



**HAL**  
open science

# Etude d'une voie de survie alternative à la sporulation contribuant à la persistance de *Bacillus thuringiensis* dans le cadavre de son hôte

Hasna Toukabri

## ► To cite this version:

Hasna Toukabri. Etude d'une voie de survie alternative à la sporulation contribuant à la persistance de *Bacillus thuringiensis* dans le cadavre de son hôte. Microbiologie et Parasitologie. Université Paris-Saclay, 2022. Français. NNT : 2022UPASB047 . tel-03942650

**HAL Id: tel-03942650**

**<https://pastel.hal.science/tel-03942650>**

Submitted on 17 Jan 2023

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

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

Etude d'une voie de survie alternative à la  
sporulation contribuant à la persistance de  
*Bacillus thuringiensis* dans le cadavre de son hôte

*Study of an alternative survival pathway to sporulation contributing to  
the persistence of Bacillus thuringiensis in the cadaver of its host*

**Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay**

École doctorale n° 581 : agriculture, alimentation, biologie,  
environnement et santé (ABIES)  
Spécialité de doctorat : Microbiologie  
Graduate School : Biosphera. Référent : AgroParisTech

Thèse préparée dans l'unité de recherche **Micalis Institute** (Université Paris-Saclay, INRAE,  
AgroParisTech), sous la direction de **Leyla SLAMTI**, Chargée de recherche (HDR)

**Thèse soutenue à Paris-Saclay, le 11 juillet 2022, par**

**Hasna TOUKABRI**

**Composition du Jury**

<b>Pascale SERROR</b> Directrice de Recherche, INRAE (Université Paris-Saclay)	Présidente
<b>Julien BRILLARD</b> Chargé de Recherche (HDR), INRAE (Centre Occitanie-Montpellier)	Rapporteur & Examineur
<b>Véronique BROUSSOLLE</b> Directrice de Recherche, INRAE (Centre PACA)	Rapporteur & Examinatrice
<b>Giulia MANINA</b> Chargée de Recherche (HDR), Institut Pasteur Paris	Examinatrice
<b>Ivan MATIC</b> Directeur de Recherche, INSERM Institut Cochin (Université Paris Cité)	Examineur
<b>Leyla SLAMTI</b> Chargée de Recherche (HDR), INRAE (Université Paris-Saclay)	Directrice de thèse

**Titre : Etude d'une voie de survie alternative à la sporulation contribuant à la persistance de *Bacillus thuringiensis* dans le cadavre de son hôte**

**Mots clés :** *Bacillus thuringiensis*, *Galleria mellonella*, survie à long terme, adaptation, infection, cadavre d'insecte

**Résumé :** *Bacillus thuringiensis* (Bt) est une bactérie entomopathogène appartenant au groupe Firmicutes sporulants *Bacillus cereus sensu lato*. Ce groupe comprend entre autres *Bacillus cereus sensu stricto*, responsable de toxi-infections alimentaires ou encore *Bacillus anthracis*, responsable de la maladie du charbon.

Bt est capable de réaliser un cycle d'infection complet chez son hôte, ici la larve de l'insecte *Galleria mellonella*, fausse teigne de la cire. Bt tue son hôte, survit dans son cadavre et sporule, en activant séquentiellement des gènes de virulence, de nécrotrophisme et de sporulation (processus aboutissant à la formation de spores, formes cellulaires déshydratées dormantes et résistantes aux conditions défavorables). Néanmoins, la population bactérienne isolée des cadavres d'insectes est hétérogène et des cellules non-sporulantes, capables de survivre dans un état physiologique inconnu, ont été identifiées.

Ces travaux présentent la caractérisation de ces bactéries à l'aide de méthodes de génétique moléculaire et d'imagerie cellulaire ainsi que d'une analyse transcriptomique par RNA-Seq.

Les résultats démontrent que ces cellules sont transitoirement nécrotrophes, puis qu'elles subissent un ralentissement métabolique tout en restant viables et particulièrement adaptées à l'environnement du cadavre d'insecte au moins jusqu'à 14 jours post-infection. Par ailleurs, le RNA-Seq révèle que de nombreux gènes exprimés lors de la survie de Bt dans le cadavre de son hôte, sont impliqués dans l'homéostasie du fer ou encore dans la réponse au stress oxydatif. Ces derniers sont plus particulièrement exprimés au cours de la phase tardive de survie dans le cadavre de l'insecte.

Cette étude est la première caractérisant l'état physiologique à long terme de Bt lors d'une infection. Elle met en évidence l'existence d'une voie de persistance alternative à la sporulation et montre l'adaptation de ces bactéries au cadavre de l'insecte, un environnement particulier et méconnu.

**Title : Study of an alternative survival pathway to sporulation contributing to the persistence of *Bacillus thuringiensis* in the cadaver of its host**

**Keywords :** *Bacillus thuringiensis*, *Galleria mellonella*, long-term survival, adaptation, infection, insect cadaver

**Abstract:** *Bacillus thuringiensis* (Bt) is an entomopathogenic bacterium belonging to the group of spore-forming Firmicutes *Bacillus cereus sensu lato*. This group includes *Bacillus cereus sensu stricto*, responsible for food-borne infections, and *Bacillus anthracis*, the agent of anthrax.

Bt is able to complete a full developmental infection cycle in its host, here the larva of the *Galleria mellonella* wax moth. Bt kills its host, survives in its cadaver and forms spores (dehydrated cell forms that are extremely resistant to harsh environmental conditions), by sequentially activating virulence, necrotrophism and sporulation genes. However, the Bt population isolated from insect cadavers is heterogeneous and non-sporulating cells able to survive in an unknown physiological state were identified.

This work presents the characterization of these bacteria using molecular genetics and cell imaging methods as well as a transcriptomic analysis by RNA-Seq.

The results show that these cells are transiently necrotrophic, then undergo a metabolic slowdown while remaining viable and particularly adapted to the environment of the insect cadaver until at least 14 days post-infection. Furthermore, RNA-Seq revealed that many genes expressed during Bt survival in the cadaver of its host are involved in iron homeostasis or in the response to oxidative stress. The latter are particularly expressed during the late phase of survival in the insect cadaver.

This is the first study characterizing the long-term physiological state of Bt during infection. It highlights the existence of a persistence pathway alternative to sporulation and shows the adaptation of these bacteria to the insect cadaver, a particular and poorly characterized environment.

# REMERCIEMENTS

---

*Cette thèse fut un périple merveilleux, parfois éprouvant, mais toujours heureux. J'arrive à destination et je le dois :*

## **Aux membres du jury,**

Je vous remercie de me faire l'honneur d'évaluer mon travail, Julien Brillard et Véronique Broussolle en tant que rapporteurs, Giulia Manina, Ivan Matic et Pascale Serror en tant qu'examinateurs. Le temps étant l'une des ressources les plus précieuses d'un chercheur, je vous exprime ma vive gratitude de m'en accorder.

## **A ma directrice de thèse,**

Leyla, un grand merci pour ta confiance. Tu m'as tant appris, avec beaucoup de pédagogie, de rigueur, de patience, de douceur et de gentillesse, je t'en serai éternellement reconnaissante. Tu as toujours été là, tout en me laissant une grande liberté. J'ai été ravie de travailler avec toi et tu vas me manquer. Ce paragraphe pourrait être interminable, mais tu sais ce que je pense de toi et combien je t'apprécie. Merci infiniment pour tout.

## **A mon comité de thèse,**

Elena Bidnenko et Giulia Manina, je vous remercie chaleureusement pour tous vos précieux conseils.

## **Aux membres du laboratoire GME,**

Mes choubidous, je vous adore, merci d'avoir fait du quotidien une fête ! Merci aux permanents : Michel le chic type, Steph king of BM, mon adorable Nath, l'Émérite Didier, le cool Stéphane G, la passionnée Isabelle, le sympa Ludo, le généreux Vincent, la si gentille Agnès et la bienveillante Christina. Ma chère Emilie, que de beaux souvenirs, de fous rires, je vais te regretter, vive le 287 ! Christophe mon génial best friend forever, merci pour tout ce que tu m'as appris sur les insectes et la vie ! Merci aux non-permanents présents ou partis : ma douce Samia, mes chères Nay, Mélissa et Anaïs, mes nioubi Haibo et Ruibin, my beautiful girls Carlotta and Jen. Elise, merci d'avoir embelli ma vie au laboratoire et en général. Alicia, merci pour ton soutien de tous les moments, tu es un diamant. Auriane, 2 ans de pur bonheur, d'euphorie et de tout, I ♥ you !

## **Aux acteurs de la vie scientifique,**

Delphine et Yan, merci pour le RNA-Seq. Pascal Brunou merci pour votre aide avec le cytomètre. Je salue mon cher Cédric, Yasmine, Clémence, Cassandra, Pauline, Romain, Simon, les Vincent, tous les doctorants, Jamila, Karine, Sandy, Arnaud et les autres collègues de Micalis. Merci à mes professeurs de Jussieu, ceux devenus collègues lors de la mission enseignement : Anne, Laetitia, Sophie et d'autres qui m'ont guidée, Fabien, Cécile, Guennadi, Hussein, Maité, Dominique. Aux étudiants que j'ai eus et à ceux qui liront cette thèse : courage les amis, on finit par y arriver. Une pensée va aux chouettes membres du labo de stage : mes chers Wei-Lin, Marie-Flo, Chantalette, Magia, Ivan, Arnaud et Seb. Enfin un grand merci à Alexandre, Pierre et Corinne pour tout leur travail à l'école doctorale ABIES.

## **A mes amis et à ma famille,**

A mes formidables amis de la fac Puthy, Vic, Pri. A mes incroyables amis de toujours, No, Sally, Manue, Morgo, Yasra, Michel. A mon pilier et tout ce qu'il y a de meilleur au monde, c'est grâce à toi !

Aux TOUKABRI, paternels et maternels, à mon oncle Abdelkhalak, mon Tonton Moumen, ma Tata Saloua, tous mes oncles et mes tantes, mes cousins et mes cousines. Je dédie cette thèse à la mémoire de mes chers grands-parents Baba Ali, Baba Hamadi, Omi Fatma et Omi Khatweya, de mon cher Tonton Jawher, de ma chère Tata Souad.

Enfin aux trésors de ma vie... A mes merveilles, mes petites sœurs Hajer et Manel, vous êtes mes fiertés et mes meilleures amies, je vous aime plus que tout. A mes modèles de toujours, mes parents, qui nous ont appris leurs belles valeurs. Je suis si fière d'être votre fille et les mots ne suffiront pas à vous remercier. A ma maman d'amour, ma belle Ahloumette, la meilleure maman du monde, tu es ma Reine. Tu nous as toujours fait passer avant tout, tu nous rends la vie facile et légère. Tu as un cœur en or et sans toi rien n'est possible. Au meilleur Papa que l'Univers porte, mon Papa Tarek, ton aide et ton soutien ont été infinis. Pour les allers-retours le week-end au labo, ton aide en informatique, tes conseils, tes encouragements et ta présence, je te dois tout et tu es tout pour moi.

# TABLES DES MATIERES

---

<b>LISTES DES ABREVIATIONS</b>	<b>3</b>
<b>LISTES DES FIGURES</b>	<b>4</b>
<b>1 INTRODUCTION</b>	<b>5</b>
<b>1.1 CHAPITRE I. LE GROUPE <i>BACILLUS CEREUS SENSU LATO</i></b>	<b>5</b>
1.1.1 GENERALITES : DIVERSITE ET TAXONOMIE	5
1.1.2 BIOLOGIE ET ECOLOGIE DES DIFFERENTES ESPECES DU GROUPE <i>BACILLUS CEREUS</i> : QUI SONT-ELLES ?	10
<b>1.2 CHAPITRE II. CYCLE INFECTIEUX DE <i>BACILLUS THURINGIENSIS</i> DANS LA LARVE DE <i>GALLERIA MELLONELLA</i></b>	<b>17</b>
1.2.1 <i>GALLERIA MELLONELLA</i> , UN MODELE PAS COMME LES AUTRES	18
a. Présentation générale	18
b. Défense contre l'agent infectieux	24
1.2.2 INFECTER SON HOTE, LE TUER ET SURVIVRE : UN PROCESSUS BIEN ORCHESTRE PAR BT	28
a. Invasion de l'hôte	28
b. Nécrotrophisme	31
c. Dissémination	34
<b>1.3 CHAPITRE III. VOIES DE SURVIE CHEZ LES <i>BACILLUS</i></b>	<b>36</b>
1.3.1 SPORULATION : LE MODE DE SURVIE ULTIME	36
a. Contexte d'initiation de la sporulation	36
b. Régulation de la sporulation : étapes clés	40
1.3.2 BIOFILMS : L'UNION FAIT LA FORCE	42
a. Formation et régulation des biofilms	42
b. Hétérogénéité des biofilms	45
1.3.3 LA DORMANCE : UN ETAT VIVEMENT DISCUTE	48
a. Persistance	49
b. L'état viable mais non-cultivable – VBNC (Viable But Non-Culturable)	52
1.3.4 ETAT DE CROISSANCE OLIGOTROPHE : L'ACTIVITE AU RALENTI	56
a. Caractéristiques phénotypiques	56
b. Caractéristiques transcriptomiques et facteurs génétiques	57
<b>2 CONTEXTE ET OBJECTIFS DE L'ETUDE</b>	<b>60</b>
<b>3 RESULTATS</b>	<b>64</b>

<b>3.1</b>	<b>PRESENTATION DE L'ARTICLE</b>	<b>64</b>
<b>3.2</b>	<b>MANUSCRIT DE L'ARTICLE SOUMIS</b>	<b>68</b>
3.2.1	RESUME (ABSTRACT - IMPORTANCE)	68
3.2.2	INTRODUCTION	69
3.2.3	RESULTATS (RESULTS)	72
3.2.4	DISCUSSION (DISCUSSION)	89
3.2.5	PROCEDURES EXPERIMENTALES (MATERIAL AND METHODS) ET NOTES	91
3.2.6	REFERENCES	97
<b>3.3</b>	<b>DONNEES SUPPLEMENTAIRES DE L'ARTICLE</b>	<b>103</b>
<b>4</b>	<b><u>APPROCHE SCIENTIFIQUE DU SUJET D'ETUDE ET DEMARCHES EXPERIMENTALES</u></b>	<b><u>127</u></b>
<b>4.1</b>	<b>CHEMINEMENT DE L'APPROCHE SCIENTIFIQUE DU SUJET D'ETUDE</b>	<b>128</b>
<b>4.2</b>	<b>DEMARCHES EXPERIMENTALES REALISEES</b>	<b>129</b>
<b>5</b>	<b><u>DISCUSSION ET PERSPECTIVES</u></b>	<b><u>142</u></b>
<b>5.1</b>	<b>BT DANS L'ENVIRONNEMENT PARTICULIER DU CADAVRE DE L'INSECTE</b>	<b>142</b>
<b>5.2</b>	<b>CARACTERISTIQUES DE L'ETAT PHYSIOLOGIQUE SPECIFIQUE DE BT APRES PASSAGE DANS L'INSECTE</b>	<b>143</b>
<b>5.3</b>	<b>PROFIL TRANSCRIPTOMIQUE DE BT LORS DE LA SURVIE A LONG TERME DANS LE CADAVRE DE SON HOTE ET PISTES POUR LA COMPREHENSION DES MECANISMES DE SURVIE</b>	<b>146</b>
<b>6</b>	<b><u>ANNEXES</u></b>	<b><u>152</u></b>
<b>6.1</b>	<b>VALORISATION DE LA THESE</b>	<b>152</b>
<b>6.2</b>	<b>POSTERS REALISES</b>	<b>152</b>
<b>7</b>	<b><u>REFERENCES</u></b>	<b><u>155</u></b>

## LISTES DES ABREVIATIONS

---

### A

**ADN** : Acide DésoxyriboNucléique –  
**AFLP** : Amplified Fragment Length Polymorphism – **ANI** : Average Nucleotide Identity – **ARN** : Acide RiboNucléique –  
**ARNr** : AcideRiboNucléique ribosomal –  
**ATP** : Adénosine TriPhosphate

### B

**B.** (devant un nom d'espèce ou de groupe) : *Bacillus* – **Ba** : *Bacillus anthracis* –  
**Bc** : *Bacillus cereus* – **BCAA** : Branched Chain Amino Acids – **Bs** : *Bacillus subtilis* –  
**Bt** : *Bacillus thuringiensis*

### E

**ERO** : Espèces Réactives de l'Oxygène –  
**EPS** : Extracellular Polymeric Substance

### F

**FACS** : Fluorescence Activated Cell Sorting

### G

**GBDP** : Genome Blast Distance Phylogeny –  
**GDP** : Guanosine DiPhosphate – **GFP** : Green Fluorescent Protein – **Gm** : *Galleria mellonella* –  
**GTP** : Guanosine TriPhosphate

### H

**HCT** : Hydrolysat de Caséine Tryptone –  
**HCTc** : Hydrolysat de Caséine Tryptone conditionné – **hpi** : heures post-infection

### J

**jpi** : jours post-infection

### L

**L-** (devant une molécule) : lévogyre –  
**LB** : lysogeny broth

### M

**MLEE** : MultiLocus Enzyme Electrophoresis –  
**MLST** : MultiLocus Sequencing Typing

### N

**Nec** : Nérotrophe (cellule) –  
**Nec<sup>-</sup>** : Non-nérotrophe (cellule)

### P

**PO** : Phénoloxydase – **(p)ppgpp** : guanosine pentaphosphate et tetraphosphate

### Q

**qPCR** : quantitative Polymerase Chain Reaction

### R

**RNA-Seq** : RNA-Sequencing –  
**RNPP** (famille) : Rap, NprR, PlcR, PrgX

### S

**Spo** : Sporulante (cellule) –  
**Spo<sup>-</sup>** : Non-Sporulante (cellule)

### U

**UFC** : Unité Formant Colonie

### V

**VBNC** : Viable But Non-Culturable

### W

**WT** : Wild Type

## LISTES DES FIGURES

---

Figure 1. Morphologie du groupe <i>Bacillus cereus sensu lato</i>	6
Figure 2. Phylogénie du groupe <i>Bacillus cereus sensu lato</i>	9
Figure 3. Niches du groupe <i>Bacillus cereus sensu lato</i> et transmission	11
Figure 4. Présentation du modèle insecte <i>Galleria mellonella</i>	20
Figure 5. Intérêt du modèle <i>Galleria mellonella</i>	23
Figure 6. Système immunitaire de <i>Galleria mellonella</i>	27
Figure 7. Infection de <i>Galleria mellonella</i> par <i>Bacillus thuringiensis</i>	28
Figure 8. Modèle de régulation du système de quorum sensing NprR–NprX chez <i>Bacillus thuringiensis</i>	33
Figure 9. Différenciation de <i>Bacillus thuringiensis</i> au cours de l'infection	34
Figure 10. Initiation de la sporulation et d'autres mécanismes sous le contrôle de Spo0A	39
Figure 11. Structure de la spore et étapes clés de la sporulation	41
Figure 12. Avantages et hétérogénéité des biofilms	47
Figure 13. Dynamique de la persistance bactérienne et de l'état VBNC	55
Figure 14. Caractéristiques de l'état de croissance oligotrophe	59
Figure 15. Survie dans le cadavre d'insecte des souches WT et $\Delta sigK$	60
Figure 16. Différenciation de la population de <i>Bacillus thuringiensis</i> dans le cadavre d'insecte	61
Figure 17. Résumé graphique de l'article soumis	67
Figure 18. Cheminement de l'approche scientifique du sujet d'étude	128
Figure 19. Effet de l'incubation de <i>Bacillus thuringiensis</i> en HCT conditionné	130
Figure 20. Activité des promoteurs <i>P<sub>xyl+</sub></i> et <i>P<sub>nprA</sub></i> des cellules isolées des cadavres d'insectes	131
Figure 21. Activité de <i>P<sub>nprA'</sub>gfp<sub>bte</sub>AAV</i> et de <i>P<sub>nprA'</sub>mCherry</i> in vitro à 37°C	133
Figure 22. Activité du promoteur <i>P<sub>nprA'</sub>gfp<sub>bte</sub>AAV</i> et <i>P<sub>nprA'</sub>mCherry</i> des cellules isolées des cadavres d'insectes	134
Figure 23. Survie dans le cadavre d'insecte des souches WT, $\Delta sigK$ , $\Delta sigE$	135
Figure 24. Expression du nécrotrophisme des souches WT, $\Delta sigK$ , $\Delta sigE$ et observations microscopiques	136
Figure 25. Rendement après tri cellulaire d'une population extraite de l'insecte	138
Figure 26. Observations au microscope après tri supposé de la sous-population Nec <sup>-</sup> Spo <sup>-</sup> à 18 hpi	139
Figure 27. Exemple d'analyse qualité d'un échantillon d'ARN de <i>Bacillus thuringiensis</i> extrait des cadavres d'insectes à 16 hpi vs à 7 jpi	140

# 1 INTRODUCTION

---

Les travaux de cette thèse portent sur l'étude de la bactérie entomopathogène *Bacillus thuringiensis* (Bt) lors de sa survie à long-terme dans le cadavre de son hôte insecte, ici la larve de la fausse teigne de la cire, *Galleria mellonella* (Gm). Isolé pour la première fois en 1901 par le bactériologiste japonais Shigetane Ishiwata, Bt a été désigné comme responsable de l'infection fatale de vers à soie. Dix ans plus tard, en 1911, le scientifique allemand Ernst Berliner a identifié Bt comme étant l'agent pathogène d'*Ephestia kuehniella*, la pyrale de la farine. Caractérisé par Berliner dans le Land Allemand de Thuringe, nous devinons donc l'origine du nom de cette bactérie. Ainsi, Bt fascine depuis plus d'un siècle et au cours de cette thèse, pas moins de 1363 productions scientifiques l'incluant ont été référencées sur la base de données PubMed.

Bt appartient au groupe *Bacillus cereus sensu lato*, composé de bacilles ayant la capacité de se différencier en spore (une forme cellulaire déshydratée extrêmement résistante), lorsque les conditions environnementales deviennent peu favorables. Les bactéries du groupe *B. cereus sensu lato* présentent de nombreuses caractéristiques en commun, mais aussi des différences qu'il convient d'explicitier dans les prochaines lignes.

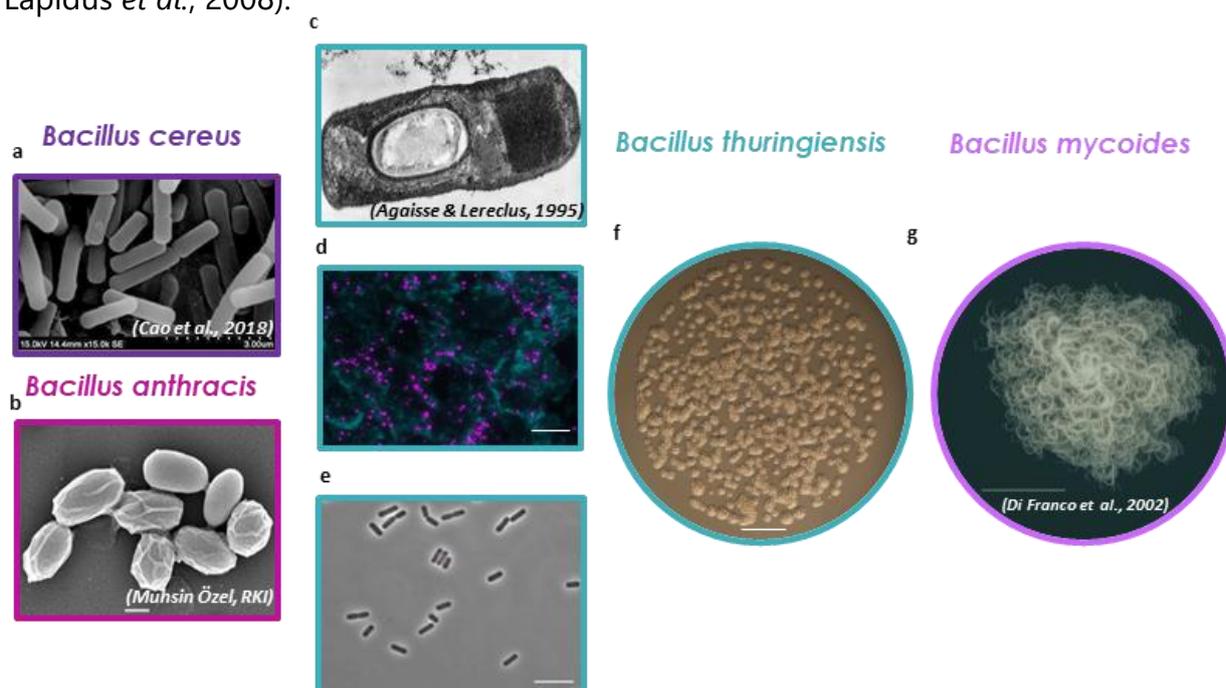
## 1.1 Chapitre I. Le groupe *Bacillus cereus sensu lato*

### 1.1.1 Généralités : diversité et taxonomie

Classé dans le phylum des Firmicutes, dans le genre *Bacillus*, le groupe *Bacillus cereus sensu lato* (à distinguer de l'espèce *Bacillus cereus sensu stricto*) comprend des espèces très proches phylogénétiquement, bien qu'elles présentent un large spectre de pathogénicité et qu'elles se retrouvent dans des niches environnementales diverses. Ce groupe est composé de 8 espèces : *Bacillus anthracis* (Ba), *Bacillus cereus sensu stricto* (Bc), *Bacillus cytotoxicus*, *Bacillus mycoides*,

*Bacillus pseudomycooides*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus toyonensis* et *Bacillus weihenstephanensis* (Ehling-Schulz *et al.*, 2019).

Les bactéries du groupe *B. cereus sensu lato* sont des bacilles de grande taille (>1 µm), sporulants, à coloration de Gram positive, anaérobies facultatives, mobiles ou immobiles (figure 1). Au sein du genre *Bacillus*, les bactéries du groupe *B. cereus sensu lato* sont référencées comme celles ayant les plus grands génomes, le plus grand nombre de protéines prédites et le génome le plus pauvre en GC (≈35%) (Alcaraz *et al.*, 2010 ; Anderson *et al.*, 2005). À l'exception de *B. cytotoxicus* dont le chromosome est long de 4,085 Mb, les autres espèces du groupe ont un chromosome compris entre 5,2 et 5,5 Mb. Les bactéries de ce groupe ont des séquences génétiques d'ARNr 16S très similaires et 3000 (± 200) gènes en commun (Stevens *et al.*, 2019 ; Lapidus *et al.*, 2008).



**Figure 1. Morphologie du groupe *B. cereus sensu lato*** - **a.** *Bacillus cereus*, (x1500), microscopie électronique à balayage (Cao *et al.*, 2018). **b.** Spores de *Bacillus anthracis* (échelle : 500 nm), microscopie électronique à balayage (Muhsin Özel). **c.** *Bacillus thuringiensis*, cellule avec la spore et son cristal en microscopie électronique (échelle non précisée) (Agaisse et Lereclus, 1995). **d.** Spores fluorescentes de *Bacillus thuringiensis* colorées en rose dans les tissus du cadavre d'insecte en bleu (microscopie à fluorescence) (échelle : 10 µm). **e.** Cellules végétatives de *Bacillus thuringiensis* en phase exponentielle (échelle : 10 µm). **f.** Colonies de *Bacillus thuringiensis* en phase stationnaire sur LB-Agar (échelle : 2 mm). **g.** colonie de *Bacillus mycooides* (échelle : 1 cm), loupe binoculaire (Di Franco *et al.*, 2002).

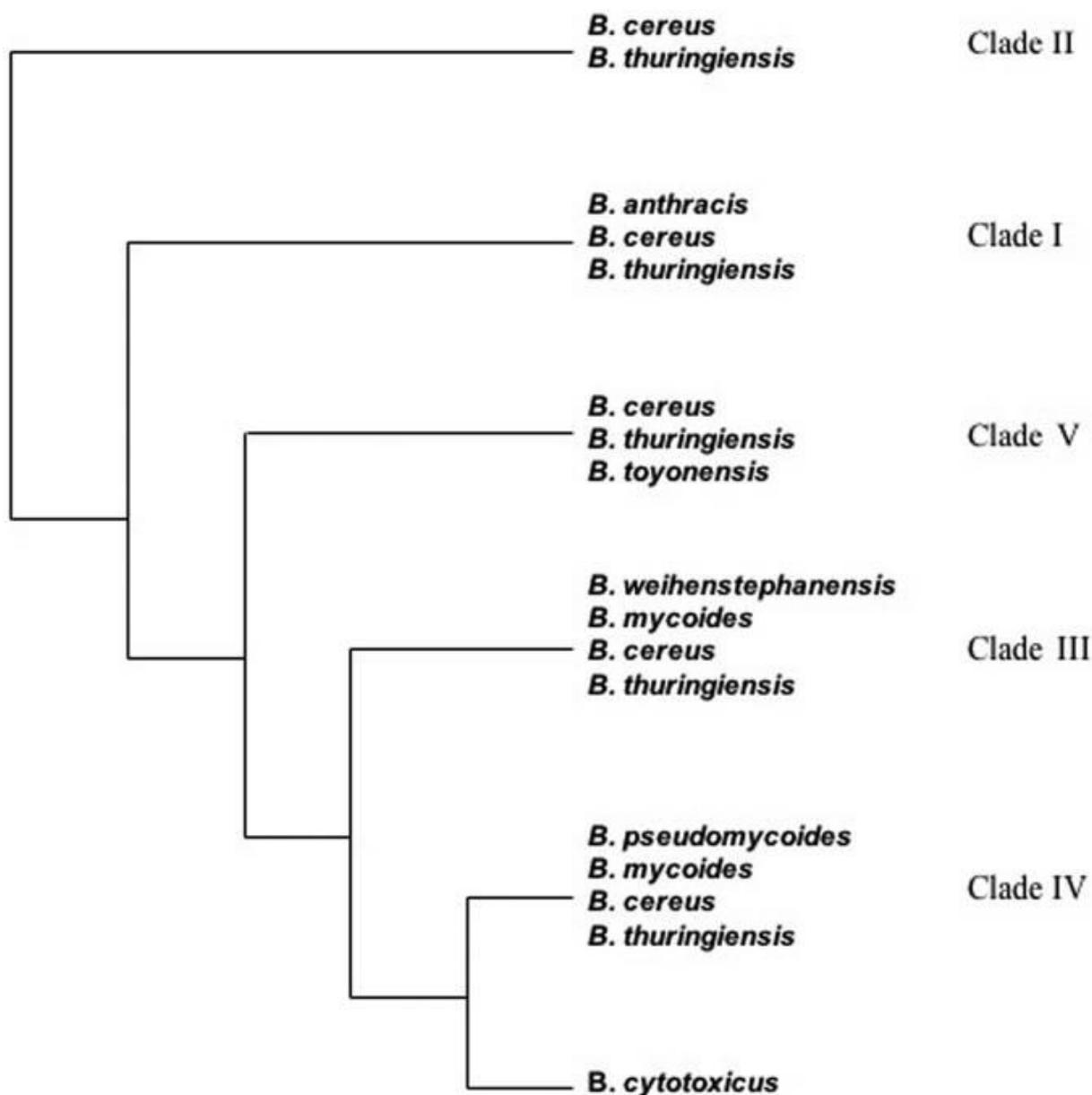
La classification des espèces du groupe *B. cereus sensu lato* est basée sur leurs phénotypes et leur pathogénicité, généralement liés à leur contenu plasmidique (Kolstø *et al.*, 2002 ; Rasko *et al.*, 2005). Par exemple, Bt porte plusieurs plasmides codant pour une grande variété de toxines insecticides Cry et Cyt, qui forment le cristal parasporal caractéristique de l'espèce (Schnepf *et al.*, 1998). Les souches de Bc émétiques portent quant à elles, le plasmide pCER270 codant pour les composants enzymatiques nécessaires à la biosynthèse non ribosomale de la toxine céréulide (Ehling-Schulz *et al.*, 2006). Ba porte deux plasmides : pXO1 (182 kb) et pXO2 (95 kb), codant respectivement les gènes de toxines et les gènes de biosynthèse de la capsule (Moayeri *et al.*, 2015).

La classification et la distinction des espèces Ba, Bc, Bt a toujours été délicate. Initialement, elles avaient été classifiées selon leur phénotype dans les années 1900 (Ehling-Schulz *et al.*, 2019). Dans les années 1990, il a été démontré que l'ARN ribosomal 16S et 23S de ces espèces était quasiment identique et ne différait que sur quelques paires de bases (Ash *et al.*, 1991 ; Ash et Collins, 1992). Par la suite de nouvelles méthodes ont été utilisées pour distinguer ces espèces comme par exemple, l'AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), le MLEE (MultiLocus Enzyme Electrophoresis), le MLST (MultiLocus Sequencing Typing), les SNP (Single Nucleotide Polymorphism), le GBDP (Genome Blast Distance Phylogeny). Bien que ces méthodes permettent de distinguer Ba de Bt et Bc, la distinction entre Bt et Bc reste impossible (Chen et Tsen, 2002 ; Hill *et al.*, 2004 ; Helgason *et al.*, 2004 ; Rasko *et al.*, 2005 ; Liu *et al.*, 2015).

Les autres espèces du groupe sont classifiées selon leur morphotype ou encore leur physiologie. Par exemple, *B. weihenstephanensis* est caractérisé par sa psychrotolérance, cette bactérie peut croître à 4°C bien que sa température optimale de croissance soit comprise entre 25 et 35°C (comme les autres espèces du groupe, connues pour être mésophiles) (Lechner *et al.*, 1998). *B. cytotoxicus* est quant à lui capable de croître jusqu'à 50°C (Guinebrerière *et al.*, 2013). D'autres caractéristiques

particulières peuvent également être mentionnées comme la formation de colonies rhizoïdes par *B. mycoides* et *B. pseudomycoides* (figure 1) (Di Franco *et al.*, 2002 ; Nakamura, 1998).

Cependant, la classification selon les plasmides, le morphotype ou la physiologie peut s'avérer imprécise et des études génomiques démontrent que le groupe *Bacillus cereus* peut être divisé en 5 clades majeurs où les espèces décrites ci-dessus peuvent se retrouver dans plusieurs clades (figure 2) (Méric *et al.*, 2018). Ainsi, il peut s'avérer plus pertinent de considérer le groupe *B. cereus* comme une espèce unique composée de souches extrêmement diverses et dont les propriétés diffèrent en raison de leur contenu plasmidique, de leur morphotype, de leur physiologie ou de l'expression génétique associée à des gènes régulateurs clés (Helgason *et al.*, 2000 ; Rasko *et al.*, 2005). Récemment, Carroll et collaborateurs ont proposé une nouvelle taxonomie, réassignant les bactéries aux espèces *Bacillus pseudomycoides*, *Bacillus paramycoides*, *Bacillus mosaicus*, *Bacillus cereus sensu stricto*, *Bacillus-toyonensis*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus cytotoxicus* et *Bacillus luti*, en se basant entre autres sur la moyenne d'identité nucléique (ANI). Cette nouvelle taxonomie relègue ainsi Bt à un biovar de *B. cereus* ou de *B. mosaicus* et Ba à un biovar de *B. mosaicus* (Carroll *et al.*, 2020). Cependant, comme indiqué par Baldwin, pour que cette nouvelle classification du groupe *B. cereus sensu lato* soit validée, elle doit être acceptée par la communauté scientifique (Baldwin, 2020). Carroll et collaborateurs semblent conscients de ce paramètre, dans la mesure où l'intitulé de leur article indique qu'il s'agit d'une « proposition ». D'ailleurs, lors de la dernière conférence BACT2022 à Paris, qui a rassemblé des experts internationaux de Ba, Bc et Bt, Klee a indiqué que cela pouvait par exemple être limitant pour Ba car des souches dangereuses pourraient manquer de visibilité sous la désignation de *B. mosaicus* (Klee, présentation orale, BACT2022, 2022).



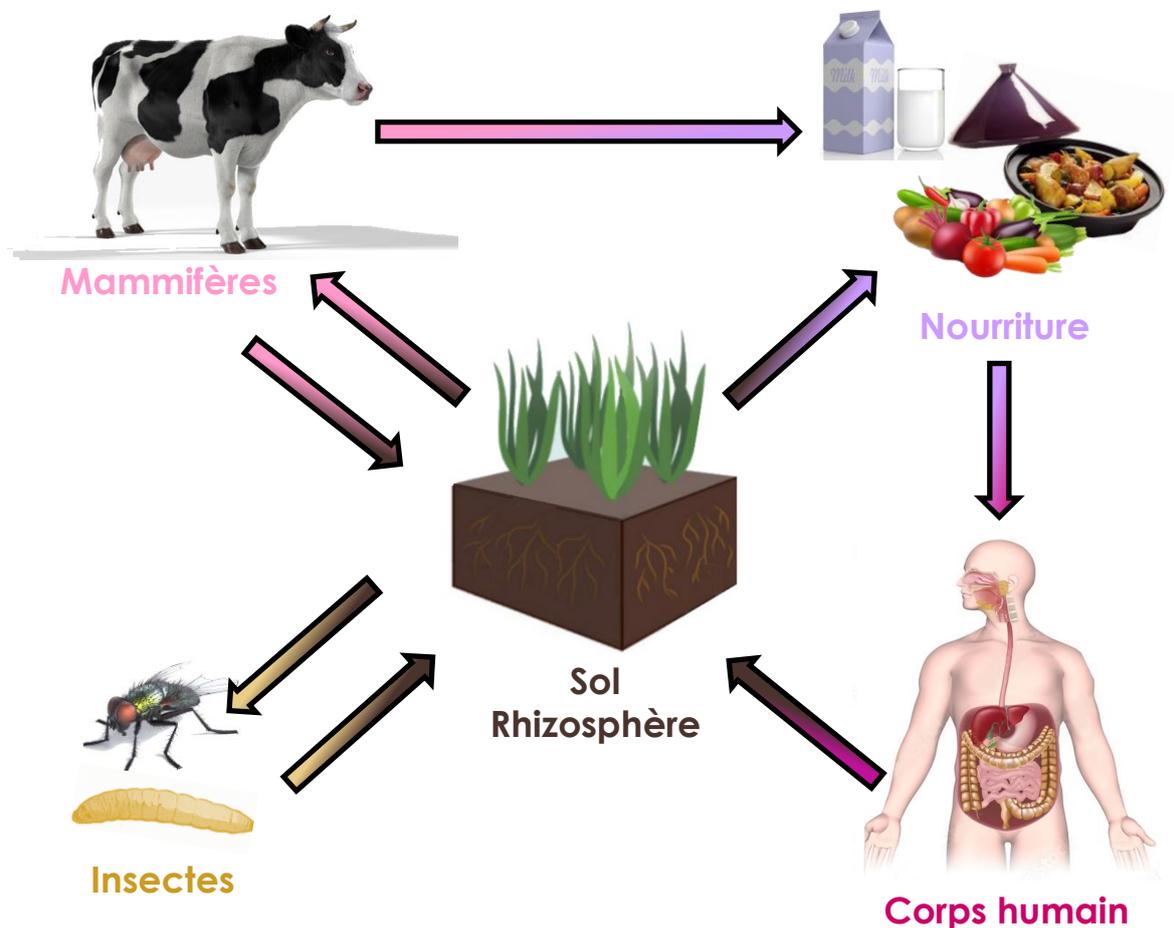
**Figure 2. Phylogénie du groupe *Bacillus cereus sensu lato*** - Les cinq principaux clades phylogénétiques du groupe *B. cereus* sont représentés. Le clade I est connu sous le nom de clade de *B. anthracis* mais comprend également *B. cereus* émétique ainsi que plusieurs isolats cliniques de *B. thuringiensis*. Le clade II est connu sous le nom de clade *B. cereus/B. thuringiensis*, qui comprend la plupart des *B. thuringiensis* utilisés commercialement ainsi que les souches types *B. cereus* et *B. thuringiensis*. Le clade III est connu sous le nom de clade *B. weihenstephanensis* et comprend la plupart des isolats psychrotolérants du groupe *B. cereus*. Ces clades sont basés sur des données de MLST, AFLP et de séquence du génome entier. Les souches thermotolérantes appartenant à l'espèce *B. cytotoxicus* sont dans un groupe distinct (Ehling-Schulz *et al.*, 2019).

### 1.1.2 Biologie et écologie des différentes espèces du groupe *Bacillus cereus* : qui sont-elles ?

Les bactéries du groupe *B. cereus sensu lato* occupent des niches environnementales très diverses. Elles sont endémiques du sol mais peuvent être retrouvées dans de nombreux habitats comme des matrices alimentaires, des invertébrés ou encore des plantes (figure 3) (Jensen *et al.*, 2003). La formation de spores permet la persistance de ces espèces dans l'environnement de par leur nature extrêmement résistante aux UVs, à la chaleur, à la sécheresse et à divers stress. La présence de spores d'espèces du genre *Bacillus* a été détectée dans les intestins et les fèces d'hommes, d'autres mammifères ou encore d'animaux aquatiques et d'insectes (Hong *et al.* 2005).

