X-60.5.544.
- Faille, C., Lemy, C., Allion-Maurer, A., and Zoueshtiagh, F. (2019). Evaluation of the hydrophobic properties of latex microspheres and *Bacillus* spores. Influence of the particle size on the data obtained by the MATH method (microbial adhesion to hydrocarbons). *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 182, 110398. doi: 10.1016/j.colsurfb.2019.110398.
- Faille, C., Lequette, Y., Ronse, A., Slomianny, C., Garénaux, E., and Guerardel, Y. (2010a). Morphology and physico-chemical properties of *Bacillus* spores surrounded or not with an exosporium: Consequences on



- their ability to adhere to stainless steel. *Int. J. Food Microbiol.* 143, 125–135. doi: 10.1016/J.IJFOODMICRO.2010.07.038.
- Faille, C., Ronse, A., Dewailly, E., Slomianny, C., Maes, E., Krzewinski, F., et al. (2014b). Presence and function of a thick mucous layer rich in polysaccharides around *Bacillus subtilis* spores. *Biofouling* 30, 845–858. doi: 10.1080/08927014.2014.939073.
- Faille, C., Sylla, Y., Le Gentil, C., Bénézec, T., Slomianny, C., and Lequette, Y. (2010b). Viability and surface properties of spores subjected to a cleaning-in-place procedure: Consequences on their ability to contaminate surfaces of equipment. *Food Microbiol.* 27, 769–776. doi: 10.1016/j.fm.2010.04.001.
- Faille, C., Tauveron, G., Le Gentil-Lelievre, C., and Slomianny, C. (2007). Occurrence of *Bacillus cereus* spores with a damaged exosporium: Consequences on the spore adhesion on surfaces of food processing lines. *J. Food Prot.* 70, 2346–2353. doi: 10.4315/0362-028X-70.10.2346.
- Fan, B., Blom, J., Klenk, H.-P., and Borriss, R. (2017a). *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus velezensis*, and *Bacillus siamensis* Form an “Operational Group *B. amyloliquefaciens*” within the *B. subtilis* Species Complex. *Front. Microbiol.* 8, 22. doi: 10.3389/fmicb.2017.00022.
- Fan, B., Wang, C., Song, X., Ding, X., Wu, L., Wu, H., et al. (2018). *Bacillus velezensis* FZB42 in 2018: The gram-positive model strain for plant growth promotion and biocontrol. *Front. Microbiol.* 9. doi: 10.3389/fmicb.2018.02491.
- Fan, H., Zhang, Z., Li, Y., Zhang, X., Duan, Y., and Wang, Q. (2017b). Biocontrol of bacterial fruit blotch by *Bacillus subtilis* 9407 via surfactin-mediated antibacterial activity and colonization. *Front. Microbiol.* 8, 1973. doi: 10.3389/FMICB.2017.01973/BIBTEX.
- Flemming, H. C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S. A., and Kjelleberg, S. (2016). Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nat. Rev. Microbiol.* 2016 149 14, 563–575. doi: 10.1038/nrmicro.2016.94.
- Flügge, C. (1886). Die Mikroorganismen, mit besonderer Berücksichtigung der Aetiologie der Infektionskrankheiten. *DMW - Dtsch. Medizinische Wochenschrift* 13, 14–15. doi: 10.1055/S-0029-1197389.
- Fredlund, J., Broder, D., Fleming, T., Claussin, C., and Pogliano, K. (2013). The SpoIIQ landmark protein has different requirements for septal localization and immobilization. *Mol. Microbiol.* 89, 1053. doi: 10.1111/MMI.12333.
- Freiberger, F., Claus, H., Günzel, A., Oltmann-Norden, I., Vionnet, J., Mühlenhoff, M., et al. (2007). Biochemical characterization of a *Neisseria meningitidis* polysialyltransferase reveals novel functional motifs in bacterial sialyltransferases. *Mol. Microbiol.* 65, 1258. doi: 10.1111/J.1365-2958.2007.05862.X.
- Furukawa, S., Narisawa, N., Watanabe, T., Kawarai, T., Myozen, K., Okazaki, S., et al. (2005). Formation of the spore clumps during heat treatment increases the heat resistance of bacterial spores. *Int. J. Food Microbiol.* 102, 107–111. doi: 10.1016/J.IJFOODMICRO.2004.12.004.
- Galperin, M. Y., Yutin, N., Wolf, Y. I., Alvarez, R. V., and Koonin, E. V. (2022). Conservation and Evolution of the Sporulation Gene Set in Diverse Members of the Firmicutes. *J. Bacteriol.* 204. doi: 10.1128/JB.00079-22.
- Gatson, J. W., Benz, B. F., Chandrasekaran, C., Satomi, M., Venkateswaran, K., and Hart, M. E. (2006). *Bacillus tequilensis* sp. nov., isolated from a 2000-year-old Mexican shaft-tomb, is closely related to *Bacillus subtilis*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56, 1475–1484. doi: 10.1099/IJS.0.63946-0.

- Gerhardt, P., and Ribí, E. (1964). Ultrastructure of the Exosporium Enveloping Spores of *Bacillus cereus*. *J. Bacteriol.* 88, 1774. doi: 10.1128/jb.88.6.1774-1789.1964.
- Gevers, D., Cohan, F. M., Lawrence, J. G., Spratt, B. G., Coenye, T., Feil, E. J., et al. (2005). Re-evaluating prokaryotic species. *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 733–739. doi: 10.1038/nrmicro1236.
- Ghelardi, E., Celandroni, F., Salvetti, S., Fiscarelli, E., and Senesi, S. (2007). *Bacillus thuringiensis* pulmonary infection: critical role for bacterial membrane-damaging toxins and host neutrophils. *Microbes Infect.* 9, 591–598. doi: 10.1016/j.micinf.2007.02.001.
- Ghosh, S., Joseph, G., Korza, G., He, L., Yuan, J. H., Dong, W., et al. (2019). Effects of the microbicide ceragenin CSA-13 on and properties of *Bacillus subtilis* spores prepared on two very different media. *J. Appl. Microbiol.* 127, 109–120. doi: 10.1111/JAM.14300.
- Gibbons, N. E., and Murray, R. G. E. (1978). Proposals concerning the higher taxa of bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 28, 1–6. doi: 10.1099/00207713-28-1-1.
- Gill, C. O. (1998). *Microbial contamination of meat during slaughter and butchering of cattle, sheep and pigs*.
- Gillis, A., Fayad, N., Makart, L., Bolotin, A., Sorokin, A., Kallassy, M., et al. (2019). Role of plasmid plasticity and mobile genetic elements in the entomopathogen *Bacillus thuringiensis* serovar israelensis. *FEMS Microbiol. Rev.* 43, 341–361. doi: 10.1093/FEMSRE.
- Gilmore, M. S., Cruz-Rodz, A. L., Leimeister-Wachter, M., Kreft, J., and Goebel, W. (1989). A *Bacillus cereus* cytolytic determinant, cereolysin AB, which comprises the phospholipase C and sphingomyelinase genes: Nucleotide sequence and genetic linkage. *J. Bacteriol.* 171, 744–753. doi: 10.1128/jb.171.2.744-753.1989.
- Glaser, P., Kunst, F., Arnaud, M., Coudart, M. -P, Gonzales, W., Hullo, M. -F, et al. (1993). *Bacillus subtilis* genome project: cloning and sequencing of the 97 kb region from 325° to 333deg; *Mol. Microbiol.* 10, 371–384. doi: 10.1111/J.1365-2958.1993.TB01963.X.
- Glekas, G. D., Mulhern, B. J., Kroc, A., Duelfer, K. A., Lei, V., Rao, C. V., et al. (2012). The *Bacillus subtilis* chemoreceptor McpC senses multiple ligands using two discrete mechanisms. *J. Biol. Chem.* 287, 39412–39418. doi: 10.1074/jbc.M112.413518.
- Gokey, T., Halavaty, A. S., Minasov, G., Anderson, W. F., and Kuhn, M. L. (2018). Structure of the *Bacillus anthracis* dTDP-L-rhamnose biosynthetic pathway enzyme: dTDP- $\alpha$ -D-glucose 4,6-dehydratase, RfbB. *J. Struct. Biol.* 202, 175. doi: 10.1016/J.JSB.2018.01.006.
- Goldman, R. C., and Tipper, D. J. (1978). *Bacillus subtilis* spore coats: complexity and purification of a unique polypeptide component. *J. Bacteriol.* 135, 1091. doi: 10.1128/jb.135.3.1091-1106.1978.
- Goon, S., Kelly, J. F., Logan, S. M., Ewing, C. P., and Guerry, P. (2003). Pseudaminic acid, the major modification on *Campylobacter* flagellin, is synthesized via the Cj1293 gene. *Mol. Microbiol.* 50, 659–71.
- Gopal, N., Hill, C., Ross, P. R., Beresford, T. P., Fenelon, M. A., and Cotter, P. D. (2015). The Prevalence and Control of *Bacillus* and Related Spore-Forming Bacteria in the Dairy Industry. *Front. Microbiol.* 6. doi: 10.3389/FMICB.2015.01418.
- Granum, P. E., O'sullivan, K., and Lund, T. (1999). The sequence of the non-haemolytic enterotoxin operon from *Bacillus cereus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 177, 225–229. doi: 10.1111/j.1574-6968.1999.tb13736.x.
- Guerry, P., Ewing, C. P., Schirm, M., Lorenzo, M., Kelly, J., Pattarini, D., et al. (2006). Changes in flagellin glycosylation affect *Campylobacter* autoagglutination and virulence. *Mol. Microbiol.* 60, 299–311. doi: 10.1111/j.1365-2958.2006.05100.x.