La présence ubiquitaire de ces bactéries peut poser problème dans la mesure où elles peuvent s'adapter facilement à leur environnement et contaminer des chaînes de production alimentaire, *B. cereus* est d'ailleurs le deuxième agent à l'origine de toxi-infections alimentaires collectives (Santé Publique France, 2021). Cependant, cette ubiquité peut également permettre la colonisation et la protection de certaines plantes contre les infections. Par exemple, des études démontrent que Bc active des mécanismes de défense de la plante *Arabidopsis thaliana* contre *Pseudomonas syringae* pv. tomato (Wang *et al.*, 2018) ou encore que cette bactérie protège la plante ornementale *Kalanchoe* contre l'agent fongique pathogène *Fusarium oxysporum* (Madriz-Ordeñana *et al.*, 2022).

Les bactéries du groupe *B. cereus sensu lato* sont considérées comme ayant un haut pouvoir pathogène. Cela est justifié, entre autres, par la présence de nombreux gènes codant pour des facteurs extracellulaires tels que des protéines cytotoxiques comme des hémolysines, des entérotoxines, des cytotoxines ou encore pour des enzymes telles que des phospholipases, des protéases, des chitinases. Ces facteurs sont nécessaires à la virulence et à la colonisation des hôtes de ces bactéries (Gohar *et al.*, 2008 ; Raymond *et al.*, 2010 ; Enosi Tuipulotu *et al.*, 2020).



**Figure 3. Niches du groupe *Bacillus cereus sensu lato* et transmission** – Le sol est le réservoir principal des espèces de ce groupe. Elles se transmettent également aux organismes associés au sol, notamment aux plantes, aux insectes, aux nématodes et aux amibes. *B. cereus* peut contaminer la rhizosphère, se nourrir des substrats de racines et y persister sous formes de spores. Elles se transmettent également aux mammifères par ingestion, inhalation ou blessures et notamment à l'homme via la production alimentaire et textile issues des animaux. Non représentée sur la figure, l'eau peut également être un réservoir, les spores s'associent alors aux plantes aquatiques et aux sédiments, infectant ainsi les vertébrés et invertébrés. Adapté de (Mols et Abee, 2011).

Pour compléter ce chapitre, les espèces composant le groupe *B. cereus sensu lato* (selon Ehling-Schulz *et al.*, 2019) vont être décrites brièvement ci-dessous pour mettre en évidence leurs caractéristiques biologiques et écologiques clés.

### ***Bacillus thuringiensis***

Bactérie entomopathogène, Bt s'est rapidement imposé en tant que biopesticide. Initialement utilisé contre quelques espèces de lépidoptères, Bt a été démontré comme efficace contre les moustiques dès 1977, puis contre les coléoptères, ainsi que les nématodes, représentant ainsi 90% du marché global des biopesticides microbiens (Kumar *et al.*, 2021). L'intérêt économique de Bt est manifeste sachant qu'il représente plus de 210 millions de dollars américains sur le marché mondial des biopesticides et que son utilisation est amenée à se développer davantage d'ici 2050 (Ehling-Schulz *et al.*, 2019 ; Lacey *et al.*, 2015 ; Kumar *et al.*, 2021). Ces propriétés insecticides sont dues à la production de cristaux protéiques comme indiqué précédemment. Les toxines Cry sont capables de reconnaître des récepteurs membranaires spécifiques de certains insectes, de s'y lier et d'y former des pores, déstabilisant ainsi l'intégrité des cellules intestinales. La formation du cristal parasporal peut représenter jusqu'à 25% du poids sec d'une bactérie sporulante (Agaisse et Lereclus, 1995). Le cristal est dit parasporal car il est généralement produit lors de la sporulation dans le compartiment de la cellule mère jouxtant la spore. Pour la plupart des souches de Bt, l'expression des gènes Cry dépend de facteurs sigma spécifiques de la sporulation tels que SigE et SigK, fonctionnels dans la cellule mère au cours de la sporulation (Deng *et al.*, 2014). Les toxines Cry sont des facteurs de virulence spécifiques contre les lépidoptères, les diptères, les coléoptères, les pucerons, les mites, les nématodes et certaines sont également cytotoxiques pour les lignées de cellules cancéreuses (Ehling-Schulz *et al.*, 2019 ; Mendoza-Almanza *et al.*, 2020). D'autres facteurs de virulence peuvent également être produits par Bt, comme les cytotoxines Cyt, les protéines Vip ou encore les Sip. Ces protéines sont importantes pour l'activité

insecticide de Bt (Domínguez-Arrizabalaga *et al.*, 2020). Les gènes des toxines *cry*, *vip* et *cyt* sont portés par de grands plasmides, généralement conjugatifs et les gènes *cry* sont souvent retrouvés à proximité d'éléments génétiques mobiles comme des transposons ou des séquences d'insertion (Ehling-Schulz *et al.*, 2019).

### ***Bacillus cereus sensu stricto***

Bc fut isolé pour la première fois à partir de l'air d'une étable, en 1887 au Royaume-Uni (Frankland et Frankland, 1887). Cette souche dénommée ATCC 14579 est considérée comme la souche de référence de Bc. Les souches de Bc sont décrites comme motiles, largement répandues dans le sol et elles se retrouvent également dans le tractus intestinal des insectes et des mammifères (Premkrishnan *et al.*, 2021). Comme indiqué précédemment, Bc peut être la cause d'infections alimentaires, de type émétique ou diarrhéique, possiblement létales. Bc peut contaminer tout type d'aliments : viandes rouges, viandes blanches, épices, riz, pâtes, légumes, suscitant ainsi une attention particulière des industries agroalimentaires (Stenfors Arnesen *et al.*, 2008). Les hémolysines Hbl, les entérotoxines non-hémolytiques Nhe et les cytotoxines CytK sont des toxines impliquées dans les symptômes diarrhéiques, capables de former des pores membranaires détruisant ainsi la membrane épithéliale du petit intestin (Dietrich *et al.*, 2021). D'autres facteurs de virulence tels que des phospholipases et des collagénases sont aussi impliqués dans la pathogénicité de Bc (Kotiranta *et al.*, 2000). L'ensemble de ces facteurs, retrouvés également chez Bt, sont sous le contrôle du régulateur transcriptionnel PlcR (Gohar *et al.*, 2008). Les symptômes émétiques sont quant à eux, causés par le peptide céréulide, dont la synthèse non ribosomale dépend du locus *ces* porté par le plasmide PCER270 (Rasko *et al.*, 2007). D'autres facteurs de virulence comme des métalloprotéases ou encore l'entérotoxine EntFM sont également décrits (Dietrich *et al.*, 2021). La pathogénicité de Bc est complexe et continue d'être caractérisée.

## ***Bacillus anthracis***

Ba est l'agent causal de la maladie du charbon (anthrax en anglais). Cette maladie, rapportée dans la Bible et décrite dans la littérature depuis plus de 2000 ans, n'a été imputée formellement à Ba qu'en 1876 par Robert Koch (Koch, 1876 ; Schwartz, 2009).

Des armes biologiques à base de Ba ont été détectées à partir de la Première Guerre Mondiale, mais leur développement et leur utilisation se sont amplifiés lors de la Seconde Guerre mondiale. Ratifié par un grand nombre d'États, le Protocole de Genève de 1925 interdit l'utilisation d'armes biologiques, cependant son efficacité fut relative. En 1931, les Japonais ont créé des centres d'armement spécialisés utilisant Ba. Ils s'y sont livrés à des expérimentations sur des prisonniers de guerre et des civils Chinois. De 1940 à 1944, ils ont également largué des spores sur des villes Chinoises. A la même époque, les Britanniques ont testé Ba comme potentiel agent offensif à déployer contre les Allemands. En 1941-1942, ils ont fait exploser plusieurs bombes chargées de spores sur l'île Gruinard, au large de l'Écosse, condamnant ainsi l'accès à cette île pour plusieurs décennies (Wenner et Kenner, 2004).

Ba peut infecter les mammifères selon trois modes : par inhalation, par ingestion ou par voie cutanée. Les cellules végétatives produisent trois facteurs de virulence : la capsule permettant d'échapper au système immunitaire et deux toxines se disséminant par voie lymphatique. L'infection cutanée conduit à l'apparition d'une petite vésicule cutanée entourée d'une zone œdématiée où peuvent apparaître des vésicules secondaires. Ces vésicules se transforment ensuite en escarres noirâtres, d'où le nom de maladie du charbon. Les trois modes d'infection peuvent conduire à une septicémie létale. En l'absence de la capsule ou des toxines, la virulence est réduite d'un facteur 1000 (Moayeri *et al.*, 2015).

Les facteurs majeurs de virulence sont codés par les plasmides pXO1 et pXO2. Le plasmide pXO1 porte les gènes *pag* (codant pour l'antigène protecteur, PA), *lef*

(codant pour le facteur létal, LF), *cya* (codant pour le facteur œdémateux, EF) et leurs régulateurs *atxA* et *pagR* (Fouet et Mock, 1996). PA est une protéine RBD (Receptor Binding Domain) formant un pore dans la membrane des endosomes permettant la libération de LF et EF dans le cytosol. La transcription des gènes de toxines est diminuée dans un mutant *atxA*, suggérant la régulation positive de ces gènes par AtxA (Dai *et al.*, 1995). Quant au plasmide pXO2, il porte les gènes de synthèse de la capsule d'acide poly-d-γ-glutamique, regroupés sous le locus *capBCADE*, dont la transcription est également contrôlée indirectement par AtxA via l'activation des régulateurs AcpA et AcpB (Drysdale *et al.*, 2004, Fouet et Mock 2006). Le gène *pag* intervient également dans la synthèse de la capsule en influant sur la transcription des régulateurs *acpA* et *acpB* (Liang *et al.*, 2017). La capsule résulte d'une synthèse séquentielle dont l'étape finale est son attachement à la paroi du peptidoglycane (Château *et al.*, 2018), permettant ainsi à Ba d'échapper aux macrophages.

### ***Bacillus weihenstephanensis***

*B. weihenstephanensis* est une souche psychrotolérante distinguable des autres espèces du groupe par sa capacité à croître de 4°C à 43°C (Lechner *et al.*, 1998 ; Soufiane et Côté, 2013). Certaines souches produisent la toxine céréulide comme les souches émétiques de Bc (Guérin *et al.*, 2017). La souche KBAB4 de *B. weihenstephanensis* produit des facteurs de virulence sous le contrôle du régulateur PlcR, elle est pathogène pour l'insecte *Galleria mellonella* et les cellules épithéliales Vero, mais seulement à 15°C et non à 30°C pour les deux cibles (Réjasse *et al.*, 2012).

### ***Bacillus mycoides***

*B. mycoides*, est communément décrite dans la littérature comme endophyte, associé à la rhizosphère, ayant un rôle phytoprotecteur et utilisé à ce titre comme agent de lutte biologique (Yi *et al.* 2018 ; Wu *et al.*, 2020 ; Kurniawan et Chuang, 2022). *B. mycoides* produit des métabolites ayant des effets insecticides, comme le styrène, capable de tuer les nématodes *Caenorhabditis elegans* et *Meloidogyne incognita* (Luo

*et al.*, 2018). Cette bactérie est également capable de produire de l'acide phénylacétique ou l'acétate de méthylphényle, deux composés volatiles antifongiques (Wu *et al.*, 2020). D'autres souches ont été rapportées comme ayant la capacité de fixer l'azote (Singh *et al.*, 2020) ou des propriétés inhibitrices sur des cellules cancéreuses grâce à un exopolysaccharide (Farag *et al.*, 2020).

### ***Bacillus pseudomyoides***

Cette espèce est très proche de *B. myoides* avec 98% de similarité de séquences de l'ARNr 16S (Nakamura, 1998). Ces bactéries ont un intérêt industriel car elles ont été décrites comme pouvant être utilisées pour produire des cellulases (Pramanik *et al.* 2021) ou des polysaccharides (Solmaz *et al.* 2018). Elles peuvent aussi être utilisées pour traiter les eaux usées (Mehrotra *et al.* 2020), notamment en séquestrant les ions cuivre de l'eau, empêchant leur entrée dans les plantes (Li *et al.*, 2022).

### ***Bacillus cytotoxicus***

Les bactéries de cette espèce sont thermotolérantes, elles ont la capacité de croître jusqu'à 52°C. Elles synthétisent la cytotoxine K-1, une cytotoxine diarrhéique, qui semble être unique à cette espèce et plus cytotoxique que la cytotoxine K-2 produite par d'autres espèces. Seuls quelques isolats de cette espèce ont été caractérisés en ce qui concerne leurs effets cytotoxiques. Cependant, le rôle de la cytotoxine K-1 en tant qu'agent causal d'infections alimentaires reste méconnu (Guinebretière *et al.*, 2013 ; Koné *et al.*, 2021). *B. cytotoxicus* a été initialement isolé lors d'une épidémie d'origine alimentaire qui a entraîné trois décès. Ce microorganisme a depuis été lié à d'autres épidémies impliquant toutes des matrices alimentaires d'origine végétale. Une autre caractéristique importante de *B. cytotoxicus*, par rapport aux autres souches du groupe *B. cereus*, est l'absence apparente de gènes codant pour le facteur de transcription alternatif Sigma B et ses protéines associées, régulon clé de la réponse générale au stress (Cairo *et al.*, 2021).

## ***Bacillus toyonensis***

*B. toyonensis* est une espèce qui présente des valeurs ANI inférieures à 92 % par rapport aux souches Bc types et des valeurs ANI inférieures à 94 % par rapport aux autres espèces du groupe *B. cereus sensu lato* (Jiménez *et al.*, 2013). Elle est utilisée dans le monde comme probiotique sous le nom commercial TOYOCERIN® depuis 1975. Les spores de cette souche sont utilisées comme additif alimentaire pour les porcs, les volailles, les bovins, les lapins et l'aquaculture (Jiménez *et al.*, 2013). L'ingestion des spores de cette souche ne montre pas de toxicité pour divers mammifères, y compris les humains (Trapecar *et al.*, 2011 ; Williams *et al.*, 2009). Des études récentes ont également montré que cette espèce pouvait améliorer la réponse immunitaire des souris et des brebis (Santos *et al.*, 2018 ; 2021) ainsi que la croissance des plantes (Contreras-Pérez *et al.*, 2019 ; Rojas-Solis *et al.*, 2020). Néanmoins, en 2014, l'Agence Européenne de Sécurité des Aliments (EFSA, European Food Safety Agency) a émis des réserves quant à la sécurité de l'utilisation de la TOYOCERIN® car la souche utilisée porte des gènes de résistance au chloramphénicol (*catQ*) et à la tétracycline (*tetM*), elle porte également les opérons complets *nhe* et *hbl* codant pour des entérotoxines, révoquant ainsi l'autorisation de son utilisation dans toute l'Union Européenne à compter de 2015 (EFSA Journal, 2014).

### **1.2 Chapitre II. Cycle infectieux de *Bacillus thuringiensis* dans la larve de *Galleria mellonella***

Parmi les espèces présentées ci-dessus, celle qui concentre l'intérêt de notre étude est l'entomopathogène **Bt**, au sein du modèle hôte/pathogène Gm/Bt. Ce modèle est utilisé depuis plus de vingt ans et a permis l'étude du comportement *in vivo* de Bt dans la larve de ce lépidoptère ainsi que l'étude de l'immunité de Gm (Salamitou *et al.*, 2000 ; Nielsen-Leroux *et al.*, 2012 ; Wojda *et al.*, 2017). Ce chapitre décrit le modèle hôte/pathogène utilisé dans notre étude et commence par une présentation de Gm, un modèle insecte de plus en plus exploité.

## 1.2.1 *Galleria mellonella*, un modèle pas comme les autres

### a. Présentation générale

#### ***Taxonomie et cycle de vie***

Gm est la seule espèce du genre *Galleria*. Elle fait partie de l'embranchement des Arthropodes, animaux caractérisés par un corps segmenté en métamères. Cet embranchement comprend entre autres les arachnides, les crustacés et les insectes tels que Gm. Le genre *Galleria* appartient à l'ordre des Lépidoptères et à la famille des Pyralidés (Ménard *et al.*, 2021) (figure 4.a). Son nom d'usage, « fausse teigne de la cire », fait référence à son comportement ravageur des ruches d'abeilles qui constitue son habitat naturel et duquel il se nourrit des rayons de cire. Cet insecte est ubiquitaire, il est en effet retrouvé dans quasiment toutes les régions du monde (Kwadha *et al.*, 2017).

Gm a un cycle de vie en quatre stades : **1. Œuf**, **2. Larve**, **3. Chrysalide**, **4. Papillon (adulte)** (figure 4.b). Dans des conditions optimales, la durée de vie moyenne de cet insecte est de 7 à 9 semaines. Des facteurs tels que l'humidité, la température, la disponibilité de la nourriture ou encore le cannibalisme et la compétition pour les ressources peuvent faire varier cette durée de vie (Wojda *et al.*, 2020). L'alimentation joue un rôle dans le développement de Gm, dans la mesure où une alimentation pauvre rend les insectes plus sensibles aux infections tandis qu'une alimentation riche stimule leur système immunitaire (Banville *et al.*, 2012 ; Kazek *et al.*, 2019).

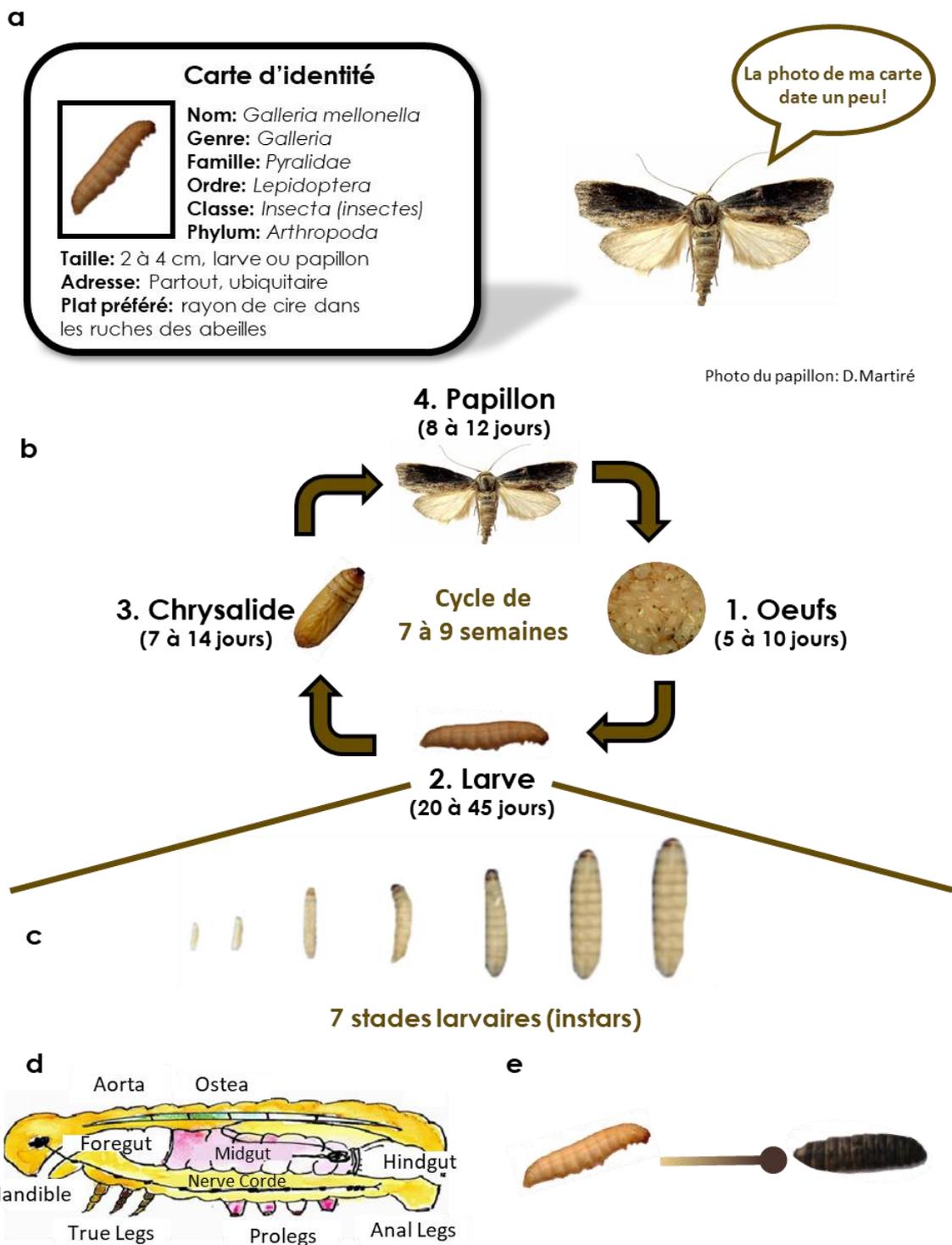
**1. Le stade œuf** dure entre 5 à 10 jours. La fécondité de cette espèce est élevée : la femelle peut pondre jusqu'à 1000 œufs disposés géométriquement par lots de de 50 à 355 œufs (Wojda *et al.*, 2020)

**2. Le stade larvaire** dure entre 20 à 45 jours. A l'éclosion des œufs, les larves mesurent en moyenne 1 cm de long et 1,5 à 2 mm de diamètre. Dans la nature, les larves vont se nourrir dans les nids d'abeilles, d'un peu de miel, de cire, des exuvies de larves d'abeilles

et des résidus de pollen. Les larves vont se développer jusqu'à atteindre une taille de 2,5 à 3 cm de long et 5 à 7 mm de diamètre au dernier stade larvaire (Kwadha *et al.*, 2017). Celui-ci est le plus couramment utilisé pour réaliser les infections, comme c'est le cas pour les expériences de cette étude. Il y a 7 stades larvaires et les deux derniers sont ceux au cours duquel les larves se développent le plus (Kumar et Khan, 2018) (figure 4.c). Treize métamères sectionnent le corps de la larve, qui est constitué de 3 paires de pattes avant suivies par 4 paires de ventouses appelées « fausses-pattes ». La tête comprend une mandibule, trait caractéristique des arthropodes *Mandibulata* (figure 4.d).

**3. Le stade chrysalide** dure 7 à 14 jours et concerne les larves qui ont fini leur croissance. Une fois cette dernière achevée, celles-ci cessent alors leur prise alimentaire et se mettent en quête d'un endroit sûr pour attacher leur cocon, comme les cavités des nids d'abeille. Le cocon de soie protège des menaces extérieures telles que les insectes, les parasites et les variations de température (Shaik *et al.*, 2017).

**4. Le stade papillon (adulte)** dure entre 8 à 9 jours pour les femelles et jusqu'à 12 jours pour les mâles. Gm sort de sa chrysalide à la fin de la métamorphose ; la différenciation en mâle ou femelle est alors aboutie (Wojda *et al.*, 2020).



**Figure 4. Présentation du modèle insecte *Galleria mellonella*** – **a.** *Galleria mellonella* est un insecte ubiquitaire qui est la seule espèce du genre *Galleria*. Cet insecte fait partie de l'embranchement des Arthropodes. **b.** Le cycle de vie de Gm est composé de 4 étapes majeures : Œufs, Larves, Chrysalide, Papillon qui ont des durées variables. **c.** Le stade larvaire est composé de 7 stades. **d.** Anatomie de Gm en coupe longitudinale (Frawley *et al.*, 2019). **e.** Une fois infecté par un pathogène (ici, Bt), le corps de Gm mélanise, il s'agit d'une réaction immunitaire.

## ***Gm, un modèle pas comme les autres, pourquoi ?***

En 1938, Thomas L. Smith réalise pour la première fois une étude génétique avec Gm comme modèle, il en introduit ainsi les raisons : "Sa viabilité, même dans des conditions défavorables, sa nature très prolifique et son adaptabilité générale au laboratoire expliquent son choix pour cette étude." (Smith, 1938). Nous constatons que 85 ans plus tard, de plus en plus de scientifiques partagent cette affirmation et que l'utilisation de ce modèle pour l'étude des interactions hôte-pathogène a connu une forte croissance depuis le début du siècle. Sur la base de données PubMed, pas moins de 1000 études référencent Gm depuis le début de cette thèse (figure 5.a). En 2018, son génome a été entièrement séquencé (Lange *et al.*, 2018).

En 2010, le traité d'Amsterdam pour la protection des animaux met en place le principe de Russell et Burch des « 3R » (Remplacer, Réduire, Raffiner) concernant les projets de recherche nécessitant des expérimentations animales (Graham et Prescott, 2005 ; Hubrecht et Carter, 2019). L'éthique n'est pas la seule contrainte au cœur de l'utilisation de modèles animaux. En effet, les ressources requises pour mener des expérimentations sur modèles mammifères sont importantes, qu'elles soient humaines et économiques. Le coût d'une expérience nécessitant par exemple des modèles rongeurs peut s'élever à plusieurs milliers d'euros selon les catalogues des différents fournisseurs. Les élevages sont complexes et les expériences peuvent durer des mois. L'intérêt d'utiliser un modèle tel que Gm apparaît alors évident : il est possible d'obtenir un nombre important d'individus dans un élevage moins complexe et plus éthique, moins coûteux et sur une échelle de temps réduite. Si l'installation d'un élevage n'est pas toujours possible selon les laboratoires, les expériences l'utilisant restent réalisables car les larves de Gm sont peu onéreuses et faciles à obtenir auprès de vendeurs d'appâts de pêches (0,10 € par larve). Néanmoins leur alimentation n'est ni connue, ni standardisée et des hormones ou des antibiotiques peuvent être utilisés. Des laboratoires disposant d'un élevage peuvent également fournir des larves (comme celui où cette thèse est réalisée : GME, Micalis, INRAE à 0,90 € HT par larve, sans

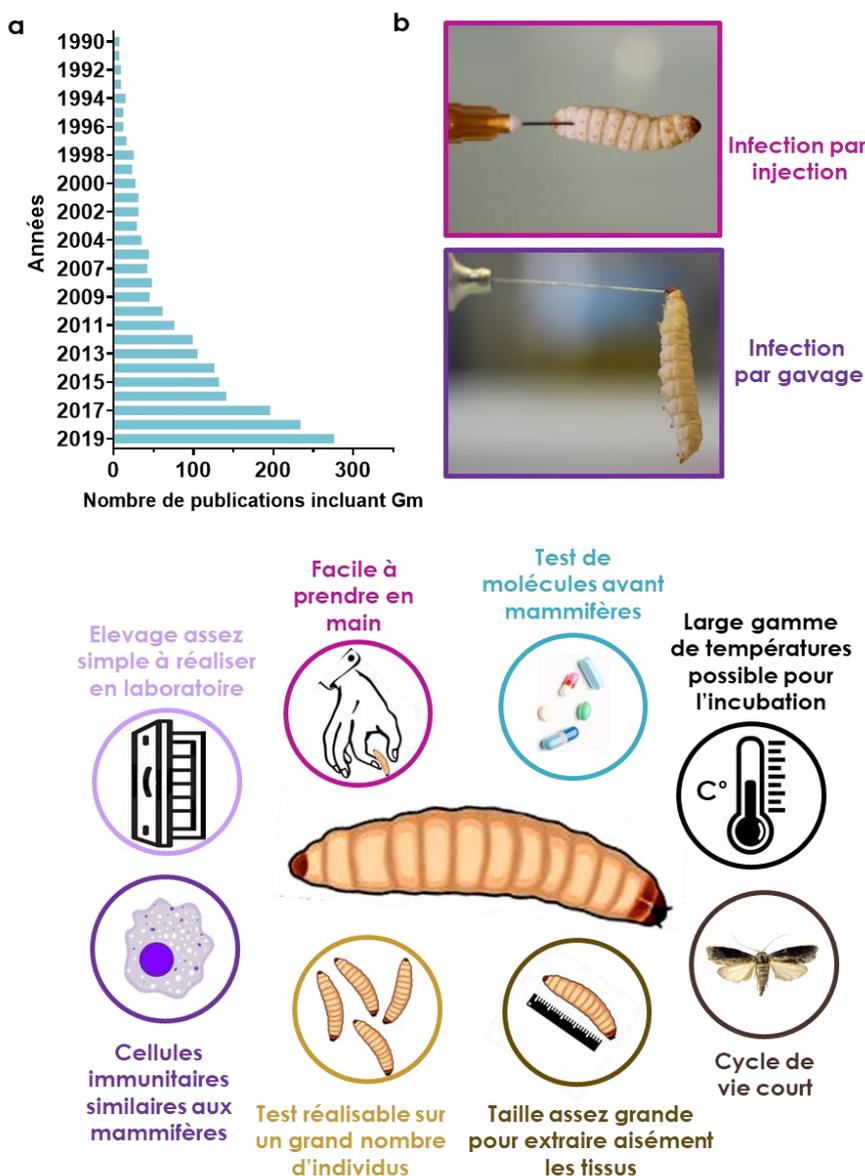
hormones ni antibiotiques), ou encore des compagnies privées spécialisées (où le prix de la larve avoisine 1,40 €).

D'autres modèles invertébrés et insectes sont disponibles, comme la drosophile ou d'autres larves. Bien que certains de ces modèles partagent des caractéristiques communes, le cumul des différents avantages qui vont être décrits dans les prochaines lignes et dans la [figure 5.c](#) est unique à Gm. Le nombre important de larves obtenues à chaque ponte et leur taille est un avantage certain comparé à d'autres modèles. Elles sont facilement manipulables de par leur taille car elles ne sont ni trop petites ni trop imposantes et les infections peuvent être réalisées à l'aide d'aiguilles et de seringues classiques ([figure 5.b](#)). La dissection et l'extraction de tissus sont possibles, ainsi que la quantification de l'inoculum contrairement à d'autres modèles invertébrés. Le nombre important d'individus générés et leur court cycle de vie rendent la répétition des expériences aisée. Les tests sont également réalisables à grande échelle et notamment à haut débit dans le cadre de cribles et d'études d'antimicrobiens ou pour comparer la virulence de nombreuses souches (Cook et McArthur, 2013 ; Tsai *et al.*, 2016). La mort de la larve de Gm est facilement identifiable de par l'arrêt de ses mouvements et la mélanisation de son corps ([figure 4.d](#)) (Cutuli *et al.*, 2019). L'infection peut alors être suivie à l'œil nu et le temps de létalité se détermine aisément, ce qui constitue également un atout. Un autre avantage remarquable et unique à Gm est le fait que les larves soient très résistantes et qu'elles survivent à un large spectre de température : à la suite des infections les larves peuvent être incubées entre 4 et 40°C. Cet avantage en particulier et le fait qu'ils se cumulent à ceux déjà décrits, fait de Gm un modèle pas comme les autres, car il permet d'étudier l'agent infectieux à sa température optimale de croissance ou de la faire varier pour réaliser des tests (Mowlds et Kavanagh, 2008).

Enfin, le dernier avantage réside dans le fait que le système immunitaire de Gm présente de nombreux points commun avec celui des mammifères, ce qui rend les études sur ce modèle d'autant plus pertinentes. A titre d'exemple, l'infection par *Staphylococcus aureus* entraîne la formation de nodules chez Gm avec des structures

similaires à celles trouvées dans les abcès humains (Sheehan *et al.*, 2019). Cependant, l'absence de réponse immunitaire adaptative chez Gm par rapport aux mammifères, constitue une des limites du modèle, le système immunitaire de Gm sera d'ailleurs abordé plus en détails dans le point suivant.

D'autres limites peuvent également être soulignées comme l'absence de standardisation des élevages et le fait que, pour la plupart des études, Gm n'est pas l'hôte naturel des organismes étudiés.



**Figure 5. Intérêt du modèle *Galleria mellonella*** - a. Nombre croissant de publications scientifiques sur Gm entre 1990 et 2019. b. Les infections sont réalisables à l'aide d'aiguilles classiques par gavage ou injection (Photos réalisées au laboratoire avec Christophe Buisson). c. Avantages de l'utilisation de Gm

## b. Défense contre l'agent infectieux

La cuticule joue un rôle analogue à celui de la peau chez les mammifères. C'est la première ligne de défense de Gm contre les agents pathogènes. La cuticule est formée de fibres de chitine dans une matrice de protéines et est recouverte par une membrane composée de stérols, de lipides et d'acides gras (Kazek *et al.*, 2019). Sous cette cuticule, un liquide circulatoire transporte les molécules « signal », les nutriments et les déchets : il s'agit de l'hémolymphe, équivalent du sang chez les mammifères (Wojda, 2017).

Comme évoqué précédemment, Gm dispose d'une immunité innée mais pas d'immunité adaptative. Son immunité est basée sur deux réponses coopératives pour éliminer l'élément étranger : **la réponse cellulaire** et **la réponse humorale** (Figure 6).

Avant d'entrer dans les détails, pour simplifier le décryptage du système immunitaire de Gm, il faut s'imaginer une collaboration entre les acteurs du bloc « réponse cellulaire » et du bloc « réponse humorale ». Ils sont tous les deux capables de reconnaître l'élément étranger puis de l'éliminer. L'élément étranger est reconnu grâce à des protéines, les PRR (Pattern Recognition Receptor) qui peuvent donc être cellulaires ou humorales. Les deux types de réponses sont coopératives : elles interagissent. Par exemple, les effecteurs de la réponse humorale peuvent activer une réponse cellulaire comme la phagocytose et les cellules de la réponse cellulaire peuvent larguer des précurseurs d'effecteurs humoraux, comme le précurseur de la mélanine.

**La réponse cellulaire** s'effectue via les hémocytes dont il existe 6 types : les prohémocytes, les plasmocytes, les granulocytes, les sphérulocytes, les coagulocytes et les oenocytoïdes (Wu *et al.*, 2016). Les hémocytes sont attachés à des organes internes tels que le tractus digestif, les corps gras, ou retrouvés en circulation dans l'hémolymphe (Browne *et al.*, 2013). Ces cellules ont un rôle de phagocytose, d'encapsulation et de nodulation de l'agent extérieur.

La phagocytose est similaire à celles des mammifères : les PRR cellulaires sont des protéines associées aux hémocytes, elles peuvent directement reconnaître le pathogène ou se lier aux PRR humoraux, qui sont des protéines libres dans l'hémolymphe pouvant opsoniser l'élément étranger. Ensuite, une cascade de signalisation induit le réarrangement du cytosquelette d'actine, permettant ainsi d'internaliser l'élément étranger dans le phagosome. Après recrutement du lysosome, le phagosome mature, dit phagolysosome, active des mécanismes de destruction de l'agent pathogène (Brivio *et al.*, 2010).

L'encapsidation permet la formation d'une capsidite autour des éléments étrangers de plus grande taille (nématodes, parasites). La capsidite est composée de plasmocytes, de granulocytes et de polymères de mélanine (Pereira *et al.*, 2018).

La nodulation est la formation d'une couche d'hémocytes autour de l'élément étranger impliquant également la formation de mélanine. A la différence de l'encapsidation, la nodulation s'effectue uniquement sur des microorganismes de petite taille (bactéries ou groupe de bactéries, levures ou groupe de levures, petits filaments de champignons) et les nodules peuvent être eux-mêmes encapsidés (Dubovskiy *et al.*, 2016).

**La réponse humorale** implique plusieurs effecteurs solubles comme des opsonines, des produits de cascades protéolytiques, de la mélanine et des peptides antimicrobiens (Sheehan *et al.*, 2018).

Des analyses de protéomique ont permis de mettre en évidence plus de 18 peptides antimicrobiens dont des cécropines, la galiomycine, la gallerimycine, la gloverine, etc. Ces peptides sont majoritairement produits dans les hémocytes, les corps gras et les glandes salivaires. Ils attaquent la membrane des agents pathogènes ou empêchent des processus vitaux (Brown *et al.*, 2009 ; Tsai *et al.*, 2016 ; Sheehan *et al.*, 2020).

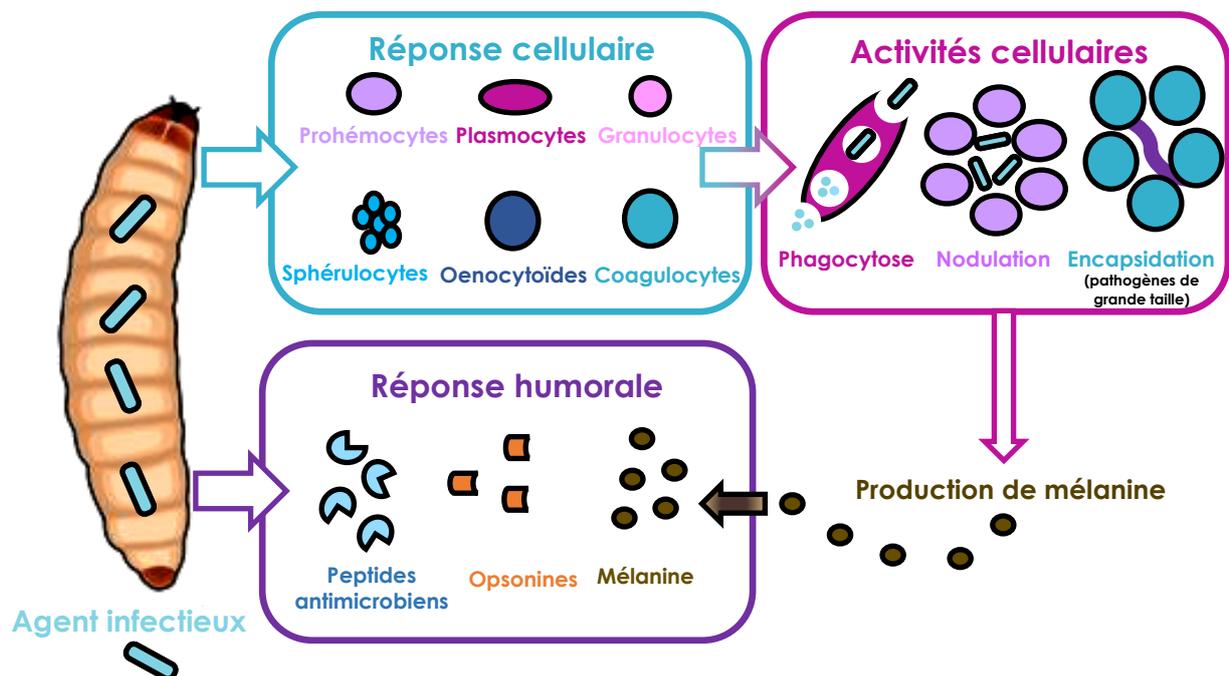
Quant aux opsonines, elles reconnaissent et se lient à des éléments tels que les lipopolysaccharides (LPS), l'acide lipotéichoïque et le peptidoglycane. Ces opsonines sont les PRR humoraux énoncés précédemment. Dans l'état actuel des connaissances, quatre PRR humoraux ont été décrits chez Gm (Wang *et al.*, 2019 ; Aathmanathan *et al.*, 2018). Par exemple, la Gm-CP8, petit peptide de 9 kDa, est capable de déclencher la phagocytose. L'ApoLP-III (Apolipoporphin-III) est quant à elle capable de reconnaître différents types de pathogène. Cette dernière peut aussi stimuler la production de superoxyde par les hémocytes, augmenter la production de cécropine et agir en synergie avec le lysozyme, augmentant ainsi son activité antimicrobienne (Staczek *et al.*, 2018 ; Maravilla *et al.*, 2020).

Un des mécanismes de la réponse humorale est la coagulation de l'hémolymphe, elle permet la cicatrisation en empêchant la perte de l'hémolymphe suite à une blessure. Elle permet aussi, comme l'encapsidation, de contrer la propagation d'un agent infectieux dans l'hémolymphe. Elle repose sur une coopération entre la réponse humorale et la réponse cellulaire, en faisant appel aux hémocytes. Dans l'hémolymphe, les hémocytes de type granulocytes larguent des protéines coagulantes, les lipophorines, à proximité de l'agent étranger grâce à l'activation de la cascade de coagulation par les PRR. L'activation de la cascade de coagulation peut aussi se faire grâce aux oenocytoïdes qui détectent la présence d'acides nucléiques extracellulaires (Altincicek *et al.*, 2008). Les granulocytes et les oenocytoïdes sont retrouvés dans des coagula mélanisés, car la lyse des oenocytoïdes libère un précurseur de la mélanine, la pro-phénoloxydase (pro-PO, dont le fonctionnement sera expliqué au prochain paragraphe). La coagulation et la production de mélanine sont mises en place de manière synergique pour piéger les agents extérieurs (Chen et Keddie, 2021).

La mélanisation est un mécanisme clé de la réponse humorale. Elle est également impliquée dans les processus d'encapsidation et de nodulation comme décrits précédemment, la mélanisation participe donc également à la fois à la réponse cellulaire et à la réponse humorale. La mélanine est un polymère de phénols, sa

production est catalysée par une phénoloxydase (PO). La PO est produite sous la forme inactive pro-PO dans les hémocytes. Lorsque les PRR se lient à leurs cibles, à la surface des molécules bactériennes par exemple, une cascade de protéases à sérine clive la pro-PO en PO. La PO catalyse l'oxydation des phénols en quinones, dont la polymérisation forme la mélanine (Eleftherianos et Revenis, 2011). Une accumulation de PO produit des espèces réactives de l'oxygène (ERO), endommageant également les cellules bactériennes, mais également les propres cellules de l'insecte. De ce fait, l'activation de la PO est contrôlée par des inhibiteurs de protéases (Lu *et al.*, 2014).

Face à cette défense bien élaborée par Gm, Bt est tout de même capable de réaliser un cycle d'infection complet chez son hôte. Le prochain point présente comment cette bactérie entomopathogène est capable d'envahir son hôte, de le tuer, puis de survivre et de persister dans son cadavre.