- Guinebretière, M. H., Auger, S., Galleron, N., Contzen, M., de Sarrau, B., de Buyser, M. L., et al. (2013). *Bacillus cytotoxicus* sp. nov. is a novel thermotolerant species of the *Bacillus cereus* group occasionally associated with food poisoning. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 63, 31–40. doi: 10.1099/ijss.0.030627-0.
- Gupta, M., and Rao, K. K. (2014). Phosphorylation of DegU is essential for activation of *amyE* expression in *Bacillus subtilis*. *J. Biosci.* 39, 747–752. doi: 10.1007/S12038-014-9481-5.
- Harimawan, A., Zhong, S., Lim, C. T., and Ting, Y. P. (2013). Adhesion of *B. subtilis* spores and vegetative cells onto stainless steel – DLVO theories and AFM spectroscopy. *J. Colloid Interface Sci.* 405, 233–241. doi: 10.1016/J.JCIS.2013.05.031.
- Harwood, C. R., and Kikuchi, Y. (2022). The ins and outs of *Bacillus* proteases: activities, functions and commercial significance. *FEMS Microbiol. Rev.* 46, 1–20. doi: 10.1093/FEMSRE/FUAB046.
- Heinrichs, J. H., Beecher, D. J., MacMillan, J. D., and Zilinskas, B. A. (1993). Molecular cloning and characterization of the *hbla* gene encoding the B component of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. *J. Bacteriol.* 175, 6760–6766. doi: 10.1128/jb.175.21.6760-6766.1993.
- Henriques, A. O., and Moran, Jr., C. P. (2007). Structure, Assembly, and Function of the Spore Surface Layers. *Annu. Rev. Microbiol.* 61, 555–588. doi: 10.1146/annurev.micro.61.080706.093224.
- Hermansson, M., and Marshall, K. C. (1985). Utilization of surface localized substrate by non-adhesive marine bacteria. *Microb. Ecol.* 11, 91–105. doi: 10.1007/BF02010482.
- Heyndrickx, M., and Scheldeman, P. (2008). “Bacilli Associated with Spoilage in Dairy Products and Other Food,” in *Applications and Systematics of Bacillus and Relatives* (wiley), 64–82. doi: 10.1002/9780470696743.ch6.
- Hill, K. K., Ticknor, L. O., Okinaka, R. T., Asay, M., Blair, H., Bliss, K. A., et al. (2004). Fluorescent Amplified Fragment Length Polymorphism Analysis of *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis* Isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 1068–1080. doi: 10.1128/AEM.70.2.1068-1080.2004.
- Hossain, M. J., Ran, C., Liu, K., Ryu, C. M., Rasmussen-Ivey, C. R., Williams, M. A., et al. (2015). Deciphering the conserved genetic loci implicated in plant disease control through comparative genomics of *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. plantarum. *Front. Plant Sci.* 6. doi: 10.3389/fpls.2015.00631.
- Illing, N., and Errington, J. (1990). The spoIIIA locus is not a major determinant of prespore-specific gene expression during sporulation in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 172, 6930. doi: 10.1128/JB.172.12.6930-6936.1990.
- Imamura, D., Kuwana, R., Takamatsu, H., and Watabe, K. (2010). Localization of Proteins to Different Layers and Regions of *Bacillus subtilis* Spore Coats. *J. Bacteriol.* 192, 518. doi: 10.1128/JB.01103-09.
- Imamura, D., Kuwana, R., Takamatsu, H., and Watabe, K. (2011). Proteins involved in formation of the outermost layer of *Bacillus subtilis* spores. *J. Bacteriol.* 193, 4075–4080. doi: 10.1128/JB.05310-11.
- Imamura, D., Zhou, R., Feig, M., and Kroos, L. (2008). Evidence That the *Bacillus subtilis* SpoIIGA Protein Is a Novel Type of Signal-transducing Aspartic Protease. *J. Biol. Chem.* 283, 15287. doi: 10.1074/JBC.M708962200.
- Islam, M. A., Roy, S., Nabi, A., Solaiman, S., Rahman, M., Huq, M., et al. (2018). Microbiological quality assessment of milk at different stages of the dairy value chain in a developing country setting. *Int. J. Food Microbiol.* 278, 11–19. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2018.04.028.
- Isticato, R., Lanzilli, M., Petrillo, C., Donadio, G., Baccigalupi, L., and Ricca, E. (2020). *Bacillus subtilis* builds structurally and functionally different spores in response to the temperature of growth. *Environ. Microbiol.*

- 22, 170–182. doi: 10.1111/1462-2920.14835.
- Ivanova, N., Sorokin, A., Anderson, I., Galleron, N., Candelon, B., Kapatral, V., et al. (2003). Genome sequence of *Bacillus cereus* and comparative analysis with *Bacillus anthracis*. *Nature* 423, 87–91. doi: 10.1038/nature01582.
- Jha, P. K., Dallagi, H., Richard, E., Deleplace, M., Benezech, T., and Faille, C. (2022). Does the vertical vs horizontal positioning of surfaces affect either biofilm formation on different materials or their resistance to detachment? *Food Control* 133, 108646. doi: 10.1016/J.FOODCONT.2021.108646.
- Jiang, M., Grau, R., and Perego, M. (2000a). Differential Processing of Propeptide Inhibitors of Rap Phosphatases in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 182, 303. doi: 10.1128/JB.182.2.303-310.2000.
- Jiang, M., Shao, W., Perego, M., and Hoch, J. A. (2000b). Multiple histidine kinases regulate entry into stationary phase and sporulation in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* 38, 535–542. doi: 10.1046/J.1365-2958.2000.02148.X.
- Jiang, S., Wan, Q., Krajcikova, D., Tang, J., Tzokov, S. B., Barak, I., et al. (2015). Diverse supramolecular structures formed by self-assembling proteins of the *Bacillus subtilis* spore coat. *Mol. Microbiol.* 97, 347. doi: 10.1111/MMI.13030.
- Jiménez, G., Urdiain, M., Cifuentes, A., López-López, A., Blanch, A. R., Tamames, J., et al. (2013). Description of *Bacillus toyonensis* sp. nov., a novel species of the *Bacillus cereus* group, and pairwise genome comparisons of the species of the group by means of ANI calculations. *Syst. Appl. Microbiol.* 36, 383–391. doi: 10.1016/j.syapm.2013.04.008.
- Jones, J. D., and O'Connor, C. D. (2011). Protein acetylation in prokaryotes. *Proteomics* 11, 3012–3022. doi: 10.1002/PMIC.201000812.
- Jovanovic, J., Ornelis, V. F. M., Madder, A., and Rajkovic, A. (2021). *Bacillus cereus* food intoxication and toxicoinfection. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 20, 3719–3761. doi: 10.1111/1541-4337.12785.
- Kailas, L., Terry, C., Abbott, N., Taylor, R., Mullin, N., Tzokov, S. B., et al. (2011). Surface architecture of endospores of the *Bacillus cereus/anthracis/thuringiensis* family at the subnanometer scale. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 16014–16019. doi: 10.1073/PNAS.1109419108/-/DCSUPPLEMENTAL.
- Kawamura-Sato, K., Hiramata, Y., Agata, N., Ito, H., Torii, K., Takeno, A., et al. (2005). Quantitative analysis of cereulide, an emetic toxin of *Bacillus cereus*, by using rat liver mitochondria. *Microbiol. Immunol.* 49, 25–30. doi: 10.1111/j.1348-0421.2005.tb03636.x.
- Kim, E. Y., Tyndall, E. R., Huang, K. C., Tian, F., and Ramamurthi, K. S. (2017). Dash-and-recruit mechanism drives membrane curvature recognition by the small bacterial protein SpoVM. *Cell Syst.* 5, 518. doi: 10.1016/J.CELS.2017.10.004.
- Kirschner, L. A. M., and von Holy, A. (1989). Rope spoilage of bread. *S. Afr. J. Sci.* 85, 425–427.
- Ko, K. S., Kim, J. W., Kim, J. M., Kim, W., Chung, S. I., Kim, I. J., et al. (2004). Population structure of the *Bacillus cereus* group as determined by sequence analysis of six housekeeping genes and the *plcR* gene. *Infect. Immun.* 72, 5253–5261. doi: 10.1128/IAI.72.9.5253-5261.2004.
- Koch, R. (1876). Untersuchungen über bakterien V. Die aetiologie der milzbrand-krankheit, begründet auf die entwicklungsgeschichte *Bacillus anthracis*. *Beitr Biol Pflanz* 2, 277–310.
- Koné, K. M., Hinnekens, P., Jovanovic, J., Rajkovic, A., and Mahillon, J. (2021). New Insights into the Potential Cytotoxic Role of *Bacillus cytotoxicus* Cytotoxin K-1. *Toxins* 2021, Vol. 13, Page 698 13, 698. doi:

- 10.3390/TOXINS13100698.
- Krajčičková, D., Bugárová, V., and Barák, I. (2021). Interactions of *Bacillus subtilis* Basement Spore Coat Layer Proteins. *Microorganisms* 9, 1–15. doi: 10.3390/MICROORGANISMS9020285.
- Krajčičková, D., Forgáč, V., Szabo, A., and Barák, I. (2017). Exploring the interaction network of the *Bacillus subtilis* outer coat and crust proteins. *Microbiol. Res.* 204, 72–80. doi: 10.1016/j.micres.2017.08.004.
- Krajčičková, D., Lukáčová, M., Müllerová, D., Cutting, S. M., and Barák, I. (2009). Searching for Protein-Protein Interactions within the *Bacillus subtilis* Spore Coat. *J. Bacteriol.* 191, 3212–3219. doi: 10.1128/JB.01807-08.
- Kumari, S., and Sarkar, P. K. (2014). In vitro model study for biofilm formation by *Bacillus cereus* in dairy chilling tanks and optimization of clean-in-place (CIP) regimes using response surface methodology. *Food Control* 36, 153–158. doi: 10.1016/j.foodcont.2013.08.014.
- Kunkel, B., Losick, R., and Stragier, P. (1990). The *Bacillus subtilis* gene for the development transcription factor sigma K is generated by excision of a dispensable DNA element containing a sporulation recombinase gene. *Genes Dev.* 4, 525–535. doi: 10.1101/GAD.4.4.525.
- LaBell, T. L., Trempy, J. E., and Haldenwang, W. G. (1987). Sporulation-specific sigma factor sigma 29 of *Bacillus subtilis* is synthesized from a precursor protein, P31. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 84, 1784–1788. doi: 10.1073/PNAS.84.7.1784.
- Lablaine, A., Serrano, M., Bressuire-Isoard, C., Chamot, S., Bornard, I., Carlin, F., et al. (2021). The Morphogenetic Protein CotE Positions Exosporium Proteins CotY and ExsY during Sporulation of *Bacillus cereus*. *mSphere* 6. doi: 10.1128/MSPHERE.00007-21.
- Lairson, L. L., Henrissat, B., Davies, G. J., and Withers, S. G. (2008). Glycosyltransferases: Structures, Functions, and Mechanisms. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.76.061005.092322> 77, 521–555. doi: 10.1146/ANNUREV.BIOCHEM.76.061005.092322.
- Law, A., Stergioulis, A., Halavaty, A. S., Minasov, G., Anderson, W. F., and Kuhn, M. L. (2017). Structure of the *Bacillus anthracis* dTDP-1-rhamnose-biosynthetic enzyme dTDP-4-dehydrorhamnose reductase (RfbD). *Acta Crystallogr. Sect. F Structural Biol. Commun.* 73, 644–650. doi: 10.1107/S2053230X17015746/DP510.
- Lequette, Y., Garénaux, E., Tauveron, G., Dumez, S., Perchat, S., Slomianny, C., et al. (2011). Role played by exosporium glycoproteins in the surface properties of *Bacillus cereus* spores and in their adhesion to stainless steel. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 4905–11. doi: 10.1128/AEM.02872-10.
- Lewis, A. L., Chen, X., Schnaar, R. L., and Varki, A. (2022). Sialic Acids and Other Nonulosonic Acids. *Essentials Glycobiol.* doi: 10.1101/GLYCOBIOLOGY.4E.15.
- Li, A. G., Xing, Y., and Burggraf, L. W. (2013). Thermal effects on surface structures and properties of *Bacillus anthracis* spores on nanometer scales. *Langmuir* 29, 8343–8354. doi: 10.1021/LA400992Q.
- Li, Y., and Chen, X. (2012). Sialic acid metabolism and sialyltransferases: natural functions and applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 94, 887. doi: 10.1007/S00253-012-4040-1.
- Li, Z., Siepmann, F. B., Rojas Tovar, L. E., Chen, X., and Gänzle, M. G. (2020). Effect of copy number of the spoVA2mob operon, sourdough and reutericyclin on rOPY bread spoilage caused by *Bacillus* spp. *Food Microbiol.* 91, 103507. doi: 10.1016/J.FM.2020.103507.
- Linda I., H., Bruno P., L., and Alan J., W. (2010). Bacterial Protein Acetylation: the Dawning of a New Age. *Mol. Microbiol.* 77, 15. doi: 10.1111/J.1365-2958.2010.07204.X.

- Liu, H., Krajcikova, D., Wang, N., Zhang, Z., Wang, H., Barak, I., et al. (2016a). Forces and Kinetics of the *Bacillus subtilis* Spore Coat Proteins CotY and CotX Binding to CotE Inspected by Single Molecule Force Spectroscopy. *J. Phys. Chem. B* 120, 1041–1047. doi: 10.1021/ACS.JPCB.5B11344.
- Liu, H., Krajcikova, D., Zhang, Z., Wang, H., Barak, I., and Tang, J. (2015a). Investigating interactions of the *Bacillus subtilis* spore coat proteins CotY and CotZ using single molecule force spectroscopy. *J. Struct. Biol.* 192, 14–20. doi: 10.1016/J.JSB.2015.09.001.
- Liu, H., Qiao, H., Krajcikova, D., Zhang, Z., Wang, H., Barak, I., et al. (2016b). Physical interaction and assembly of *Bacillus subtilis* spore coat proteins CotE and CotZ studied by atomic force microscopy. *J. Struct. Biol.* 195, 245–251. doi: 10.1016/J.JSB.2016.06.010.
- Liu, Y., Lai, Q., Göker, M., Meier-Kolthoff, J. P., Wang, M., Sun, Y., et al. (2015b). Genomic insights into the taxonomic status of the *Bacillus cereus* group. *Sci. Rep.* 5. doi: 10.1038/srep14082.
- Liu, Y., Tao, J., Yan, Y., Li, B., Li, H., and Li, C. (2011). Biocontrol Efficiency of *Bacillus subtilis* SL-13 and Characterization of an Antifungal Chitinase. *Chinese J. Chem. Eng.* 19, 128–134. doi: 10.1016/S1004-9541(09)60188-9.
- Logan, N. A. (2012). *Bacillus* and relatives in foodborne illness. *J. Appl. Microbiol.* 112, 417–429. doi: 10.1111/j.1365-2672.2011.05204.x.
- Logan, N., and De Vos, P. (2009). “*Bacillus*,” in *Bergey’s Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* (Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd), 1–163. doi: 10.1002/9781118960608.gbm00530.
- Maiden, M. C. J., Bygraves, J. A., Feil, E., Morelli, G., Russell, J. E., Urwin, R., et al. (1998). Multilocus sequence typing: A portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 3140–3145. doi: 10.1073/pnas.95.6.3140.
- Martinez-Fleites, C., Proctor, M., Roberts, S., Bolam, D. N., Gilbert, H. J., and Davies, G. J. (2006). Insights into the Synthesis of Lipopolysaccharide and Antibiotics through the Structures of Two Retaining Glycosyltransferases from Family GT4. *Chem. Biol.* 13, 1143–1152. doi: 10.1016/J.CHEMBIOL.2006.09.005.
- Martínez Viedma, P., Abriouel, H., Ben Omar, N., López, R. L., and Gálvez, A. (2011). Inhibition of spoilage and toxigenic *Bacillus* species in dough from wheat flour by the cyclic peptide enterocin AS-48. *Food Control* 22, 756–761. doi: 10.1016/J.FOODCONT.2010.11.010.
- Mazas, M., López, M., González, I., Bernardo, A., and Martín, R. (1997). Effects of sporulation pH on the heat resistance and the sporulation of *Bacillus cereus*. *Lett. Appl. Microbiol.* 25, 331–334. doi: 10.1046/J.1472-765X.1997.00240.X. *Bacillus cereus*.
- McAllister, C., Karymov, M. A., Kawano, Y., Lushnikov, A. Y., Mikheikin, A., Uversky, V. N., et al. (2005). Protein Interactions and Misfolding Analyzed by AFM Force Spectroscopy. *J. Mol. Biol.* 354, 1028–1042. doi: 10.1016/J.JMB.2005.10.012.
- McKenney, P. T., Driks, A., and Eichenberger, P. (2013). The *Bacillus subtilis* endospore: assembly and functions of the multilayered coat. *Nat. Rev. Microbiol.* 11, 33–44. doi: 10.1038/nrmicro2921.
- McKenney, P. T., Driks, A., Eskandarian, H. A., Grabowski, P., Guberman, J., Wang, K. H., et al. (2010). A Distance-Weighted interaction map reveals a previously uncharacterized layer of the *Bacillus subtilis* spore coat. *Curr. Biol.* 20, 934. doi: 10.1016/J.CUB.2010.03.060.
- McKevitt, M. T., Bryant, K. M., Shakir, S. M., Larabee, J. L., Blanke, S. R., Lovchik, J., et al. (2007). Effects of