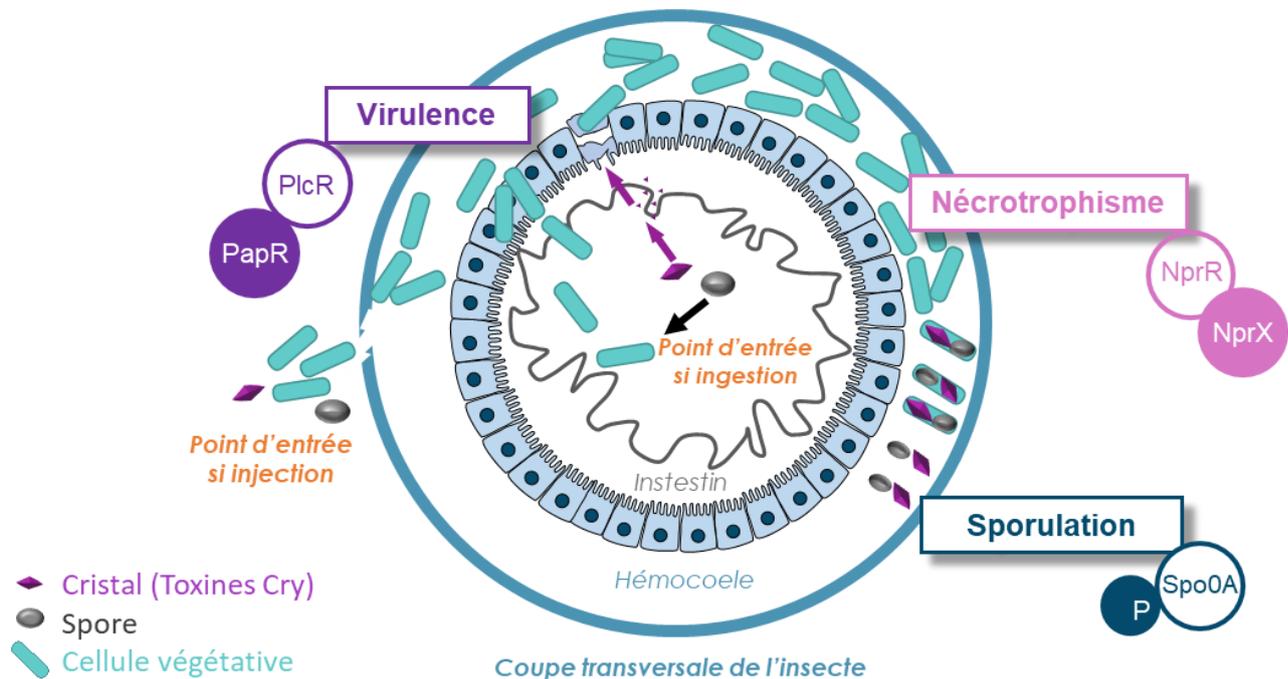


**Figure 6. Système immunitaire de *Galleria mellonella*** - Le système immunitaire de *Galleria mellonella* comprend les composantes d'une réponse cellulaire et d'une réponse humorale. La réponse cellulaire comprend six types de cellules (en haut à gauche). Certaines de ces cellules participent à l'élimination des agents envahisseurs par phagocytose, nodulation et encapsulation, ce qui entraîne la production de mélanine. La mélanine est l'un des composants de la réponse humorale du système immunitaire inné de Gm, qui comprend également des peptides antimicrobiens et des oponines (en bas à gauche). Adapté de (Pereira *et al.*, 2020).

## 1.2.2 Infecter son hôte, le tuer et survivre : un processus bien orchestré par Bt

### a. Invasion de l'hôte

Envahir son hôte nécessite au préalable d'y entrer pour l'infecter. Les infections de Gm par Bt réalisées au laboratoire essayent de mimer des scénarios rencontrés dans la nature. Les infections pratiquées se font selon deux modes : par injection (mode utilisé pour les expériences présentées dans ce travail) ou par gavage. L'infection par gavage mime le scénario d'infection naturel et commun qui conduirait Gm à ingérer des cristaux de Bt et des bactéries (spores ou cellules végétatives). Gm est faiblement sensible aux cristaux seuls et une combinaison cristaux+bactéries est généralement utilisée dans les infections par gavage (Salamitou *et al.*, 2000). L'infection par injection mime la situation où une blessure sur le corps de Gm permettrait l'entrée de Bt aboutissant à une septicémie. La figure 7 présente une schématisation de l'infection via les deux modes présentés et les acteurs clés de cette infection (figure 7).



**Figure 7. Infection de *Galleria mellonella* par *Bacillus thuringiensis*** - Vue en coupe transversale de la larve de Gm infectée par Bt selon deux points d'entrée (en orange) et selon différentes formes de Bt : spores (gris), cristaux (violet) ou cellules végétatives (bleu). Les cellules de Bt vont passer par trois grandes étapes d'infection qui sont encadrées sur la figure avec les peptides activateurs entourés : la virulence sous le contrôle de PapR/PlcR, le nécrotrophisme sous le contrôle de NprR/NprX et la sporulation sous le contrôle de Spo0A. Adapté de (Raymond *et al.*, 2010).

Lorsque Gm ingère un mélange de spores/cristaux, un des plus importants facteurs de virulence de Bt va entrer en action : les toxines Cry. Il existe tout un arsenal de toxines Cry, dont les gènes *cry* sont généralement portés par de grands plasmides. Les toxines sont produites sous la forme d'inclusions cristallines durant la phase de sporulation, comme énoncé précédemment. A noter que les cristaux sont principalement composés par les toxines Cry et Cyt, nommées  $\delta$ -endotoxines (Ehling-Schulz *et al.*, 2019). Selon la souche de Bt, diverses combinaisons de toxines peuvent être retrouvées dans le cristal. Par exemple la souche commerciale, utilisée contre les lépidoptères, *kurstaki* HD1 Dipel® contient 5 gènes de toxines Cry (*cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1Ac*, *cry2Aa* et *cry2Ab*). Il existe plus de 74 classes de protéines Cry et certaines peuvent agir en synergie avec les toxines Cyt (Cyt1Aa et Cyt2Ba notamment contre les moustiques). Il existe également d'autres toxines comme les toxines Sip (Sip1A contre les coléoptères) et les toxines Vip (Vip3A contre les lépidoptères), (Crickmore *et al.*, 2018 ; Ehling-Schulz *et al.*, 2019).

**Après ingestion**, les cristaux vont être solubilisés par le pH alcalin de l'intestin des diptères et des lépidoptères comme Gm (Deist *et al.*, 2014). La solubilisation des cristaux libère la pro-toxine qui est ensuite activée par clivage protéolytique sous l'action des enzymes digestives. Les toxines actives se lient à des récepteurs membranaires spécifiques de l'épithélium intestinal des insectes. Les toxines vont former des pores non-spécifiques, perméables aux acides aminés, aux sucres et aux ions, induisant la lyse de certaines cellules épithéliales et la paralysie de l'intestin. Dans le cadre des infections par gavage réalisées au laboratoire, les larves sont infectées par des bactéries associées à la toxine Cry1C. Ceci leur permet d'avoir accès à l'épithélium intestinal en fragilisant la matrice péritrophique, barrière qui protège le tube digestif (Consentino *et al.*, 2021). La barrière intestinale étant déstabilisée, le transit intestinal ralentit, ce qui favorise ensuite la germination des spores. Les cellules végétatives vont alors se diviser et coloniser la surface de l'épithélium intestinal (Buisson et Nielsen-Leroux., non publié).

Les bactéries végétatives vont sécréter un arsenal d'enzymes dégradatives sous le contrôle du régulateur PlcR, compromettant ainsi l'intégrité de l'intestin de Gm. PlcR est un régulateur transcriptionnel retrouvé uniquement dans le groupe *B. cereus*. Il régule près de 45 gènes codant notamment des facteurs de virulence extracellulaires tels que des entérotoxines, des hémolysines, des phospholipases et des protéases (Agaïsse *et al.*, 1999 ; Gohar *et al.*, 2002, 2008 ; Salamitou *et al.*, 2000). PlcR est un régulateur de quorum sensing (Slamti *et al.*, 2002), mécanisme utilisé par les bactéries pour coordonner collectivement certains processus physiologiques. Ce mécanisme leur permet de détecter la densité cellulaire grâce à de fines régulations génétiques. PlcR appartient à la famille des RNPP (Rap, NprR, PlcR, PrgX) retrouvée chez les Gram+ (Declerck *et al.*, 2007). Les régulateurs de cette famille (Rap phosphatases ou régulateurs transcriptionnels NprR, PlcR, PrgX) interagissent directement avec leur peptide de signalisation. Les processus physiologiques contrôlés par cette famille chez Bt sont par exemple la virulence, le nécrotrophisme ou encore la sporulation (Slamti *et al.*, 2014). La transcription de *plcR* et de son peptide activateur *papR* débute en fin de phase exponentielle, elle est auto-activée par PlcR et réprimée par la forme phosphorylée du régulateur pléiotropique Spo0A (Lereclus *et al.*, 1996 ; Lereclus *et al.*, 2000). PapR est exporté dans le milieu extracellulaire, mûri et réimporté dans la bactérie, *via* l'oligopeptide perméase Opp (Gominet *et al.*, 2001 ; Slamti *et al.*, 2002). La liaison de deux PapR à un homodimère de PlcR induit un changement de conformation, orientant correctement ses motifs HTH pour lier l'ADN (Declerck *et al.*, 2007 ; Grenha *et al.*, 2013) permettant ainsi l'activation de gènes codant les facteurs de virulence énoncés précédemment.

**Après injection**, les bactéries se retrouvent directement dans l'hémocoèle, évitant ainsi le passage de la barrière intestinale et ne nécessitant donc pas l'action des toxines Cry. Les bactéries vont ainsi se multiplier, envahir l'hôte et conduire à une septicémie. L'infection par injection est réalisable plus facilement que par gavage et elle reste le mode d'infection le plus répandu dans les laboratoires. De nombreux facteurs

impliqués dans la pathogenèse de Bt et Bc dépendants ou non de PlcR, ont été identifiés grâce à cette méthode. Ils comprennent entre autres des gènes associés au métabolisme du fer et de son acquisition. Par exemple, la bacillibactine, un sidérophore synthétisé par la machinerie codée par les gènes *entA-dhBCF* chez Bc, a été démontrée comme ayant un rôle important au cours de l'infection. En effet, il a été montré que l'abolition de sa synthèse atténue la virulence de Bc (Segond *et al.*, 2014). La virulence d'un mutant  $\Delta fur$ , un gène codant un régulateur majeur de l'homéostasie du fer, est également atténuée via ce mode d'infection (Harvie *et al.*, 2005). Ils comprennent également des gènes impliqués dans la défense contre les peptides antimicrobiens et les phagocytes (Kamar *et al.*, 2017) ou dans la mobilité bactérienne (Mazzantini *et al.*, 2016). Le rôle de régulateurs plus globaux a également été identifié tels que CodY (régulateur transcriptionnel indirect de certains facteurs de virulence, entre autres) (Frenzel *et al.*, 2012) et AbrB (régulateur global de la transition vers la phase stationnaire impliqué dans la synthèse de toxines), (Lücking *et al.*, 2009).

Une fois Gm morte, Bt cesse progressivement de produire les facteurs de virulence sous le contrôle de PlcR (Verplaetse *et al.*, 2015 ; Dubois *et al.*, 2016). Un second régulateur de quorum sensing, NprR, dont la transcription est entre autres activée par PlcR, permet ensuite à Bt d'adopter un mode de vie nécrotrophe (Dubois *et al.*, 2013 ; Dubois *et al.*, 2016).

#### b. Nécrotrophisme

NprR est un autre régulateur RNPP majeur dans le cycle infectieux de Bt. Il est responsable du mode de vie nécrotrophe de cette bactérie (Dubois *et al.*, 2016). Le régulon NprR comprend une quarantaine de gènes responsables de la production d'enzymes impliquées dans la dégradation du cadavre de la larve. Ces enzymes dégradatives sont des protéases, des lipases, des estérases et des chitinases. NprR permet également la synthèse de la kurstakine, un lipopeptide impliqué dans la formation de biofilms (Dubois *et al.*, 2016 ; Gélis-Jeanvoine *et al.*, 2017). NprR active

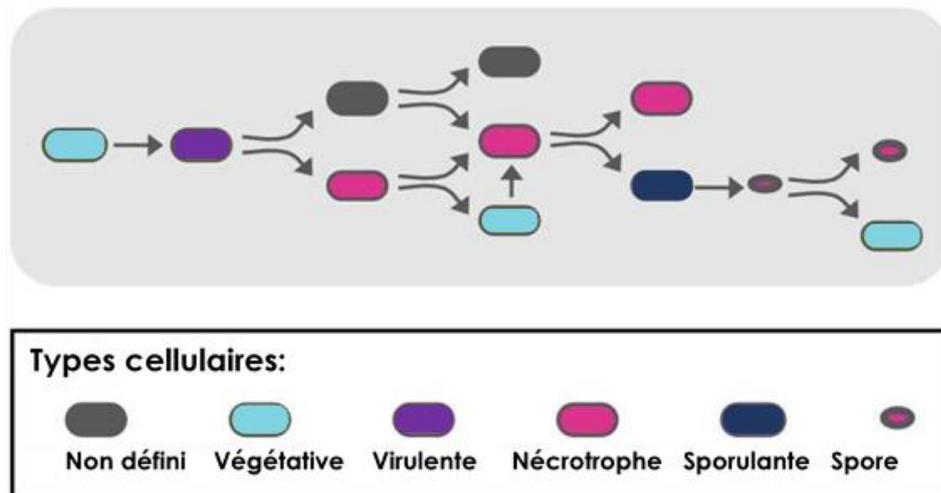
également l'expression du gène *nprA*, codant une métalloprotéase extracellulaire ayant une forte activité protéolytique et capable de cliver divers composants tissulaires tels que le collagène, la laminine ou la fibronectine (Donovan *et al.*, 1997 ; Chung *et al.*, 2006). Le régulon NprR est nécessaire pour la survie de Bt dans le cadavre de Gm (Dubois *et al.*, 2016). En effet, un mutant  $\Delta nprR-nprX$  est capable de se multiplier après injection dans l'hémocoèle de Gm et de tuer la larve, mais le nombre d'UFC/larve chute drastiquement dans le cadavre de l'insecte. Les différentes enzymes dégradatives sous le contrôle de NprR permettraient d'utiliser le cadavre comme source de nutriments, retardant potentiellement l'entrée en sporulation (Dubois *et al.*, 2016).

Le gène *nprR* est organisé en opéron avec le gène codant son peptide activateur, *nprX*. Les gènes *nprR-nprX* sont co-transcrits à partir d'un promoteur  $P_A$  dépendant de SigA en amont du gène *nprR* (figure 8). La transcription à partir de ce promoteur commence à l'entrée en phase stationnaire, elle est contrôlée par deux régulateurs transcriptionnels déjà évoqués : CodY et PlcR. En phase exponentielle, CodY a un rôle répresseur de *nprR-nprX*, puis à l'entrée en phase stationnaire, l'inhibition est levée et PlcR active la transcription de *nprR-nprX* en se liant à une boîte PlcR en amont de  $P_A$ . Le gène *nprX* peut également être transcrit indépendamment de *nprR* à partir des promoteurs  $P_H$  (dépendant de SigH) et  $P_E$  (dépendant de SigE). Ces promoteurs permettent la transcription de *nprX* en phase tardive lorsque la transcription à partir de  $P_A$  est achevée (Dubois *et al.*, 2013). Le peptide NprX est sécrété, mûri et réimporté dans la cellule par deux oligopeptides perméases, Opp et Npp (figure 8). A l'intérieur de la cellule, le peptide NprX sous sa forme mature se lie à NprR ce qui permet la transcription de *NprA*. L'homodimère de NprR joue quant à lui un rôle de régulateur post-traductionnel. En effet la forme apo de NprR peut se lier au régulateur de réponse intermédiaire Spo0F, bloquant ainsi le phosphorelais qui permet la phosphorylation de Spo0A, nécessaire à la sporulation. Mais dès lors que NprX se lie à NprR, NprR ne peut plus se lier au facteur Spo0F, ce dernier peut alors activer le phosphorelais et initier la sporulation (figure 8) (Perchat *et al.*, 2016). L'ensemble de ces



### c. Dissémination

Lorsqu'un cadavre d'insecte finit par s'appauvrir en ressources, Bt doit, pour survivre, trouver une nouvelle source de nutriments. S'il n'y parvient pas, il peut alors sporuler et attendre des conditions plus favorables à sa multiplication. Néanmoins, toute la population ne s'engage pas en sporulation (Verplaetse *et al.*, 2015). Il a été montré que dans un cadavre de larve de Gm, la population de Bt est composée de plusieurs sous-populations : une population virulente, une population nécrotrophe, une population sporulante et une sous-population non-caractérisée, cette dernière faisant l'objet des travaux de cette thèse (Dubois *et al.*, 2016 ; Verplaetse *et al.*, 2015). La sous-population non-caractérisée comprend au moins 60% de cellules vivantes et ne semble pas être en phase exponentielle, car le promoteur du gène *abrB* n'est pas activé (Ben Rejeb *et al.*, 2017). Le promoteur du gène *cry3A*, spécifique de la phase stationnaire, ne semble également pas activé (non publié). Les différentes étapes de différenciation sont schématisées sur la [figure 9](#).



**Figure 9. Différenciation de *Bacillus thuringiensis* au cours de l'infection** - Modèle représentant les différents types cellulaires de Bt pendant l'infection. Les formes oblongues représentent des cellules dans un état indéfini (gris), en phase exponentielle de croissance (bleu clair), virulentes (violet), nécrotrophes (rose) et engagées dans la sporulation (bleu foncé). Les spores sont représentées par des formes ovales rouges. Après l'infection par des cellules en phase exponentielle, les bactéries sont végétatives. Après le stade de virulence et la mort de l'hôte, une partie de la population va être nécrotrophe. Parmi ces bactéries, il est suggéré que certaines vont rentrer dans un état végétatif. La sporulation s'active ensuite dans une partie des cellules nécrotrophes. Certaines spores seront ensuite capables de germer et de reprendre une croissance végétative (Ben Rejeb *et al.*, 2017).

Comme énoncé précédemment, la sporulation de Bt s'accompagne de la production du cristal parasporal. Ce duo spore-cristal pourra éventuellement constituer le vecteur d'une prochaine infection qui permettra la dissémination de Bt. Le génome de Bt est riche en gènes codant pour des facteurs sigma extra-cytoplasmiques ( $\sigma$ ECF), il en possède au moins 10. Ces facteurs sigma activent généralement l'expression de gènes en réponse à des signaux extracellulaires, comme par exemple la disponibilité de sources de fer spécifiques, permettant ainsi l'adaptation des bactéries à leur environnement et la colonisation de nouvelles niches (Schmidt *et al.*, 2011).

Quant à la population non-sporulante, elle pourrait permettre à Bt de se développer plus rapidement si l'environnement devenait favorable. Elle aurait alors un avantage sur les spores qui devraient s'engager dans le processus de germination.

La germination est un processus complexe, les spores peuvent germer en présence de certains nutriments ou de certaines conditions environnementales. Les germinants varient d'une espèce à l'autre, nous retrouvons par exemple des acides aminés tels que la L-alanine, la L-cystéine, la L-glutamine et la L-thréonine qui peuvent être combinés ou des molécules comme l'inosine, le glucose ou le dodecylamine (Christie et Setlow, 2020). Par exemple chez Bc et Bt, une meilleure réponse est observée pour l'inosine et la L-alanine (Barlass *et al.*, 2002 ; Broussolle *et al.*, 2008). Les traitements à haute-pression, la digestion par le lysozyme et les fragments de peptidoglycane d'autres cellules peuvent également induire la germination (Moir et Cooper, 2015). Les protéines décrites comme impliquées dans la germination ont été initialement décrites chez *Bacillus subtilis* (Bs). La plupart des mécanismes qui régissent la germination présentent des similitudes entre Bs et Bc/Bt. Par exemple, des orthologues de l'opéron *gerA* de Bs sont retrouvés chez Bt/Bc. Plusieurs gènes de Bt, tels que *gerQ*, sont également annotés comme participant à la germination, un processus multi-étapes. Durant la première étape de germination, les germinants se lient aux récepteurs de germination tels que GerA ou GerQ, puis des ions monovalents sont largués par les spores. Par la suite, le  $\text{Ca}^{2+}$ -acide dipicolinique contenu dans le cœur de la spore est

largué à son tour et est remplacé par de l'eau sous le contrôle de l'opéron *spoVA*. A cette étape, la spore n'est plus thermorésistante et elle perd sa réfringence (Vepachedu et Setlow, 2007). Durant la seconde étape, le cortex de la spore est hydrolysé par des enzymes lytiques comme CwlJ et SleB, la spore redevient alors complètement hydratée puis sa tunique est dégradée. Au cours de la dernière étape, les cellules redeviennent végétatives et se multiplient (Moir et Cooper, 2015).

La formation de spores permet d'assurer la survie et la persistance des bactéries dans un environnement hostile. Elles pourront ensuite germer lorsque les conditions redeviendront favorables, se multiplier et coloniser leur environnement. La sporulation est une voie de survie sûre mais coûteuse en énergie et irréversible passée un certain stade. D'autres voies de survie peuvent alors s'avérer envisageables pour économiser des ressources qui seraient allouées à la germination, ou dans des contextes n'ayant pas permis la germination.

### **1.3 Chapitre III. Voies de survie chez les *Bacillus***

Ce chapitre présente les principales voies de survie empruntées par les bactéries du genre *Bacillus* et qui pourraient éventuellement être transposées à Bt, si la démonstration n'en a pas été encore faite. En ouvrant cette description au genre *Bacillus*, il est alors possible de passer en revue plus d'exemples, dans la mesure où beaucoup d'études utilisent la bactérie modèle *B. subtilis* et que des analogies sont possibles avec Bt. Par exemple, il est admis que la régulation des étapes clés de la sporulation est transposable à Bt.

#### **1.3.1 Sporulation : le mode de survie ultime**

##### **a. Contexte d'initiation de la sporulation**

La spore survit là où d'autres formes cellulaires auraient eu peu de chances et pour des périodes très longues, ce qui en fait probablement le mode de survie ultime. A titre d'exemple, des spores viables ont été ramenées de l'espace après six ans d'exposition à l'environnement spatial à bord du satellite LDEF (Long Duration Exposure Facility) de

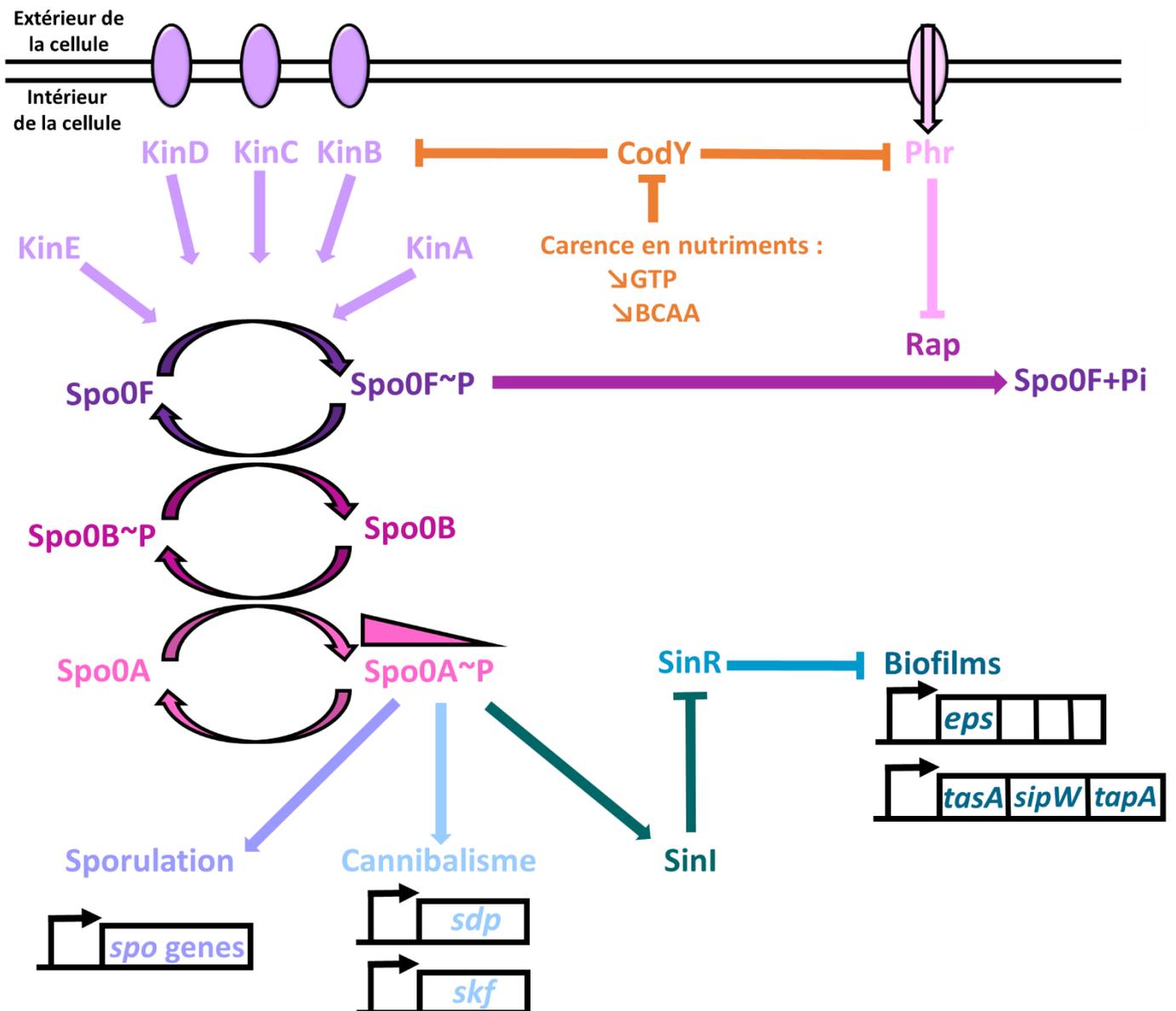
la NASA (Horneck *et al.*, 1994).

La résistance de la spore est notamment due à la condensation de son chromosome, qui est protégé par des protéines spécifiques au cœur d'un noyau déshydraté, le tout entouré de plusieurs couches compactes (figure 11.a et 11.b). Cet assemblage concentrique requiert la mise en place d'étapes hautement régulées, déclenchées par la reconnaissance de signaux de stress environnementaux (Hilbert et Piggot, 2004).

Chez les bactéries du genre *Bacillus*, la sporulation est initiée en début de phase stationnaire, avec la limitation des nutriments nécessaires à la croissance bactérienne. Elle requiert un coût important en ressources et elle est irréversible. En effet, Le processus de sporulation atteint un point de non-retour à partir de l'expression de *sigF* et de *sigE*, il s'agit de la notion de « commitment ». Pour ces raisons, il est admis que si des mécanismes alternatifs à la sporulation sont réalisables, ils seront alors initiés (Phillip et Strauch, 2002 ; Dworkin et Losick, 2005 ; Schulz *et al.*, 2009 ; Mirouze et Dubnau, 2013). Parmi ces mécanismes, la synthèse de flagelles et le chimiotactisme, permettent aux bactéries de se déplacer et d'acquérir des nutriments dans le milieu où elles se trouvent (Harshey, 2003). Un autre mécanisme, désigné cannibalisme, permet le sacrifice de cellules pour en acquérir les nutriments. Il est à ce jour exclusif à Bs. Les cellules engagées en sporulation produisent un facteur létal (SKF, Sporulation Killing Factor) et une protéine « signal » (SDP, Sporulation Delaying Factor) capables de déclencher la lyse des cellules non-sporulantes. Les lysats cellulaires servent alors de nutriments aux cellules voisines engagées en sporulation de manière réversible, soit avant le « commitment ». Elles peuvent utiliser ces lysats afin de croître et de se désengager de leur coûteuse sporulation (Gonzàles-Pastor, 2010). Le mécanisme de compétence permettant l'intégration d'ADN exogène sous le contrôle de ComK améliore notamment la valeur sélective des bactéries (Mirouze et Dubnau, 2013). La production d'antibiotiques ou de toxines ainsi que la synthèse d'enzymes hydrolytiques pour capter les protéines et les polysaccharides sont également d'autres mécanismes

que peuvent employer les bactéries en conditions limitantes (Schulz *et al.*, 2009 ; Mirouze et Dubnau, 2013). Si ces mécanismes ne conduisent pas au retour à la croissance bactérienne, la sporulation est alors initiée.

L'initiation de la sporulation est régie par un système de phosphorelais répondant à des signaux environnementaux, tels que les carences en nutriments signalées par une baisse de niveau de GTP/GDP ou la densité cellulaire signalée par l'accumulation de peptides sécrétés permettant la phosphorylation du régulateur clé de la sporulation : Spo0A. Spo0A est le produit du gène *spo0A*, il est transcrit dès la fin de la phase exponentielle (Fujita et Losick., 2005). Ce régulateur a été découvert chez *Bs* à travers son rôle dans les premières étapes de la sporulation (Piggot et Coote, 1976). Spo0A est un régulateur pléiotrope également impliqué dans certains mécanismes énoncés ci-dessus comme le cannibalisme, la motilité, la formation de biofilms (Piggot et Hilbert, 2004) (figure 10). La figure 10 synthétise l'ensemble des mécanismes présentés ci-dessous. Lorsqu'il y a une carence en nutriments par exemple, le niveau de GTP et de BCAA (Branched Chain Amino Acids) baisse, ce qui va inactiver CodY qui a besoin de ces cofacteurs pour être actif. Ceci permettra de lever son effet répresseur sur des facteurs activant le phosphorelais tels que la kinase KinB ou les Phr (Piggot et Hilbert, 2004). Le système du quorum sensing Rap-Phr déjà évoqué participe en effet à l'activation de Spo0A. Lorsque la densité cellulaire augmente, les peptides Phr sont importés dans la cellule et inhibent les protéines Rap, ce qui a pour conséquence de lever leur activité phosphatase sur le régulateur de réponse intermédiaire Spo0F, permettant ainsi l'activation du phosphorelais (Parashar *et al.*, 2011). D'autres régulations se mettent également en place lorsque le milieu s'appauvrit : Spo0A phosphorylé va activer la transcription de SinI, inhibiteur de SinR. SinR est un régulateur transcriptionnel qui réprime l'expression des gènes nécessaires à la formation des biofilms dans un milieu riche en nutriments (Mandic-Mulec, Doukhan et Smith 1995 ; Shafikhani *et al.*, 2002).

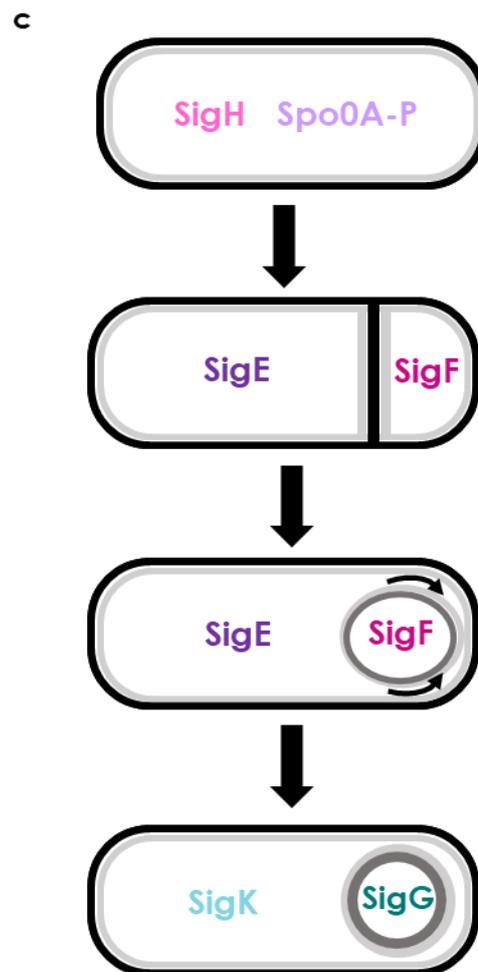
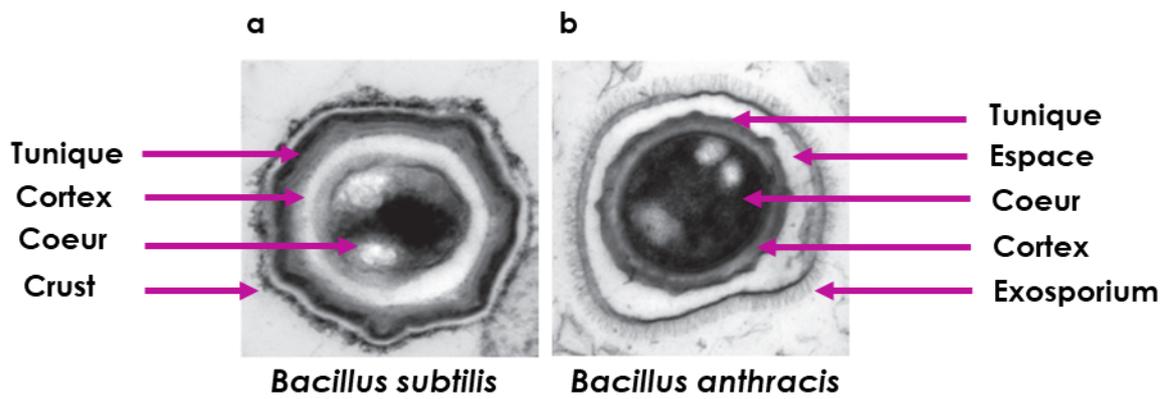


**Figure 10. Initiation de la sporulation et d'autres mécanismes sous le contrôle de Spo0A** - Différents stimuli sont détectés par les kinases KinA-E (violet clair), première ligne à gauche de la figure) ce qui a pour conséquence d'activer le phosphorelais conduisant à l'activation (flèche) de Spo0A. La quantité de Spo0A~P module un ensemble de mécanismes. Lorsqu'il est présent en faible quantité, il initie le cannibalisme ou la formation de biofilms (bleu), en quantité plus élevée il va initier la sporulation (violet). La sporulation peut être enclenchée par une carence en nutriments : le niveau de GTP et de BCAA (Branched Chain Amino Acids) baisse, inactivant ainsi CodY (barre) et levant son effet inhibiteur sur l'activation du phosphorelais initiant ainsi la sporulation (orange). La densité cellulaire influe aussi sur Spo0A : lorsque la densité cellulaire augmente, les peptides Phr sont importés dans la cellule et inhibent les protéines Rap (rose). L'activité phosphatase de Rap sur Spo0F est alors inhibée ce qui enclenche également le phosphorelais (prune). Adapté de (Mirouze et Dubnau, 2013) et de (Piggot et Hilbert., 2004).

## b. Régulation de la sporulation : étapes clés

Comme indiqué précédemment, l'initiation de la sporulation est régie par un système de phosphorelais. Différents stimuli extracellulaires tels que des changements de pression osmotique ou une limitation en oxygène sont reconnus par les cinq kinases, KinA, KinB, KinC, KinD, KinE (Liu *et al.*, 2018). Elles vont alors s'autophosphoryler et transférer leur groupement phosphate au régulateur de réponse intermédiaire Spo0F. Spo0F le transmet ensuite à la protéine Spo0B capable d'activer le régulateur majeur de la sporulation Spo0A. Une fois Spo0A phosphorylé, la sporulation est initiée. L'entrée en sporulation requiert des concentrations élevées de Spo0A~P (figure 10) (Fujita *et al.*, 2005) et se produit de façon stochastique dans la population (Chastanet *et al.*, 2010). Sur la figure 11.c, les étapes de la sporulation sont présentées et le code couleur utilisé est repris dans les prochaines lignes.

Une fois que Spo0A~P est phosphorylé, deux programmes d'expression génique impliquant différents facteurs sigma se mettent en place en parallèle, un dans la cellule mère et un dans la préspore. Une fois la sporulation initiée, un septum asymétrique se forme sous le contrôle de SigH, la cellule mère se différencie et un petit compartiment s'y développe : la préspore. Ce processus va se faire sous le contrôle des facteurs sigma SigF et SigE. Dans la préspore, le régulon de SigF va activer SigE dans la cellule mère. SigE et SigF vont à leur tour activer SigG dans la préspore. Parallèlement à l'activation de SigG, une couche de peptidoglycane va se mettre en place autour de la préspore : le cortex. Des gènes sous le contrôle de sigE activent SigK dans la cellule mère (Piggot et Hilbert, 2004). Une fois SigK activé, il y a formation des tuniques de la spore. Les tuniques sont des structures complexes de nature protéique. Certaines bactéries, peuvent également mettre en place deux types de couches externes supplémentaires qui couvrent les tuniques : l'exosporium et le crust (figure 11.a et 11.b). SigG et SigK vont également participer à la transcription de gènes de sporulation tardifs, provoquant la lyse de la cellule mère, permettant ainsi à la spore mature de se retrouver dans l'environnement (Higgins et Dworkin, 2012).



**Figure 11. Structure de la spore et étapes clés de la sporulation** – Observation au microscope électronique à transmission de spores de **a.** *B. subtilis*, marquage du crust (couche externe de la spore) au rouge de ruthénium. **b.** *B. anthracis* marquage au tétroxide d’osmium. L’exosporium est constitué d’une base et de projections aériennes et est séparé des tuniques par un espace, échelle non précisée (McKenney *et al.*, 2010). **c.** Morphogenèse et régulation des gènes pendant la formation des spores. Pour le détail, se référer au texte. Adapté de (Hilbert et Piggot, 2004).

Toutefois, si la sporulation reste une voie ultime pour échapper aux conditions environnementales peu favorables, il existe d'autres voies permettant de survivre aux mêmes stress que ceux induisant la sporulation. Par exemple, la sporulation protège les bactéries de la dessiccation (Checinska *et al.*, 2015), mais l'association en biofilms aussi. L'hydratation est maintenue grâce aux polymères extracellulaires de la matrice du biofilm qui retiennent l'eau comme une éponge (Flemming et Wingender, 2010). Par ailleurs, la composition des populations bactériennes est le plus souvent hétérogène et dynamique, par exemple, la sporulation est détectée dans la population d'un biofilm (Vlamakis *et al.*, 2008 ; El-Khoury *et al.*, 2016 ; Verplaetse *et al.*, 2015 ; 2017).

### 1.3.2 Biofilms : l'union fait la force

#### a. Formation et régulation des biofilms

Un biofilm est une communauté multicellulaire de microorganismes mono- ou multi-espèces, à l'architecture complexe, adhérant entre eux et à une surface, ayant la capacité de sécréter des substances polymériques extracellulaires (EPS), adhésives et protectrices (Arnaouteli *et al.*, 2021). Ce mode de vie est observé pour la première fois par Van Leeuwenhoek (1632-1723), en examinant notamment sa propre plaque dentaire. Les « amas d'animalcules » (selon ses termes) ont laissé la place au terme de « biofilm » dans les années 1980 (McCoy *et al.*, 1981). Il a été montré que selon l'environnement du biofilm, sa structure change, faisant de ce mode une réponse adaptative permettant aux bactéries de persister (Lin *et al.*, 2022). Comme déjà énoncé, la matrice protège les cellules de la dessiccation. Par exemple, *Bs* produit la protéine BlsA qui forme un film hydrophobe autour du biofilm, augmentant sa résistance à la dessiccation (Arnaouteli *et al.*, 2021). Le biofilm permet également de survivre à des réponses immunitaires, des agents biocides ou encore à l'appauvrissement en nutriments (do Canto Canabarro *et al.*, 2022 ; Gingichashvili *et al.*, 2019). En effet, le biofilm peut permettre un échange de gaz et de nutriments avec le milieu extérieur grâce à la matrice par sorption passive (Billings *et al.*, 2015). De plus, en cas de lyse cellulaire, les débris se retrouvent dans le biofilm où ils peuvent être utilisés par les

bactéries vivantes. L'ADN de lysats cellulaires est notamment utilisé comme source de nutriments (Popp et Mascher, 2019). Le biofilm est également un lieu privilégié d'échanges de signaux cellulaires conduisant à l'émergence de caractères sociaux tels que la coordination et la coopération des cellules sessiles (Boles et Horswill 2012). L'ensemble des avantages que cette vie en communauté confère est schématisé sur la [figure 12](#).

### **Formation du biofilm**

La **formation du biofilm** repose sur **trois étapes essentielles** : l'**adhésion** à une surface de type biologique ou abiotique, la **maturation** du biofilm et l'**essaimage** permettant la colonisation d'autres surfaces.

L'**adhésion** est l'étape initiatrice de la formation du biofilm, elle peut présenter un avantage non négligeable en biofilm multi-espèces car certaines bactéries peuvent adhérer à un type de surface et d'autres non, facilitant ainsi le recrutement d'espèces non adaptées par celles qui ont adhéré (Kolenbrander *et al.*, 2010). L'adhésion se fait en deux étapes : l'amarrage et l'ancrage. L'amarrage peut se faire suite à un mouvement brownien ou à la sédimentation mais peut également se faire grâce à la mobilité bactérienne flagellaire ou au chimiotactisme. La phase d'ancrage permet ensuite de consolider l'adhésion, grâce à un contact de la bactérie à la surface régité par les pilis ou un contact direct de la paroi bactérienne ou bien encore à des molécules de type adhésines (Carpentier et Cerf, 2013).

La **maturation** est une étape au cours de laquelle la croissance bactérienne favorise la croissance des macro-colonies. Elle est initiée par le recrutement des bactéries planctoniques dans le biofilm en cours de formation (El-Khoury *et al.*, 2021), par les bactéries mobiles en périphérie des microcolonies et par la division cellulaire des bactéries adhérentes (Houry *et al.*, 2010).

L'**essaimage** est la dernière étape de la vie du biofilm, les bactéries se détachent

des macro-colonies et le biofilm se disperse. L'essaimage peut être passif (dû à des forces extérieures ou des perturbations de la température, de la concentration en oxygène ou nutriments) ou actif (dû à la production de molécules du quorum sensing ou autres molécules tensioactives) (Vlamakis *et al.*, 2013).

### **Régulation du biofilm : faits marquants**

La surfactine est un lipopeptide tensioactif régulé chez *Bs* par le système de quorum sensing ComP/ComA. Le peptide de signalisation de densité cellulaire ComX induit l'autophosphorylation de ComP ce qui active ComA. ComA induit l'expression de l'opéron *urfA* contrôlant notamment la production de surfactine (Cosby *et al.*, 1998). La surfactine va agir en formant des pores dans la membrane cellulaire conduisant à un efflux de potassium, ce qui va activer la kinase membranaire KinC. KinC va ensuite phosphoryler Spo0A et transcrire l'opéron *epsA-O*, codant pour la majorité des exopolysaccharides de la matrice de *Bs*, nécessaires à l'organisation du biofilm (Chu *et al.*, 2008)

Comme évoqué lors du point sur la sporulation, Spo0A est impliqué dans toute une multitude de processus dont la régulation des biofilms. Spo0A~P réprime aussi AbrB, un des inhibiteurs de la formation des biofilms et notamment de la protéine de la matrice évoquée précédemment BlsA (Hamon *et al.*, 2004 ; Verhamme *et al.*, 2009). Spo0A~P va aussi activer SinI, qui empêche alors SinR de réprimer la transcription du locus *tapA-sipW-tasA* (figure10). SipW est une signal-peptidase qui va permettre la libération de TasA et TapA dans l'espace extracellulaire. TasA est une petite protéine de 31 kDa chez *Bs*, c'est le composant protéique majeur de la matrice. Elle forme des fibres amyloïdes ancrées à sa surface par TapA. Ces fibres permettent de fournir un soutien structural au biofilm (Romero *et al.*, 2011). Chez *Bc*, il n'y pas de TapA mais deux orthologues de TasA : *tasA-sipW* en opéron et *calY* à proximité. La délétion de ces gènes affecte la formation du biofilm chez *Bc* et *Bt* comme chez *Bs* (Caro-Astorga *et al.*, 2014 ; Candela *et al.*, 2019).

## b. Hétérogénéité des biofilms

La matrice des biofilms offre un environnement dans lequel les coefficients de diffusion sont faibles (Flemming *et al.*, 2016). Cet environnement est donc propice aux interactions entre microorganismes au niveau local : il y a des échanges génétiques, des échanges de métabolites, de molécules de signalisation. L'ensemble de ces échanges aboutissent à divers gradients, ce qui conduit à une hétérogénéité de l'environnement, se traduisant par une hétérogénéité cellulaire (Flemming *et al.*, 2016). Selon l'emplacement de la bactérie dans le biofilm, elle sera amenée à se différencier pour s'adapter à son microenvironnement comme schématisé sur la [figure 12](#).

La différence majeure entre les bactéries planctoniques (libres dans leurs milieux) et les bactéries sessiles (attachées à une surface), est l'absence de mobilité de ces dernières. Une fois encore, Spo0A joue un rôle important : comme déjà énoncé, une fois phosphorylé, il active SinI qui inhibe à son tour SinR. L'effet inhibiteur de SinR sur l'opéron *epsA-O* est levé. Dans ce locus, EpsE va alors être produit. S'il se lie à FliG la mobilité est alors inhibée, FliG, permettant la rotation flagellaire (Blair *et al.*, 2008). Sous l'influence de Spo0A~P les bactéries deviennent alors sessiles. Nous avons vu que Spo0A est impliqué dans l'activation de nombreux facteurs impliqués dans la formation de biofilms, via l'inhibition de SinR. Une concentration faible de Spo0A~P permet la transition vers la formation du biofilm tandis qu'une concentration plus élevée provoque l'entrée en sporulation (Fujita *et al.* 2005). Des spores peuvent donc être formées dans le biofilm si la quantité de Spo0A~P augmente.

Vlamakis et collaborateurs ont démontré en 2008 que la population des biofilms de *Bs* était hétérogène à l'aide de rapporteurs fluorescents de mobilité, de matrice et de sporulation. Jusqu'à 12 h après la formation du biofilm, la majorité des cellules est motile (le temps de former le biofilm) puis cette proportion diminue avec le vieillissement du biofilm. Le promoteur de synthèse de la matrice présente un pic d'expression à 24 h, puis au bout de 48 h une partie de la population sporule. Les 3

sous-populations coexistent au sein du biofilm, révélant ainsi son hétérogénéité mais aussi son organisation spatio-temporelle. Ils ont démontré que les spores se retrouvaient dans la partie supérieure du biofilm au niveau des structures aériennes, ce qui faciliterait leur dispersion (Vlamakis *et al.*, 2008).

Une autre étude, menée par Houry et collaborateurs en 2012, a également mis en évidence une hétérogénéité bactérienne au sein du biofilm. Une sous-population de bactéries mobiles dans le biofilm de Bt représentant entre 0,1 % et 1 % de la population totale a été détectée (Houry *et al.*, 2012). Cette sous-population peut s'avérer avantageuse pour le biofilm car elle crée des tunnels dans la matrice, augmentant ainsi les transferts de molécules tels que les nutriments. Néanmoins, ces tunnels peuvent être néfastes au biofilm s'ils agissent comme une voie favorisant l'accès de biocides (Houry *et al.* 2012).

Enfin, le dernier exemple de ce point, est la démonstration de l'hétérogénéité bactérienne du biofilm démontrée par Verplaetse et collaborateurs en 2015 chez Bt. A l'aide de rapporteurs fluorescents toujours, ces travaux ont démontré la coexistence de différentes sous-populations au sein d'un même biofilm. Ainsi, il a été détecté une sous-population virulente représentant jusqu'à 35% de la population totale ; une sous-population nécrotrophe qui croît avec la maturation du biofilm et qui représente jusqu'à 74% de la population totale et une sous-population de bactéries sporulantes représentant jusqu'à 15% de la population totale (Verplaetse *et al.* 2015). Une sous-population non-virulente, non-nécrotrophe et non-sporulante a également été identifiée. Il serait intéressant de caractériser cette dernière sous-population et son état physiologique.

Il a également été démontré que d'autres types bactériens pouvaient être retrouvés dans un biofilm, impliquant des mécanismes déjà énoncés comme le cannibalisme ou la compétence et d'autres dont nous allons parler dans le prochain point, comme la persistance (Flemming *et al.*, 2016).



**Figure 12. Avantages et hétérogénéité des biofilms** - Les avantages de la vie en biofilms sont décrits dans les encadrés. L'hétérogénéité des biofilms étant bénéfique, chaque avantage a été mis en relation avec un mode de vie cellulaire retrouvé dans les biofilms. Les différents types de cellules sont schématisés par les bactéries colorées. Par exemple, les aérobés en bleu sont plus proches du milieu extérieur et donc de l'oxygène, ou les cellules dormantes en vert. Des spores sont également retrouvées dans les biofilms, généralement proches de l'extérieur (Vlamakis *et al.*, 2008). Figure adaptée de (Flemming *et al.*, 2016).

### 1.3.3 La dormance : un état vivement discuté

Le ralentissement de la croissance bactérienne est reconnu depuis des décennies comme mécanisme de survie en réponse au stress mis en place par les bactéries, par exemple au sein des biofilms, lorsqu'elles sont exposées à des agents antimicrobiens (Brown *et al.*, 1988). La dormance bactérienne inclut diverses notions qui laissent penser qu'il existe peut-être des dormances. Le principe qui les lie est la caractérisation de cet état par un ralentissement métabolique. Néanmoins, la dormance est vivement discutée dans la littérature et différents processus expliquent ce ralentissement métabolique, qui pourrait être inégal dans une population bactérienne. Des études récentes montrent que des populations reconnues comme dormantes peuvent être hétérogènes et que les cellules de ces populations n'ont pas le même niveau d'activité métabolique (Zou *et al.*, 2020 ; Goormaghtigh et Van Melderen, 2019).

Dans une synthèse bibliographique de 2013, Rittershaus, Baek et Sasseti ont décrit la sporulation comme étant « la vraie dormance ». L'arrêt des activités métaboliques et les extrêmes changements morphologiques au cours de la sporulation en font une définition claire de ce que représente la dormance bactérienne (Rittershaus *et al.*, 2013). D'autres cellules dormantes introduisent également des changements morphologiques et physiologiques. Parmi ces états physiologiques, nous retrouvons entre autres la persistance et l'état viable mais non-cultivable des bactéries (VBNC : Viable But Non-Culturable). Cependant, il est admis qu'à la différence de la sporulation, ces changements morphologiques ne sont pas aussi drastiques et que les cellules maintiennent une activité métabolique minimale ainsi que leur potentiel de membrane (Rittershaus *et al.*, 2013).

La persistance bactérienne peut faire référence à la survie à long-terme d'un microorganisme dans son environnement, comme la persistance de Bt dans le cadavre de Gm énoncé dans le titre de cette thèse. C'est une notion générale et plus globale, dont les processus adaptatifs peuvent être nombreux et qui peuvent être soutenus par

les différents statuts physiologiques décrits dans ce chapitre. Le sous-chapitre ci-dessous décrit la notion de persistance au sens de « persisters », comme définit au prochain paragraphe.

#### a. Persistance

Dans une population bactérienne isogénique, les bactéries persistantes, communément nommées sous l'appellation anglo-saxonne « persisters » sont des bactéries qui ont notamment la capacité de survivre à des doses létales d'antibiotiques. Les persisters sont donc définis comme étant des variants phénotypiques transitoires retrouvés dans une population sensible (Gefen et Balaban, 2009).

Le terme de « persisters » a été introduit en 1944 par Joseph Bigger, un médecin du Trinity College à Dublin. Il a appelé ainsi les cellules d'une population sensible de *Staphylococcus aureus* ayant survécu à un traitement à la pénicilline. Il avait constaté que la réinoculation de ces cellules générait une population sensible à la pénicilline et qu'il subsistait une fois encore une sous-population tolérante. Ces cellules ont été caractérisées comme métaboliquement inactives et se trouvant donc dans un état de dormance (Bigger, 1944). Les persisters sont suspectés d'être à l'origine de phénomènes de rechute lors d'infections et d'échecs thérapeutiques, car une fois que les concentrations en antibiotiques diminuent, les persisters survivants rétablissent une population à l'origine d'une nouvelle infection (Lewis, 2010).

Les persisters ont été observés à la fois chez des espèces Gram-positives et Gram-négatives. Il y a généralement entre 0,001% et 1% de persisters dans une population bactérienne étudiée, la persistance étant un phénotype variable et sous l'influence de nombreux paramètres environnementaux (Van den Bergh *et al.*, 2017).

Lors d'un stress bactéricide, l'élimination des populations isogéniques sensibles se produit généralement de manière biphasique : le « biphasic killing » (figure 13.a). Dans un premier temps, la majeure partie de la population constituée de cellules sensibles

est éliminée. Ensuite, la population s'enrichit de survivants et le taux de mortalité ralentit. Une fois le stress évacué, les cellules sortent de persistance et se remultiplient normalement. En contrepartie, elles perdent leur tolérance ce qui indique que la persistance est réversible (figure 13.a) (Sánchez-Romero et Casadesús, 2014 ; Vega et Gore, 2014). Par conséquent, la persistance bactérienne est un facteur important de la survie et de la régénération des populations bactériennes dans l'environnement et lors de traitements anti-infectieux (Cohen *et al.*, 2013).

La formation de persisters est une réponse au stress, aux signaux extérieurs, comme le quorum-sensing, le manque de nutriments, ou encore des concentrations sub-inhibitrices d'antibiotiques. La mise en place de l'état physiologique de persistance repose sur des mécanismes divers et redondants, liés aux conditions environnementales.

La formation de persisters peut par exemple être aléatoire. Les systèmes toxine/antitoxine induisent la formation de persisters, notamment chez *E. coli* lorsque les fluctuations de l'expression de ces modules conduisent à un excès de toxine par rapport à l'antitoxine (Fasani et Savageau, 2013 ; Gelens *et al.*, 2013). Cela peut inhiber la réplication de l'ADN ou activer des réponses au stress telles que la réponse stringente, impliquée dans la persistance (Michiels *et al.*, 2016).

Le manque de ressources peut également conduire à la formation de persisters. Une fois encore la réponse stringente peut être impliquée. La réponse stringente est une réponse à une carence en acides aminés ou à d'autres types de stress tels un choc thermique (Hauryliuk *et al.*, 2015). Ces stress déclenchent la production de l'alarmone (p)ppGpp, un régulateur central qui met en place les fonctions de survie et d'homéostasie de la cellule (Harms *et al.*, 2016). Le facteur sigma de réponse générale au stress RpoS est également impliqué dans la persistance. Chez *E. coli*, il a été montré que la délétion du gène *rpoS* augmente la proportion de persisters en présence de norfloxacine ou d'ampicilline mais la diminue en présence de gentamycine (Wu *et al.*,

2015). Cette réponse permet de tolérer des carences en nutriments ou des conditions défavorables comme des températures extrêmes et des stress oxydatifs ou osmotiques. La réponse stringente et la réponse générale au stress peuvent également être induites par des concentrations sub-inhibitrices d'antibiotiques. Chez *E. coli*, la réponse SOS est également impliquée dans la formation de persisters à la ciprofloxacine par exemple (Dörr *et al.*, 2009). La réponse SOS induit des mécanismes de réparation de l'ADN, ce qui explique notamment la tolérance aux fluoroquinolones. Ces antibiotiques ciblent des topoisomérases bactériennes impliquées dans le compactage de l'ADN et la régulation de la conformation de l'ADN lors de la réplication, de la transcription et de la recombinaison (Dörr *et al.*, 2009).

La persistance peut également émerger d'autres fluctuations de l'expression génétique de sous-populations bactériennes. Ainsi la surexpression ou la sous-expression de plusieurs gènes peuvent augmenter la tolérance au stress. Par exemple la surexpression de gènes d'hydrolase dans une partie de la population conduit à l'arrêt de sa croissance et donc à sa tolérance à la ceftriaxone qui nécessite l'élongation de la paroi pour agir (Wang *et al.*, 2014).

Finalement, les persisters ne présentent pas qu'un seul phénotype mais peuvent présenter un ensemble hétérogène impliquant des mécanismes redondants de réponses au stress, entre autres (Wu *et al.*, 2015). Dans la mesure où certains articles défendent que la persistance est une réponse active au stress, la dormance des persisters a été remise en cause (Orman et Brynildsen, 2013). Wood a répondu que certes les cellules répondent au stress, mais que cet état n'est pas la persistance, car cette réponse au stress n'est que la voie qui conduit à la dormance (Wood *et al.*, 2013 ; Kim et Wood, 2016). Néanmoins il a été montré récemment que des persisters étaient issus de cellules dont la capacité à croître n'était pas amoindrie, que pendant le traitement à l'antibiotique, elles subissaient des dommages à l'ADN et que la population de persisters était hétérogène (Goormaghtigh et Van Melderen, 2019).

Les persisters chez les *Bacillus* sont peu étudiés, la bactérie *Escherichia coli* étant le modèle d'étude de la persistance. Cependant, le fait que quelques études récentes démontrent l'existence de persisters au sein des *Bacillus*, méritait que l'on s'y penche, la persistance pouvant être une de leurs voies de survie (Fernandes *et al.*, 2022 ; Liu *et al.*, 2021).

Fernandes et collaborateurs ont apporté une preuve de concept de la persistance chez Bc en testant la susceptibilité de cellules ayant survécu à un traitement bactéricide. Après réinoculation en culture planctonique et en biofilms, en appliquant un deuxième traitement bactéricide aux cellules de Bc, elles étaient à nouveau sensibles dans les deux conditions. Quant à Liu et collaborateurs, ils ont isolé des persisters de Bs par tri cellulaire, en triant, après un traitement antibiotique, les cellules positives au 5(6)-CFDA (marqueur d'activité estérase, signe de vitalité cellulaire) et négatives à l'iodure de propidium (marquage des cellules à l'intégrité membranaire compromise, signe de mortalité cellulaire). Les cellules traitées à l'antibiotique, marquées puis triées sont capables de repousser en milieu favorable après lavage. Ils ont ensuite effectué des qPCR pour analyser l'expression de gènes de réponse aux stress, ils ont remarqué que *lial* était fortement exprimé (*lial* est important pour maintenir l'intégrité membranaire) et que les persisters isolés étaient sensibles à un peptide antimicrobien cationique. Cette étude est une approche élégante de la caractérisation et l'isolation de différentes sous-populations bactériennes.

b. L'état viable mais non-cultivable – VBNC (Viable But Non-Culturable)

L'état viable mais non-cultivable (VBNC) diffère de la persistance par le fait que les persisters soient capables de croître immédiatement après la disparition du stress subi et qu'ils soient cultivables. Autrement, ces deux états physiologiques sont similaires. Ce sont deux états de dormance qui permettent aux bactéries de ralentir leur métabolisme et d'affronter des stress. Ils peuvent être induits par des conditions de stress ou émerger stochastiquement dans la population, toutefois l'apparition de VBNC se fait

sur une échelle de temps plus longue (jours vs heures pour les persisters, [figure 13.b](#)) (Ayrapetyan *et al.*, 2015). Ils sont également réversibles lorsque les conditions environnementales s'améliorent. Par exemple, ces bactéries peuvent se retrouver dans des zones appauvries d'un biofilm car elles peuvent résister à des carences (Flemming *et al.*, 2016). Si elles sont pathogènes, elles pourront ensuite être à l'origine d'infections récalcitrantes, dans la mesure où cet état confère une tolérance aux antibiotiques et permet de recoloniser l'hôte en conditions favorables. Les cellules de ces états forment des sous-populations représentant un faible pourcentage de la population totale, ce qui rend leur détection et leur étude complexe.

Les bactéries VBNC ont été découvertes en 1982 dans le laboratoire de Colwell (Xu *et al.*, 1982), elles ont depuis été observées pour plus de 100 espèces dont *Bc* (Rowan *et al.*, 2004 ; Li *et al.*, 2014). Les bactéries dans un état viable mais non-cultivable sont vivantes, mais dans un état de faible activité métabolique, ce qui les rend incapables de croître sur des milieux de culture standards. Contrairement aux persisters, elles ne forment ni colonies ni cultures troubles (Lotoux *et al.*, 2022). Les bactéries VBNC maintiennent leur activité cellulaire et leur intégrité. Les plasmides ainsi que l'expression des gènes sont maintenus, les cellules répondent aux signaux externes par l'expression de gènes spécifiques (Fakruddin *et al.*, 2013). Le potentiel de membrane est maintenu, cependant la composition du peptidoglycane est modifiée ainsi que la morphologie des cellules qui ont tendance à s'arrondir en passant de bacilles à coccoïdes, notamment chez *Vibrio cholerae* (Wagley *et al.*, 2021). Les VBNC sont capables de retrouver leur culturabilité sous certaines conditions qui permettent leur ressuscitation. La présence de nutriments, de certains acides gras, les changements de pH ou d'humidité constituent des signaux de ressuscitation (Loutoux *et al.*, 2022).

Il y a de nombreux mécanismes moléculaires en commun entre la formation de VBNC et la persistance. A titre d'exemple, nous pouvons à nouveau citer *relA*, facteur de la réponse stringente. Comme mentionné auparavant, l'alarmone (p)ppGpp est produite lors de carences en acides aminés sous le contrôle de *relA* (Harshman et

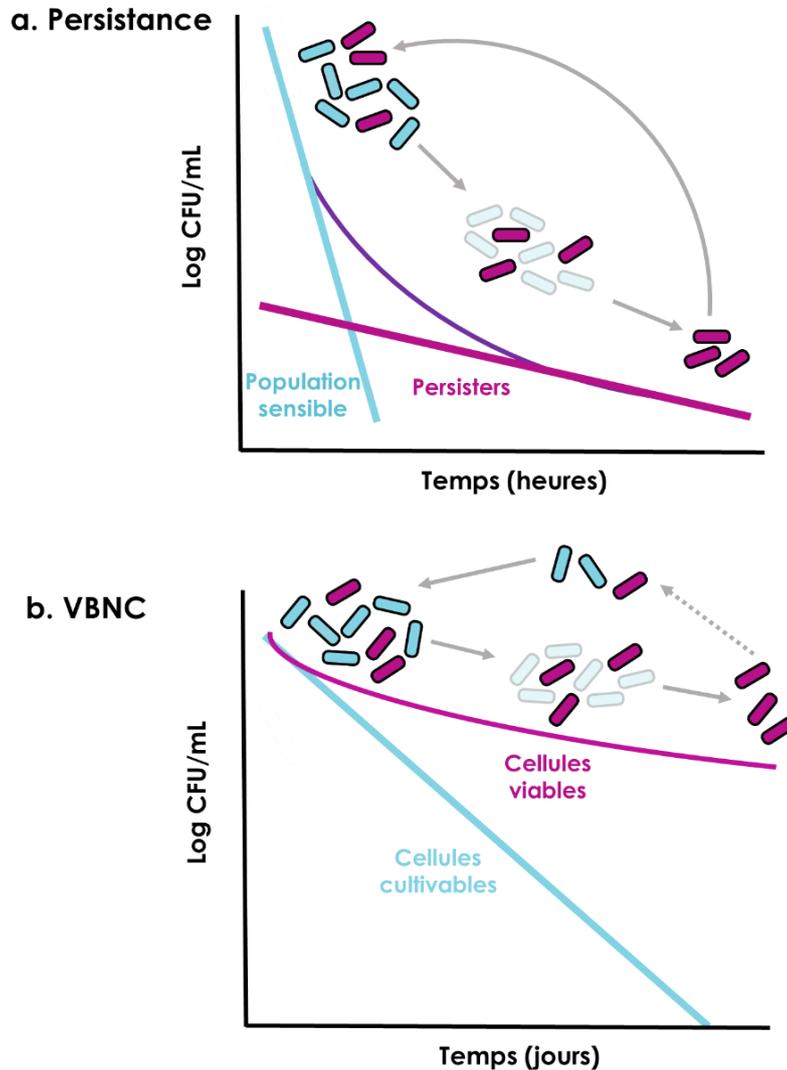
Yamazaki, 1971). Ces carences ont été reliées à la formation de persisters et de VBNC. Il a été montré que *relA* était fortement exprimé chez des VBNC de *V. cholerae* (Mishra *et al.*, 2012). Il a aussi été démontré qu'un mutant de *E. coli* incapable de produire du ppGpp formait moins de VBNC (Boaretti *et al.*, 2003).

Du fait que la persistance partage de nombreux points communs avec l'état Viable mais non-cultivable (VBNC), Ayrapetyan et collaborateurs ont initié l'expression de « dormancy continuum » pour réunir les deux notions (Ayrapetyan *et al.*, 2015 ; Ayrapetyan *et al.*, 2015 ; Ayrapetyan *et al.*, 2018). D'ailleurs Dewachter et collaborateurs l'ont confirmé en affirmant qu'il s'agit d'un même programme. Ils ont en effet démontré que l'agrégation des protéines supportait la transition des persisters vers les VBNC (Dewachter *et al.*, 2021). Il a été identifié que les persisters contenaient des agrégats protéiques précoces, tandis que les agrégats des VBNC sont plus matures. L'agrégation des protéines est un phénomène connu se produisant lors de carences en nutriments et ils ont établi que la GTPase OpgE l'accélérait. (Dewachter *et al.*, 2021).

La recherche faite sur les VBNC chez *Bacillus* est surtout axée sur la détection de cet état et non fondamentale. Ceci s'explique par un intérêt industriel, notamment pour détecter des contaminants alimentaires ; l'absence de culturabilité rendant la tâche plus complexe. A titre d'exemple, une étude a quantifié des VBNC de Bc dans la viande en combinant la qPCR, un marquage de mortalité et des numérations sur boîte (El Aziz *et al.*, 2018). Une autre méthode de détection chez Bc a été réalisée par quantification de synthèse *de novo* d'ATP (Robben *et al.*, 2019). Une méthode de comparaison de dénombrement versus cytométrie en flux a également été utilisée pour caractériser les VBNC de la souche commerciale de *Bacillus coagulans* (un probiotique) (Majeed *et al.*, 2018).

Par ailleurs, il semble compliqué d'un point de vue expérimental de faire de la recherche fondamentale sur les VBNC ou la persistance avec les *Bacillus* comme modèle. En effet, la sporulation rend les populations hétérogènes, ce qui ajoute un

degré de complexité au système. Cependant le challenge technique n'enlève rien à l'intérêt que suscitent ces questions, dans la mesure où la coexistence de ces sous-populations dans la nature n'est pas à exclure.



**Figure 13. Dynamique de la persistance bactérienne et de l'état VBNC** – a. Suite à une dose létale d'antibiotiques, les cellules sensibles meurent et les persisters survivent selon un modèle biphasique caractéristique. La première phase (ligne bleue) représente la mort rapide de la population sensible et la deuxième phase (ligne rose) représente la mort beaucoup plus lente de la population de persisters. Après le retrait de l'antibiotique, les persisters peuvent repousser et générer des cellules sensibles aux antibiotiques, génétiquement identiques à celles de la population sensible (flèche grise). b. Les cellules VBNC sont isolées en appliquant un stress létal à une culture en croissance. Au cours de ce processus, les cellules deviennent indétectables sur le milieu nutritif (ligne bleue). Cependant, une partie de la population reste viable (courbe rose). Lorsque le stress est supprimé, la population devient cultivable après une période de ressuscitation (flèche en pointillée). Lorsque les cellules captent des nutriments, elles génèrent une population similaire à la population la population d'origine. Adapté de (Ayrapetyan *et al.*, 2015).

### 1.3.4 Etat de croissance oligotrophe : l'activité au ralenti

« L'état de croissance oligotrophe » est un état physiologique adopté par les cellules lors de conditions oligotrophes, nouvellement décrit en 2019 par Gray et collaborateurs (Gray *et al.*, 2019). L'élégante étude publiée dans Nature Communications rapporte les caractéristiques phénotypiques et transcriptomiques d'un état de croissance extrêmement ralenti observé chez une souche de *Bs* déficiente pour la sporulation. Il s'agit de la première étude caractérisant un état de persistance alternatif à la sporulation chez les Firmicutes sporulants. Une limite est néanmoins à souligner : cet état de croissance est décrit chez un mutant  $\Delta spollE$  *in vitro*, *SpollE* est impliqué précocement dans la cascade sporulation et n'a pas de rôle connu à ce jour dans d'autres processus. Il reste à déterminer si l'état de croissance oligotrophe est observable dans la nature ainsi que chez d'autres espèces.

#### a. Caractéristiques phénotypiques

L'état de croissance oligotrophe a été observé chez des cellules non-sporulantes, dans un milieu minimum, dans l'eau ou dans un milieu carencé (sans source de carbone). Il assure la survie des cellules pour au moins 100 jours, bien que la population initiale décroît de 5 logs et qu'il ne reste plus que 1000 cellules/mL au bout du 14<sup>ème</sup> jour.

Comme évoqué dans le point précédent, lorsque les cellules bactériennes sont stressées, elles changent morphologiquement. C'est le cas pour les cellules en croissance oligotrophe dont la longueur décroît au fil des jours et qui finissent par avoir une morphologie coccoïde, comme décrit pour les VBNC de *Vibrio cholerae* par exemple (Wagley *et al.*, 2021). Ces cellules présentent une tolérance au chloramphénicol, à l'ampicilline, au paraquat mais une sensibilité à la valinomycine, un ionophore qui dissipe le potentiel de membrane. Cette sensibilité et la réponse à un marqueur de potentiel de membrane démontrent que ces cellules ont un potentiel de membrane mais qu'elles sont éventuellement ralenties pour d'autres processus au vu

de leur tolérance. Plusieurs études ont déjà utilisé la sensibilité aux antibiotiques pour déterminer l'activité métabolique des cellules (Oliver *et al.*, 1991 ; Watson *et al.*, 1998). Ces expériences se basent sur le fait que, si par exemple, un antibiotique qui cible la réplication de l'ADN agit peu ou pas, c'est que les cibles de la réplication sont inactives et que les bactéries ne se répliquent pas, indiquant alors leur ralentissement métabolique. Un test d'induction à l'IPTG de la synthèse protéique en complément d'une approche de marquage fluorescent de la synthèse protéique de *novo* ont confirmé que ces cellules ne sont pas dormantes.

Pour tester si les cellules se divisent, un rapporteur fluorescent associé à DivIVA, protéine impliquée dans la division cellulaire qui s'accumule au septum lors de la division, a été construit. Les cellules ont également été incubées avec un inhibiteur de la protéine de division FtsZ. Si FtsZ était actif, il serait alors inhibé et les cellules seront allongées, car elles ne pourront plus se diviser. La fluorescence observée au niveau du septum des cellules à 14 jours ainsi que l'élongation des cellules incubées avec l'inhibiteur de division, leur ont permis de conclure que les cellules se divisent.

Une diminution de la survie a été observée lorsque les cellules sont filtrées de leur milieu et resuspendues dans un milieu minimum. Ceci indique que cette croissance oligotrophe est notamment supportée par la lyse des cellules qui servent de nutriments aux autres au fil des jours.

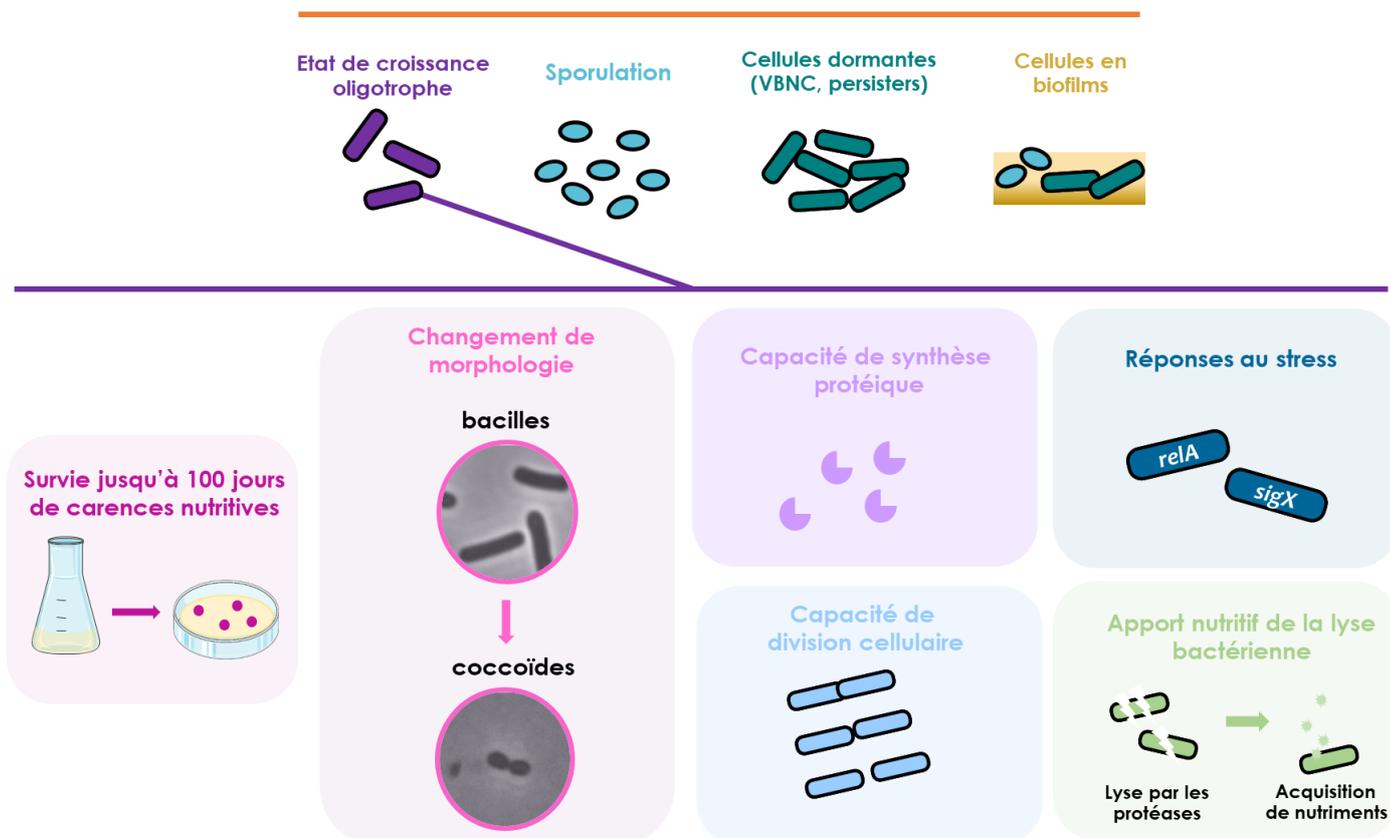
#### b. Caractéristiques transcriptomiques et facteurs génétiques

L'état de croissance oligotrophe est un état qui se distingue de la phase stationnaire et de la phase exponentielle dans la mesure où le profil transcriptomique obtenu par RNA-Seq sépare bien les trois états physiologiques. En comparaison de la phase exponentielle et de la phase stationnaire, les cellules en état de croissance oligotrophe expriment plus fortement des gènes impliqués dans l'acquisition de nutriments et moins fortement des gènes impliqués dans la compétence ou la formation de biofilms.

Pour déterminer une signature de cet état physiologique, toute une série de mutants a été construite en se basant sur les gènes les plus exprimés dans le RNA-Seq effectué. Aucun mutant de ces gènes, ni leurs régulateurs ne s'est avéré essentiel à la survie. Des mutants de gènes de réponse au stress et des facteurs sigma extra-cytoplasmiques impliqués dans le stress des enveloppes ont alors été construits. Les seuls phénotypes observés en termes de diminution de la survie sont ceux obtenus avec les mutants  $\Delta relA$ ,  $\Delta sigX$  et  $\Delta degU$ . Comme évoqué précédemment RelA est impliqué dans la réponse stringente. SigX, est un facteur sigma extra-cytoplasmique qui permet le maintien de l'enveloppe cellulaire et son intégrité. DegU contrôle l'expression de protéases sécrétées et il semble que ces protéases soient nécessaires pour utiliser les nutriments relargués lors de la lyse des cellules. Il peut sembler difficile de déterminer le facteur spécifiquement impliqué dans la croissance oligotrophe en ciblant un gène et en le mutant, car cet état est potentiellement multifactoriel. Ils ont donc construit un mutant délété pour 8 protéases, dont la survie est affectée. La mutation séquentielle de ces 8 protéases n'a fait chuter la survie que lorsque l'expression de la dernière protéase a été abolie. La mutation de cette seule protéase ne reproduit pas ce phénotype, indiquant que c'est bien la délétion des 8 protéases qui réduit la survie et qu'une fonction protéase peut éventuellement être compensée par une autre. Pour finir, Gray et collaborateurs ont déterminé que la sortie de cet état de croissance oligotrophe était rapide lors de la réinoculation en milieu minimum (pas de différence avec les cellules en phase en stationnaire).

Ces conclusions attestent que les cellules en croissance oligotrophe sont potentiellement des cellules stressées mais non-dormantes. Une partie de la population meurt et sert de nutriments aux survivantes. Les grandes lignes de l'état de croissance oligotrophe sont résumées sur la [figure 14](#).

## Stress

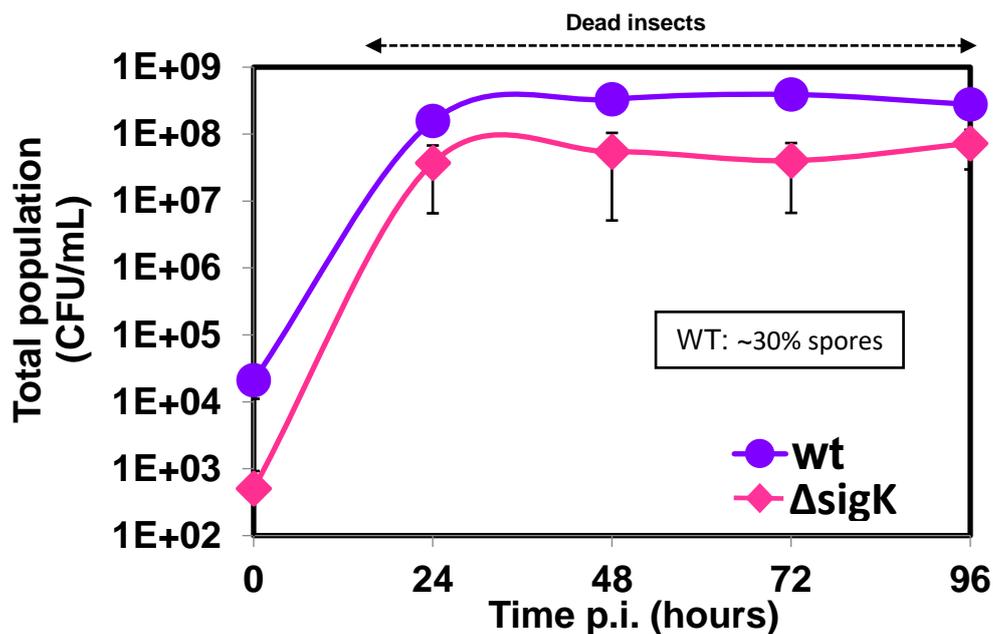


**Figure 14. Caractéristiques de l'état de croissance oligotrophe** - Cette figure reprend les principales conclusions (encadrés colorés) de l'étude de Gray et collaborateurs, parue en 2019 dans Nature Communications. Suite à un stress, les bactéries empruntent différentes voies de survie détaillées au cours de ce chapitre : l'état de croissance oligotrophe, la sporulation, la dormance, la conformation en biofilms. L'état de croissance oligotrophe permet aux bactéries de survivre à des carences nutritives. La morphologie des cellules change, elles passent de bacilles à coccoïdes. Les cellules ne sont pas dormantes et restent actives métaboliquement, elles sont capables de synthétiser des protéines et de croître. Les mécanismes qui supportent cet état de croissance sont les réponses adaptatives aux stress ainsi que l'apport en nutriments des lysats bactériens issus des cellules environnantes qui meurent.

## 2 CONTEXTE ET OBJECTIFS DE L'ETUDE

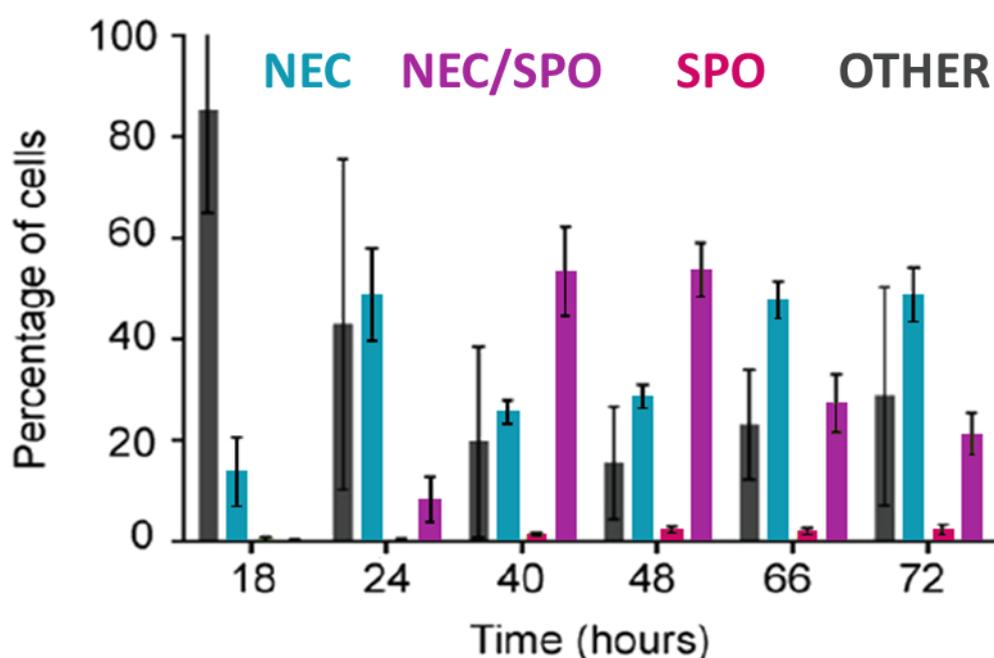
L'étude menée au cours de cette thèse a pour objectif de caractériser la population non-sporulante de Bt au cours de l'infection de Gm et son évolution dans le cadavre de l'insecte jusqu'à 14 jours post-infection.

Bt est en effet capable d'effectuer un cycle de développement complet dans l'hôte insecte. A l'échelle de la population totale, il a été montré que seule une partie de la population sporule dans le cadavre d'insecte et qu'un mutant de facteur sigma de sporulation tardif,  $\Delta sigK$  est capable de survivre jusqu'à 96 h post-infection dans le cadavre de l'insecte (figure 15) (Dubois *et al.*, 2016). Ainsi, cette expérience indique que Bt peut survivre dans le cadavre de l'insecte sans avoir recours à la sporulation.