- endogenous D-alanine synthesis and autoinhibition of *Bacillus anthracis* germination on *in vitro* and *in vivo* infections. *Infect. Immun.* 75, 5726–5734. doi: 10.1128/IAI.00727-07.
- Mearls, E. B., Jackter, J., Colquhoun, J. M., Farmer, V., Matthews, A. J., Murphy, L. S., et al. (2018). Transcription and translation of the *sigG* gene is tuned for proper execution of the switch from early to late gene expression in the developing *Bacillus subtilis* spore. *PLOS Genet.* 14, e1007350. doi: 10.1371/JOURNAL.PGEN.1007350.
- Meier, A., and Söding, J. (2015). Automatic Prediction of Protein 3D Structures by Probabilistic Multi-template Homology Modeling. *PLOS Comput. Biol.* 11, e1004343. doi: 10.1371/JOURNAL.PCBI.1004343.
- Melly, E., Genest, P. C., Gilmore, M. E., Little, S., Popham, D. L., Driks, A., et al. (2002). Analysis of the properties of spores of *Bacillus subtilis* prepared at different temperatures. *J. Appl. Microbiol.* 92, 1105–1115. doi: 10.1046/j.1365-2672.2002.01644.x.
- Mendez, R., Gutierrez, A., Reyes, J., and Márquez-Magaña, L. (2012). The extracytoplasmic function sigma factor SigY is important for efficient maintenance of the Sp $\beta$  prophage that encodes sublancin in *Bacillus subtilis*. *DNA Cell Biol.* 31, 946–955. doi: 10.1089/dna.2011.1513.
- 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.
- Mistou, M. Y., Sutcliffe, I. C., and Van Sorge, N. M. (2016). Bacterial glycobiology: rhamnose-containing cell wall polysaccharides in Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 40, 464–479. doi: 10.1093/FEMSRE/FUW006.
- Moeller, R., Wassmann, M., Reitz, G., and 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. *J. Appl. Microbiol.* 110, 1485–1494. doi: 10.1111/j.1365-2672.2011.05004.x.
- Mols, M., and Abee, T. (2011a). *Bacillus cereus* responses to acid stress. *Environ. Microbiol.* 13, 2835–2843. doi: 10.1111/j.1462-2920.2011.02490.x.
- Mols, M., and Abee, T. (2011b). Primary and secondary oxidative stress in *Bacillus*. *Environ. Microbiol.* 13, 1387–1394. doi: 10.1111/J.1462-2920.2011.02433.X.
- Moschonas, G., Lianou, A., Nychas, G. J. E., and Panagou, E. Z. (2021). Spoilage potential of *Bacillus subtilis* in a neutral-pH dairy dessert. *Food Microbiol.* 95, 103715. doi: 10.1016/J.FM.2020.103715.
- Mukherjee, D. V., Tonry, J. H., Kim, K. S., Ramarao, N., Popova, T. G., Bailey, C., et al. (2011). *Bacillus anthracis* protease InhA increases blood-brain barrier permeability and contributes to cerebral hemorrhages. *PLoS One* 6. doi: 10.1371/journal.pone.0017921.
- Nakamura, L. K. (1989). Taxonomic relationship of black-pigmented *Bacillus subtilis* strains and a proposal for *Bacillus atrophaeus* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 39, 295–300. doi: 10.1099/00207713-39-3-295/CITE/REFWORKS.
- Nguyen Thi Minh, H., Durand, A., Loison, P., Perrier-Cornet, J.-M., and Gervais, P. (2011). Effect of sporulation conditions on the resistance of *Bacillus subtilis* spores to heat and high pressure. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 90, 1409–1417. doi: 10.1007/s00253-011-3183-9.
- Nicholson, W. L., Munakata, N., Horneck, G., Melosh, H. J., and Setlow, P. (2000). Resistance of *Bacillus* Endospores to Extreme Terrestrial and Extraterrestrial Environments. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64, 548–

572. doi: 10.1128/mmbr.64.3.548-572.2000.
- Nicolas, P., Mäder, U., Dervyn, E., Rochat, T., Leduc, A., Pigeonneau, N., et al. (2012). Condition-dependent transcriptome reveals high-level regulatory architecture in *Bacillus subtilis*. *Science* (80- ). 335, 1103–1106. doi: 10.1126/SCIENCE.1206848.
- Noma, S., Kiyohara, K., Hirokado, R., Yamashita, N., Migita, Y., Tanaka, M., et al. (2018). Increase in hydrophobicity of *Bacillus subtilis* spores by heat, hydrostatic pressure, and pressurized carbon dioxide treatments. *J. Biosci. Bioeng.* 125, 327–332. doi: 10.1016/J.JBIOSEC.2017.09.012.
- Odeyemi, O. A., Alegbeleye, O. O., Strateva, M., and Stratev, D. (2020). Understanding spoilage microbial community and spoilage mechanisms in foods of animal origin. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 19, 311–331. doi: 10.1111/1541-4337.12526.
- Ohlsen, K. L., Grimsley, J. K., and Hoch, J. A. (1994). Deactivation of the sporulation transcription factor Spo0A by the Spo0E protein phosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 1756. doi: 10.1073/PNAS.91.5.1756.
- Okinaka, R., Cloud, K., Hampton, O., Hoffmaster, A., Hill, K., Keim, P., et al. (1999). Sequence, assembly and analysis of pX01 and pX02. *J. Appl. Microbiol.* 87, 261–262. doi: 10.1046/j.1365-2672.1999.00883.x.
- Olsen, J. S., Skogan, G., Fykse, E. M., Rawlinson, E. L., Tomaso, H., Granum, P. E., et al. (2007). Genetic distribution of 295 *Bacillus cereus* group members based on adk-screening in combination with MLST (Multilocus Sequence Typing) used for validating a primer targeting a chromosomal locus in *B. anthracis*. *J. Microbiol. Methods* 71, 265–274. doi: 10.1016/j.mimet.2007.10.001.
- Oomes, S. J. C. M., and Brul, S. (2004). The effect of metal ions commonly present in food on gene expression of sporulating *Bacillus subtilis* cells in relation to spore wet heat resistance. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 5, 307–316. doi: 10.1016/j.ifset.2004.03.006.
- Oomes, S. J. C. M., Jonker, M. J., Wittink, F. R. A., Hehenkamp, J. O., Breit, T. M., and Brul, S. (2009). The effect of calcium on the transcriptome of sporulating *B. subtilis* cells. *Int. J. Food Microbiol.* 133, 234–242. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2009.05.019.
- Oomes, S. J. C. M., van Zuijlen, A. C. M., Hehenkamp, J. O., Witsenboer, H., van der Vossen, J. M. B. M., and Brul, S. (2007). The characterisation of *Bacillus spores* occurring in the manufacturing of (low acid) canned products. *Int. J. Food Microbiol.* 120, 85–94. doi: 10.1016/J.IJFOODMICRO.2007.06.013.
- Ostrov, I., Paz, T., and Shemesh, M. (2019). Robust biofilm-forming *Bacillus* isolates from the dairy environment demonstrate an enhanced resistance to cleaning-in-place procedures. *Foods* 8. doi: 10.3390/foods8040134.
- Pacher, N., Burtscher, J., Johler, S., Etter, D., Bender, D., Fieseler, L., et al. (2022). Ropiness in Bread—A Re-Emerging Spoilage Phenomenon. *Foods* 11. doi: 10.3390/FOODS11193021.
- Paidhungat, M., Setlow, B., Driks, A., and Setlow, P. (2000). Characterization of spores of *Bacillus subtilis* which lack dipicolinic acid. *J. Bacteriol.* 182, 5505–5512. doi: 10.1128/JB.182.19.5505-5512.2000.
- Palmisano, G., Lendal, S. E., Engholm-Keller, K., Leth-Larsen, R., Parker, B. L., and Larsen, M. R. (2010). Selective enrichment of sialic acid-containing glycopeptides using titanium dioxide chromatography with analysis by HILIC and mass spectrometry. *Nat. Protoc.* 5, 1974–1982. doi: 10.1038/nprot.2010.167.
- Palmisano, M. M., Nakamura, L. K., Duncan, K. E., Istock, C. A., and Cohan, F. M. (2001). *Bacillus sonorensis* sp. nov., a close relative of *Bacillus licheniformis*, isolated from soil in the Sonoran Desert, Arizona. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51, 1671–1679. doi: 10.1099/00207713-51-5-1671.
- Paredes-Sabja, D., Setlow, P., and Sarker, M. R. (2011). Germination of spores of Bacillales and Clostridiales