**Figure 15. Survie dans le cadavre d'insecte de Bt WT et Bt  $\Delta sigK$**  – Nombre de UFC/mL après broyage et étalement des cadavres d'insectes pour la souche WT (violet) et la souche  $\Delta sigK$  (rose) en fonction du temps post-infection. Test de sporulation réalisé pour la WT avant et après chauffage pour éliminer les cellules végétatives et ne compter que les spores qui résistent à la chaleur (Dubois *et al.*, 2016).

Ces expériences ont été complétées par une approche menée à l'échelle de la cellule individuelle pour déterminer la composition précise de la population et son évolution au cours de l'infection. En 2015, au sein du laboratoire, Verplaetse et collaborateurs ont suivi le processus de différenciation des cellules dans le cadavre d'insectes, en biofilm et en milieu agité grâce à des rapporteurs fluorescents sous le contrôle de promoteurs reflétant l'activité des régulateurs responsables de la virulence, du nécrotrophisme et de la sporulation (figure 16) (Verplaetse *et al.*, 2015).



**Figure 16. Différenciation de la population de *Bacillus thuringiensis* dans le cadavre d'insecte –**

Pourcentage de la population exprimant les rapporteurs de nécrotrophisme (bleu), de nécrotrophisme et de sporulation (violet), de sporulation (rose), ou n'exprimant aucun de ces rapporteurs (gris) en fonction du temps post-infection. Les cellules sont extraites des cadavres de l'insecte, fixées et analysées par cytométrie en flux.

Ces travaux ont montré que le nécrotrophisme ne se déclenche que dans une partie de la population dans le cadavre d'insecte, suggérant une spécificité d'activation liée à l'environnement. Quant à la sporulation, elle ne se déclenche que dans une partie de la population ayant activé le régulon de nécrotrophisme. Ceci est en concordance avec le fait que la forme apo de NprR inhibe la sporulation tandis que NprR en complexe avec son peptide signal NprX active les gènes de nécrotrophisme et ne se lie donc plus à Spo0F qui peut alors phosphoryler Spo0A, activant ainsi la sporulation

(Perchat *et al.*, 2016). Une catégorie de cellules n'exprimant aucun des rapporteurs a également été identifiée, confirmant qu'il existe une partie de la population qui ne sporule pas dans le cadavre de l'insecte.

Par la suite, les travaux de Ben Rejeb et collaborateurs ont utilisé des rapporteurs fluorescents permettant de déterminer si ces cellules étaient en phase exponentielle ou en phase stationnaire de croissance. Les résultats ont montré qu'il existe toujours une population dont l'état physiologique dans le cadavre d'insecte est indéterminé et que plus de 60% de cette population sont des cellules vivantes (Ben Rejeb *et al.*, 2017).

D'autres études démontrent également que des bactéries du genre *Bacillus* survivent sans avoir recours à la sporulation. Comme indiqué dans l'introduction, des cellules non-sporulantes de Bs sont capables de survivre à des carences nutritives extrêmes. Ces cellules sont en « état de croissance oligotrophe » et sont caractérisées par une croissance extrêmement ralentie (Gray *et al.*, 2019). Des travaux ont démontré que Bc peut survivre sous-forme végétative pendant 50 jours dans les eaux souterraines (Brillard *et al.*, 2015). Une autre étude récente montre que Bc est capable de survivre sans sporuler dans l'eau pendant plus de 30 jours. Ces cellules non-sporulantes présentent des mutations du gène *spo0A* et sont capables d'adapter leur métabolisme à des milieux oligotrophes tels que les eaux souterraines (Rousset *et al.*, 2020). Il a également été observé qu'une souche de Bc incapable de sporuler peut persister plusieurs jours dans certains végétaux tels que les endives et endommager l'épithélium intestinal chez des modèles murins (Antequera-Gómez *et al.*, 2021).

L'ensemble de ces résultats suggère qu'il existe des alternatives au mode ultime de résistance au stress que représente la sporulation, afin de survivre dans certaines conditions, y compris lors de l'infection. Chez les bactéries sporulantes, la survie alternative à la sporulation permettrait aux bactéries de persister dans leur hôte sans avoir à s'engager dans ce processus complexe et irréversible.

Ce contexte appuie donc le projet de thèse, dont **la problématique est de comprendre quel est l'état physiologique des bactéries non-sporulantes au cours de l'infection et d'identifier les traits spécifiques qui caractérisent cet état physiologique.**

**Les objectifs sont de déterminer si les cellules qui composent la population non-sporulante sont métaboliquement actives, si cet état physiologique constitue un état particulier non-décrit auparavant et finalement s'il existe un ensemble de gènes dont l'expression est associée à cet état physiologique.**

Le comportement des populations d'intérêt dans le cadavre de l'insecte a été analysé à l'aide de méthodes de microbiologie classique, de microscopie à fluorescence et de cytométrie en flux couplées à des approches génétiques à l'aide de fusion transcriptionnelles avec des gènes rapporteurs fluorescents. Des marqueurs moléculaires commerciaux ont également été utilisés pour déterminer la vitalité des cellules non-sporulantes. Enfin, une approche transcriptomique par RNA-Seq a été réalisée. Cette approche a permis de caractériser le profil génétique des cellules extraites de l'insecte à 7 jours post-infection et de mettre en évidence l'expression de gènes spécifiques à la survie tardive dans le cadavre de l'insecte.

## 3 RESULTATS

---

### 3.1 Présentation de l'article

Les travaux de cette thèse ont permis la rédaction d'un article scientifique qui a été soumis pour publication. La partie 3 de ce manuscrit est consacrée à cet article et ce paragraphe a pour objectif de présenter les résultats marquants de l'article.

Lorsque cette étude a été initiée, la seule information disponible sur la population non-sporulante extraite des cadavres d'insectes était que les cellules étaient vivantes sans pour autant être en phase exponentielle (Ben Rejeb *et al.*, 2017). Par ailleurs toutes les expériences n'avaient jamais été conduites au-delà du 4<sup>ème</sup> jour post-infection, ce qui posait des questions quant au devenir de ces cellules dans le cadavre de l'insecte. La première question à laquelle il était donc intéressant de répondre concernait l'évolution des cellules non-sporulantes dans cet environnement. Il paraissait pertinent de déterminer si ces cellules non-sporulantes allaient finir par sporuler au-delà du 4<sup>ème</sup> jour post-infection ou si cette sous-population était stable au cours du temps. La première expérience nous a donc permis d'établir que jusqu'au 14<sup>ème</sup> jour post-infection le taux d'unités formant colonies (UFC)/larve ainsi que le taux de sporulation au sein de la population étaient stables.

Ensuite, le gène codant la GFP instable, qui permet de détecter l'expression transitoire des gènes, a été fusionné transcriptionnellement avec le promoteur du gène *nprA* codant une métalloprotéase appartenant au régulon de nécrotrophisme. *NprA* permet donc de rapporter l'activité du régulateur *NprR-NprX*. Cette construction a été associée à une autre fusion transcriptionnelle, *PspIIQ'mcherry*. Celle-ci associe le promoteur du gène de sporulation *PspIIQ* au gène codant la protéine fluorescente rouge *mCherry*. *spolIQ* est sous le contrôle de *SigF* et est activé dans la préspore des cellules irréversiblement engagées en sporulation. Les spores restent ensuite rouges grâce à la haute stabilité de la *mCherry*. Notre objectif était de déterminer si le

nécrotrophisme était l'état permettant aux cellules non-sporulantes de persister dans le cadavre de l'insecte sur des temps longs post-infection. De manière intéressante, il est apparu que le nécrotrophisme n'est exprimé que de manière transitoire entre 18 et 24 h post-infection suggérant que d'autres éléments supportent la survie à long-terme de Bt dans le cadavre de Gm.

L'étape suivante a été de caractériser plus en détails la physiologie des cellules non-sporulantes à l'aide de plusieurs approches complémentaires. Premièrement, un test de vitalité bactérienne a été réalisé en utilisant des marqueurs moléculaires commerciaux à la fluorescence verte avec des cellules portant la fusion *PspollQ'mCherry*. Ce test permet de voir la proportion de cellules actives ou non (fluorescence verte ou non selon le marqueur) parmi les cellules non-sporulantes. Des cellules cultivées *in vitro*, en phase exponentielle ou stationnaire, ainsi que des cellules extraites du cadavre de l'insecte à 1, 3 ou 7 jours post-infection ont été incubées avec du DiBAC4(3) (indicateur de mortalité cellulaire marquant les cellules dont le potentiel de membrane est compromis), du 5(6)-CFDA (indicateur de vitalité cellulaire marquant les cellules qui présentent une activité estérase) et du Sytox Green (indicateur de mortalité cellulaire marquant les cellules dont l'intégrité de la membrane est compromise). Les résultats démontrent qu'il y a une proportion de cellules endommagées plus importante dans les cellules extraites de l'insecte que dans les cellules *in vitro*, cependant une large majorité des cellules présente des signes de vitalité. Dans la continuité de l'exploitation de la fluorescence verte en combinaison avec la fluorescence rouge, une souche portant la fusion *PspollQ'mCherry* et un promoteur inductible au xylose associé à la GFP (*PspollQ'mCherry-Pxyl'gfp*) a été construite. Elle a permis de mettre en évidence que les cellules extraites du cadavre de l'insecte à 7 jours post-infection répondaient plus lentement et dans une moindre proportion à l'induction au xylose. Ces résultats suggèrent un changement physiologique dans ces cellules et un ralentissement métabolique.

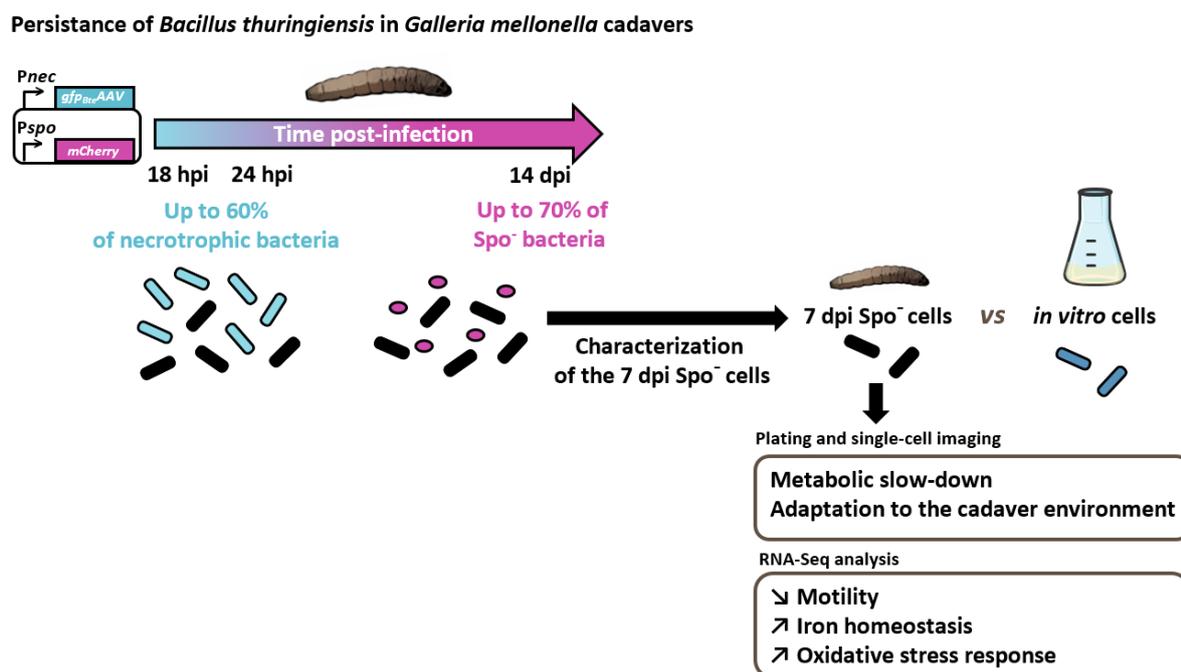
Ensuite une approche de microbiologie classique a permis de mettre en

évidence que les cellules extraites tardivement du cadavre de l'insecte repoussaient plus lentement après réinoculation en milieu riche (LB), car elles forment des plus petites colonies que des cellules extraites du cadavre plus précocement ou cultivées *in vitro*. De plus, les cellules cultivées *in vitro* se divisent sur LB Agarose lorsqu'elles sont observées en microscopie pendant 5 h, tandis que celles extraites de l'insecte sont inactives. Ensuite un milieu artificiel « cadavre d'insecte » a été mis au point pour se rapprocher des conditions du cadavre de l'insecte. De manière intéressante les cellules extraites de l'insecte tardivement sont mieux adaptées à ce milieu insecte que les cellules cultivées *in vitro*. En effet le nombre de UFC/mL reste similaire en milieu insecte pour ces cellules, tandis qu'il chute pour les cellules cultivées *in vitro*. Cette partie du travail met en évidence l'adaptation des bactéries extraites de l'insecte à leur milieu particulier.

Afin de déterminer si les bactéries extraites de l'insecte à un temps tardif présentaient une signature d'expression génétique particulière, un RNA-Seq a été réalisé. Il a permis de comparer le profil transcriptomique de cellules extraites du cadavre de l'insecte à 7 jours post-infection à celui de cellules en phase exponentielle et en phase stationnaire de croissance. Le RNA-Seq a révélé que ces cellules ne sont ni en phase stationnaire ni en phase exponentielle et qu'elles expriment d'avantage des gènes impliqués dans l'homéostasie du fer, dans la réponse au stress oxydatif ainsi que dans la réparation, la recombinaison, la réplication et la transcription de l'ADN. De manière intéressante, tous les gènes liés à la mobilité sont sous-exprimés dans les cellules extraites de l'insecte. Enfin, pour affiner les résultats du RNA-Seq, plusieurs fusions transcriptionnelles ont été réalisées avec les gènes les plus surexprimés pour déterminer si ces candidats étaient exprimés de manière spécifique lors de la survie tardive (à 7 jours post-infection) ou s'ils étaient exprimés tout au long de l'infection. C'est ainsi qu'il a été montré que l'homéostasie du fer est nécessaire tout au long de l'infection, tandis que la réponse au stress oxydatif est d'avantage activée à mesure que l'infection se prolonge.

Ces résultats permettent de mettre en évidence l'existence d'une voie de persistance alternative à la sporulation et démontrent l'adaptation de ces bactéries à l'environnement particulier que représente le cadavre de l'insecte.

Le résumé graphique ci-dessous représente les points clés de la publication soumise (figure 17).



**Figure 17. Résumé graphique de l'article soumis** – Explication de la démarche mise en place à l'aide de la souche portant des rapporteurs fluorescents de nécrotrophisme et de sporulation représentée en haut à gauche. Cette souche a été utilisée pour infecter les insectes et elle a permis de déterminer que le nécrotrophisme est transitoire au début de l'infection (bleu) et que jusqu'à 70% de la population ne sporule pas (*Spo<sup>-</sup>*, rose). Ensuite la caractérisation des cellules à 7 jours post-infection démontre qu'elles subissent un ralentissement métabolique, tout en étant mieux adaptées aux cadavres d'insectes. Enfin le RNA-Seq révèle que les gènes de mobilité sont moins exprimés dans ces cellules contrairement aux gènes de l'homéostasie du fer et de la réponse au stress oxydatif, en comparaison des cellules cultivées *in vitro*. Des analyses complémentaires démontrent que la réponse au stress oxydatif est spécifique à la survie tardive, tandis que les gènes d'homéostasie du fer sont exprimés tout au long de l'infection.

## 3.2 Manuscrit de l'article soumis

### **A sporulation-independent way of life for *Bacillus thuringiensis* in the late stages of an infection**

Hasna Toukabri, Didier Lereclus and Leyla Slamti\*

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

\*Corresponding author: leyla.slamti@inrae.fr

The authors declare that there are no competing interests in relation to the work described.

#### 3.2.1 Résumé (Abstract - Importance)

##### Abstract

The formation of endospores has been considered as the unique mode of survival and transmission of sporulating Firmicutes due to the exceptional resistance and persistence of this bacterial form. However, the persistence of non-sporulated bacteria (Spo<sup>-</sup>) was reported during infection in *Bacillus thuringiensis*, an entomopathogenic sporulating Gram-positive bacterium. In this study, we investigated the behavior of a bacterial population in the late stages of an infection as well as the characteristics of the Spo<sup>-</sup> bacteria in the *B. thuringiensis/Galleria mellonella* infection model. Using fluorescent reporters coupled to flow cytometry as well as molecular markers, we demonstrated that the Spo<sup>-</sup> cells constitute about half of the population two weeks post-infection (pi) and that these bacteria present vitality signs. However, a protein synthesis and a growth recovery assay indicated that they are in a metabolically slowed-down state. Interestingly, they were extremely resistant to the cadaver environment which proved deadly for in vitro-grown vegetative cells and, strikingly, did not support spore germination. A transcriptomic analysis of this subpopulation at 7 days pi revealed a signature profile of this state. The expression analysis of individual genes at the cell level suggests that iron homeostasis is important at all stages of the

infection, whereas the oxidative stress response seems of particular importance as the survival time increases. Altogether, these data show that non-sporulated bacteria are able to survive for a prolonged period of time and indicate that they engage in a profound adaptation process that leads to their persistence in the host cadaver.

### Importance

*Bacillus thuringiensis* is an entomopathogenic bacterium widely used as a biopesticide. It belongs to the *Bacillus cereus* group, comprising the foodborne pathogen *B. cereus sensu stricto* and the anthrax agent *Bacillus anthracis*. Like other Firmicutes when they encounter harsh conditions, these Gram-positive bacteria can form dormant cells called spores. Due to its highly resistant nature, the spore was considered the unique mode of long-term survival, occulting any other form of persistence. Breaking this paradigm, we observed that *B. thuringiensis* was able to persist in its host cadaver in a non-sporulated form during at least 14 days. Our results show that these bacteria survived in the cadaver environment which proved hostile for actively growing bacteria by engaging in a profound adaptation process. Studying this facet to the lifecycle of a sporulating bacterium provides new fundamental knowledge and might lead to the development of strategies to combat sporulating pathogenic species.

### 3.2.2 Introduction

The ability of bacteria to face environmental fluctuations is essential to their survival. These stresses include nutrient limitation or depletion, variations of pH, temperature, oxygen level, osmolarity, radiation and chemical exposure. In conditions that do not support their growth, some Firmicutes, such as *Bacillus* species, have evolved the ultimate mode of resistance, sporulation (1). This survival mode requires the activation of a specific and complex developmental pathway that leads to the formation of a spore, a highly resistant dormant cell that allows these species to survive

in extreme conditions during extended periods (2–5).

Due to their resistant nature, the formation of endospores was considered the unique mode of survival and transmission of these sporulating species. However, it was recently shown that a *Bacillus subtilis* sporulation mutant was able to survive deep starvation during several months by entering an oligotrophic state that supports extreme slow growth (6). Moreover, spontaneous mutants in *spo0A*, the gene specifying the master regulator of sporulation (7, 8), were isolated alongside spores after a month-long incubation of the food-borne pathogen *Bacillus cereus* under abiotic conditions in groundwater (9). Furthermore, a *B. cereus* strain impaired in sporulation was shown to persist for several days on ready-to-eat vegetables and retained its ability to cause illness in a mammalian host (10). In addition, it was shown that spores represented only 30% of the bacterial population that survived in an insect cadaver 4 days pi (dpi) with *Bacillus thuringiensis* and that a sporulation mutant was able to persist in the cadaver during that time (11).

*B. thuringiensis* is an entomopathogenic bacterium that belongs to the *B. cereus sensu lato* group comprising several species that are pathogenic to humans and animals, notably *B. cereus sensu stricto*, which is responsible for foodborne toxin infections as well as systemic infections, and *Bacillus anthracis*, the agent of anthrax (12). *B. thuringiensis* was shown to carry out a full infectious cycle in the *Galleria mellonella* insect larvae model. This process is composed of three major phases controlled by quorum-sensing systems (13): virulence that allows the bacteria to invade and kill the host (14), necrotrophism which permits the bacteria to feed on the cadaver (11), and sporulation. These processes were reported in insects using fluorescent reporters to detect the activity of the regulators responsible for these states at the cell level (15). Sporulation was shown to only occur in a part of the subpopulation that had activated the necrotrophic regulon. This is due to the dual nature of the NprR regulator that acts as an activator of the necrotrophic regulon when bound to its cognate signaling peptide NprX, and as a phosphatase negatively regulating sporulation in its apo-form (16). Necrotrophism was reported to be activated during the whole

experiment time-span (*i.e.* 4 days) in bacteria that did not engage in sporulation. A category of cells, which did not express the necrotrophic or the sporulation reporters in the host, was identified and designated Nec<sup>-</sup>/Spo<sup>-</sup> (15, 17). Most of these bacteria were identified as viable using a cell death marker at 3 dpi and the results suggested that they were not in exponential or stationary phase (18), (and unpublished).

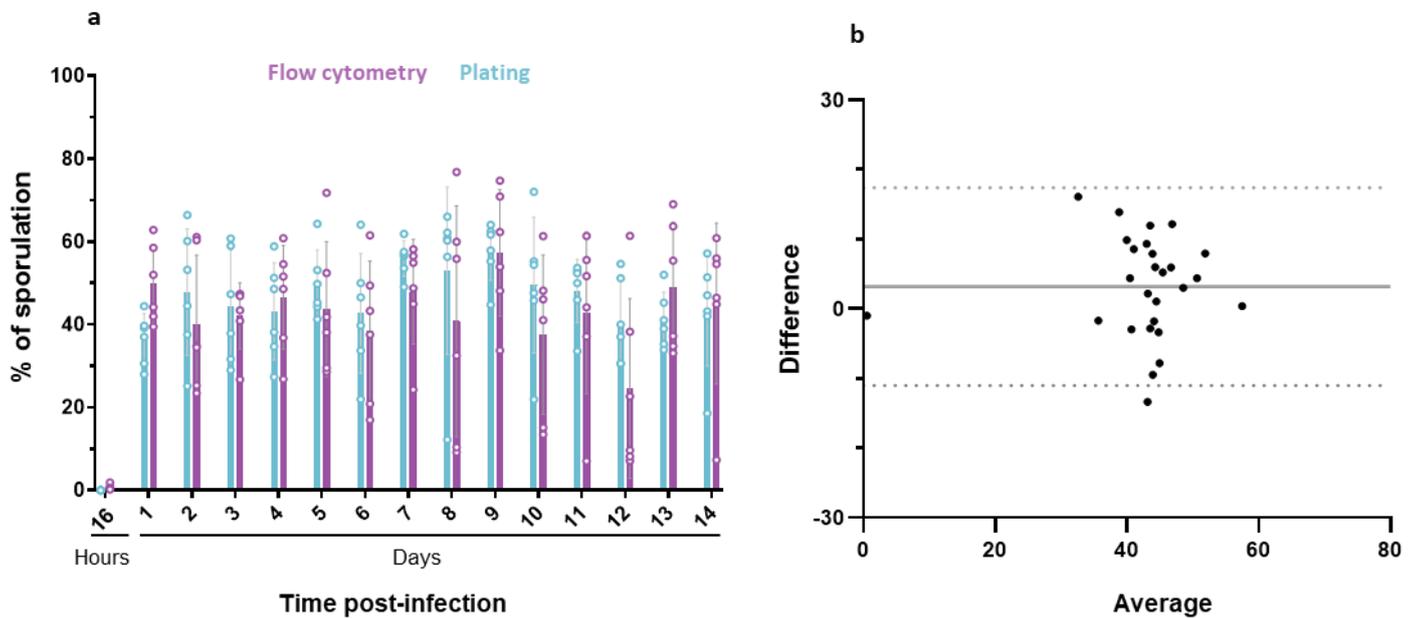
In this study, we investigated the composition of the bacterial population during the late stages of an infection as well as the characteristics and the proportion of the non-sporulated bacterial population in the *B. thuringiensis*/*G. mellonella* infection model. We used an unstable fluorescent reporter coupled to flow cytometry to determine the actual duration of necrotrophism. We also examined the metabolic state of the Spo<sup>-</sup> cells using protein synthesis and growth recovery assays on rich or insect-based medium. We performed a transcriptomic analysis of this subpopulation at 7 dpi that revealed a signature profile of this state.

### 3.2.3 Résultats (Results)

#### ***Non-sporulated bacteria survive in insect cadavers for at least 14 days post-infection***

A previous study recorded the sporulation rate of *B. thuringiensis* in insect larvae cadavers and showed that heat-resistant spores were detected 24 hpi and reached a plateau at 30% of the bacterial population from 48 hpi until the end of the experiment 4 dpi (11). This result indicated that a large part of the bacterial population was able to survive for 4 days in these conditions without resorting to sporulation. In order to determine if the non-sporulating cells persisted during a longer period of time, and if the sporulation rate remained constant, we monitored the fate of the bacterial population during 14 days using two complementary methods. *B. thuringiensis* cells harboring *PspollQ'mcherry*, a transcriptional fusion between the promoter of *spollQ*, a sporulation gene activated when the cells are committed to sporulation (19), and the *B. thuringiensis*-optimized *mcherry* fluorescent reporter gene (15), were injected into *G. mellonella* larvae. Sporulation was then assayed by plating and by flow cytometry (as described in the Materials and Methods section). In our conditions, flow cytometry analysis of *PspollQ'mCherry* cannot discriminate between bacteria irreversibly engaged in sporulation and sporulated cells as the mCherry protein remains fluorescent in spores. In the plating assay, we cannot exclude that some spores will not be able to germinate and form colonies on LB agar plates. These two methods were therefore implemented to give the closest assessment of the sporulated and non-sporulated subpopulations. Larvae died between 8 to 12 hpi (fig S1) and bacteria were extracted from insect cadavers from 16 hpi to 14 dpi for analysis. The plating assay showed that the total number of CFU per larva remained stable during 14 dpi (fig S2). mCherry-positive bacteria (fig 1.a and 2.a) and heat-resistant spores (fig S2) were detected starting 1 dpi and represented about 40 and 50 % of the total population, respectively. Accordingly, microscopy results indicate that the mCherry-positive events mainly correspond to spores from the third day post-infection onwards (fig S3 and data not

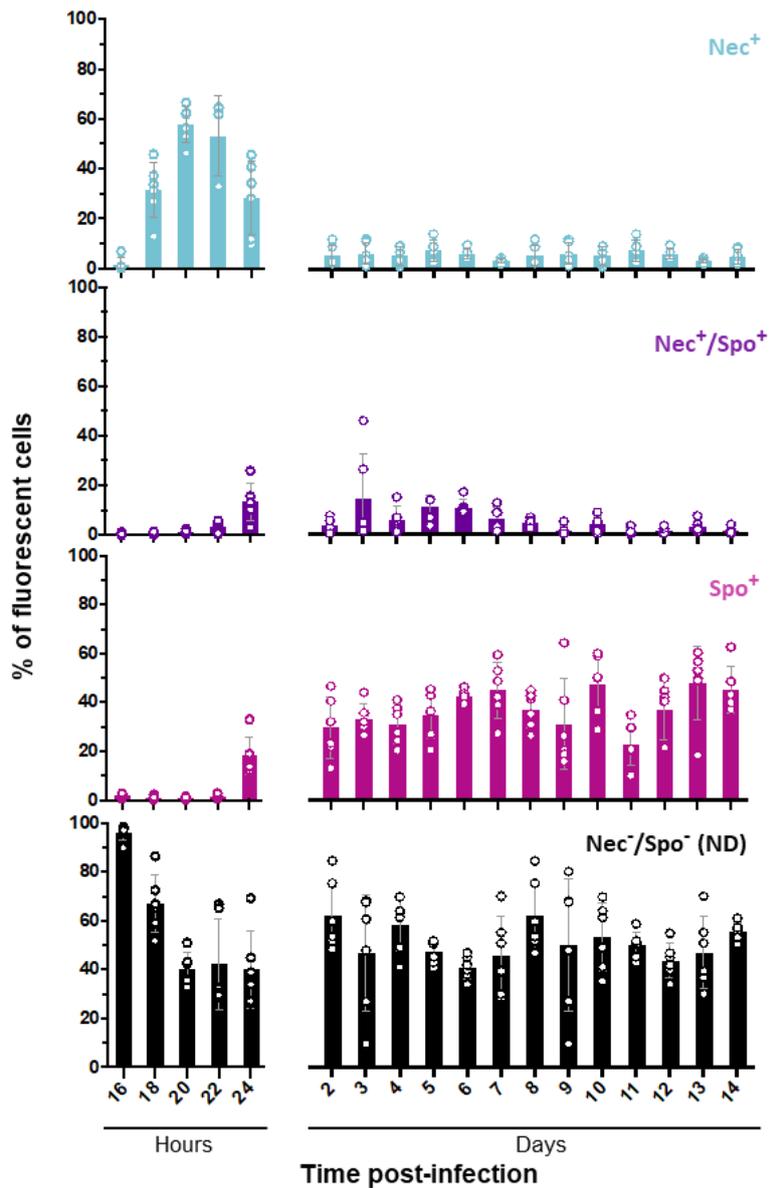
shown). The sporulation rate remained stable during 14 days and was comprised between 30% and 55% indicating that up to 70% of the cells could be in a non-sporulated form. We cannot exclude that germination occurred in insect cadavers as a few spores had lost their refringence and remained fluorescent when observed by microscopy (data not shown). However less than 5% of the bacteria presented this profile (data not shown). Comparison of the data using a Bland-Altman plot (fig 2.b) showed that the results obtained using both methods are similar. Indeed, the bias value is 3.2 and the SD of bias 7.3, indicating that there is less than 10% difference in the sporulation percentage when comparing plating and flow cytometry. This indicates that both methods are equivalent for evaluating sporulation in these conditions. Taken together, these results show that sporulation is not the only survival strategy in insect cadavers even in late-infection stages.



**Figure 1. Monitoring of the sporulated subpopulation during long-term infection. a.** The percentage of sporulation was determined daily for 14 days after intrahemocoelic infection of *G. mellonella* with Bt (pPnprA'gfp<sub>Bte</sub>AAV-PspollIQ'mCherry) by plating onto LB agar (blue) or by flow cytometry (purple). 6 larvae were crushed at the time points indicated and serial dilutions of the homogenate were directly plated onto LB agar for total population numeration, or after heating at 80°C during 12 minutes to account for heat-resistant spores. For the flow cytometry assay, the same samples were fixed and red fluorescent events were discriminated in cytograms (as described in the Materials and Methods) and counted as sporulating bacteria. The total population was determined by the number of total events. Each symbol represents the data relative to bacteria extracted from one larva. The data are the result of two independent experiments and the error bars show the standard deviation from the mean. **b.** Bland-Altman comparison plot between flow cytometry and plating sporulation assessment. The difference between plating and flow cytometry is plotted on the Y axis and the average of the values obtained by both method is plotted on the X axis. The black line represents the bias value (3,198) and dotted lines indicates the 95% limits of agreement. Data were collected from 27 larvae.

### ***Necrotrophism is a transient state occurring at early stages of survival in insect cadavers***

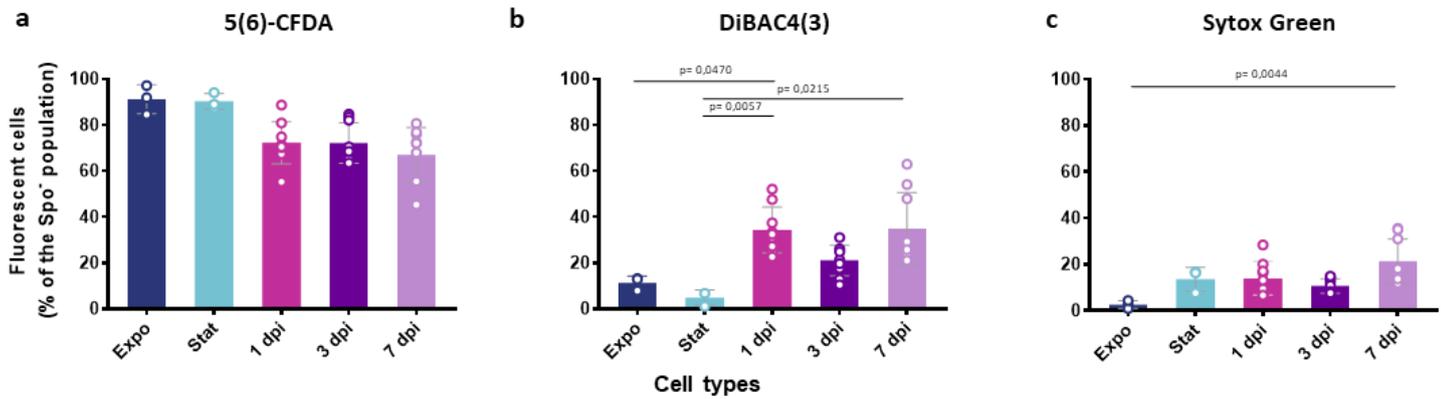
To assess the proportion of bacteria in the necrotrophic state during the late stages of infection in insect larvae, we monitored this state for 14 dpi using a transcriptional fusion between the promoter of *nprA*, an NprR-regulated gene (20), and the reporter gene *gfp<sub>Bte</sub>AAV*, encoding an unstable GFP (18). This reporter gene was previously used to detect vegetative cells *in vivo* and showed its relevance as a molecular tool to assess transient gene expression during infection (18). We associated this construct to the *PspollQ'mcherry* fusion. This combination of reporters allowed us to determine the fraction of the population that was able to persist in the late stages of infection without entering sporulation or activating the necrotrophism pathway. *G. mellonella* larvae were infected by intrahemocoelic injection with the Bt (*pPnprA'gfp<sub>Bte</sub>AAV-PspollQ'mCherry*) strain. Figure 2 shows that expression of the *PnprA'gfp<sub>Bte</sub>AAV* fusion started between 16 and 18 hpi with about 30% of the bacteria in the necrotrophic state (Nec<sup>+</sup>) at 18 hpi. The number of Nec<sup>+</sup> bacteria peaked at 20 hpi to near 60% and decreased to around 30% at 24 hpi. Expression of the *PspollQ'mCherry* fusion started between 22 and 24 hpi with about 20% of the bacteria expressing the sporulation reporter only (Spo<sup>+</sup>) and 15% of the population expressing both the necrotrophic and sporulation reporter (Nec<sup>+</sup>/Spo<sup>+</sup>). At 2 dpi the total number of Nec<sup>+</sup> and Nec<sup>+</sup>/Spo<sup>+</sup> bacteria decreased to about 10% of the population and remained at that level until the end of the experiment. These data show that necrotrophism is a transient state in which the bacteria remain during a limited period after the death of their host. Furthermore, our results reveal that the previously reported proportion of Nec<sup>-</sup>/Spo<sup>-</sup> cells was underestimated



**Figure 2. Necrotrophism and sporulation promoter activities in bacterial cells during long-term infection.** Flow cytometry analysis of Bt ( $pPnprA'gfp_{Bte}AAV-PspollIQ'mCherry$ ) cells during *G. mellonella* infection. Cells were extracted from 6 larvae cadavers at the time points indicated during 14 days after intrahemocoelic infection. The percentage of the total cell count represented by each population was discriminated in cytograms and is presented as a function of time (as described in the Materials and Methods section). Each population phenotype is associated with a color: Nec<sup>+</sup> in blue for cells expressing the necrotrophic marker, Spo<sup>+</sup> in pink for cells expressing the sporulation marker, Nec<sup>+</sup>/Spo<sup>+</sup> in purple for cells expressing both markers, ND in black for cells that do not express any of the markers used. Each symbol represents bacteria extracted from one larva. The data are the results of two independent experiments and the error bars show the standard deviation from the mean.

### ***The majority of the non-sporulated late-infection stage bacteria present cellular vitality***

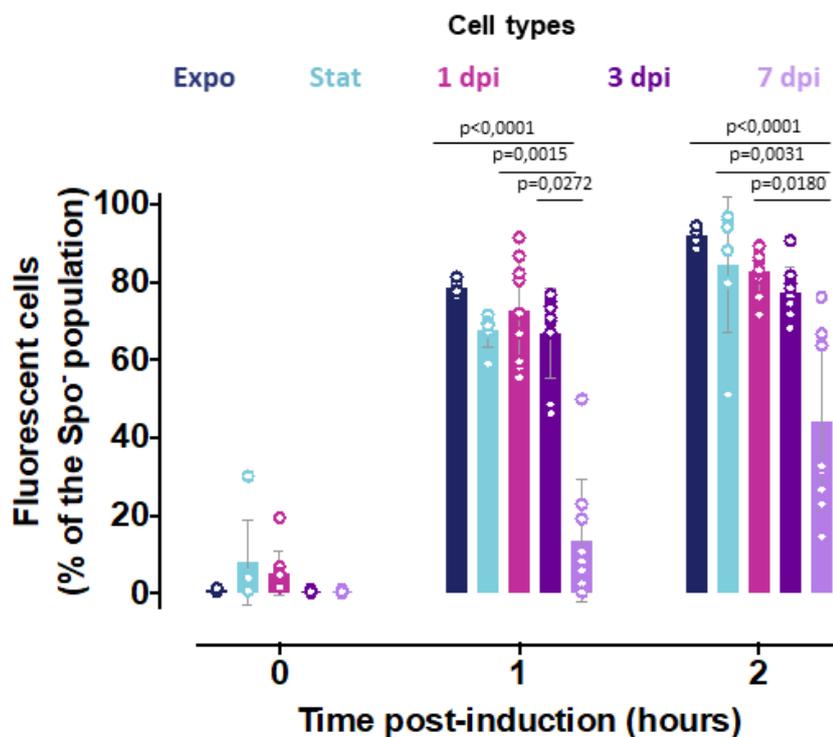
We analyzed the behavior and features of the Spo<sup>-</sup> bacteria during infection using molecular dyes to assess bacterial vitality. We used three commercial dyes to examine different vitality features of these bacteria: enzymatic activity by assessing esterase activity with 5(6)-CFDA (fig 3.a), membrane potential with DiBAC4(3) (fig 3.b) and membrane integrity with Sytox Green (fig 3.c) (21). Sytox Green staining was previously successfully used on cells extracted from insect cadavers to detect mortality among the 3 dpi non-necrotrophic cells (18). Strain Bt (pPspollQ'mCherry) cultured in LB and harvested in exponential growth phase (Expo) and stationary growth phase (Stat), or extracted from insect cadavers at 1, 3 and 7 dpi, was incubated with the molecular dyes listed above. Cells were then analyzed by flow cytometry (fig 3) to quantify the stained Spo<sup>-</sup> cells. The results show that 5(6)-CFDA stained 90% of Expo and Stat cells, and 67% to 72% of insect cadavers cells (fig 3). However, this difference was not statistically significant. Less than 16% of Expo and Stat cells and approximately 30% of insect cadavers cells were marked with DiBAC4(3) and Sytox Green (fig 3.b and 3.c). Bacteria extracted from insect cadavers presented a more heterogeneous profile as the percentage of marked cells ranged from 15% to 60% of the Spo<sup>-</sup> bacteria. Our results indicate that a portion of the Spo<sup>-</sup> cells extracted from insect cadavers was damaged, but the majority of these bacteria presented esterase activity, membrane polarization and membrane integrity, indicating cellular vitality.



**Figure 3. Assessment of the vitality status of the non-sporulated bacteria during infection.** Flow cytometry analysis of Bt (*pPspolIQ'mCherry*) cells grown in LB medium and harvested in exponential ( $OD_{600} = 1$ , dark blue) or stationary phase ( $OD_{600} = 8$ , light blue), or extracted from *G. mellonella* cadavers at 1 day (pink), 3 (dark purple) and 7 days (light purple) post-infection. The samples were incubated for 10 min in the dark at RT with 5  $\mu$ M 5(6)-CFDA (**a**), 0,5  $\mu$ M DiBAC4(3) (**b**) and 0.5  $\mu$ M Sytox Green (**c**) before being subjected to analysis. The percentage of marked cells among non-sporulating bacteria discriminated in cytograms (as described in the Materials and Methods section) is presented as a function of time. Unmarked and heat-shocked bacteria were used as controls. Each symbol represents the data relative to bacteria extracted from one larva. The data are the result of three independent experiments and the error bars show the standard deviation from the mean. Statistically significant differences are indicated by black bars with the p-value obtained after a Kruskal-Wallis Test followed by a Dunn's multiple comparison test.

### ***Protein production induction is delayed in non-sporulated late-infection stage bacteria***

To further assess the physiological state of the 7 dpi bacteria, we examined the metabolic activity of these cells by recording their protein synthesis ability. We designed a strain harboring the transcriptional fusion  $Px'gfp_{Bte}$  between a xylose-inducible promoter and a GFP-encoding reporter gene associated to the sporulation reporter  $PspolIQ'mCherry$ . We assessed the ability of the  $Spo^-$  cells to synthesize proteins by incubating them in conditioned HCT medium (HCTc) supplemented with xylose for 1 and 2 h and measuring the proportion of GFP-positive and mCherry-negative bacteria using flow cytometry (fig 4) coupled to microscopy observations (fig S4). Expo cells and Stat cells harvested from HCT cultures at 30°C, as well as bacteria extracted from insect cadavers at different time points (1, 3 and 7 dpi) were subjected to this treatment. The results show that at the start of induction, almost no bacteria expressed the  $Px'gfp_{Bte}$  fusion in any of the samples, except for about 6% of the Stat and 1 dpi cells (fig 4). However, approximately 70% of the  $Spo^-$  Expo, Stat, 1 and 3 dpi cells, synthesized Gfp at 1 h post-induction. At 2 h post-induction the proportion of bacteria expressing  $gfp_{Bte}$  in these samples slightly increased to 80%. Interestingly, the 7 dpi bacteria presented a different induction profile. At 1 h post-induction, less than 15% of the  $Spo^-$  bacteria were fluorescent, whereas at 2 h post-induction 15% to 75% of these cells were able to produce Gfp. This result indicates that the 7 dpi bacteria retain their ability to synthesize proteins, albeit with a greater time delay and variability between samples than for the other bacterial conditions assayed. This indicates that non-sporulating bacteria undergo physiological changes during the late infection stages suggestive of a metabolic slow-down.



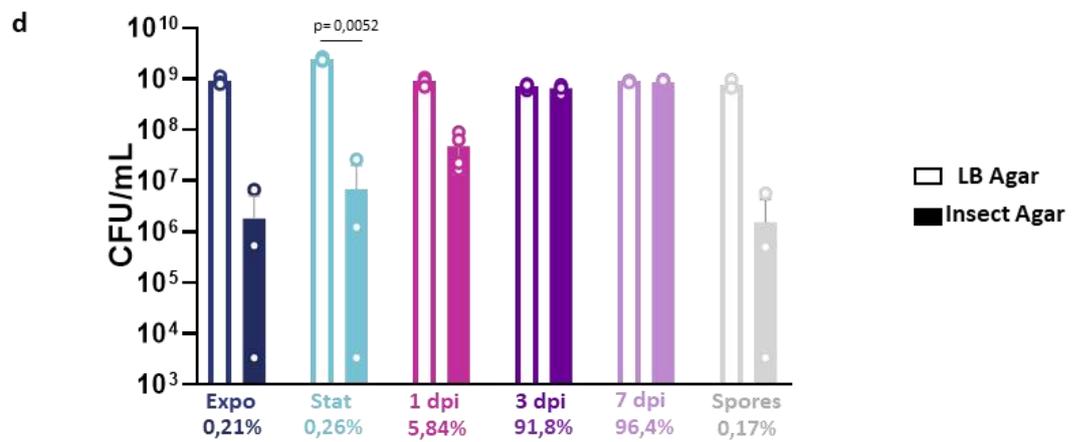
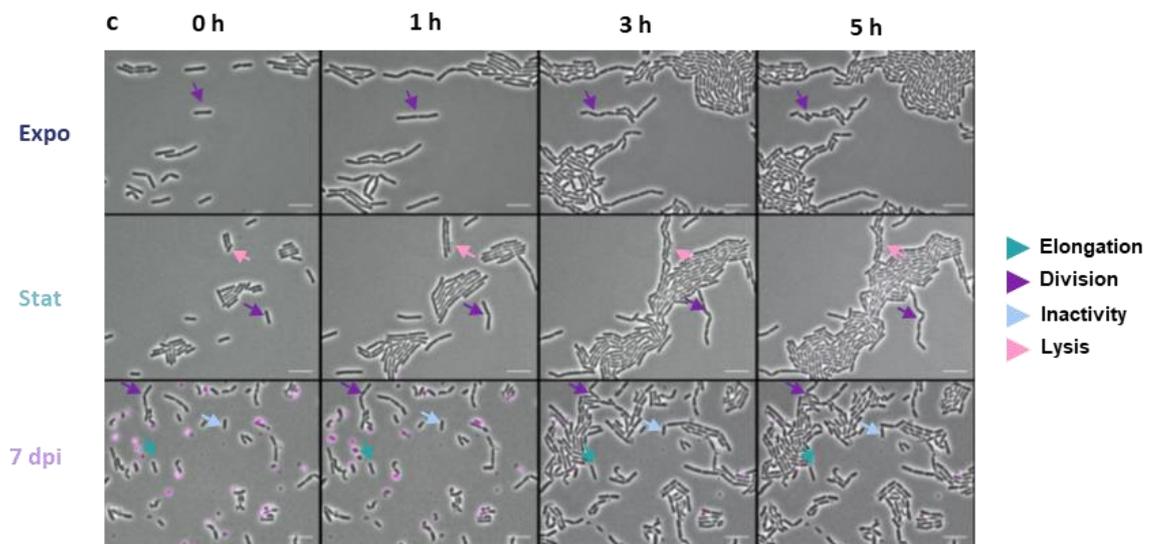
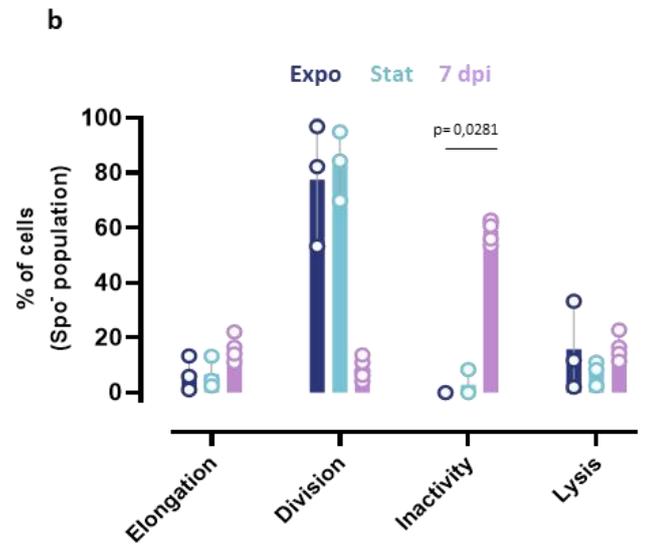
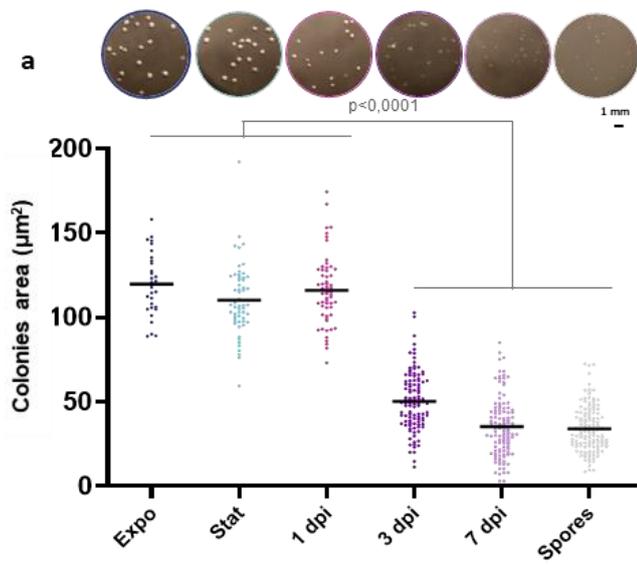
**Figure 4. Induction of *gfp* expression in non-sporulated bacteria during infection.** Flow cytometry analysis of Bt (*pPx'gfp<sub>Bte</sub>-PspollQ'mCherry*) cells grown in HCT medium and harvested in exponential ( $OD_{600} = 1$ , dark blue) or stationary phase ( $OD_{600} = 6$ , light blue), or extracted from *G. mellonella* cadavers at 1 day (pink), 3 (dark purple) and 7 days (light purple) post-infection. The bacteria were resuspended in conditioned HCT medium supplemented with 25 mM xylose. Aliquots were analyzed at the time of inoculation and 1 and 2 h after the start of the induction. Green-fluorescent cells among the non-sporulating bacteria were discriminated in cytograms as described in the Materials and Methods section. Each symbol represents the data relative to bacteria extracted from one larva. The data are the result of three independent experiments and the error bars show the standard deviation from the mean. Statistically significant differences are indicated by black bars with the p-value obtained after a Kruskal-Wallis Test followed by a Dunn's multiple comparison test.

### ***Growth recovery of late-infection stage bacteria is impaired on rich medium, in contrast to insect medium***

We performed a colony-size assay to determine whether bacteria extracted at late time points from insect cadavers were able to replicate when exposed to fresh growth medium. Expo cells, Stat cells, spores harvested from 48 h-LB cultures at 30°C and bacteria extracted from insect cadavers at 1, 3 and 7 dpi were plated onto LB agar. Plates were photographed after 16 hours of incubation at room temperature (fig 5.a) and colony size was determined as described in the Materials and Methods section. The results show that colonies resulting from 3 and 7 dpi bacteria, as well as *in vitro*-prepared spores, were smaller than those resulting from Expo, Stat and 1 dpi cells (fig 5.a). This indicates that late-infection stage bacteria recover slower than bacteria sampled at an earlier infection stage or than *in vitro*-grown bacteria. This recovery is similar to that of *in vitro*-generated spores. The results might reflect a delay of growth due to the germination of the spores present at 3 dpi or after. However, all the colonies were smaller and therefore include the Spo<sup>-</sup> cells, unless they are unable to form a colony. After longer incubation times, all the samples displayed similar colony-size (data not shown). In order to determine more precisely the behavior of the bacterial subpopulations, we also examined the growth of 7 dpi bacteria at the single cell level using time-lapse microscopy. Expo, Stat and 7 dpi bacteria were inoculated on LB agarose strips at 30°C and the behavior of Spo<sup>-</sup> cells was followed during 5 hours (fig 5.c and 5.d). About 8 to 16% of the inoculated bacteria lysed regardless of the sample. Approximately 80% of Expo and Stat cells were able to divide whereas the majority of 7 dpi cells were inactive (fig 5.b). We observed elongation and growth for less than 20% of the 7 dpi bacteria (fig 5.c). These results show that 7 dpi bacteria rarely divided over a 5 h-time-lapse experiment which is in agreement with the slower growth recovery phenotype observed on LB plates.

In order to determine if the late-infection stage bacteria were better adapted to a medium closer to the insect cadaver environment, we performed a recovery assay on

an Insect agar medium prepared as described in the Materials and Methods section. Expo cells, Stat cells, spores harvested from 48 h-LB cultures at 30°C and bacteria extracted from insect cadavers at 1, 3 and 7 dpi were plated onto Insect agar plates. [Figure 5.d](#) shows that there is a drastic drop in the numbers of CFU/mL resulting from the plating of Expo and Stat cells, as well as spores, on Insect agar compared to LB. Less than 0.3% of these bacteria survived on this medium. About 6% of the 1 dpi population was able to grow on this medium compared to LB. In sharp contrast, the number of CFU/mL for 3 and 7 dpi cells was similar on both media. Taken together, these results suggest that the insect cadaver is a hostile environment for bacteria and that adaptation is required to survive in these conditions.



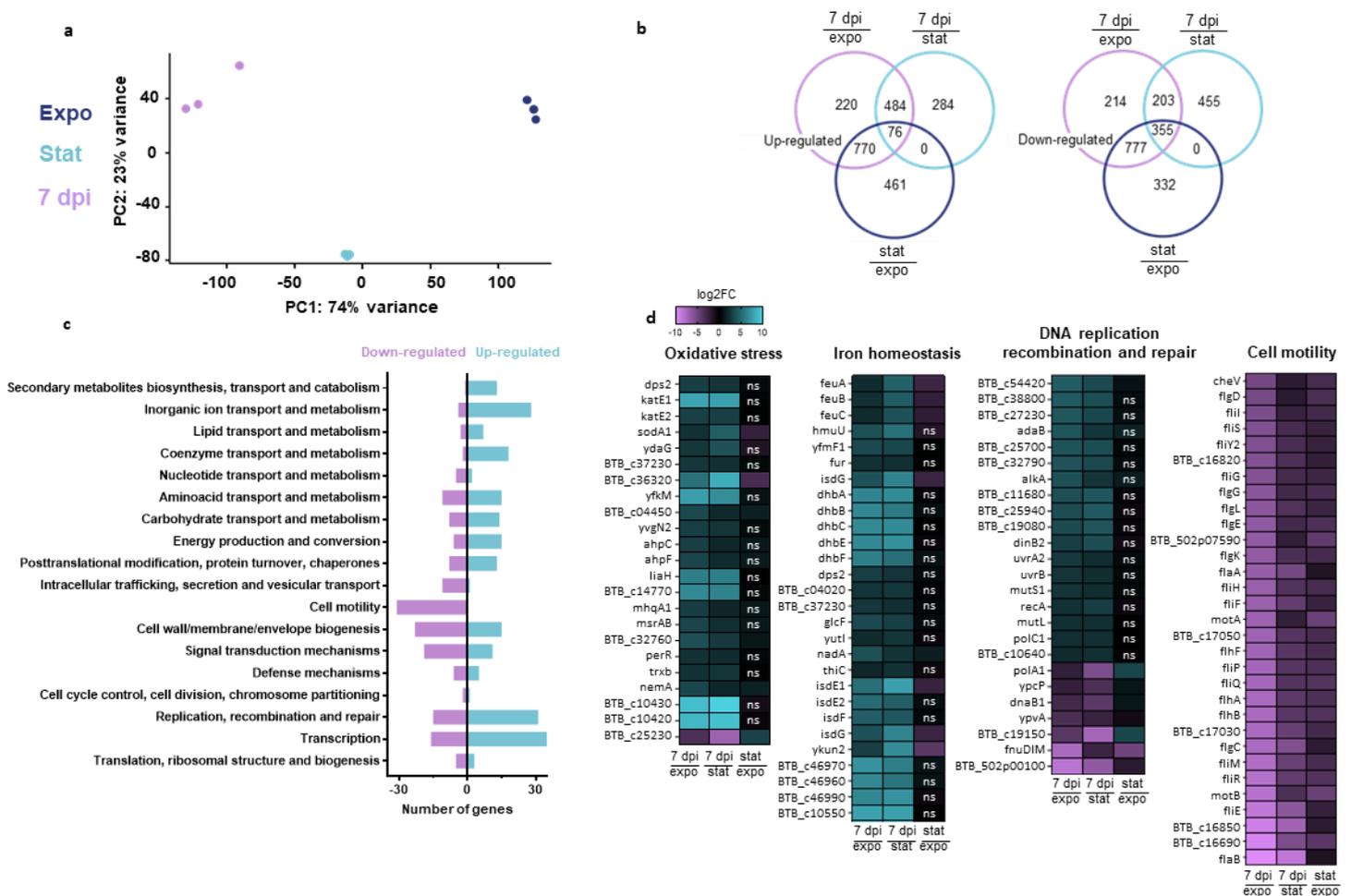
**Figure 5. Recovery assessment of the bacteria extracted from insect cadavers.** **a.** Colony size analysis of Bt (pPspollQ'mCherry) cells grown in LB medium and harvested in exponential ( $OD_{600} = 1$ , dark blue) or stationary phase ( $OD_{600} = 8$ , light blue), or extracted from *G. mellonella* cadavers at 1 day (pink), 3 (dark purple) and 7 days (light purple) post-infection, or of an *in vitro* spore preparation in LB medium (grey). The upper panels show colonies photographed under a binocular stereo microscope (see details in the Materials and Methods section), 16 hours post-planting on LB agar. The scale bar represents 1 mm. Colony size was then measured using ImageJ as described in the Materials and Methods section. At least 145 colonies were measured for each condition. Each symbol on the lower graph represents one colony. The data are the results of three independent experiments and the black horizontal bars indicate the mean. Statistically significant differences are indicated by black bars with the p-value obtained after a Kruskal-Wallis Test followed by a Dunn's multiple comparison test. **b.** Time-lapse microscopy analysis performed on bacteria spotted onto LB agarose pads. One picture was taken per hour, during 5 hours. Each non-sporulating cell was affected to each of the listed categories and the percentage of cells for each category was calculated. The data are the result of three independent experiments. At least 145 cells were counted and the error bars show the standard deviation from the mean. Statistically significant differences are indicated by black bars with the p-value obtained after a Kruskal-Wallis Test followed by a Dunn's multiple comparison test. **c.** Time-lapse microscopy pictures with the time scale represented above each picture. Bacteria were false colored in pink for Spo<sup>+</sup> cells. Arrows point to representative bacteria of the categories listed in b. The scale bar represents 10  $\mu$ m. These results are representative of three independent experiments. **d.** Growth recovery on Insect agar medium. The bacteria were spotted onto Insect agar (filled bars) or LB agar plates (open bars). The bacteria were incubated at RT and CFU were numerated the next day of plating on the latter and 3 days later on the former. Each symbol represents bacteria extracted from one larva or originating from one culture. The percentage of CFU counted on LB versus Insect agar is indicated below each cell type. The data are the result of four independent experiments and the error bars show the standard deviation from the mean. Statistically significant differences are indicated by black bars with the p-value obtained after a Kruskal-Wallis Test followed by a Dunn's multiple comparison test.

### ***Transcriptomic profile of late-infection B. thuringiensis***

To determine the expression profile of the Spo<sup>-</sup>/Nec<sup>-</sup> cells and begin to understand how these bacteria persist in the cadavers, we performed a global *in vivo* transcriptional analysis at a late stage of infection using an RNA-Sequencing approach. We chose to extract RNA from the total population at the 7 dpi time-point that presented very few

Nec<sup>+</sup> bacteria (fig 2) and we verified that RNA was only poorly extracted from spores, thus preventing a bias in our analysis (see Materials and Methods section). We compared the transcriptome of 7 dpi bacteria to Expo and Stat bacteria grown in LB medium. The transcriptome of the Stat and Expo bacteria grown in LB medium was also compared to identify genes differentially expressed in the insect specifically. As presented in fig 6.a, the principal component analysis shows that the 7 dpi bacteria differed substantially from both Expo and Stat cells, indicating that these cells are in a different state. The results show that 484 and 203 genes were specifically up-regulated and down-regulated, respectively, in the 7 dpi cells when compared to both Expo and Stat bacteria (fig 6.b). We found that most of the genes belonging to the NprR regulon were down-regulated when compared to Stat cells but up-regulated when compared to Expo cells (Table S2.a). This is in accordance with the fact that a small proportion of bacteria are Nec<sup>+</sup> at 7 dpi (fig 1) while necrotrophism is repressed in exponential phase and activated during stationary phase *in vitro* (20). The data also show that most sporulation and germination genes were not differentially expressed, indicating that these two processes were not triggered in the subpopulation of interest (Table S2.b,c).

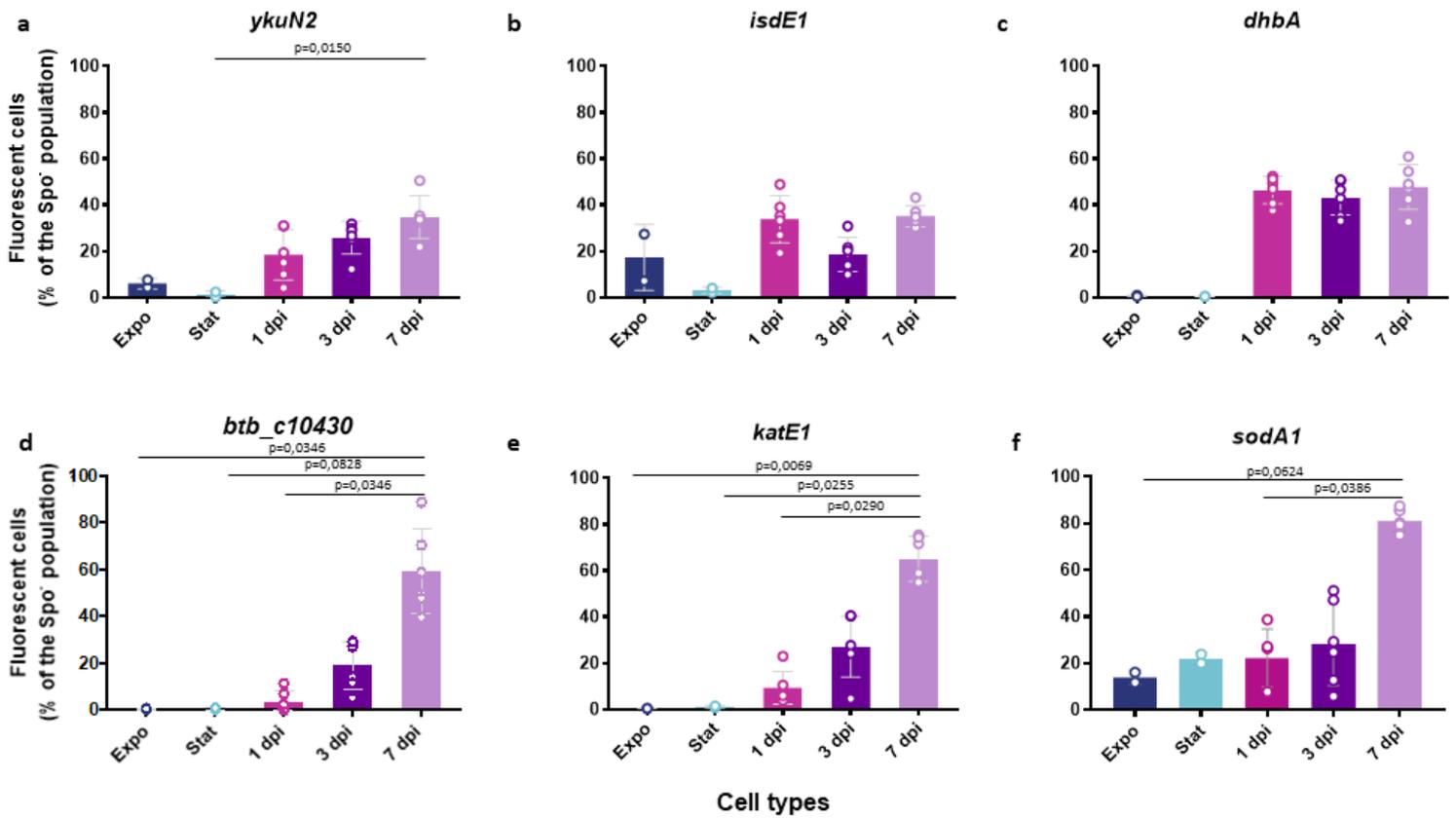
Most of the up-regulated genes in the 7 dpi cells are involved in inorganic ion transport and metabolism, transcription, replication, recombination and repair, whereas the down-regulated genes are mostly involved in cell motility, signal transduction mechanisms and cell wall/membrane/envelope biogenesis (fig 6.c), the latter indicating a decrease in the growth process. More than 300 differentially expressed genes were assigned to an unknown function. Differentially expressed genes with the highest or lowest log<sub>2</sub>FC values were found in the oxidative stress, iron homeostasis, DNA replication, recombination and repair and cell motility categories (fig 6.d). Interestingly, all motility genes were down, all iron homeostasis genes were up, and all oxidative stress genes were up (except for one), indicating that these mechanisms are key for late infection stage survival.



**Figure 6. Transcriptomic analysis of bacterial cells extracted from insect cadavers at 7 days post-infection.** **a.** Principal component analysis plot of the different samples: exponential growth phase cells (dark blue), stationary growth phase cells (light blue), cells extracted from insect cadavers at 7 dpi (purple). Samples were plotted against the first two principal components calculated from the gene expression values. The axes labels indicate percentage of total variance that is explained by each component. **b.** Venn diagrams indicating the number of up-regulated and down-regulated genes in cells extracted from insect cadavers at 7 dpi compared to exponential growth phase cells (purple) or stationary growth phase cells (light blue) and in stationary growth phase cells compared to exponential growth phase cells (dark blue). The genes taken into account present a  $\log_2FC \leq -2$  or  $\log_2FC \geq 2$  and an adjusted  $p\text{-value} \leq 0,01$ . **c.** COG analysis of genes expressed in cells extracted from insect cadavers at 7 dpi compared to exponential growth phase cells and stationary growth phase cells. Blue bars indicate up-regulated genes with a  $\log_2FC \geq 2$ , purple bars indicate down-regulated genes with a  $\log_2FC \leq -2$ . The considered genes have an adjusted  $p\text{-value} \leq 0,01$ . Genes with unknown functions are not represented. **d.** Heatmaps of genes expressed in cells extracted from insect cadavers at 7 dpi compared to exponential growth phase cells (left column), stationary growth phase cells (mid column) or in bacteria harvested in stationary growth phase compared to exponential growth phase (right column). Selected categories of differentially expressed genes are shown: oxidative stress, iron homeostasis, DNA replication recombination and repair as well as cell motility. Purple indicates low expression ( $\log_2FC \leq -2$ ) and blue indicates high expression ( $\log_2FC \geq 2$ ). ns indicates an adjusted  $p\text{-value} > 0,01$ .

### ***Oxidative stress genes are specifically expressed during late-infection, in contrast to iron homeostasis genes expressed at all times***

To examine the expression profile of selected genes identified in the RNA-Seq analysis and determine which of these were specific to late infection stage survival, we constructed strains harboring a transcriptional fusion between the promoter region of the gene of interest and the *gfp<sub>Bte</sub>AAV* reporter gene, associated to the sporulation reporter *PspollQ-mCherry*. We chose genes with the highest log<sub>2</sub>FC values obtained by the differential gene expression analysis in the iron homeostasis and oxidative stress resistance categories. We followed the expression profile of representative genes from these categories such as *ykun2* (a flavodoxin that replaces ferredoxin under conditions of iron limitation), *isdE1* (involved in heme scavenging), *dhbA* (the first gene of the *dhb* operon that specifies the biosynthesis of the siderophore bacillibactin involved in the chelation of ferric iron from the surrounding environment), *BTB\_c10430* (annotated as *sigX* by KEGG orthology), *katE1* (a catalase and general stress protein) and *sodA1* (a superoxide dismutase and general stress protein) (22). *Pykun2'gfp<sub>Bte</sub>AAV* and *PisdE1'gfp<sub>Bte</sub>AAV* were expressed from the start of the infection, and the percentage of fluorescent cells among the Spo<sup>-</sup> cells was around 30% (fig 7.a and 7.b). Similarly, *PdhbA'gfp<sub>Bte</sub>AAV* was expressed in approximately 40% of the cells among the Spo<sup>-</sup> bacteria in the 1, 3 and 7 dpi samples (fig 7.c). For the reporter *PBTB\_c10430'gfp<sub>Bte</sub>AAV* less than 20% of the 1 and 3 dpi Spo<sup>-</sup> cells were Gfp-positive. At 7 dpi, around 40% of the Spo<sup>-</sup> cells produced GFP, indicating a specific activation of *BTB\_c10430* during late infection survival (fig 7.d). *PkatE1'gfp<sub>Bte</sub>AAV* and *PsodA1'gfp<sub>Bte</sub>AAV* were specifically expressed in 7 dpi cells with about 65% of green fluorescent Spo<sup>-</sup> cells for the former and 80% for the latter (fig 7.c). As expected, none of these reporters were expressed in Expo and Stat cells. Altogether, these results indicate that iron homeostasis is important from the start of the infection whereas an oxidative stress response is mounted as the bacteria spend more time in the cadaver environment.



**Figure 7. Iron homeostasis and oxidative stress resistance promoter activities during infection.**

Flow cytometry analysis of Bt (pPykuN2'*gfp*<sub>Bte</sub>AAV-PspollQ'*mCherry*) (a), Bt (pIsdE1'*gfp*<sub>Bte</sub>AAV-PspollQ'*mCherry*) (b), Bt (pDhbA'*gfp*<sub>Bte</sub>AAV-PspollQ'*mCherry*) (c), Bt (pBTB\_c10430'*gfp*<sub>Bte</sub>AAV-PspollQ'*mCherry*) (d), Bt (pKatE1'*gfp*<sub>Bte</sub>AAV-PspollQ'*mCherry*) (e) and Bt (pSodA1'*gfp*<sub>Bte</sub>AAV-PspollQ'*mCherry*) (f) cells grown in LB medium and harvested in exponential (OD<sub>600</sub> = 1, dark blue) or stationary phase (OD<sub>600</sub> = 8, light blue), or extracted from *G. mellonella* cadavers at 1 day (pink), 3 (dark purple) and 7 days (light purple) pi. Green fluorescent cells among the non-sporulating bacteria were discriminated in cytograms as described in the Materials and Methods section. Each symbol represents the data relative to bacteria extracted from one larva. The data are the result of two independent experiments and the error bars show the standard deviation from the mean. Statistically significant differences are indicated by black bars with the p-value obtained after a Kruskal-Wallis Test followed by a Dunn's multiple comparison test.

### 3.2.4 Discussion (Discussion)

Our study reports the characterization of a physiological state that procures the sporulating entomopathogenic Gram-positive bacterium *B. thuringiensis* specific properties allowing its persistence in the host environment in a non-sporulated form. We analyzed the phenotypic properties and transcription profile of the Spo<sup>-</sup> *B. thuringiensis* cells in the context of an infection in *G. mellonella* larvae. These larvae are natural hosts for the *B. thuringiensis* species, but they are also widely used as an alternative to mammalian models of infection to study bacterial virulence and host colonization (23, 24).

The RNA-Seq analysis showed that the motility genes were down-regulated in 7 dpi bacteria compared to *in-vitro*-grown cells, and that the motility repressor-encoding gene *mogR* (25) was up-regulated in 7 dpi bacteria compared to exponentially growing cells. Similarly, the biofilm-associated genes *calY*, *tasA* and the *eps2* locus (26, 27), were up-regulated compared to exponentially growing cells. These data suggest that the late-infection stage bacteria form a biofilm which might confer them an advantage for long-term survival considering the resistance properties of these structures (28). The most represented categories among the up-regulated transcripts in 7 dpi bacteria compared to *in vitro*-grown cells are the oxidative stress response, DNA recombination, replication and repair in addition to iron homeostasis. The expression of uptake systems for iron, as well as biosynthesis and uptake of the endogenous siderophore bacillibactin was shown to be activated by iron limitation in *B. cereus* (29). During an infection, the host is considered to be an iron-depleted environment and bacteria need to deploy strategies to scavenge this element, such as the activation of the Fur regulon (30, 31). This is consistent with the activation of the iron homeostasis genes *dhbA* and *isdE1*, belonging to this regulon, during all stages of the infection. Iron is essential for the function of various proteins and iron homeostasis was previously reported as being important for *B. cereus* pathogenesis in the first stages of *G. mellonella* infection by oral gavage (32). However, this metal is also a

potential hazard in combination with compounds such as H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> because the reaction between the two products generates reactive oxygen species (ROS) that can be harmful by damaging cellular components such as DNA or proteins with [Fe-S] clusters (33). Several studies have linked iron homeostasis and DNA repair to a response to oxidative stress and showed the upregulation of these gene categories upon H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exposure (34, 35), and it was recently reported that H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was produced in the hemolymph of *G. mellonella* during *Salmonella enterica* infection (36). Moreover, the melanization defense reaction that occurs after the insect infection liberates ROS and might last for several days (37–39). Aerobic metabolism also generates endogenous oxidative stress if O<sub>2</sub> is not completely reduced during respiration and a secondary oxidative stress response can also be triggered when *Bacillus* encounter unfavorable conditions in an aerobic environment (40). All these stresses are counteracted by the action of proteins such as catalases (Kat), superoxide dismutases (SodA) or DNA-binding ferroxidases (Dps) (41, 42), all of which are overexpressed in 7 dpi bacteria. RNA-Seq analysis also revealed that the BTB\_c10430 locus, annotated as encoding the SigX protein (22), is specifically up-regulated in 7 dpi bacteria. SigX belongs to the extracytoplasmic function (ECF) sigma factor family that helps maintain cell envelope homeostasis and activate resistance to agents that can compromise the integrity of the envelope, the first defense against environmental threats (43). A *B. subtilis sigX* deletion mutant was shown to be sensitive to oxidative stress (44). Further investigations should examine the involvement of this regulatory protein in the maintenance of *B. thuringiensis* in insect cadavers. It would also be informative to determine if the oxidative stress response triggered in the late-infection stage bacteria is due to the cadaver environment, to an excessive iron uptake or to a combination of the two and to understand the role of the oxidative stress response in the resistance of *B. thuringiensis* during long-term infection.

*B. thuringiensis* is able to overcome the immune defenses of *G. mellonella*, to multiply and to completely invade its host in less than 24 hpi (11, 45, 46), (this study and unpublished). It was shown that the bacteria engage in necrotrophism after the

death of the larva by activating the NprR regulon that includes genes encoding chitinases, proteases and oligopeptide permeases (11, 15). Activation of this regulon seemed to last throughout the duration of the infection (15) and an *nprR* deletion mutant was unable to survive in the cadaver suggesting that the regulon was required for long-term survival. However, we showed here that necrotrophism is a transient state limited to the first stages of survival in the cadaver. We propose that this state allows *B. thuringiensis* to scavenge the nutrients present in the cadaver shortly after the insect death, then the bacteria enter different pathways, potentially triggered by a stress signal such as nutrient depletion, that allow for their persistence in the host. A subpopulation enters the differentiation pathway leading to sporulation, while another engages in a metabolic slow-down that accentuates with the increase of exposure time to the cadaver environment. This subpopulation also showed resistance to the cadaver environment, which proved hostile for *in vitro*-grown bacteria as well as *in-vitro* generated spores.

Altogether, these results show that non-sporulated late-infection stage *B. thuringiensis* are resilient cells able to resist in a harsh environment and suggest that this adaptation relies mainly on the activation of stress resistance genes as well as entering a metabolic slow-down. The fitness advantages conferred by the phenotypic heterogeneity of the *B. thuringiensis* population during infection and, in particular, by the co-existence of spores and of the non-sporulated form able to survive for a prolonged period in a host cadaver, still need to be elucidated. Studying the mechanisms that govern this state will provide valuable fundamental knowledge about the lifecycle of these bacteria and might lead to the development of new strategies to combat sporulating pathogenic species.

### 3.2.5 Procédures expérimentales (Material and Methods) et notes

#### ***Bacterial strains and growth conditions***

The acrySTALLIFEROUS *Bacillus thuringiensis* 407 Cry<sup>-</sup> strain (*B. thuringiensis* 407<sup>-</sup>) (47) was

used as the parental strain to create all the strains used in this study. *Escherichia coli* strain DH5 $\alpha$  (48) was used as the host strain for plasmid construction. *E. coli* strain ET12567 (49) was used to prepare DNA prior to electroporation in *B. thuringiensis*. Cells were grown under shaking at 30°C or 37°C in LB medium (1% tryptone, 0.5% yeast extract, 1% NaCl) or HCT medium (0.7% casein hydrolysate, 0.5% tryptone, 0.68% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.012% MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.00022% MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O, 0.0014% ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.008% ferric ammonium citrate, 0.018% CaCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, pH 7.2). The bacteria were stored at -80°C in LB containing 15% glycerol.

When required, the medium was supplemented with antibiotics at the following concentrations: 100  $\mu$ g/mL ampicillin (for *E. coli*), 10  $\mu$ g/mL erythromycin (for *B. thuringiensis*).

### **Plasmids and strains construction**

DNA manipulations are detailed in the supplemental material text. All the plasmids, strains and oligonucleotide primers used in this study are listed in [Tables S1.a, b and c](#) in the supplemental material.

### **Infection of *Galleria mellonella***

Intrahemocoelic injection experiments with *Galleria mellonella* were carried out as described previously (14). Briefly, last instar larvae were infected by intrahaemocoelic injections with  $2 \cdot 10^4$  vegetative cells in exponential phase ( $OD_{600}=1$ ). Inocula were enumerated after plating onto LB agar medium. Infected larvae were incubated at 30°C under a Nikon CoolPix P1 on time-lapse photography mode and pictures were taken every 10 min to determine the time of death for each larva. Larvae that died within the same hour were used for each time point. A larva was considered dead at the time its movements stopped if followed by melanization ([see supplemental material for details, fig S1](#)).

### ***Extraction of B. thuringiensis from G. mellonella cadavers***

Isolation of bacteria from insect cadavers was adapted from Verplaetse *et al.*, 2015, (15). Cadavers were crushed with a 1 mL tip in a 1.5 mL Eppendorf tube. 1 mL of saline was added and the tube was vortexed. 750  $\mu$ L of the suspension were transferred to a new 1.5 mL tube and centrifuged for 45 sec at 13000 rpm. The pellet was resuspended in 750  $\mu$ L of saline and loaded in a 1 mL syringe fitted with a cotton filter in order to isolate bacterial cells from cadaver debris. The filtrate was then centrifuged for 30 sec at 13000 rpm, fixed in 4% formaldehyde in saline for 15 min, washed in saline, resuspended in GTE buffer (50) and kept at 4°C until flow cytometric or microscopy analysis.

### ***Flow cytometric analysis***

Bacteria were diluted in filtered saline and fluorescent events were measured on a CyFlow Space cytometer (Sysmex Partec, France). Specifications of the apparatus and flow cytometric analyses are described in the supplemental material text.

### ***Microscopy***

Bacteria were observed with an AxioObserver.Z1 Zeiss inverted fluorescence microscope with a Zeiss AxioCam MRm digital camera and with Zeiss fluorescence filters. GFP, 5(6)-CFDA, DiBAC4(3), Sytox Green were imaged using the 38 HE filter (excitation: BP 470/40, beam splitter: FT 495, emission: 525/50) and mCherry was imaged using the 45 HE filter (excitation: BP 590/20, beam splitter: FT 605, emission: 620/14). Images were processed using the ZEN software package (Zeiss).

### ***Sporulation assay***

The sporulated population was assessed by plating and by flow cytometry. Each larva cadaver was ground in 3 mL of saline on ice using an T10 Ultra-Turaxx apparatus. The volume was then adjusted to 10 mL. To determine the number of total cells and the number of heat-resistant spores, the bacteria were enumerated by plating on LB agar

plates following serial dilutions before and after heat treatment at 80°C for 12 min. For flow cytometry, fixed bacteria (as described above) harboring the red fluorescent sporulation reporter *PspollQ'mCherry* were analyzed. Red fluorescent events were counted among the total cell count to calculate the percentage of sporulation.

### ***Induction of gfp expression***

Bacteria were extracted from insect cadavers as described above or were harvested from HCT cultures at 30°C at OD<sub>600</sub>=1 (exponential phase of growth) and OD<sub>600</sub>=6 (stationary phase of growth) *via* centrifugation at 13000 rpm for 30 sec, washed once in saline and resuspended in conditioned HCT medium (obtained after filtration of a 10 h culture of *B. thuringiensis* 407<sup>-</sup> in HCT) to preserve bacteria while preventing cell growth. Half of the suspension was supplemented with xylose at 25 mM final concentration. For each sample, an aliquot was fixed as described above at the time of xylose addition and after 1 and 2 h of incubation with shaking at 30°C. The samples were kept at 4°C until flow cytometric or microscopy analysis.

### ***Growth recovery assessment of the bacteria extracted from insect cadavers***

Culturability was assessed by plating the bacteria on two different media, LB agar and Insect agar, and by time-lapse microscopy. The bacteria were extracted from insect cadavers as described above or were harvested from *in vitro* cultures in LB at 30°C at OD<sub>600</sub>=1 (exponential phase), OD<sub>600</sub>=8 (stationary phase) and from a 48 h culture (composed of about 65% of spores) *via* centrifugation at 13000 rpm for 30 sec, washed once in saline, serially diluted and plated onto LB plates containing erythromycin. 16 hours after incubation at room temperature, colonies were photographed with a Canon Eos 750D under a binocular stereo microscope Leica MZFLIII. Colony area was determined using the Image J software (51).

To prepare Insect agar plates, 12 larvae cadavers were harvested at 7 dpi and crushed in 50 mL saline then filtered as described above. Agar prepared in saline was then added at a final concentration of 1.5%. The bacteria extracted from insect larvae or harvested from LB cultures, in the same manner as above, were serially diluted and plated onto LB plates supplemented with erythromycin and Insect agar plates supplemented

with erythromycin. Colonies were counted 16 hours after incubation at room temperature for LB plates and after 4 days for Insect agar plates.

For time lapse microscopy, medium pads were prepared with LB supplemented with 1% agarose to fill a 125- $\mu$ l GeneFrame (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, U.S.A.). After polymerization, 2-mm-wide strips were cut and three strips were placed in a new gene frame. Bacteria were extracted from insect larvae or harvested from LB cultures as described above and washed in saline. 2  $\mu$ L of cells were then pipetted onto the strips before the frame was sealed with a coverslip. *B. thuringiensis* development was monitored at 30°C in a temperature-controlled chamber with the microscope described above. Phase-contrast and fluorescence images were taken every hour for 5 h. Only bacteria extracted from insect cadavers at 0 h were assigned to a category (elongation, division, lysis, inactivity). Newly-formed daughter cells were excluded from the analysis.

### ***Molecular dye staining***

Bacterial cells were harvested from LB cultures or insect cadavers as described above and resuspended in 1 mL of saline. Samples were diluted to  $10^7$  cells/mL in filtered saline supplemented or not with one of the dyes. 5(6)-CFDA (Biotium, Fremont, CA, USA), DiBAC4(3) (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA) and Sytox Green (Invitrogen, Eugene, OR, USA) were suspended in DMSO and used at a final concentration of 5  $\mu$ M (5(6)-CFDA) or 0.5  $\mu$ M (DiBAC4(3) and Sytox Green). Cells were incubated at room temperature for 15 min in the dark. Stained samples were washed once in saline before flow cytometric or microscopy analysis. Unstained and heat-shocked cells at 90°C for 15 min were used as control.