- species: mechanisms and proteins involved. *Trends Microbiol.* 19, 85–94. doi: 10.1016/J.TIM.2010.10.004.
- Pavić, S., Brett, M., Petrić, I., Laštre, D., Smoljanović, M., Atkinson, M., et al. (2005). An outbreak of food poisoning in a kindergarten caused by milk powder containing toxigenic *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis*. *Arch. Lebensmittelhyg.* 56, 20–22.
- Pepe, O., Blaiotta, G., Moschetti, G., Greco, T., and Villani, F. (2003). Rope-Producing Strains of *Bacillus* spp. from Wheat Bread and Strategy for Their Control by Lactic Acid Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 2321. doi: 10.1128/AEM.69.4.2321-2329.2003.
- Perego, M. (2001). A new family of aspartyl phosphate phosphatases targeting the sporulation transcription factor Spo0A of *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* 42, 133–143. doi: 10.1046/J.1365-2958.2001.02611.X.
- Pereira, A. P. M., Stradiotto, G. C., Freire, L., Alvarenga, V. O., Crucello, A., Morassi, L. L. P., et al. (2020). Occurrence and enumeration of rope-producing spore forming bacteria in flour and their spoilage potential in different bread formulations. *LWT-Food Sci. Technol.* 133, 110108. doi: 10.1016/j.lwt.2020.110108.
- Pereira, K. S., Cayres, C. A., Chaves, J. Q., De Brito, J. T., Rabinovitch, L., and Vivoni, A. M. (2017). Salad dressing spoilage by *Bacillus amyloliquefaciens* with gas formation. *Brazilian J. Food Technol.* 21. doi: 10.1590/1981-6723.2517.
- Petruzzi, L., Corbo, M. R., Sinigaglia, M., and Bevilacqua, A. (2017). *Microbial Spoilage of Foods: Fundamentals*. Elsevier Ltd doi: 10.1016/B978-0-08-100502-6.00002-9.
- Pieterse, C. M. J., Zamioudis, C., Berendsen, R. L., Weller, D. M., Van Wees, S. C. M., Bakker, P. A. H. M., et al. (2014). Induced Systemic Resistance by Beneficial Microbes. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-phyto-082712-102340> 52, 347–375. doi: 10.1146/ANNUREV-PHYTO-082712-102340.
- Piggot, P. J., and Coote, J. G. (1976). Genetic aspects of bacterial endospore formation. *Bacteriol. Rev.* 40, 908. doi: 10.1128/membr.40.4.908-962.1976.
- Pilo, P., and Frey, J. (2018). Pathogenicity, population genetics and dissemination of *Bacillus anthracis*. *Infect. Genet. Evol.* 64, 115–125. doi: 10.1016/j.meegid.2018.06.024.
- Plata, G., Fuhrer, T., Hsiao, T. L., Sauer, U., and Vitkup, D. (2012). Global probabilistic annotation of metabolic networks enables enzyme discovery. *Nat. Chem. Biol.* 8, 848–854. doi: 10.1038/nchembio.1063.
- Pompeo, F., Foulquier, E., and Galinier, A. (2016). Impact of Serine/Threonine Protein Kinases on the Regulation of Sporulation in *Bacillus subtilis*. *Front. Microbiol.* 7. doi: 10.3389/FMICB.2016.00568.
- Popham, D. L., and Bernhards, C. B. (2015). Spore Peptidoglycan. *Microbiol. Spectr.* 3. doi: 10.1128/microbiolspec.TBS-0005-2012
- Pretorius, I. S., Kock, M. J. d., Britz, T. J., Potgieter, H. J., and Lategan, P. M. (1986). Numerical taxonomy of alpha-amylase producing *Bacillus* species. *J. Appl. Bacteriol.* 60, 351–360. doi: 10.1111/J.1365-2672.1986.TB01743.X.
- Priest, F. G., Goodfellow, M., Shute, L. A., and Berkeley, R. C. W. (1987). *Bacillus amyloliquefaciens* sp. nov., nom. rev. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 37, 69–71. doi: 10.1099/00207713-37-1-69.
- Priest, F. G., Goodfellow, M., and Todd, C. (1988). A numerical classification of the genus *Bacillus*. *J. Gen. Microbiol.* 134, 1847–1882. doi: 10.1099/00221287-134-7-1847.
- Radhakrishnan, R., Hashem, A., and Abd Allah, E. F. (2017). *Bacillus*: A biological tool for crop improvement through bio-molecular changes in adverse environments. *Front. Physiol.* 8. doi: 10.3389/fphys.2017.00667.
- Ramamurthi, K. S., Lecuyer, S., Stone, H. A., and Losick, R. (2009). Geometric Cue for Protein Localization in a

- Bacterium. *Science* 323, 1354. doi: 10.1126/SCIENCE.1169218.
- Ramarao, N., and Lereclus, D. (2006). Adhesion and cytotoxicity of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* to epithelial cells are FlhA and PlcR dependent, respectively. *Microbes Infect.* 8, 1483–1491. doi: 10.1016/j.micinf.2006.01.005.
- Rasimus-Sahari, S., Teplova, V. V., Andersson, M. A., Mikkola, R., Kankkunen, P., Matikainen, S., et al. (2015). The peptide toxin amylosin of *Bacillus amyloliquefaciens* from moisture-damaged buildings is immunotoxic, induces potassium efflux from mammalian cells, and has antimicrobial activity. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 2939–2949. doi: 10.1128/AEM.03430-14.
- Raso, J., Palop, A., Bayarte, M., Condón, S., and Sala, F. J. (1995). Influence of sporulation temperature on the heat resistance of a strain of *Bacillus licheniformis* (Spanish Type Culture Collection 4523). *Food Microbiol.* 12, 357–361. doi: 10.1016/S0740-0020(95)80116-2.
- Read, T. D., Peterson, S. N., Tourasse, N., Baillie, L. W., Paulsen, I. T., Nelson, K. E., et al. (2003). The genome sequence of *Bacillus anthracis* Ames and comparison to closely related bacteria. *Nature* 423, 81–86. doi: 10.1038/nature01586.
- Reder, A., Gerth, U., and Hecker, M. (2012). Integration of  $\sigma$ B Activity into the Decision-Making Process of Sporulation Initiation in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 194, 1065. doi: 10.1128/JB.06490-11.
- Redmond, C., Baillie, L. W. J., Hibbs, S., Moir, A. J. G., and Moir, A. (2004). Identification of proteins in the exosporium of *Bacillus anthracis*. *Microbiology* 150, 355–363. doi: 10.1099/MIC.0.26681-0.
- Règlement d'exécution (UE) 2015/1399 (2015). Règlement d'exécution (UE) 2015/1399. *Off. J. Eur. Union*.
- Riesenman, P. J., and Nicholson, W. L. (2000). Role of the Spore Coat Layers in *Bacillus subtilis* Spore Resistance to Hydrogen Peroxide, Artificial UV-C, UV-B, and Solar UV Radiation. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 620. doi: 10.1128/AEM.66.2.620-626.2000.
- Riley, E. P., Schwarz, C., Derman, A. I., and Lopez-Garrido, J. (2020). Milestones in *Bacillus subtilis* sporulation research. *Microb. cell (Graz, Austria)* 8. doi: 10.15698/MIC2021.01.739.
- Rini, J. M., Moremen, K. W., Davis, B. G., and Esko, J. D. (2022). Glycosyltransferases and Glycan-Processing Enzymes. *Essentials Glycobiol.* doi: 10.1101/GLYCOBIOLOGY.4E.6.
- Roberts, M. S., Nakamura, L. K., and Cohan, F. M. (1994). *Bacillus mojavensis* sp. nov., distinguishable from *Bacillus subtilis* by sexual isolation, divergence in DNA sequence, and differences in fatty acid composition. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44, 256–264. doi: 10.1099/00207713-44-2-256.
- Roberts, M. S., Nakamura, L. K., and Cohan, F. M. (1996). *Bacillus vallismortis* sp. nov., a close relative of *Bacillus subtilis*, isolated from soil in Death Valley, California. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46, 470–475. doi: 10.1099/00207713-46-2-470.
- Rodenburg, C. M., McPherson, S. A., Turnbough, C. L., and Dokland, T. (2014). Cryo-EM analysis of the organization of BclA and BxpB in the *Bacillus anthracis* exosporium. *J. Struct. Biol.* 186, 181. doi: 10.1016/J.JSB.2014.02.018.
- Roels, S., and Losick, R. (1995). Adjacent and divergently oriented operons under the control of the sporulation regulatory protein GerE in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 177, 6263–75. doi: 10.1128/jb.177.21.6263-6275.1995.
- Rooney, A. P., Price, N. P. J., Ehrhardt, C., Sewzey, J. L., and Bannan, J. D. (2009). Phylogeny and molecular taxonomy of the *Bacillus subtilis* species complex and description of *Bacillus subtilis* subsp. inaquosorum

- subsp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59, 2429–2436. doi: 10.1099/ijss.0.009126-0.
- Rose, R., Setlow, B., Monroe, A., Mallozzi, M., Driks, A., and Setlow, P. (2007). Comparison of the properties of *Bacillus subtilis* spores made in liquid or on agar plates. *J. Appl. Microbiol.* 103, 691–699. doi: 10.1111/j.1365-2672.2007.03297.x.
- Ruiz-García, C., Béjar, V., Martínez-Checa, F., Llamas, I., and Quesada, E. (2005a). *Bacillus velezensis* sp. nov., a surfactant-producing bacterium isolated from the river Vélez in Málaga, southern Spain. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55, 191–195. doi: 10.1099/IJS.0.63310-0.
- Ruiz-García, C., Quesada, E., Martínez-Checa, F., Llamas, I., Urdaci, M. C., and Béjar, V. (2005b). *Bacillus axarquiensis* sp. nov. and *Bacillus malacitensis* sp. nov., isolated from river-mouth sediments in southern Spain. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55, 1279–1285. doi: 10.1099/IJS.0.63567-0.
- Ryan, P. A., Macmillan, J. D., and Zilinskas, B. A. (1997). Molecular cloning and characterization of the genes encoding the L1 and L2 components of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. *J. Bacteriol.* 179, 2551–2556. doi: 10.1128/jb.179.8.2551-2556.1997.
- Salah Ud-Din, A. I. M., and Roujeinikova, A. (2018). Flagellin glycosylation with pseudaminic acid in *Campylobacter* and *Helicobacter*: prospects for development of novel therapeutics. *Cell. Mol. Life Sci.* 75, 1163–1178. doi: 10.1007/S00018-017-2696-5.
- Saleh-Lakha, S., Leon-Velarde, C. G., Chen, S., Lee, S., Shannon, K., Fabri, M., et al. (2017). A study to assess the numbers and prevalence of *Bacillus cereus* and its toxins in pasteurized fluid milk. *J. Food Prot.* 80, 1085–1089. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-16-521.
- Salkinoja-Salonen, M. S., Vuorio, R., Andersson, M. A., Kämpfer, P., Andersson, M. C., Honkanen-Buzalski, T., et al. (1999). Toxigenic Strains of *Bacillus licheniformis* Related to Food Poisoning. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 4637. doi: 10.1128/aem.65.10.4637-4645.1999.
- Schirm, M., Soo, E. C., Aubry, A. J., Austin, J., Thibault, P., and Logan, S. M. (2003). Structural, genetic and functional characterization of the flagellin glycosylation process in *Helicobacter pylori*. *Mol. Microbiol.* 48, 1579–1592. doi: 10.1046/j.1365-2958.2003.03527.x.
- Schmidt, R., Margolis, P., Duncan, L., Coppolecchia, R., Moran, C. P., and Losick, R. (1990). Control of developmental transcription factor sigma F by sporulation regulatory proteins SpoIIAA and SpoIIAB in *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, 9221. doi: 10.1073/PNAS.87.23.9221.
- Schoenhofen, I. C., McNally, D. J., Brisson, J. R., and Logan, S. M. (2006a). Elucidation of the CMP-pseudaminic acid pathway in *Helicobacter pylori*: Synthesis from UDP-N-acetylglucosamine by a single enzymatic reaction. *Glycobiology* 16. doi: 10.1093/GLYCOB/CWL010.
- Schoenhofen, I. C., McNally, D. J., Vinogradov, E., Whitfield, D., Young, N. M., Dick, S., et al. (2006b). Functional characterization of dehydratase/aminotransferase pairs from *Helicobacter* and *Campylobacter*: Enzymes distinguishing the pseudaminic acid and bacillosamine biosynthetic pathways. *J. Biol. Chem.* 281, 723–732. doi: 10.1074/jbc.M511021200.
- Schoenhofen, I. C., Vinogradov, E., Whitfield, D. M., Brisson, J. R., and Logan, S. M. (2009). The CMP-legionaminic acid pathway in *Campylobacter*: Biosynthesis involving novel GDP-linked precursors. *Glycobiology* 19, 715–725. doi: 10.1093/GLYCOB/CWP039.
- Seong, C. N., Kang, J. W., Lee, J. H., Seo, S. Y., Woo, J. J., Park, C., et al. (2018). Taxonomic hierarchy of the phylum Firmicutes and novel Firmicutes species originated from various environments in Korea. *J.*

- Microbiol.* 56, 1–10. doi: 10.1007/s12275-018-7318-x.
- Setlow, B., Atluri, S., Kitchel, R., Koziol-Dube, K., and Setlow, P. (2006). Role of Dipicolinic Acid in Resistance and Stability of Spores of *Bacillus subtilis* with or without DNA-Protective  $\alpha/\beta$ -Type Small Acid-Soluble Proteins. *J. Bacteriol.* 188, 3740. doi: 10.1128/JB.00212-06.
- Setlow, B., and Setlow, P. (1995). Small, Acid-Soluble Proteins Bound to DNA Protect *Bacillus subtilis* Spores from Killing by Dry Heat. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 2787–2790.
- Setlow, B., and Setlow, P. (1996). Role of DNA repair in *Bacillus subtilis* spore resistance. *J. Bacteriol.* 178, 3486. doi: 10.1128/JB.178.12.3486-3495.1996.
- Setlow, P. (1992). DNA in dormant spores of *Bacillus* species is in an A-like conformation. *Mol. Microbiol.* 6, 563–567. doi: 10.1111/J.1365-2958.1992.TB01501.X.
- Setlow, P. (2001). Resistance of spores of *Bacillus* species to ultraviolet light. *Environ. Mol. Mutagen.* 38, 97–104. doi: 10.1002/EM.1058.
- Setlow, P. (2014a). Germination of spores of *Bacillus* species: What we know and do not know. *J. Bacteriol.* 196, 1297–1305. doi: 10.1128/JB.01455-13
- Setlow, P. (2014b). Spore Resistance Properties. *Microbiol. Spectr.* 2. doi: 10.1128/microbiolspec.tbs-0003-2012.
- Setlow, P., and Christie, G. (2020). Bacterial Spore mRNA – What’s Up With That? *Front. Microbiol.* 11, 596092. doi: 10.3389/FMICB.2020.596092.
- Severson, K. M., Mallozzi, M., Bozue, J., Welkos, S. L., Cote, C. K., Knight, K. L., et al. (2009). Roles of the *Bacillus anthracis* spore protein ExsK in exosporium maturation and germination. *J. Bacteriol.* 191, 7587–7596. doi: 10.1128/JB.01110-09.
- Shafikhani, S. H., and Leighton, T. (2004). AbrB and Spo0E Control the Proper Timing of Sporulation in *Bacillus subtilis*. *Curr. Microbiol.* 2004 484 48, 262–269. doi: 10.1007/S00284-003-4186-2.
- Shaheen, R., Svensson, B., Andersson, M. A., Christiansson, A., and Salkinoja-Salonen, M. (2010). Persistence strategies of *Bacillus cereus* spores isolated from dairy silo tanks. *Food Microbiol.* 27, 347–355. doi: 10.1016/j.fm.2009.11.004.
- Shannon, J. G., Ross, C. L., Koehler, T. M., and Rest, R. F. (2003). Characterization of anthrolysin O, the *Bacillus anthracis* cholesterol-dependent cytolysin. *Infect. Immun.* 71, 3183–3189. doi: 10.1128/IAI.71.6.3183-3189.2003.
- Sharma, C., Devki, Gupta, V., Neelam, D., and Rahi, R. K. (2021). Spore Forming Bacteria Responsible for Food Spoilage: A Review. *Asian J. Dairy Food Res.* 40, 197–205. doi: 10.18805/ajdfr.DR-1626.
- Sharma, M., and Anand, S. K. (2002). Characterization of constitutive microflora of biofilms in dairy processing lines. *Food Microbiol.* 19, 627–636. doi: 10.1006/FMIC.2002.0472.
- Sharma, S., Bhatnagar, R., and Gaur, D. (2020). *Bacillus anthracis* Poly- $\gamma$ -D-Glutamate Capsule Inhibits Opsonic Phagocytosis by Impeding Complement Activation. *Front. Immunol.* 11. doi: 10.3389/fimmu.2020.00462.
- Sharma, V. K. (2012). Reactive Oxygen Species. *Oxid. Amin. Acids, Pept. Proteins*, 122–204. doi: 10.1002/9781118482469.CH4.
- Shemesh, M., and Ostrov, I. (2020). Role of *Bacillus* species in biofilm persistence and emerging antibiofilm strategies in the dairy industry. *J. Sci. Food Agric.* 100, 2327–2336. doi: 10.1002/jsfa.10285.
- Shinagawa, K., Ueno, Y., Hu, D., Ueda, S., and Sugii, S. (1996). Mouse lethal activity of a hep-2 vacuolation factor, cereulide, produced by *Bacillus cereus* isolated from vomiting-type food poisoning. *J. Vet. Med. Sci.*

- 58, 1027–1029. doi: 10.1292/jvms.58.10\_1027.
- Shornikov, A., Tran, H., Macias, J., Halavaty, A. S., Minasov, G., Anderson, W. F., et al. (2017). Structure of the *Bacillus anthracis* dTDP-l-rhamnose-biosynthetic enzyme dTDP-4-dehydrorhamnose 3,5-epimerase (RfbC). *Acta Crystallogr. Sect. F, Struct. Biol. Commun.* 73, 664. doi: 10.1107/S2053230X17015849.
- Shuster, B., Khemmani, M., Abe, K., Huang, X., Nakaya, Y., Maryn, N., et al. (2019a). Contributions of crust proteins to spore surface properties in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* 111, 825–843. doi: 10.1111/mmi.14194.
- Shuster, B., Khemmani, M., Nakaya, Y., Holland, G., Iwamoto, K., Abe, K., et al. (2019b). Expansion of the spore surface polysaccharide layer in *Bacillus subtilis* by deletion of genes encoding glycosyltransferases and glucose modification enzymes. *J. Bacteriol.* 201. doi: 10.1128/JB.00321-19.
- Sicuia, A. O., Constantinescu, F., and Cornea, C.-P. (2015). Biodiversity of *Bacillus subtilis* group and beneficial traits of *Bacillus species* useful in plant protection. *Rom. Biotechnol. Lett.* 20, 10737–10750.
- Simmonds, P., Mossel, B. L., Intaraphan, T., and Deeth, H. C. (2003). Heat Resistance of *Bacillus* Spores When Adhered to Stainless Steel and Its Relationship to Spore Hydrophobicity. *J. Food Prot.* 66.
- Smith, C. A., Toogood, H. S., Baker, H. M., Daniel, R. M., and Baker, E. N. (1999). Calcium-mediated thermostability in the subtilisin superfamily: the crystal structure of *Bacillus* Ak.1 protease at 1.8 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 294, 1027–1040. doi: 10.1006/JMBI.1999.3291.
- Soni, A., Oey, I., Silcock, P., and Bremer, P. (2016). *Bacillus* Spores in the Food Industry: A Review on Resistance and Response to Novel Inactivation Technologies. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 15, 1139–1148. doi: 10.1111/1541-4337.12231.
- Stewart, G. C. (2015). The Exosporium Layer of Bacterial Spores: a Connection to the Environment and the Infected Host. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 79, 437–457. doi: 10.1128/mmbr.00050-15.
- Stier, P., Kulozik, U., Belén, A., and Diana, M. (2020). Effect of Sporulation Conditions Following Submerged Cultivation on the Resistance of *Bacillus atrophaeus* Spores against Inactivation by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Mol.* 2020, Vol. 25, Page 2985 25, 2985. doi: 10.3390/MOLECULES25132985.
- Sulzenbacher, G., Roig-Zamboni, V., Lebrun, R., Guérardel, Y., Murat, D., Mansuelle, P., et al. (2018). Glycosylate and move! The glycosyltransferase Maf is involved in bacterial flagella formation. *Environ. Microbiol.* 20, 228–240. doi: 10.1111/1462-2920.13975.
- Svensson, B. (1994). Protein engineering in the  $\alpha$ -amylase family: catalytic mechanism, substrate specificity, and stability. *Plant Mol. Biol.* 1994 252 25, 141–157. doi: 10.1007/BF00023233.
- Swoboda, J. G., Campbell, J., Meredith, T. C., and Walker, S. (2010). Wall Teichoic Acid Function, Biosynthesis, and Inhibition. *Chembiochem* 11, 35. doi: 10.1002/CBIC.200900557.
- Sylvestre, P., Couture-Tosi, E., and Mock, M. (2003). Polymorphism in the collagen-like region of the *Bacillus anthracis* BclA protein leads to variation in exosporium filament length. *J. Bacteriol.* 185, 1555–1563. doi: 10.1128/JB.185.5.1555-1563.2003.
- Sylvestre, P., Couture-Tosi, E., and Mock, M. (2005). Contribution of ExsFA and ExsFB proteins to the localization of BclA on the spore surface and to the stability of the *Bacillus anthracis* exosporium. *J. Bacteriol.* 187, 5122–5128. doi: 10.1128/JB.187.15.5122-5128.2005.
- Tabei, S. M. B., Hitchen, P. G., Day-Williams, M. J., Merino, S., Vart, R., Pang, P. C., et al. (2009). An *Aeromonas caviae* Genomic Island Is Required for both O-Antigen Lipopolysaccharide Biosynthesis and Flagellin