### ***RNA-Seq analysis***

RNA was extracted from shaken liquid cultures and from dead larvae at 7 dpi as described in the supplemental material text. Nanodrop and Bioanalyzer instruments were used for quantity and quality controls ( $6,8 \leq \text{RINs} \leq 10$ ). Disrupting cells broke Spo<sup>-</sup> bacteria and left spores intact. Moreover, extraction of RNA from spore preparations using our protocol resulted in a very low yield of poor quality. However,

we cannot exclude a minute contamination with RNA from spores.

Library preparation including ribosomal RNA depletion (RiboZero) and sequencing was performed by the I2BC platform (Gif-sur-Yvette, France). Sequencing was conducted on an Illumina NextSeq machine using NextSeq 550/500 Mid Output Kit v2 to generate paired end reads (2x75).

Data processing was performed by the I2BC platform including the following steps: demultiplexing (with bcl2fastq2-2.18.12), adapter trimming (Cutadapt 1.15), quality control (FastQC v0.11.5), mapping (BWA v0.6.2-r126) against *B. thuringiensis* 407 strain. This generated between 9 M and 18 M of uniquely mapped reads per sample and counts for 6530 genes. Differentially expressed genes (DEG) were determined using the R package "DESeq2" (v1.30.1) to estimate p-values and log<sub>2</sub> fold-changes. DEG with  $\text{padj} \leq 10^{-2}$  and  $\log_2\text{FC} \leq -2$  or  $\log_2\text{FC} \geq 2$  were used for further analyses. Gene expression data are being deposited at the public repository Gene Expression Omnibus under the accession number GSE206636.

Using the functional re-annotation database available in the laboratory (see details in supplemental materials) of the *B. thuringiensis* 407 genome (chromosome: INSDC CP003889.1, plasmids: INSDC CP003890.1 to CP003898.1), GO terms, COG letters and *B. subtilis* homologous genes were assigned to our data-set with Microsoft SQL server 2019. Venn Diagrams were constructed with Venny 2.1.0 (52), 2007-2015 (<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>). Using Subtiwiki (53), KEGG orthology database (22) and COG letters, we retrieved genes from these functional categories: oxidative stress, iron homeostasis, DNA recombination and repair, necrotrophism, sporulation, and germination (see supplemental material, table S2.a,b,c for necrotrophism, sporulation and germination, respectively). Histograms and heatmaps of DEG according to these functional categories were then constructed using Prism 8 software (GraphPad).

### **Statistical analysis**

The data were analyzed using the Prism 8 software (GraphPad).

## CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

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.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are indebted to Christophe Buisson for insect rearing. This work has benefited from the facilities and expertise of the high throughput sequencing core facility of I2BC (Centre de Recherche de Gif – <http://www.i2bc.paris-saclay.fr/>) and the authors thank Delphine Naquin for primary analysis. We are grateful to Tarek Toukabri, Agnès Réjasse, Sébastien Gélis-Jeanvoine and Yan Jaszczyszyn for their help with the RNA-Seq experiment and analysis. The CyFlow Space flow cytometer was funded by the DIM Astrea (French regional program Ast11 0137). HT was the recipient of a doctoral grant from the ministry of French higher education, delivered by the Doctoral School ABIES at AgroParisTech–Université Paris Saclay. This work was supported by the MICA department of INRAE (French National Research Institute for Agriculture, Food and Environment).

### 3.2.6 References

1. Galperin MY. 2013. Genome Diversity of Spore-Forming Firmicutes. *Microbiol Spectr* 1.
2. Hilbert DW, Piggot PJ. 2004. Compartmentalization of Gene Expression during *Bacillus subtilis* Spore Formation. 2. *Microbiol Mol Biol Rev* 68:234–262.
3. Setlow P. 2014. Spore Resistance Properties. 5. *Microbiol Spectr* 2:2.5.11.
4. Horneck G, Bücker H, Reitz G. 1994. Long-term survival of bacterial spores in space. 10. *Advances in Space Research* 14:41–45.
5. Stragier P, Losick R. 1990. Cascades of sigma factors revisited. *Mol Microbiol* 4:1801–1806.

6. Gray DA, Dugar G, Gamba P, Strahl H, Jonker MJ, Hamoen LW. 2019. Extreme slow growth as alternative strategy to survive deep starvation in bacteria. 1. *Nat Commun* 10:890.
7. Piggot PJ, Coote JG. 1976. Genetic aspects of bacterial endospore formation. 4. *Bacteriol Rev* 40:908–962.
8. Molle V, Fujita M, Jensen ST, Eichenberger P, González-Pastor JE, Liu JS, Losick R. 2003. The Spo0A regulon of *Bacillus subtilis*: The Spo0A regulon. 5. *Molecular Microbiology* 50:1683–1701.
9. Rousset L, Alpha-Bazin B, Château A, Armengaud J, Clavel T, Berge O, Duport C. 2020. Groundwater promotes emergence of asporogenic mutants of emetic *Bacillus cereus* . 12. *Environ Microbiol* 22:5248–5264.
10. Antequera-Gómez ML, Díaz-Martínez L, Guadix JA, Sánchez-Tévar AM, Sopena-Torres S, Hierrezuelo J, Doan HK, Leveau JHJ, Vicente A, Romero D. 2021. Sporulation is dispensable for the vegetable-associated life cycle of the human pathogen *Bacillus cereus*. 4. *Microb Biotechnol* 14:1550–1565.
11. Dubois T, Faegri K, Gélis-Jeanvoine S, Perchat S, Lemy C, Buisson C, Nielsen-Leroux C, Gohar M, Jacques P, Ramarao N, Slamti L, Kolstø A-B, Lereclus D. 2016. Correction: Necrotrophism Is a Quorum-Sensing-Regulated Lifestyle in *Bacillus thuringiensis*. 11. *PLoS Pathog* 12:e1006049.
12. Ehling-Schulz M, Lereclus D, Koehler TM. 2019. The *Bacillus cereus* Group: *Bacillus* Species with Pathogenic Potential. *Microbiol Spectr* 7.
13. Slamti L, Perchat S, Huillet E, Lereclus D. 2014. Quorum Sensing in *Bacillus thuringiensis* Is Required for Completion of a Full Infectious Cycle in the Insect. 8. *Toxins* 6:2239–2255.
14. Salamitou S, Ramiisse F, Brehélin M, Bourguet D, Gilois N, Gominet M, Hernandez

- E, Lereclus D. 2000. The *plcR* regulon is involved in the opportunistic properties of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus* in mice and insects. 11. *Microbiology* 146:2825–2832.
15. Verplaetse E, Slamti L, Gohar M, Lereclus D. 2015. Cell Differentiation in a *Bacillus thuringiensis* Population during Planktonic Growth, Biofilm Formation, and Host Infection. 3. *mBio* 6:e00138-15.
16. Perchat S, Talagas A, Poncet S, Lazar N, Li de la Sierra-Gallay I, Gohar M, Lereclus D, Nessler S. 2016. How Quorum Sensing Connects Sporulation to Necrotrophism in *Bacillus thuringiensis*. 8. *PLoS Pathog* 12:e1005779.
17. Verplaetse E, Slamti L, Gohar M, Lereclus D. 2017. Two distinct pathways lead *Bacillus thuringiensis* to commit to sporulation in biofilm. *Res Microbiol* 168:388–393.
18. Ben Rejeb S, Lereclus D, Slamti L. 2017. Analysis of *abrB* Expression during the Infectious Cycle of *Bacillus thuringiensis* Reveals Population Heterogeneity. *Front Microbiol* 8:2471.
19. Londoño-Vallejo JA, Fréhel C, Stragier P. 1997. *SpollQ*, a forespore-expressed gene required for engulfment in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* 24:29–39.
20. Perchat S, Dubois T, Zouhir S, Gominet M, Poncet S, Lemy C, Aumont-Nicaise M, Deutscher J, Gohar M, Nessler S, Lereclus D. 2011. A cell-cell communication system regulates protease production during sporulation in bacteria of the *Bacillus cereus* group. 3. *Mol Microbiol* 82:619–633.
21. Kumar SS, Ghosh AR. 2019. Assessment of bacterial viability: a comprehensive review on recent advances and challenges. 6. *Microbiology (Reading)* 165:593–610.
22. Kanehisa M, Sato Y, Kawashima M, Furumichi M, Tanabe M. 2016. KEGG as a reference resource for gene and protein annotation. D1. *Nucleic Acids Res* 44:D457-462.

23. Tsai CJ-Y, Loh JMS, Proft T. 2016. *Galleria mellonella* infection models for the study of bacterial diseases and for antimicrobial drug testing. 3. *Virulence* 7:214–229.
24. Fedhila S, Buisson C, Dussurget O, Serror P, Glomski IJ, Liehl P, Lereclus D, Nielsen-Leroux C. 2010. Comparative analysis of the virulence of invertebrate and mammalian pathogenic bacteria in the oral insect infection model *Galleria mellonella*. *J Invertebr Pathol* 103:24–29.
25. Smith V, Josefsen M, Lindbäck T, Hegna IK, Finke S, Tourasse NJ, Nielsen-Leroux C, Økstad OA, Fagerlund A. 2020. MogR Is a Ubiquitous Transcriptional Repressor Affecting Motility, Biofilm Formation and Virulence in *Bacillus thuringiensis*. *Front Microbiol* 11:610650.
26. Candela T, Fagerlund A, Buisson C, Gilois N, Kolstø A-B, Økstad OA, Aymerich S, Nielsen-Leroux C, Lereclus D, Gohar M. 2019. CalY is a major virulence factor and a biofilm matrix protein. 6. *Mol Microbiol* 111:1416–1429.
27. Caro-Astorga J, Frenzel E, Perkins JR, Álvarez-Mena A, de Vicente A, Ranea JAG, Kuipers OP, Romero D. 2020. Biofilm formation displays intrinsic offensive and defensive features of *Bacillus cereus*. *NPJ Biofilms Microbiomes* 6:3.
28. Lin Y, Briandet R, Kovács ÁT. 2022. *Bacillus cereus sensu lato* biofilm formation and its ecological importance. *Biofilm* 4:100070.
29. Hayrapetyan H, Siezen R, Abee T, Nierop Groot M. 2016. Comparative Genomics of Iron-Transporting Systems in *Bacillus cereus* Strains and Impact of Iron Sources on Growth and Biofilm Formation. *Front Microbiol* 7:842.
30. Fedhila S, Daou N, Lereclus D, Nielsen-Leroux C. 2006. Identification of *Bacillus cereus* internalin and other candidate virulence genes specifically induced during oral infection in insects: *Bacillus cereus* internalin. *Molecular Microbiology* 62:339–355.
31. Daou N, Buisson C, Gohar M, Vidic J, Bierne H, Kallassy M, Lereclus D, Nielsen-

Leroux C. 2009. IIsA, a unique surface protein of *Bacillus cereus* required for iron acquisition from heme, hemoglobin and ferritin. PLoS Pathog 5:e1000675.

32. Consentino L, Rejasse A, Crapart N, Bevilacqua C, Nielsen-Leroux C. 2021. Laser capture microdissection to study *Bacillus cereus* iron homeostasis gene expression during *Galleria mellonella* in vivo gut colonization. 1. Virulence 12:2104–2121.

33. Cornelis P, Wei Q, Andrews SC, Vinckx T. 2011. Iron homeostasis and management of oxidative stress response in bacteria. 6. Metallomics 3:540–549.

34. Fu J, Qi L, Hu M, Liu Y, Yu K, Liu Q, Liu X. 2017. *Salmonella* proteomics under oxidative stress reveals coordinated regulation of antioxidant defense with iron metabolism and bacterial virulence. J Proteomics 157:52–58.

35. Wu M, Shan W, Zhao G-P, Lyu L-D. 2022. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration-dependent kinetics of gene expression: linking the intensity of oxidative stress and mycobacterial physiological adaptation. 1. Emerg Microbes Infect 11:573–584.

36. Bismuth HD, Brasseur G, Ezraty B, Aussel L. 2021. Bacterial Genetic Approach to the Study of Reactive Oxygen Species Production in *Galleria mellonella* During *Salmonella* Infection. Front Cell Infect Microbiol 11:640112.

37. Nakhleh J, Christophides GK, Osta MA. 2017. The serine protease homolog CLIPA14 modulates the intensity of the immune response in the mosquito *Anopheles gambiae*. J Biol Chem 292:18217–18226.

38. Cerenius L, Lee BL, Söderhäll K. 2008. The proPO-system: pros and cons for its role in invertebrate immunity. Trends Immunol 29:263–271.

39. Nappi A, Poirié M, Carton Y. 2009. The role of melanization and cytotoxic by-products in the cellular immune responses of *Drosophila* against parasitic wasps. Adv Parasitol 70:99–121.

40. Mols M, Abee T. 2011. Primary and secondary oxidative stress in *Bacillus*. 6. Environ Microbiol 13:1387–1394.
41. Zhao L, Zhou Y, Li J, Xia Y, Wang W, Luo X, Yin J, Zhong J. 2020. Transcriptional response of *Bacillus megaterium* FDU301 to PEG200-mediated arid stress. BMC Microbiol 20:351.
42. Shrivastava AK, Pandey S, Dietz KJ, Singh PK, Singh S, Rai R, Rai LC. 2016. Overexpression of AhpC enhances stress tolerance and N<sub>2</sub>-fixation in *Anabaena* by upregulating stress responsive genes. Biochim Biophys Acta 1860:2576–2588.
43. Helmann JD. 2016. *Bacillus subtilis* extracytoplasmic function (ECF) sigma factors and defense of the cell envelope. Curr Opin Microbiol 30:122–132.
44. Huang X, Decatur A, Sorokin A, Helmann JD. 1997. The *Bacillus subtilis* sigma(X) protein is an extracytoplasmic function sigma factor contributing to survival at high temperature. 9. J Bacteriol 179:2915–2921.
45. Kamar R, Réjasse A, Jéhanno I, Attieh Z, Courtin P, Chapot-Chartier M-P, Nielsen-Leroux C, Lereclus D, El Chamy L, Kallassy M, Sanchis-Borja V. 2017. DltX of *Bacillus thuringiensis* Is Essential for D-Alanylation of Teichoic Acids and Resistance to Antimicrobial Response in Insects. Front Microbiol 8:1437.
46. Attieh Z, Mouawad C, Rejasse A, Jehanno I, Perchat S, Hegna IK, Økstad OA, Kallassy Awad M, Sanchis-Borja V, El Chamy L. 2020. The *fliK* Gene Is Required for the Resistance of *Bacillus thuringiensis* to Antimicrobial Peptides and Virulence in *Drosophila melanogaster*. Front Microbiol 11:611220.
47. Lereclus D. 1989. Transformation and expression of a cloned  $\delta$ -endotoxin gene in *Bacillus thuringiensis*. 2. FEMS Microbiology Letters 60:211–217.
48. Taylor RG, Walker DC, McInnes RR. 1993. *E.coli* host strains significantly affect the quality of small scale plasmid DNA preparations used for sequencing. 7. Nucl Acids

Res 21:1677–1678.

49. MacNeil DJ, Gewain KM, Ruby CL, Dezeny G, Gibbons PH, MacNeil T. 1992. Analysis of *Streptomyces avermitilis* genes required for avermectin biosynthesis utilizing a novel integration vector. 1. Gene 111:61–68.
50. Vlamakis H, Aguilar C, Losick R, Kolter R. 2008. Control of cell fate by the formation of an architecturally complex bacterial community. 7. Genes Dev 22:945–953.
51. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. 7. Nat Methods 9:671–675.
52. Oliveros JC. 2007. An interactive tool for comparing lists with Venn’s diagrams. Venny 21. <https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>. Retrieved 16 April 2022.
53. Pedreira T, Efmann C, Stülke J. 2022. The current state of SubtiWiki, the database for the model organism *Bacillus subtilis*. D1. Nucleic Acids Res 50:D875–D882.

### **3.3 Données supplémentaires de l’article**

#### **MATERIALS AND METHODS**

##### **DNA manipulations**

Plasmid DNA was extracted from *E. coli* by a standard alkaline lysis procedure, using a Promega kit (Promega, Madison, Wisconsin USA). Restriction enzymes, T4 DNA ligase, Standard Taq DNA polymerase and Phusion high-fidelity DNA polymerase were purchased from New England Biolabs (Ipswich, MA, USA) and used as recommended by the manufacturer. The oligonucleotide primers (Table S1.c) used for PCR amplification were synthesized by Eurofins Genomics (Nantes, France). PCR was performed with a 2720 Thermak cyler (Applied Biosystems). All constructs were

systematically verified by PCR followed by sequencing of the region of interest. Nucleotide sequences were determined by Eurofins Genomics (Köln, Germany).

### **Flow cytometric analysis**

For GFP-, 5(6)-CFDA-, DiBAC4(3)- and Sytox Green-based fluorescence, a solid blue-laser emitting at 488 nm was used, combined to a 500-nm long pass dichroic mirror and a 527-nm band pass filter (512–542) (FL1 Channel). For mCherry-based fluorescence, a solid yellow-laser emitting at 561 nm was used, combined to a 610-nm long-pass filter (FL4 channel). The analyses were performed using logarithmic gains and detector settings, adjusted on a sample of reporterless cells, to define cellular autofluorescence. Gating on FSC/SSC was used to discriminate bacteria from the background. For each sample, 20000 gated events were measured. Data were collected with the FlowMax software (Sysmex Partec, France) and analyzed with the Weasel 3.3.3 software (WEHI, USA).

To identify positive and negative populations on FL1/FL4 bi-parametric cytograms, we applied the 98% division line for each fluorescent marker, i.e. we set the threshold on the reporterless strain so that 98% of the population gave a fluorescence intensity below the threshold. Bacteria with a fluorescence signal above the threshold were considered positive. We cannot exclude that for a reporter expressed at a low level, a few positive cells might have a fluorescent intensity similar to that of the reporterless cells and be included in the negative population.

### **RNA-Extraction**

2 mL aliquots were sampled from LB cultures at  $OD_{600}=1$  (exponential phase growth) and  $OD_{600}=8$  (stationary phase growth) and immediately mixed with an equal volume of RNA-later (Invitrogen, Eugene, OR, U.S.A.). Bacteria from insect cadavers were crushed in 1 mL of RNA-later and vortexed. All samples were stored at 4°C overnight to allow thorough penetration of RNA-later.

For bacteria extracted from insect cadavers, the liquid fraction was transferred to a new tube and centrifuged for 10 min at 13000 rpm at 4°C. The fat pellicle and supernatant were discarded and the pellet resuspended in 750 µL of saline. The suspension was then filtered on a cotton pad in a 1 mL syringe to remove larvae debris. Then, all samples (from *in vitro* cultures and from insect cadavers) were centrifuged for 3 minutes at 13000 rpm at 4°C and the pellets were resuspended in 1 mL of Trizol (Invitrogen, Eugene, OR, USA). Resuspended bacteria were disrupted by adding silica beads (Biospec Products, Bartlesville, OK, USA) to the suspension and shaking in a Fastprep 24 (MP Biomedicals) for 45 s at 6.5 M/s twice. The supernatant was transferred to a clean tube and 100 µL of 1-bromo-3-chloropropane (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA) were added. The suspension was vortexed, incubated for 10 min at room temperature and centrifuged for 15 min at 13000 rpm at 4°C. The aqueous phase was then transferred to a clean tube to which 0.1 volume of sodium acetate and 0.7 volume of isopropanol were added. The suspension was mixed with 1 µL of glycogen (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and incubated at -20°C for 1 h to precipitate nucleic acids. Nucleic acids were then pelleted by centrifugation (20 min at 13000 rpm at 4°C), washed twice with 75% ethanol, air-dried and resuspended in RNase-free water (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Traces of contaminating DNA were removed by TURBO DNase treatment (Invitrogen, Eugene, OR, USA).

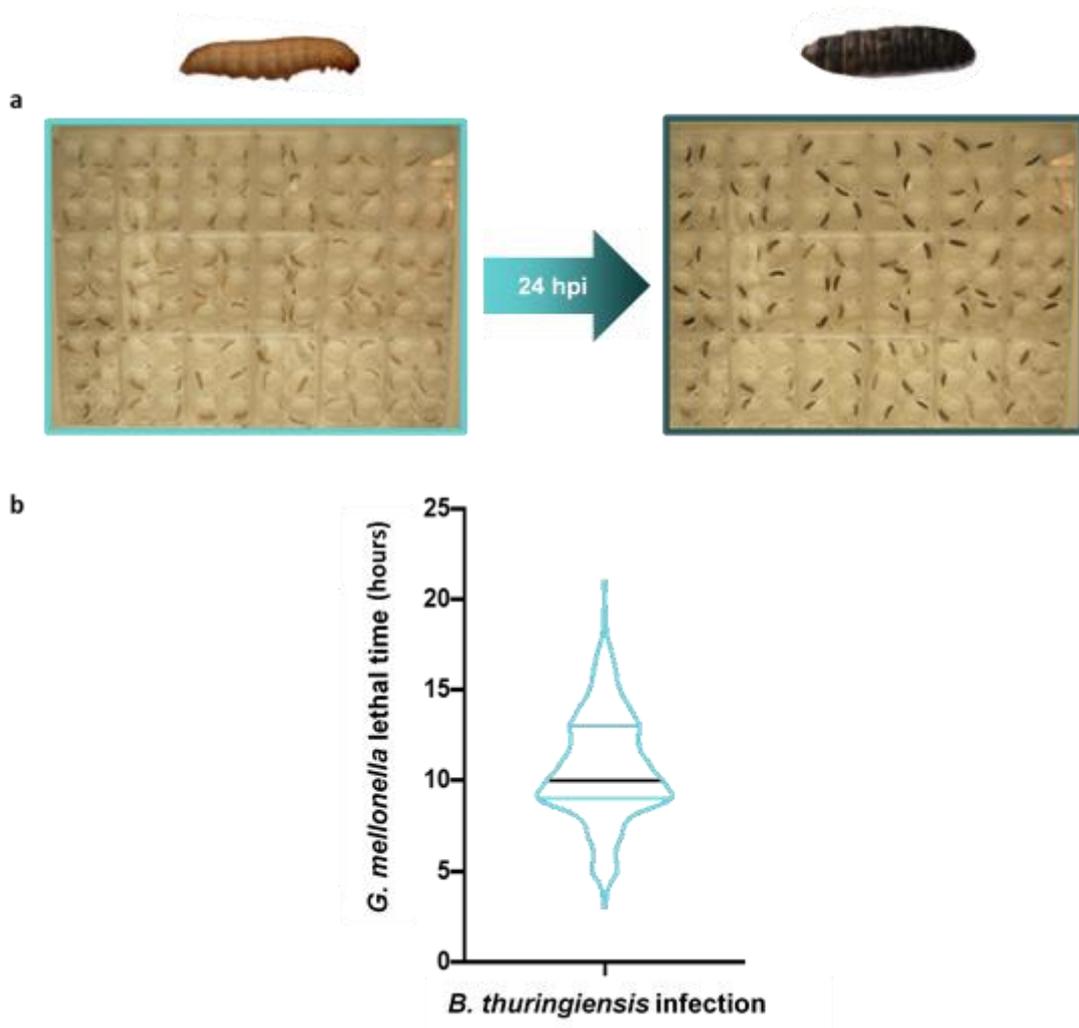
### **RNA-Seq analysis**

To assign functional categories to the differentially expressed genes, we used a database constructed by Sébastien Gélis-Jeanvoine (unpublished). This database was constructed as follows: all the genes of *B. thuringiensis* 407 were functionally re-annotated using InterProScan (1), HHSearh (2) and EggNOG (3). InterProScan v.5 was queried online through its SOAP API ([http://www.ebi.ac.uk/Tools/webservices/services/pfa/iprscan5\\_soap](http://www.ebi.ac.uk/Tools/webservices/services/pfa/iprscan5_soap)) with the --goterms and --nopathways flags. GO terms were then parsed and used as three different annotations (process, function and component). HHSearh was used on our

local cluster to query an HMM database prepared from the PDB70 database (2014-09-06 update), with a probability threshold of 95%. COG letters were assigned to our query genes by first aligning them with BLASTp (e-value threshold of  $10^{-2}$ ) against the EggNOG v4.0 data base. The best hit for each query gene was then used to retrieve the cognate COG letter via an in-house script (EggnogGenome, <https://github.com/seb-ksl/EggnogGenome>).

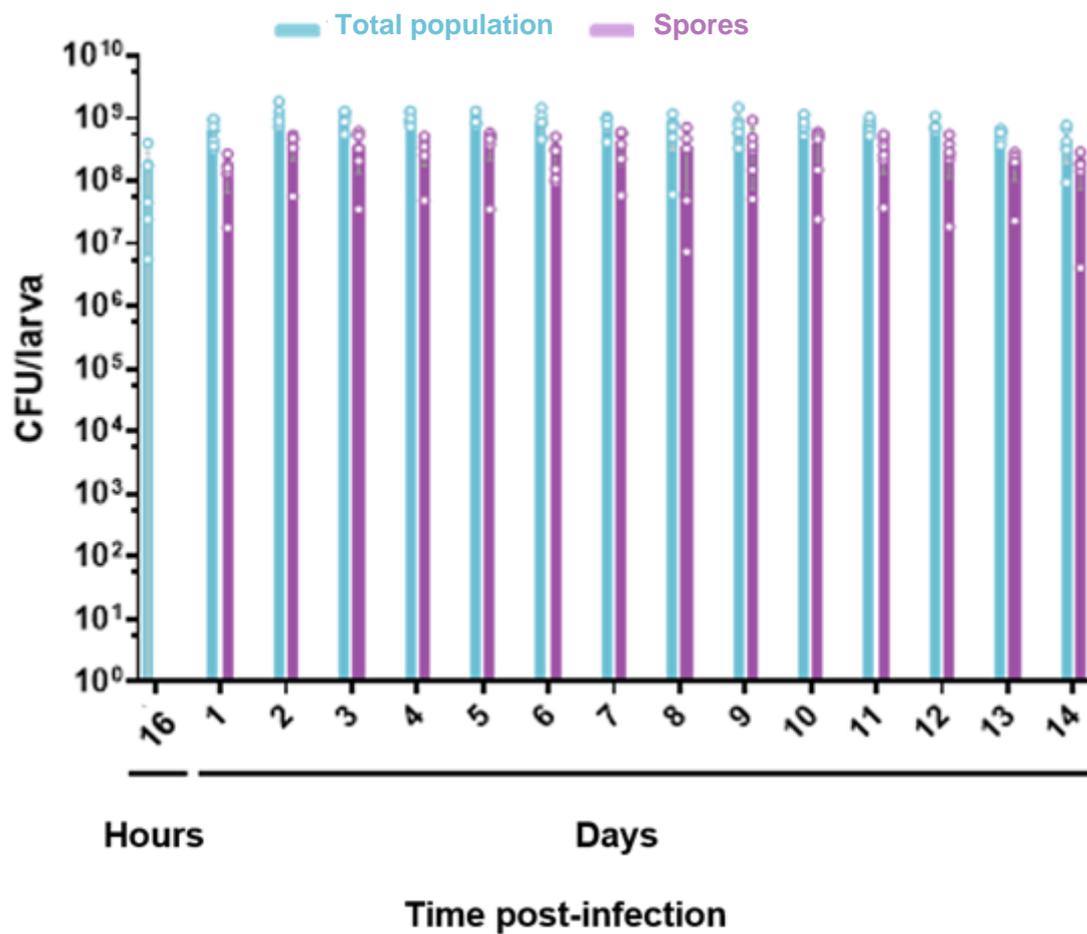
## REFERENCES

1. Jones P, Binns D, Chang H-Y, Fraser M, Li W, McAnulla C, McWilliam H, Maslen J, Mitchell A, Nuka G, Pesseat S, Quinn AF, Sangrador-Vegas A, Scheremetjew M, Yong S-Y, Lopez R, Hunter S. 2014. InterProScan 5: genome-scale protein function classification. *Bioinformatics* 30:1236–1240.
2. Söding J. 2005. Protein homology detection by HMM-HMM comparison. *Bioinformatics* 21:951–960.
3. Powell S, Forslund K, Szklarczyk D, Trachana K, Roth A, Huerta-Cepas J, Gabaldón T, Rattei T, Creevey C, Kuhn M, Jensen LJ, von Mering C, Bork P. 2014. eggNOG v4.0: nested orthology inference across 3686 organisms. *Nucleic Acids Res* 42:D231-239.

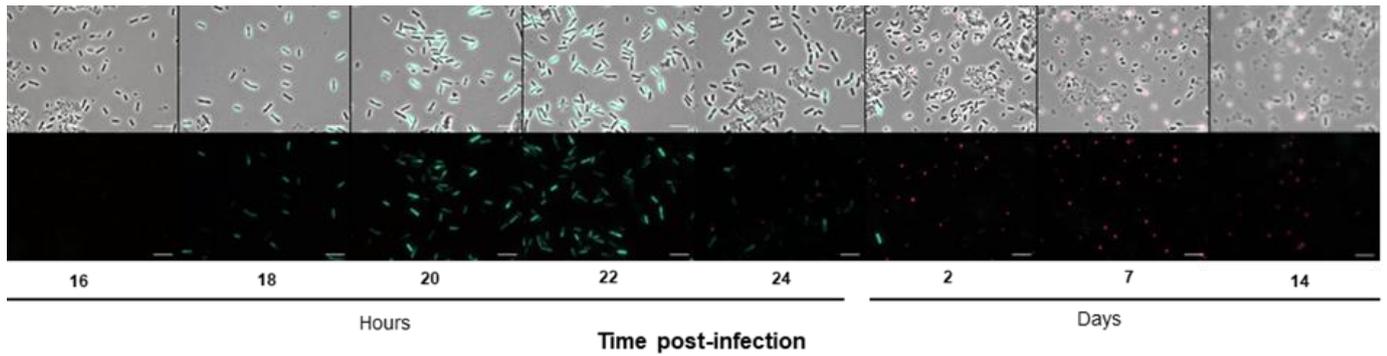


**Figure S1. Time-lapse photography set-up to determine *G. mellonella* lethal time.**

**a.** First picture shows infected larvae incubated in 6-well plates at 30°C under a Nikon CoolPix P1 camera on time-lapse photography mode to determine the time of death for each larva. Melanization as shown by the second picture at 24 hpi and absence of movement are required to consider a larva as dead. **b.** *G. mellonella* lethal time after infection with *B. thuringiensis* strain 407<sup>-</sup>. A picture was taken every 10 min with the time-lapse photography set-up and lethal time post-infection is reported. Black line indicates the median, blue lines indicate the first and last quartile,  $n > 150$ .

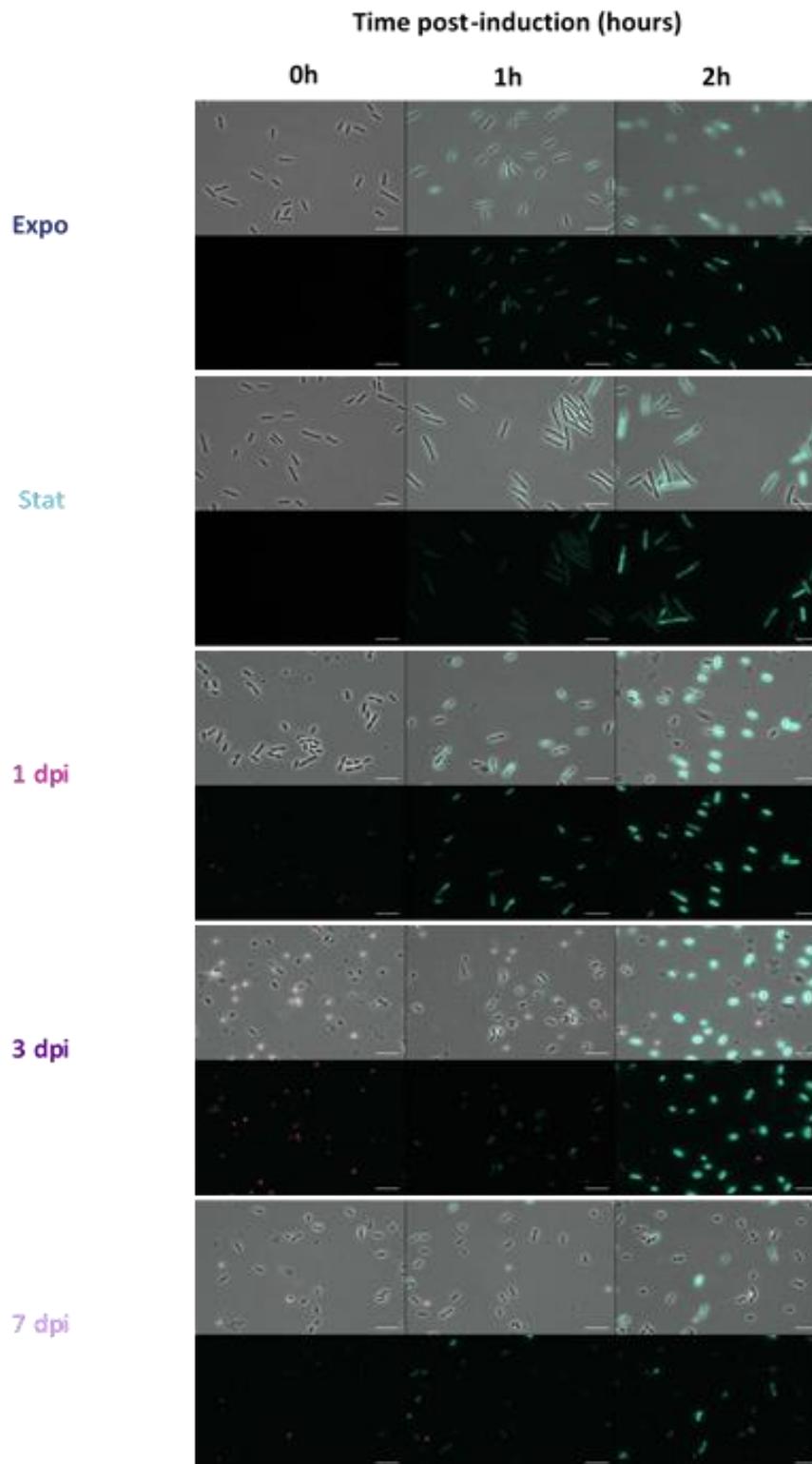


The total bacterial population (purple) and spores (blue) were numerated daily for 14 days after intrahemocoelic infection of *G. mellonella* with Bt (pPnprA'gfp<sub>Bte</sub>AAV-pPspolIQ'mCherry). 6 larvae were crushed at the time points indicated and serial dilutions of the homogenate were directly plated onto LB agar for total population numeration. The bacterial suspensions were heated at 80°C during 12 minutes and plated onto LB agar to count heat-resistant spores. Each symbol represents bacteria extracted from one larva. The data are the result of two independent experiments and the error bars show the standard deviation from the mean.



**Figure S3. Microscopy observations of the necrotrophism and sporulation promoters activity in bacterial cells during long-term infection.**

Bacteria were analyzed by fluorescence microscopy at the time points indicated. Upper panels merge between the phase contrast and epifluorescence images channels; lower panels, epifluorescence images. Cells were false colored in green for Nec<sup>+</sup> cells and pink for Spo<sup>+</sup> cells. The scale bars represents 10  $\mu$ m.



**Figure S6. Induction of *gfp* expression in non-sporulated bacteria.** Fluorescence microscopy images at the time after induction indicated above the pictures. Lower panels, epifluorescence images; upper panels, merge between the two channels. Cells were false colored in green for *gfp*-expressing cells and pink for Spo<sup>+</sup> cells. The scale bar represents 10  $\mu$ m. These results are representative of three independent experiments.