- Glycosylation. *J. Bacteriol.* 191, 2851. doi: 10.1128/JB.01406-08.
- Tan, I. S., and Ramamurthi, K. S. (2014). Spore formation in *Bacillus subtilis*. *Environ. Microbiol. Rep.* 6, 212. doi: 10.1111/1758-2229.12130.
- Tarbouriech, N., Charnock, S. J., and Davies, G. J. (2001). Three-dimensional structures of the Mn and Mg dTDP complexes of the family GT-2 glycosyltransferase SpsA: a comparison with related NDP-sugar glycosyltransferases. *J. Mol. Biol.* 314, 655–661. doi: 10.1006/JMBI.2001.5159.
- Tauveron, G., Slomianny, C., Henry, C., and Faille, C. (2006). Variability among *Bacillus cereus* strains in spore surface properties and influence on their ability to contaminate food surface equipment. *Int. J. Food Microbiol.* 110, 254–262. doi: 10.1016/J.IJFOODMICRO.2006.04.027.
- Techer, C., Jan, S., Thierry, A., Maillard, M. B., Grosset, N., Galet, O., et al. (2020). Identification of the bacteria and their metabolic activities associated with the microbial spoilage of custard cream desserts. *Food Microbiol.* 86, 103317. doi: 10.1016/J.FM.2019.103317.
- Thibault, P., Logan, S. M., Kelly, J. F., Brisson, J. R., Ewing, C. P., Trust, T. J., et al. (2001). Identification of the Carbohydrate Moieties and Glycosylation Motifs in *Campylobacter jejuni* Flagellin. *J. Biol. Chem.* 276, 34862–34870. doi: 10.1074/JBC.M104529200.
- Thompson, J. M., Dodd, C. E. R., and Waites, W. M. (1993). Spoilage of bread by *Bacillus*. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 32, 55–66. doi: 10.1016/0964-8305(93)90039-5.
- Tojo, S., Matsunaga, M., Matsumoto, T., Kang, C. M., Yamaguchi, H., Asai, K., et al. (2003). Organization and Expression of the *Bacillus subtilis* sigY Operon. *J. Biochem.* 134, 935–946. doi: 10.1093/jb/mvg225.
- Tomek, M. B., Janesch, B., Maresch, D., Windwarder, M., Altmann, F., Messner, P., et al. (2017). A pseudaminic acid or a legionaminic acid derivative transferase is strain-specifically implicated in the general protein O-glycosylation system of the periodontal pathogen *Tannerella forsythia*. *Glycobiology* 27, 555. doi: 10.1093/GLYCOB/CWX019.
- Turner, W. C., Kausrud, K. L., Krishnappa, Y. S., Cromsigt, J. P. G. M., Ganz, H. H., Mapaure, I., et al. (2014). Fatal attraction: vegetation responses to nutrient inputs attract herbivores to infectious anthrax carcass sites. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 281, 20141785. doi: 10.1098/rspb.2014.1785.
- Tweten, R. K., Hotze, E. M., and Wade, K. R. (2015). The Unique Molecular Choreography of Giant Pore Formation by the Cholesterol-Dependent Cytolysins of Gram-Positive Bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 69, 323–340. doi: 10.1146/annurev-micro-091014-104233.
- Ursem, R., Swarge, B., Abhyankar, W. R., Buncherd, H., De Koning, L. J., Setlow, P., et al. (2021). Identification of native cross-links in *Bacillus subtilis* spore coat proteins. *J. Proteome Res* 20, 1809–1816. doi: 10.1021/acs.jproteome.1c00025.
- US-EPA (n.d.). International Efforts on Wasted Food Recovery | US EPA. Available at: <https://www.epa.gov/international-cooperation/international-efforts-wasted-food-recovery> [Accessed August 6, 2022].
- Vaičiulytė-Funk, L., Žvirdauskienė, R., Šalomskienė, J., and Šarkinas, A. (2015). The effect of wheat bread contamination by the *Bacillus* genus bacteria on the quality and safety of bread. *Zemdirbyste-Agriculture* 102, 351–358. doi: 10.13080/z-a.2015.102.045.
- Valerio, F., De Bellis, P., Di Biase, M., Lonigro, S. L., Giussani, B., Visconti, A., et al. (2012). Diversity of spore-forming bacteria and identification of *Bacillus amyloliquefaciens* as a species frequently associated with the

- ropy spoilage of bread. *Int. J. Food Microbiol.* 156, 278–285. doi: 10.1016/J.IJFOODMICRO.2012.04.005.
- Valerio, F., Di Biase, M., Huchet, V., Desriac, N., Lonigro, S. L., Lavermicocca, P., et al. (2015). Comparison of three *Bacillus amyloliquefaciens* strains growth behaviour and evaluation of the spoilage risk during bread shelf-life. *Food Microbiol.* 45, 2–9. doi: 10.1016/j.fm.2014.07.006.
- van Loosdrecht, M. C. M., Lyklema, J., Norde, W., and Zehnder, A. J. B. (1989). Bacterial adhesion: A physicochemical approach. *Microb. Ecol.* 1989 171 17, 1–15. doi: 10.1007/BF02025589.
- van Oss, C. J. (1995). Hydrophobicity of biosurfaces - Origin, quantitative determination and interaction energies. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 5, 91–110. doi: 10.1016/0927-7765(95)01217-7.
- Vepachedu, V. R., and Setlow, P. (2007). Role of SpoVA Proteins in Release of Dipicolinic Acid during Germination of *Bacillus subtilis* Spores Triggered by Dodecylamine or Lysozyme. *J. Bacteriol.* 189, 1565. doi: 10.1128/JB.01613-06.
- Vilain, S., Luo, Y., Hildreth, M. B., and Brözel, V. S. (2006). Analysis of the Life Cycle of the Soil Saprophyte *Bacillus cereus* in Liquid Soil Extract and in Soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 4970. doi: 10.1128/AEM.03076-05.
- Vishnoi, M., Narula, J., Devi, S. N., Dao, H. A., Igoshin, O. A., and Fujita, M. (2013). Triggering sporulation in *Bacillus subtilis* with artificial two-component systems reveals the importance of proper Spo0A activation dynamics. *Mol. Microbiol.* 90, 181–194. doi: 10.1111/MMI.12357/SUPPINFO.
- Vithani, N., Bais, V., and Prakash, B. (2014). GlmU (N-acetylglucosamine-1-phosphate uridyltransferase) bound to three magnesium ions and ATP at the active site. *Acta Crystallogr. Sect. F, Struct. Biol. Commun.* 70, 703. doi: 10.1107/S2053230X14008279.
- Vittoria, M., Saggese, A., Di Gregorio Barletta, G., Castaldi, S., Istatico, R., Baccigalupi, L., et al. (2023). Sporulation efficiency and spore quality in a human intestinal isolate of *Bacillus cereus*. *Res. Microbiol.*, 104030. doi: 10.1016/J.RESMIC.2023.104030.
- Waller, L. N., Fox, N., Fox, K. F., Fox, A., and Price, R. L. (2004). Ruthenium red staining for ultrastructural visualization of a glycoprotein layer surrounding the spore of *Bacillus anthracis* and *Bacillus subtilis*. *J. Microbiol. Methods* 58, 23–30. doi: 10.1016/J.MIMET.2004.02.012.
- Wang, H., Sodagari, M., Chen, Y., He, X., Newby, B. Z., and Ju, L.-K. (2011). Initial bacterial attachment in slow flowing systems: Effects of cell and substrate surface properties. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 87, 415–422.
- Wang, L. T., Lee, F. L., Tai, C. J., and Kasai, H. (2007a). Comparison of *gyrB* gene sequences, 16S rRNA gene sequences and DNA-DNA hybridization in the *Bacillus subtilis* group. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57, 1846–1850. doi: 10.1099/ijms.0.64685-0.
- Wang, L. T., Lee, F. L., Tai, C. J., Yokota, A., and Kuo, H. P. (2007b). Reclassification of *Bacillus axarquiensis* Ruiz-Garcia et al. 2005 and *Bacillus malacitensis* Ruiz-Garcia et al. 2005 as later heterotypic synonyms of *Bacillus mojavensis* Roberts et al. 1994. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57, 1663–1667. doi: 10.1099/IJS.0.64808-0.
- West, A. W., Burges, H. D., Dixon, T. J., and Wyborn, C. H. (1985). Survival of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus* spore inocula in soil: Effects of pH, moisture, nutrient availability and indigenous microorganisms. *Soil Biol. Biochem.* 17, 657–665. doi: 10.1016/0038-0717(85)90043-4.
- Wiencek, K. M., Klapes, N. A., and Foegeding, P. M. (1990). Hydrophobicity of *Bacillus* and *Clostridium* spores.

- Appl. Environ. Microbiol.* 56, 2600–2605. doi: 10.1128/AEM.56.9.2600-2605.1990.
- Wu, J. J., Howard, M. G., and Piggot, P. J. (1989). Regulation of transcription of the *Bacillus subtilis spoIIA* locus. *J. Bacteriol.* 171, 692. doi: 10.1128/JB.171.2.692-698.1989.
- Yang, H., Liu, L., Shin, H. D., Chen, R. R., Li, J., Du, G., et al. (2013). Structure-based engineering of histidine residues in the catalytic domain of  $\alpha$ -amylase from *Bacillus subtilis* for improved protein stability and catalytic efficiency under acidic conditions. *J. Biotechnol.* 164, 59–66. doi: 10.1016/J.JBIOTECH.2012.12.007.
- Yang, K. Y., Kao, C. Y., Su, M. S. W., Wang, S., Chen, Y. L., Hu, S. T., et al. (2021). Glycosyltransferase Jhp0106 (PseE) contributes to flagellin maturation in *Helicobacter pylori*. *Helicobacter* 26, e12787. doi: 10.1111/HEL.12787.
- Yang, Y., Pollard, A. M., Höfler, C., Poschet, G., Wirtz, M., Hell, R., et al. (2015). Relation between chemotaxis and consumption of amino acids in bacteria. *Mol. Microbiol.* 96, 1272–1282. doi: 10.1111/mmi.13006.
- Yu, W. B., Gao, S. H., Yin, C. Y., Zhou, Y., and Ye, B. C. (2011). Comparative Transcriptome Analysis of *Bacillus subtilis* Responding to Dissolved Oxygen in Adenosine Fermentation. *PLoS One* 6. doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0020092.
- Zeigler, D., and Perkins, J. (2008). The Genus *Bacillus*. doi: 10.1201/9781420009330.ch24.
- Zenewicz, L. A., Wei, Z., Goldfine, H., and Shen, H. (2005). Phosphatidylinositol-Specific Phospholipase C of *Bacillus anthracis* Down-Modulates the Immune Response . *J. Immunol.* 174, 8011–8016. doi: 10.4049/jimmunol.174.12.8011.
- Zhang, J., Fitz-James, P. C., and Aronson, A. I. (1993). Cloning and characterization of a cluster of genes encoding polypeptides present in the insoluble fraction of the spore coat of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 175, 3757–3766. doi: 10.1128/JB.175.12.3757-3766.1993.
- Zhang, N., Yang, D., Kendall, J. R. A., Borriss, R., Druzhinina, I. S., Kubicek, C. P., et al. (2016). Comparative genomic analysis of *Bacillus amyloliquefaciens* and *Bacillus subtilis* reveals evolutionary traits for adaptation to plant-associated habitats. *Front. Microbiol.* 7. doi: 10.3389/fmicb.2016.02039.
- Zhang, Z., Bulloch, E. M. M., Bunker, R. D., Baker, E. N., and Squire, C. J. (2009). Structure and function of GlmU from *Mycobacterium tuberculosis*. *urn:issn:0907-4449* 65, 275–283. doi: 10.1107/S0907444909001036.



## Valorisations scientifiques

### Articles

The *sps* Genes Encode an Original Legionaminic Acid Pathway Required for Crust Assembly in *Bacillus subtilis*. Dubois T, Krzewinski F, Yamakawa N, Lemy C, **Hamiot A**, Brunet L, Lacoste AS, Knirel Y, Guerardel Y, Faille C. **mBio**. 2020. PMID: **32817102** PMCID: [PMC7439481](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32817102/) DOI: [10.1128/mBio.01153-20](https://doi.org/10.1128/mBio.01153-20)

Sporulation conditions influence surface and adhesion properties of *Bacillus subtilis* spores. **Hamiot A**, Lemy C, Krzewinski F, Faille C, Dubois T. *Front. Microbiol.* 14:1219581. DOI: [10.3389/fmicb.2023.1219581](https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1219581)

### Congrès

Congrès National BIOADH 21. Effect of divalent cation deficiency during sporulation on surfaces properties of the spores in *Bacillus subtilis*. **Hamiot A**, Lemy C, F, Faille C, Dubois T. Mars 2021

### Encadrement d'étudiants

Melle. Amélie Lecomte : Stage de BTS Bioanalyses et Contrôles, 2<sup>e</sup> année, 8 semaines

Melle. Océane Gomez : Stage de BTS Bioanalyses et Contrôles, 2<sup>e</sup> année, 8 semaines

Melle. Aya El Deghedy : Stage de M2 Innovation en Biotechnologie Végétale, Enzymatique et Microbienne. 6 mois

## **Crust des spores de *Bacillus subtilis*. Voies de biosynthèse et influence des conditions de sporulation sur sa structure et les propriétés de surface des spores.**

**Résumé :** Les *Bacillus subtilis* sont des bactéries sporulantes responsables de contamination récurrentes au sein des industries agro-alimentaires. La capacité des spores de *B. subtilis* à résister à des conditions environnementales extrêmes et à adhérer aux surfaces explique la persistance de ces bactéries au sein des installations des chaînes de transformation. Chez *B. subtilis*, les spores sont constituées de couches concentriques et la couche la plus externe correspond au crust. Le crust est composé de protéines et de glycanes et confère aux spores leur propriétés de surface et d'adhésion. Dans cette étude nous nous sommes intéressés aux gènes impliqués dans la biosynthèse des glycanes du crust. Nous avons mis en évidence que les gènes *spsM* et *spsCDEFG* codent les enzymes formant la voie de biosynthèse de l'acide legionaminique (Leg), un acide nonulosonique nécessaire au bon assemblage du crust. En absence de Leg, les spores sont plus hydrophobes, plus adhérentes et moins chargées à leur surface. Nous avons également montré que les gènes *cgeB* et *cgeD* codent des glycosyltransférases putatives impliquées dans la formation du crust. En leur absence les spores sont plus hydrophobes et plus adhérentes. Le crust des spores de ces mutants contient moins de rhamnose et d'acide legionaminique. Le second objectif de cette étude se porte sur l'effet des conditions de sporulations sur les propriétés de surface et d'adhésion des spores. Ainsi, nous avons montré qu'une carence en cation divalents, une faible oxygénation, la présence d'agents oxydants ou un environnement acide lors de la sporulation entraînent la production de spores plus adhérentes et plus hydrophobes. La présence d'agents oxydants et un pH acide lors de la sporulation semblent affecter la composition et/ou la structure de la partie protéique du crust. La carence en cations divalents et principalement associée à une diminution d'une partie des glycanes du crust. Enfin, une faible oxygénation lors de la sporulation entraîne la perte d'une partie des glycanes et des protéines du crust. L'ensemble de ces travaux permettent de mieux décrire la composition et la structure du crust des spores de *B. subtilis* et de mettre en évidence le rôle clé des glycanes du crust dans les propriétés de surface et d'adhésion des spores. L'impact des conditions de sporulation sur ces propriétés pourrait de plus expliquer les problèmes de contaminations récurrentes liées à ces bactéries au sein des industries agroalimentaires.

**Mots Clés :** *Bacillus subtilis*, spore, crust, acide legionaminique, surface, adhésion, conditions de sporulation.

**Abstract:** *Bacillus subtilis* are spore-forming bacteria responsible for recurrent contamination in the food industry. The ability of *B. subtilis* spores to resist extreme environmental conditions and to adhere to surfaces explains the persistence of these bacteria in processing plants. In *B. subtilis* the spores consist of a series of concentric layers and the outermost layer is the crust. The crust is composed of proteins and glycans and gives the spores their surface and adhesion properties. In this study we investigated the genes involved in the crust glycans biosynthesis. We have shown that the *spsM* and *spsCDEFG* genes encode the enzymes forming the biosynthesis pathway of legionaminic acid (Leg), a nonulosonic acid necessary for the crust assembly. In absence of Leg, spores are more hydrophobic, more adherent and less charged on their surface. We also demonstrated that the genes *cgeB* and *cgeD* encode putative glycosyltransferases involved in crust biosynthesis. In their absence spores are more hydrophobic and adherent. The spore crust of these mutants contains less rhamnose and legionaminic acid. The second objective of this study is to investigate the effect of sporulation conditions on the surface and adhesion properties of spores. Thus, we have shown that a depletion in divalent cation, a lower oxygen availability, the presence of oxidizing agents or an acidic environment during sporulation lead to the production of more adherent and hydrophobic spores. The presence of oxidizing agents and an acidic pH during sporulation seem to affect the composition and/or structure of the protein part of the crust. The depletion of divalent cation is mainly associated with a loss of a part of the glycan of the crust. Finally, a low oxygenation during sporulation leads to the loss of part of the glycanes and proteins of the crust. These results provide new information regarding the composition and structure of the crust of *B. subtilis* spores and highlight the key role of crust glycans in the surface and adhesion properties of spores. The impact of sporulation conditions on these properties could also explain the recurrent contamination problems linked to these bacteria in the food industry.

**Key words:** *Bacillus subtilis*, spore, crust, legionaminic acid, surface, adhesion, sporulation conditions.