**Table S1.a Plasmids used in this study**

Name	Relevant information	Reference
pHT304	Replicative multicopy <i>E. coli/B. thuringiensis</i> shuttle vector.	(1)
pHT304.18	Replicative multicopy <i>E. coli/B. thuringiensis</i> shuttle vector.	(2)
pPx'gfp <sub>Bte</sub>	<i>B. thuringiensis</i> codon optimized <i>gfp</i> including 24 bp encoding the first eight amino acids of <i>comGA</i> (3), cloned in the pHT304'Pxyl+ vector with the modified RBS AGGAGG (4).	(5)
pHT-gfp <sub>Bte</sub> AAV	Destabilized <i>gfp<sub>Bte</sub></i> using the <i>ssrA</i> –AAV tag designated <i>gfp<sub>Bte</sub>AAV</i> cloned into pHT304.18.	(5)
pPnprA'gfp <sub>Bte</sub> AAV	The promoter region of the <i>nprA</i> gene was amplified by PCR from the chromosome of <i>B. thuringiensis</i> strain 407 using primer pairs PnprA-F-XbaI/PnprA-R-AscI and cloned between the XbaI and AscI restriction sites of pHT-gfp <sub>Bte</sub> AAV to detect fluctuations in necrotrophism expression.	This study
pPspolIQ <sub>ST</sub>	The promoter region of the <i>spolIQ</i> gene was	This study

	<p>amplified by PCR from the chromosome of <i>B. thuringiensis</i> strain 407 using primer pairs PspIIQ-F-SphI/PspIIQ-R-XbaI and cloned between the SphI and XbaI restriction sites of pHT304.18 p<i>PspIIQ</i>'. This construction was prepared for future <i>mCherry</i> insertion and expression optimization by cloning the transcriptional terminator of phage lambda (6) using primer pairs Term-F-KpnI/Term-R-EcoRI between the KpnI and EcoRI restriction sites of p<i>PspIIQ</i>'. We also added The STAB-SD (7) sequence by PCR amplification using primer pairs StabSD-F-XbaI/StabSD-R-BamHI followed by cloning between the XbaI and BamHI restriction sites of p<i>PspIIQ</i>'TermLambda. This generated p<i>PspIIQ</i><sub>ST</sub>.</p>	
p <i>PspIIQ</i> ' <i>mCherry</i>	<p><i>B. thuringiensis</i> codon optimized <i>comGAmcherry</i> was amplified by PCR from pPx+'<i>comGAmCherry</i> (unpublished) using primer pairs comGAmC-F-BamHI/mC-R-KpnI and cloned between the BamHI and KpnI restriction sites of</p>	This study

	p <i>PspoIIQ</i> <sub>ST</sub> to create a transcriptional fusion to assess sporulation.	
p <i>PspoIIQ</i> ' <i>mCherry</i> - <i>PnprA</i> ' <i>gfp</i> <sub>BteAAV</sub>	<i>PspoIIQ</i> <sub>ST</sub> was amplified by PCR from p <i>PspoIIQ</i> <sub>ST</sub> using primer pairs <i>PspoIIQ</i> -F-SalI/Term-R-SphI and cloned between the SalI and SphI restriction sites of p <i>PnprA</i> ' <i>gfp</i> <sub>BteAAV</sub> . This construction is used to monitor sporulation and transient necrotrophism expression.	This study
p <i>Px+</i> ' <i>gfp</i> <sub>BteT</sub>	The transcriptional terminator of phage lambda was amplified by PCR using primer pairs Term-F-KpnI/Term-R-AscI-XbaI-EcoRI and cloned between the KpnI and EcoRI restriction sites of p <i>Px+</i> ' <i>gfp</i> <sub>Bte</sub> to obtain p <i>Px+</i> ' <i>gfp</i> <sub>BteT</sub>	This study
p <i>Px+</i> ' <i>gfp</i> <sub>Bte</sub> '- <i>PspoIIQ</i> ' <i>mCherry</i>	<i>PspoIIQ</i> <sub>ST</sub> was amplified by PCR from p <i>PspoIIQ</i> <sub>ST</sub> using primer pairs <i>PspoIIQ</i> -F-AscI/Term-R-EcoRI and cloned between the AscI and EcoRI restriction sites of p <i>Px+</i> ' <i>gfp</i> <sub>BteT</sub> '. This construction was used to detect GFP production upon xylose induction among the non-sporulating cells.	This study
p <i>PspoIIQ</i> ' <i>mCherry</i> -	The promoter region of the <i>ykuN2</i> gene was	This study

<p><i>PykuN2'</i> <i>gfp<sub>Bte</sub>AAV</i></p>	<p>amplified by PCR from the chromosome of <i>B. thuringiensis</i> strain 407 using primer pairs Pykun2-F-SalI/Pykun2-R-AscI and cloned between the SalI and AscI restriction sites of p<i>PspoIIQ'</i> <i>mCherry-PnprA'</i> <i>gfp<sub>Bte</sub>AAV</i>. This construction was used to determine the promoter activity of <i>ykuN2</i> among the non-sporulating cells.</p>	
<p>p<i>PspoIIQ'</i> <i>mCherry-PisdE1'</i> <i>gfp<sub>Bte</sub>AAV</i></p>	<p>This plasmid was constructed as above with the promoter region of <i>isdE1</i> amplified using primer pairs PisdE1-F-SalI/PisdE1-R-AscI to determine the promoter activity of <i>isdE1</i> among the non-sporulating cells.</p>	<p>This study</p>
<p>p<i>PspoIIQ'</i> <i>mCherry-PdhaA'</i> <i>gfp<sub>Bte</sub>AAV</i></p>	<p>This plasmid was constructed as above with the promoter region of <i>dhaA</i> amplified using primer pairs PdhaA-F-SalI/PdhaA-R-AscI to determine the promoter activity of <i>dhaA</i> among the non-sporulating cells.</p>	<p>This study</p>
<p>p<i>PspoIIQ'</i> <i>mCherry-PBTB_c10430'</i> <i>gfp<sub>Bte</sub>AAV</i></p>	<p>This plasmid was constructed as above with the promoter region of <i>BTB_c10430</i> amplified using primer pairs PBTB_c10430-F-SalI/PBTB_c10430-R-AscI to determine the promoter activity of</p>	<p>This study</p>

	<i>BTB_c10430</i> among the non-sporulating cells.	
pPspIIQ'mCherry- PkatE1'gfp <sub>Bte</sub> AAV	This plasmid was constructed as above with the promoter region of <i>katE1</i> amplified using primer pairs PkatE1-F-SalI/PkatE1-R-AscI to determine the promoter activity of <i>katE1</i> among the non-sporulating cells.	This study
pPspIIQ'mCherry- PsodA1'gfp <sub>Bte</sub> AAV	This plasmid was constructed as above with the promoter region of <i>sodA1</i> amplified using primer pairs PsodA1-F-SalI/PsodA1-R-AscI to determine the promoter activity of <i>sodA1</i> among the non-sporulating cells.	This study

**Table S1.b Strains used in this study**

Name	Relevant information	Reference
Bt (pHT304)	<i>B. thuringiensis</i> strain 407 carrying the empty pHT304 vector and used as a fluorescence-negative control.	(5)
Bt (pPspIIQ'mCherry- PnprA'gfp <sub>Bte</sub> AAV)	<i>B. thuringiensis</i> strain 407 in which we measure the activity of the promoter of <i>nprA</i> , using a reporter gene encoding an	This study

	unstable GFP, as well as the activity of the promoter of <i>spoIIQ</i> , using mCherry.	
Bt (pP <i>spoIIQ</i> 'mCherry)	<i>B. thuringiensis</i> strain 407 <sup>-</sup> in which we measure the activity of the promoter of <i>spoIIQ</i> , using a reporter gene encoding mCherry.	This study
Bt (pP <sub>xyl+</sub> ' <i>gfp</i> <sub>Bte</sub> '-P <i>spoIIQ</i> 'mCherry)	<i>B. thuringiensis</i> strain 407 <sup>-</sup> in which we measure the activity of the promoter of <i>spoIIQ</i> , using a reporter gene encoding mCherry associated to the transcriptional fusion between P <sub>xyl+</sub> and GFP to determine GFP synthesis ability upon xylose induction.	This study
Bt (pP <i>spoIIQ</i> 'mCherry-Py <i>kuN2</i> ' <i>gfp</i> <sub>Bte</sub> AAV)	<i>B. thuringiensis</i> strain 407 <sup>-</sup> in which we measure the activity of the promoter of <i>ykun2</i> , using a reporter gene encoding an unstable GFP, as well as the activity of the promoter of <i>spoIIQ</i> , using mCherry.	This study
Bt (pP <i>spoIIQ</i> 'mCherry-P <i>isdE1</i> ' <i>gfp</i> <sub>Bte</sub> AAV)	Same as the strain above with the promoter region of <i>isdE1</i> .	This study
Bt (pP <i>spoIIQ</i> 'mCherry-P <i>dhbA</i> ' <i>gfp</i> <sub>Bte</sub> AAV)	Same as the strain above with the promoter region of <i>dhbA</i> .	This study

Bt (pPspIIQ'mCherry-PBTB_c10430' gfp <sub>Bte</sub> AAV)	Same as the strain above with the promoter region of <i>BTB_c10430</i> .	This study
Bt (pPspIIQ'mCherry-PkatE1' gfp <sub>Bte</sub> AAV)	Same as the strain above with the promoter region of <i>katE1</i> .	This study
Bt (pPspIIQ'mCherry-PsodA1' gfp <sub>Bte</sub> AAV)	Same as the strain above with the promoter region of <i>sodA1</i> .	This study

**Table S1.c Oligonucleotides used in this study (pink letters indicate restriction sites)**

Name	Sequence
PnprA-F-XbaI	gctctagaGCCGGAAAGGGTTTTTTCAATATTTG
PnprA-R-AscI	tggcgcgccGCTTCTTACCAGTCGCTCC
PspIIQ-F-SphI	acatgatgcGCATCTTCGGTTGAAGTTCTAC
PspIIQ-R-XbaI	gctctagaCATCACCTCAGCAATCATTTTGAAC
Term-F-KpnI	ggggtaccGATCTCTGCAGTCGCGATGATTAATTAATTC
Term-R-EcoRI	ggaattcCGCAACGTTCTTGCCATTGCTGC
StabSD-F-XbaI	gctctagaTCTTGAAAGGAGGGATGCCTAAAAA
StabSD-R-BamHI	cgggatccATAAAATGATTTTTTCATAAATCCA
comGA <sub>mC</sub> -F-BamHI	cgggatccTTAAGGAGGTGACACCATGAATGGG
mC-R-KpnI	ggggtaccTACTTATATAATTCATCCATTCCAC

PspoIIQ-F-SalI	acgcg <b>tcgac</b> GCATCTTCGGTTGAAGTTCTAC
Term-R-SphI	acatg <b>catgc</b> GCAACGTTCTTGCCATTGCTGC
Term-R-AscI-XbaI-EcoRI	g <b>gaattccgctctagaggcgcgcc</b> GCAACGTTCTTGCCATTGCTGC
PspoIIQ-F-AscI	t <b>ggcgcgcc</b> GCATCTTCGGTTGAAGTTCTAC
Pykun2-F-SalI	acgcg <b>tcgac</b> AAAAAAGCACAGATGATTGTATAGT
Pykun2-R-AscI	t <b>ggcgcgcc</b> CATCTAAACTAACTTTAATTAAATC
PisdE1-F-SalI	acgcg <b>tcgac</b> TATTGTAACTAGAGCGCGGCGAAA
PisdE1-R-AscI	t <b>ggcgcgcc</b> AGACGCTTTCTCGTCCCCTTTGGCA
PdhbA-F-SalI	acgcg <b>tcgac</b> TATACAAATCTTCTATAACACTATG
PdhbA-R-AscI	t <b>ggcgcgcc</b> CTAAAAACATTTTGGCAACAACACT
PBTB_c10430-F-SalI	acgcg <b>tcgac</b> TAAATGCAATTTGGCAACAACTAA
PBTB_c10430-R-AscI	t <b>ggcgcgcc</b> CGTAAGCATAGTACTGCTTAAATAA
PkatE1-F-SalI	acgcg <b>tcgac</b> CGAAAAGAATTATCTTAAAAGCCAA
PkatE1-R-AscI	t <b>ggcgcgcc</b> CTTGTTTTGTTGTTAAAGCATGTTT
PsodA1-F-SalI	acgcg <b>tcgac</b> CATATCCATTTGCATGTTTATTA
PsodA1-R-AscI	t <b>ggcgcgcc</b> GGATGTTTCATTGTTTCTTTGTCCAA

## REFERENCES

1. Arantes O, Lereclus D. 1991. Construction of cloning vectors for *Bacillus thuringiensis*. *Gene* 108:115–119.
2. Agaisse H, Lereclus D. 1994. Structural and functional analysis of the promoter region involved in full expression of the *cryIIIA* toxin gene of *Bacillus thuringiensis*. *Mol Microbiol* 13:97–107.
3. Veening J-W, Smits WK, Hamoen LW, Jongbloed JDH, Kuipers OP. 2004. Visualization of differential gene expression by improved cyan fluorescent protein and yellow fluorescent protein production in *Bacillus subtilis*. *Appl Environ Microbiol* 70:6809–6815.
4. Stammen S, Müller BK, Korneli C, Biedendieck R, Gamer M, Franco-Lara E, Jahn D. 2010. High-yield intra- and extracellular protein production using *Bacillus megaterium*. *Appl Environ Microbiol* 76:4037–4046.
5. Ben Rejeb S, Lereclus D, Slamti L. 2017. Analysis of *abrB* Expression during the Infectious Cycle of *Bacillus thuringiensis* Reveals Population Heterogeneity. *Front Microbiol* 8:2471.
6. Scholtissek S, Grosse F. 1987. A cloning cartridge of lambda t(o) terminator. *Nucleic Acids Res* 15:3185.
7. Agaisse H, Lereclus D. 1996. STAB-SD: a Shine-Dalgarno sequence in the 5' untranslated region is a determinant of mRNA stability. *Mol Microbiol* 20:633–643.

### **Table S2.a – Necrotrophism differential expression at 7 dpi**

Table of necrotrophism differential expression in insect cadavers at 7 dpi compared to stationary growth phase cells (left column), exponential growth phase cells (mid column) or in bacteria harvested in stationary growth phase compared to exponential growth phase (right column). Necrotrophism genes were retrieved necrotrophism regulon published by Dubois *et al.*, 2016 (11).

Purple indicates low expression ( $\log_2FC \leq -2$ ), blue indicates high expression ( $\log_2FC \text{ value} \geq 2$ ), gray indicates an adjusted p-value  $> 0,01$  or  $-2 > \text{Log}_2FC < 2$

**NECROTROPHISM**

UP (log2FC $\geq$ 2)
DOWN (log2FC $\leq$ -2)
NON-SIGNIFICANT (p-value adj <0,01 OR -2 > Log2FC < 2)

genes	7 dpi vs stat		7 dpi vs expo		Stat vs expo	
	log2FC	p-value adj	log2FC	p-value adj	log2FC	p-value adj
BTB_c11290	-2,29	2,54E-05	4,61	7,01E-18	6,91	1,65E-38
bacC	-1,67	5,57E-03	0,86	1,52E-01	2,54	1,16E-05
BTB_c11310	-1,93	1,27E-04	3,15	1,58E-10	5,08	2,41E-25
BTB_c11290	-2,29	2,54E-05	4,61	7,01E-18	6,91	1,65E-38
BTB_c27490	1,67	8,85E-07	3,12	3,38E-15	1,45	3,96E-04
BTB_c27430	1,50	5,95E-02	8,99	2,91E-18	7,49	5,13E-13
BTB_c22030	7,85	6,53E-130	12,39	3,91E-134	4,54	9,34E-19
BTB_c27420	3,11	4,70E-28	6,73	2,86E-94	3,62	8,56E-28
BTB_c35850	1,48	1,02E-02	5,07	1,88E-14	3,59	7,90E-08
oppB3	-3,19	7,76E-07	0,51	4,61E-01	3,69	4,89E-09
oppC3	-2,89	2,59E-05	0,93	1,90E-01	3,82	1,13E-08
oppD2	-2,49	2,55E-04	1,33	5,08E-02	3,82	6,06E-09
oppF3	-2,33	8,43E-04	1,42	4,07E-02	3,75	2,34E-08
BTB_c25320	-3,96	1,37E-10	4,21	3,47E-09	8,17	1,33E-31
lgrC	-4,53	4,11E-10	4,62	1,51E-09	9,15	6,07E-34
lgrC	-4,53	4,11E-10	4,62	1,51E-09	9,15	6,07E-34
lgrD2	-3,71	1,93E-07	4,53	1,90E-10	8,24	1,25E-31
bacA1	-2,59	3,90E-07	3,20	1,79E-10	5,79	1,85E-31
bacA1	-2,59	3,90E-07	3,20	1,79E-10	5,79	1,85E-31
bacA1	-2,59	3,90E-07	3,20	1,79E-10	5,79	1,85E-31
nprA	0,69	5,66E-01	6,92	1,83E-11	6,23	1,70E-09
BTB_c22270	0,55	5,90E-01	5,42	1,04E-09	4,87	4,55E-08
ina3	-1,23	2,03E-01	7,00	1,65E-15	8,24	6,45E-21
nprB	-2,66	2,36E-03	6,61	4,50E-15	9,28	2,26E-28
BTB_c22040	0,74	3,33E-01	4,63	2,99E-11	3,89	2,84E-08
BTB_c28580	-0,28	5,59E-01	2,29	3,35E-07	2,57	6,19E-09
chiA	1,29	6,56E-02	5,54	1,32E-15	4,24	1,21E-09
BTB_c27890	2,58	3,07E-03	7,64	7,65E-20	5,07	2,18E-09
chiD	2,64	9,45E-03	11,34	7,32E-14	8,70	1,23E-08
gbpA2	1,94	2,44E-14	4,80	3,03E-76	2,86	1,01E-27
BTB_c35970	-4,54	1,85E-38	1,05	5,67E-03	5,59	1,58E-55
asnO2	4,24	2,24E-52	8,45	1,18E-127	4,21	3,15E-32
BTB_c19020	-1,99	3,49E-06	1,78	2,91E-05	3,76	1,90E-19
isp	1,97	3,37E-03	5,33	7,71E-17	3,36	2,07E-07
BTB_c10330	4,32	8,04E-13	9,28	2,04E-37	4,96	1,69E-11
yukJ	1,32	3,88E-02	7,10	2,00E-29	5,78	7,26E-20
BTB_c12940	-1,11	1,98E-02	2,69	6,12E-05	3,80	2,84E-09
BTB_c12950	-1,64	1,60E-07	0,82	2,84E-02	2,46	1,11E-13
BTB_c28890	2,92	7,69E-03	7,29	2,35E-11	4,37	8,51E-05
BTB_c55610	-2,35	4,07E-05	2,19	1,35E-04	4,54	6,18E-16
nprR	-1,59	1,57E-06	4,64	2,48E-46	6,22	1,72E-82
nprX	-0,27	6,21E-01	5,72	3,97E-31	5,99	6,10E-34

### **Table S2.b – Sporulation differential expression at 7 dpi**

Table of sporulation differential expression insect cadavers at 7 dpi compared to stationary growth phase cells (left column), exponential growth phase cells (mid column) or in bacteria harvested in stationary growth phase compared to exponential growth phase (right column). Sporulation gene were retrieved from KEGG and subtiwiki database.

Purple indicates low expression ( $\log_2FC \leq -2$ ), blue indicates high expression ( $\log_2FC \text{ value} \geq 2$ ), gray indicates an adjusted p-value  $> 0,01$  or  $-2 > \text{Log}_2FC < 2$

**SPORULATION**

UP (log2FC ≥ 2)
DOWN (log2FC ≤ -2)
NON-SIGNIFICANT (p-value adj < 0,01 OR -2 > Log2FC < 2)

genes	7 dpi vs stat		7 dpi vs expo		Stat vs expo	
	log2FC	p-value adj	log2FC	p-value adj	log2FC	p-value adj
sspK	12,94	1,83E-80	9,17	6,50E-51	-3,78	9,08E-08
BTB_c36990	11,60	3,29E-32	8,50	1,53E-30	-3,10	4,31E-03
sspl	8,18	1,37E-12	4,01	3,23E-12	-4,17	6,50E-04
BTB_c05200	7,44	9,79E-39	7,41	1,67E-38	-0,03	9,68E-01
BTB_c36960	5,96	2,86E-21	5,54	9,53E-17	-0,42	6,26E-01
BTB_c36880	4,15	3,94E-15	6,56	3,75E-31	2,41	3,65E-05
BTB_c40330	2,19	1,34E-02	5,38	2,17E-09	3,19	5,17E-04
sigE	1,73	5,40E-02	-2,60	2,12E-03	-4,33	2,20E-07
kbaA	1,64	2,21E-10	5,15	1,21E-78	3,51	5,35E-37
whiA	1,39	1,33E-04	1,64	3,70E-06	0,25	5,41E-01
sigK	1,04	1,02E-02	-0,74	5,86E-02	-1,78	2,20E-06
spoIVA	0,50	1,42E-01	1,15	3,06E-04	0,66	4,68E-02
sigF2	0,43	6,81E-01	6,36	4,13E-13	5,93	1,57E-11
sspH1	0,34	6,07E-01	0,26	7,02E-01	-0,08	9,09E-01
spoIID	0,26	6,14E-01	-2,08	5,40E-07	-2,34	8,05E-10
spoIIAB	0,25	8,12E-01	6,09	1,34E-12	5,84	1,14E-11
sspH2	-0,03	9,65E-01	1,67	8,63E-04	1,70	6,46E-04
spoIIAA	-0,13	9,06E-01	5,78	2,45E-11	5,90	9,18E-12
spoVG	-0,33	5,94E-01	2,70	1,88E-07	3,03	5,05E-09
spoOA	-0,90	8,42E-03	1,12	6,75E-04	2,02	4,50E-10
rsbV	5,24	8,03E-24	4,65	9,76E-19	-0,59	3,27E-01
spoIIE	4,19	1,44E-05	4,57	1,38E-06	0,38	7,37E-01
BTB_502p07350	4,17	0,00E+00	4,25	0,00E+00	0,08	0,00E+00
spoIIIC	3,81	8,43E-03	2,81	4,89E-02	-1,00	6,06E-01
cwlC	3,55	2,77E-09	4,09	6,84E-09	0,54	5,28E-01
spoIIIAA	2,97	1,38E-05	2,49	8,35E-04	-0,48	6,18E-01
spoVR	2,93	2,83E-07	0,33	5,59E-01	-2,61	4,66E-06
spoVB	2,49	2,20E-02	0,59	5,59E-01	-1,90	9,17E-02
kinE3	1,90	2,87E-03	3,52	1,25E-08	1,62	1,14E-02
spoIIIF	1,68	7,71E-04	1,20	2,16E-02	-0,48	4,09E-01
spoIIP2	1,53	6,70E-02	1,85	3,56E-02	0,31	7,60E-01
spoVAEB2	1,49	2,82E-01	-0,42	7,52E-01	-1,91	1,37E-01
yIbJ	1,47	9,54E-03	2,60	2,22E-04	1,13	1,33E-01
spoIIIB	1,45	1,09E-01	3,83	6,46E-03	2,38	1,08E-01
paIB	1,36	7,35E-04	3,72	3,11E-13	2,35	5,54E-06
yaaT	1,35	4,58E-03	0,79	9,51E-02	-0,56	2,58E-01
BTB_c45930	1,15	2,37E-01	2,03	2,67E-02	0,88	3,73E-01
spoVAD2	1,15	2,27E-01	-0,27	7,74E-01	-1,42	1,10E-01
spoIIIAH	1,10	2,17E-03	1,27	6,33E-04	0,17	6,99E-01
yabG	1,10	1,26E-02	-0,62	1,42E-01	-1,72	2,47E-05
BTB_c22060	1,08	2,21E-01	7,98	2,11E-21	6,90	2,93E-16
spoIIAD	1,05	3,28E-01	1,05	3,57E-01	0,00	1,00E+00
spoIIIAE	1,04	8,47E-02	1,05	9,35E-02	0,02	9,84E-01
spoVID	0,98	1,69E-01	-1,05	9,56E-02	-2,02	7,80E-04
ytrH	0,89	4,82E-01	0,80	5,43E-01	-0,08	9,58E-01
kinE2	0,88	1,87E-03	4,22	3,87E-53	3,34	1,13E-33
spoIIM	0,75	5,26E-03	1,22	3,43E-06	0,47	8,98E-02
spoIV	0,69	1,21E-01	1,48	8,98E-04	0,79	8,59E-02
spoIIAG	0,61	2,64E-01	0,48	3,85E-01	-0,13	8,32E-01
spoVAB	0,49	7,82E-01	2,12	2,63E-01	1,63	3,95E-01
spoOF	0,41	4,81E-01	0,91	8,24E-02	0,50	3,72E-01
spoOM	0,39	4,52E-01	-1,04	2,29E-02	-1,43	1,61E-03
ytrI	0,37	7,91E-01	1,28	3,46E-01	0,92	5,14E-01
spoVAA	0,29	8,35E-01	-0,02	9,90E-01	-0,31	8,19E-01
spoOJ	0,28	2,39E-01	1,67	2,04E-15	1,39	4,23E-11
ydcC	0,24	4,31E-01	-0,15	6,17E-01	-0,38	1,72E-01
soj	0,20	2,84E-01	1,65	1,77E-22	1,45	1,21E-17
spoVK	0,14	7,61E-01	0,34	4,29E-01	0,20	6,60E-01
spoIIR	0,13	9,11E-01	2,64	6,41E-03	2,51	1,01E-02

spoIVFB	0,11	8,07E-01	-1,18	1,26E-03	-1,28	2,43E-04
spoVAEB1	0,02	9,89E-01	-0,55	6,57E-01	-0,57	6,25E-01
kinB1	-0,15	5,83E-01	0,59	1,60E-02	0,75	2,16E-03
spoVAF	-0,17	6,58E-01	0,23	5,46E-01	0,40	2,59E-01
spoIIP1	-0,20	7,80E-01	2,33	1,07E-04	2,53	2,55E-05
BTB_502p00420	-0,22	0,00E+00	-4,83	0,00E+00	-4,61	0,00E+00
spoVAC2	-0,33	8,85E-01	-3,77	2,27E-02	-3,44	1,43E-02
spoVE	-0,52	2,43E-01	-1,78	8,26E-06	-1,27	1,85E-03
ypeB	-0,56	3,26E-01	-0,34	5,73E-01	0,22	6,96E-01
yunB	-0,59	2,56E-01	-0,39	4,70E-01	0,19	7,08E-01
kinB2	-0,64	3,02E-01	3,29	4,20E-09	3,93	1,78E-12
kinE1	-0,91	3,69E-02	-0,48	2,81E-01	0,44	3,29E-01
spoVAD1	-0,92	2,46E-01	-0,66	4,26E-01	0,27	7,35E-01
BTB_c16660	-0,95	2,78E-01	-3,35	1,02E-05	-2,41	1,54E-04
spoVAC1	-1,03	3,89E-01	0,20	8,88E-01	1,23	2,92E-01
BTB_c45790	-1,04	7,60E-04	-3,84	6,53E-40	-2,80	2,60E-22
spoVT	-1,12	2,67E-05	-0,90	6,04E-04	0,22	4,55E-01
spoVAEA	-1,16	2,84E-01	-0,45	7,08E-01	0,71	4,83E-01
spoVD	-1,20	3,04E-08	-1,87	6,52E-19	-0,67	1,70E-03
kinC1	-1,43	9,29E-11	-3,43	3,69E-59	-2,00	3,93E-28
BTB_502p04060	-1,46	1,92E-03	-2,68	2,21E-09	-1,22	6,59E-03
spoVS	-1,53	8,00E-02	1,12	1,89E-01	2,66	1,31E-03
kinE4	-1,63	1,01E-03	-0,15	7,86E-01	1,49	2,33E-03
kinE5	-1,71	4,03E-06	-1,95	7,84E-08	-0,24	5,61E-01
spoIID	-1,75	7,37E-07	-3,09	1,42E-19	-1,34	6,03E-06
spoIVFA	-1,92	6,46E-05	-2,69	8,88E-09	-0,77	7,55E-02
spoIIQ	-1,94	1,14E-02	1,96	9,85E-03	3,90	1,39E-07
kinD	-2,39	1,80E-11	-3,73	5,73E-27	-1,34	2,91E-05
kinE6	-2,51	4,16E-21	-4,98	2,90E-82	-2,47	1,01E-26
BTB_c13780	-2,79	7,38E-07	0,93	1,14E-01	3,72	2,10E-11
kinC2	-2,87	1,02E-11	-4,73	7,97E-31	-1,86	7,41E-09
BTB_c12000	-5,27	2,34E-11	-2,81	4,02E-04	2,46	1,45E-03
sigF1	-6,66	3,76E-22	-2,20	2,73E-03	4,46	6,20E-16
sasP2	10,63	5,27E-39	7,11	6,85E-24	-3,52	3,76E-05
BTB_c37000	9,86	2,98E-44	7,27	3,31E-28	-2,59	5,86E-04
sasP1	7,01	2,09E-22	2,46	4,40E-04	-4,55	3,07E-10
BTB_c20540	6,89	1,71E-30	4,33	1,29E-14	-2,55	5,35E-05
BTB_c24530	5,13	9,18E-16	5,66	4,58E-15	0,54	5,40E-01
splG	3,63	2,78E-08	2,86	1,79E-05	-0,78	3,28E-01
BTB_c15970	3,08	4,18E-04	2,31	7,21E-03	-0,77	4,16E-01
BTB_c12740	2,95	8,39E-06	-0,14	8,40E-01	-3,09	1,80E-06
BTB_c21000	2,88	4,53E-03	3,33	8,28E-04	0,45	7,00E-01
yheD	2,81	2,61E-07	2,62	9,34E-06	-0,19	8,02E-01
yheC	2,63	1,38E-02	1,16	2,70E-01	-1,47	1,97E-01
BTB_c12710	2,30	1,30E-02	0,84	3,71E-01	-1,46	1,20E-01
BTB_c04050	2,16	7,70E-03	2,32	5,22E-03	0,16	8,80E-01
exsA	2,04	1,84E-04	0,08	8,95E-01	-1,96	2,48E-04
sasP3	1,73	7,94E-04	-0,24	6,62E-01	-1,97	8,56E-05
BTB_c04060	1,68	3,60E-03	1,88	1,61E-03	0,20	7,75E-01
cotE	1,41	1,44E-02	-0,18	7,70E-01	-1,58	4,38E-03
ysxE	0,86	1,71E-02	-0,76	2,58E-02	-1,63	6,94E-07
rsfA1	0,76	5,22E-02	1,22	1,07E-03	0,46	2,49E-01
BTB_c13550	0,42	4,70E-01	2,06	8,75E-05	1,63	2,10E-03
spmB	0,31	6,79E-01	1,34	5,68E-02	1,03	1,46E-01
BTB_c21100	0,30	5,93E-01	1,68	6,09E-03	1,38	2,18E-02
cotH	0,16	6,82E-01	1,80	1,37E-06	1,64	8,74E-06
ytfJ2	0,04	9,65E-01	3,00	4,00E-03	2,96	4,01E-03
spmA	-0,35	6,13E-01	1,17	9,57E-02	1,52	2,30E-02
ytfJ1	-0,68	5,17E-01	0,40	7,41E-01	1,08	2,99E-01
spsK	-0,83	2,89E-03	-0,10	7,52E-01	0,73	7,11E-03
yabQ	-0,84	4,60E-03	-1,20	2,22E-05	-0,37	2,28E-01
yabP	-1,17	2,07E-04	-0,92	3,28E-03	0,25	4,56E-01
spsI	-1,29	1,32E-01	0,74	4,25E-01	2,03	1,62E-02
sleB	-1,76	1,99E-01	-2,84	2,54E-02	-1,08	1,97E-01
rsfA2	-2,71	1,78E-03	1,10	2,11E-01	3,81	5,32E-06
yutH	-2,79	2,05E-16	-1,30	2,67E-04	1,49	2,01E-06

### **Table S2.c – Germination differential expression at 7 dpi**

Table of germination differential expression insect cadavers at 7 dpi compared to stationary growth phase cells (left column), exponential growth phase cells (mid column) or in bacteria harvested in stationary growth phase compared to exponential growth phase (right column). Sporulation gene were retrieved from KEGG and subtiwiki database.

Purple indicates low expression ( $\log_2FC \leq -2$ ), blue indicates high expression ( $\log_2FC \text{ value} \geq 2$ ), gray indicates an adjusted p-value  $> 0,01$  or  $-2 > \text{Log}_2FC < 2$

**GERMINATION**

UP (log2FC≥2)
DOWN (log2FC≤2)
NON-SIGNIFICANT (p-value adj <0,01 OR -2 > Log2FC < 2)

genes	7 dpi vs stat		7 dpi vs expo		Stat vs expo	
	log2FC	p-value adj	log2FC	p-value adj	log2FC	p-value adj
BTB_c35830	4,34	2,47E-15	4,63	5,95E-15	0,29	6,95E-01
BTB_c35820	4,31	1,68E-29	4,76	2,22E-29	0,45	3,62E-01
yaaH	4,03	6,45E-11	1,75	1,82E-03	-2,28	4,87E-04
gerPF2	2,83	1,27E-03	5,58	2,92E-07	2,75	1,58E-02
gerE	2,54	1,58E-05	3,32	1,23E-08	0,78	2,18E-01
BTB_c35840	2,53	9,27E-11	2,99	1,52E-13	0,46	3,11E-01
gerM	1,56	5,30E-03	0,27	6,41E-01	-1,29	2,14E-02
gerHC	1,06	8,92E-03	0,74	7,64E-02	-0,32	4,87E-01
gerIA2	1,02	3,89E-01	1,80	1,57E-01	0,78	5,72E-01
gerPF1	1,01	1,74E-02	2,89	1,04E-09	1,87	9,45E-05
BTB_c08530	0,97	2,78E-01	0,11	9,02E-01	-0,85	3,33E-01
BTB_c08520	0,92	3,68E-01	0,58	5,78E-01	-0,34	7,63E-01
BTB_c32290	0,78	2,38E-01	0,62	3,74E-01	-0,16	8,40E-01
BTB_c32270	0,77	2,38E-02	0,75	3,48E-02	-0,02	9,62E-01
gerPD	0,74	2,65E-01	2,63	2,64E-04	1,89	9,79E-03
cwlD	0,71	1,06E-01	-1,06	7,73E-03	-1,76	2,91E-06
yndE2	0,70	6,86E-03	0,87	1,28E-03	0,17	5,67E-01
gerIA3	0,66	2,05E-01	0,52	3,43E-01	-0,14	8,10E-01
gerD	0,55	3,36E-01	2,59	1,55E-05	2,04	7,11E-04
gerIA1	0,52	4,90E-01	-0,44	5,37E-01	-0,96	1,49E-01
gerSB	0,51	4,66E-01	1,73	1,16E-02	1,22	7,98E-02
BTB_c32260	0,48	1,40E-01	0,73	2,29E-02	0,25	4,65E-01
gerKA3	0,29	6,99E-01	1,39	4,67E-02	1,10	1,21E-01
gerSC2	0,10	9,04E-01	2,12	2,06E-02	2,02	2,36E-02
gerPE	0,08	8,73E-01	2,62	2,10E-08	2,54	3,99E-08
gerPC	-0,06	8,61E-01	1,92	2,52E-10	1,97	2,12E-11
BTB_c08510	-0,09	8,86E-01	-1,22	2,42E-02	-1,13	3,14E-02
gerHB	-0,17	8,45E-01	0,12	8,90E-01	0,29	7,32E-01
gerSC1	-0,19	8,12E-01	2,50	2,07E-02	2,69	9,94E-03
gerKA2	-0,19	7,85E-01	0,42	5,50E-01	0,61	3,53E-01
gpr	-0,22	6,18E-01	0,02	9,71E-01	0,23	5,80E-01
BTB_c06480	-0,36	6,23E-01	-0,65	3,54E-01	-0,28	6,77E-01
gerKC	-0,57	1,62E-01	-0,67	1,01E-01	-0,10	8,08E-01
BTB_c07800	-0,69	4,34E-01	0,10	9,10E-01	0,79	3,49E-01
gerKA1	-0,70	2,76E-01	0,15	8,37E-01	0,85	1,72E-01
yndE1	-0,81	6,35E-02	0,78	1,24E-01	1,59	4,14E-04
BTB_c49600	-0,82	4,27E-02	2,04	3,46E-06	2,85	1,61E-11
yndF2	-1,09	3,96E-03	0,95	4,71E-02	2,04	9,59E-07
gerPA	-1,57	5,73E-03	0,16	8,22E-01	1,73	1,97E-03
gerLB	-2,18	3,29E-04	-0,60	4,02E-01	1,57	3,15E-03
yndF1	-2,72	2,00E-03	-2,27	1,02E-02	0,45	5,81E-01
ykvl	3,79	2,07E-05	6,36	4,64E-06	2,57	1,02E-01
spoVAF	-0,17	6,58E-01	0,23	5,46E-01	0,40	2,59E-01
ypeB	-0,56	3,26E-01	-0,34	5,73E-01	0,22	6,96E-01
sleB	-1,76	1,99E-01	-2,84	2,54E-02	-1,08	1,97E-01
yndD	-2,03	3,50E-04	-0,12	8,69E-01	1,92	4,39E-04

## 4 APPROCHE SCIENTIFIQUE DU SUJET D'ÉTUDE ET DEMARCHES EXPERIMENTALES

---

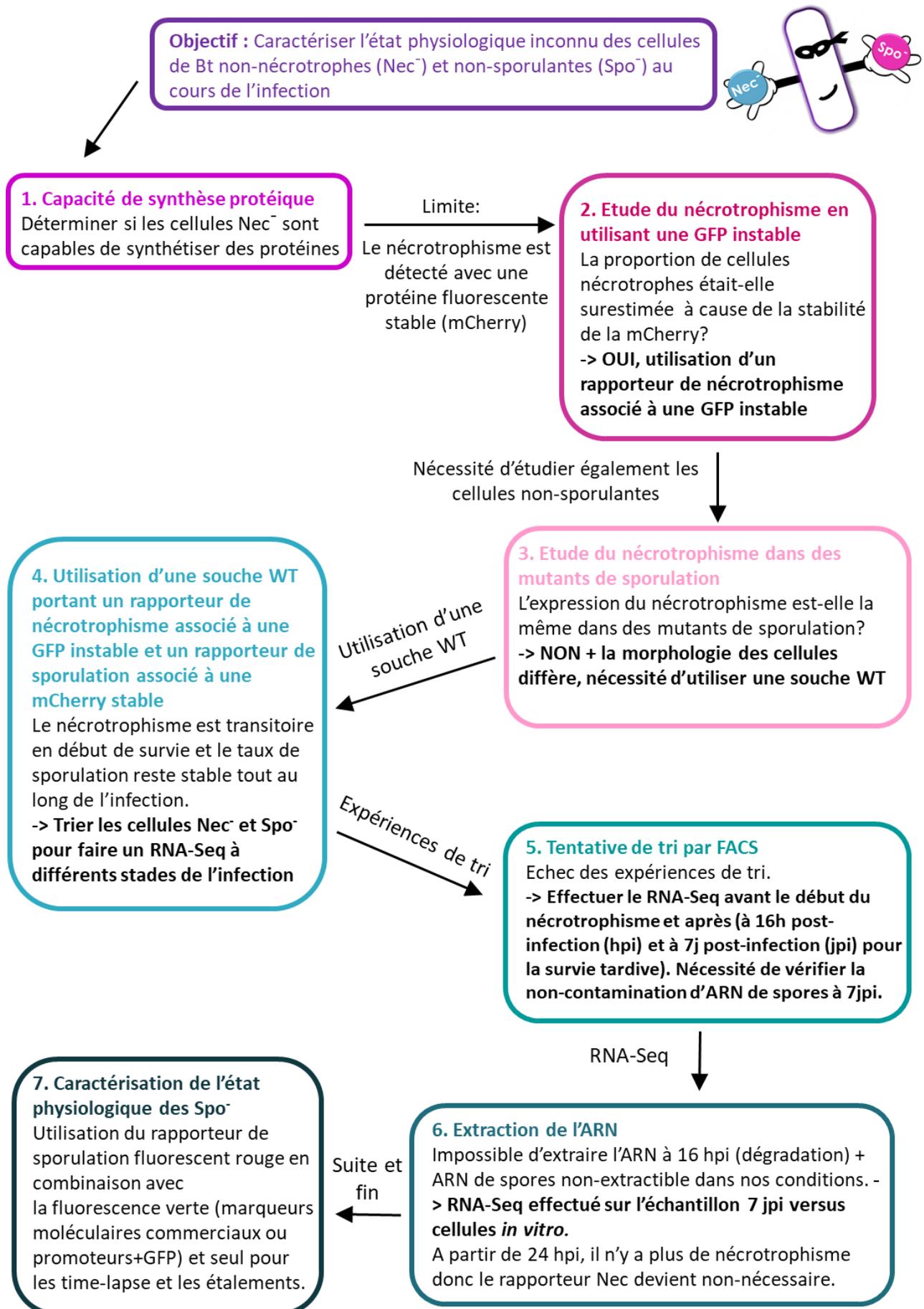
La recherche scientifique est faite de réorientations et de réajustements perpétuels selon les progressions effectuées dans la démarche expérimentale, les obstacles rencontrés et les conclusions qui en sont tirées.

Communément appliquée en sciences, la démarche hypothético-déductive théorisée par Roger Bacon en 1267 (Bacon, 1267), stipule que des observations nous conduisent à formuler des hypothèses, à recueillir des données, puis à tester les résultats obtenus pour réfuter ou appuyer ces hypothèses. Cette démarche se résume dans le modèle simplifié OHERIC (Observation, Hypothèse, Expérience, Résultats, Interprétation, Conclusion) présenté par André Giordan en 1976.

Durant cette thèse, cette démarche a été suivie dans la mesure où les travaux de Dubois, de Verplaetse ainsi que de Ben Rejeb et leurs collaborateurs ont conduit à l'observation qu'il existe des cellules non-sporulantes dans le cadavre de l'insecte au cours de l'infection (Dubois *et al.*, 2016 ; Verplaetse *et al.*, 2015 ; Ben Rejeb *et al.*, 2017). L'hypothèse formulée est que ces cellules sont dans un état physiologique particulier leur permettant de survivre sans sporuler. Ensuite, une démarche expérimentale a été mise en place pour déterminer si, effectivement, les cellules sont dans un état physiologique particulier. Les résultats obtenus nous conduisent à valider cette hypothèse.

Néanmoins, la mise en place de la démarche expérimentale a été techniquement complexe. Comme l'avait critiqué l'historien Mirko Grmek, le format de présentation de la recherche est reconstruit pour être proche du schéma OHERIC, gommant ainsi des errances, des pistes abandonnées et des bifurcations brusques (Grmek, 1973). Ce chapitre propose donc de retracer les démarches expérimentales qui ont conduit à l'article scientifique soumis, incluant ainsi les expériences connexes qui ont jalonné le cheminement scientifique de ce projet de thèse.

## 4.1 Cheminement de l'approche scientifique du sujet d'étude – Figure 18.



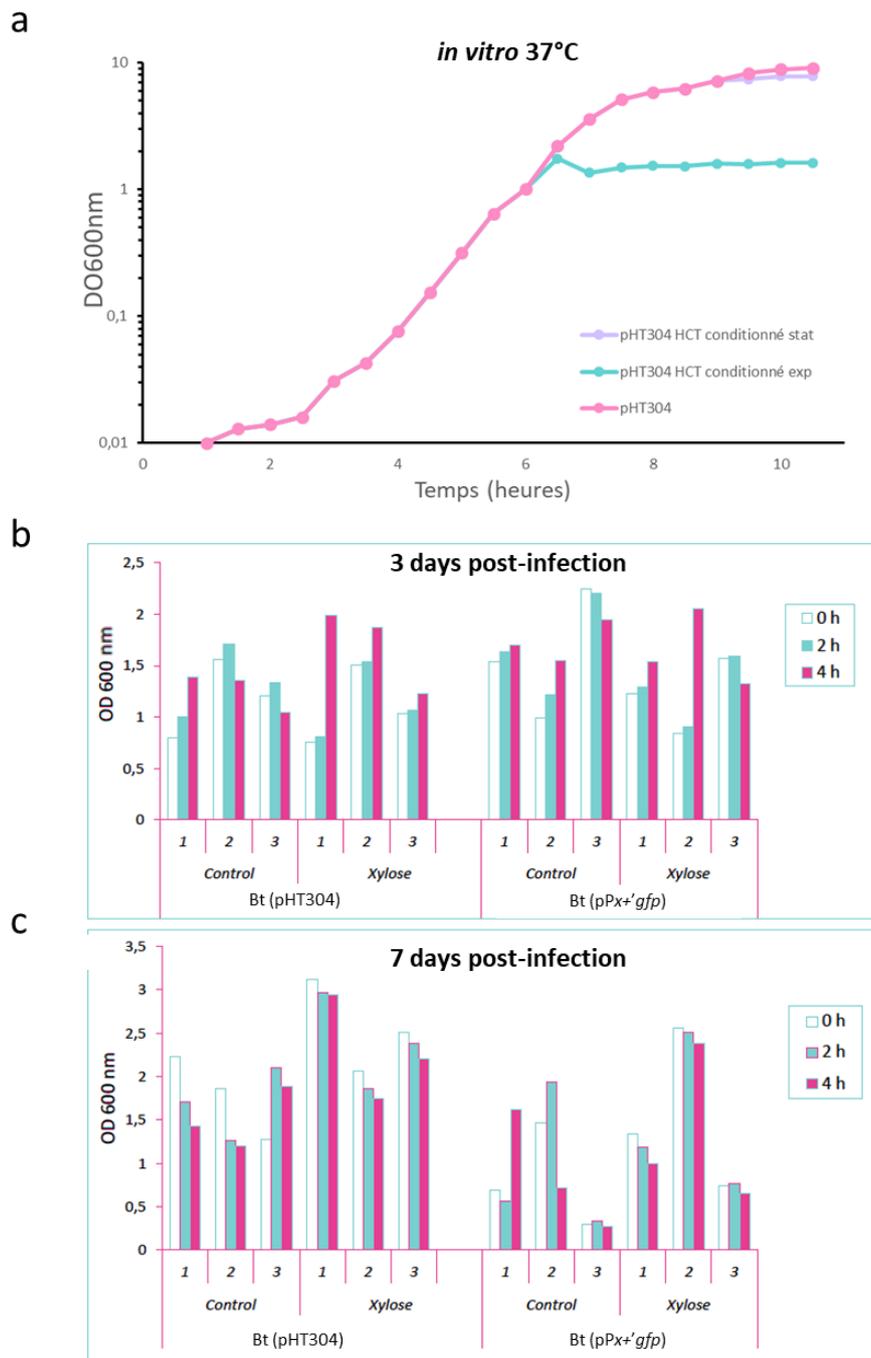
## 4.2 Démarches expérimentales réalisées

Ce sous-chapitre reprend les différents points de l'organigramme précédent et détaille les expériences réalisées pour chaque partie.

### 1. Capacité de synthèse protéique

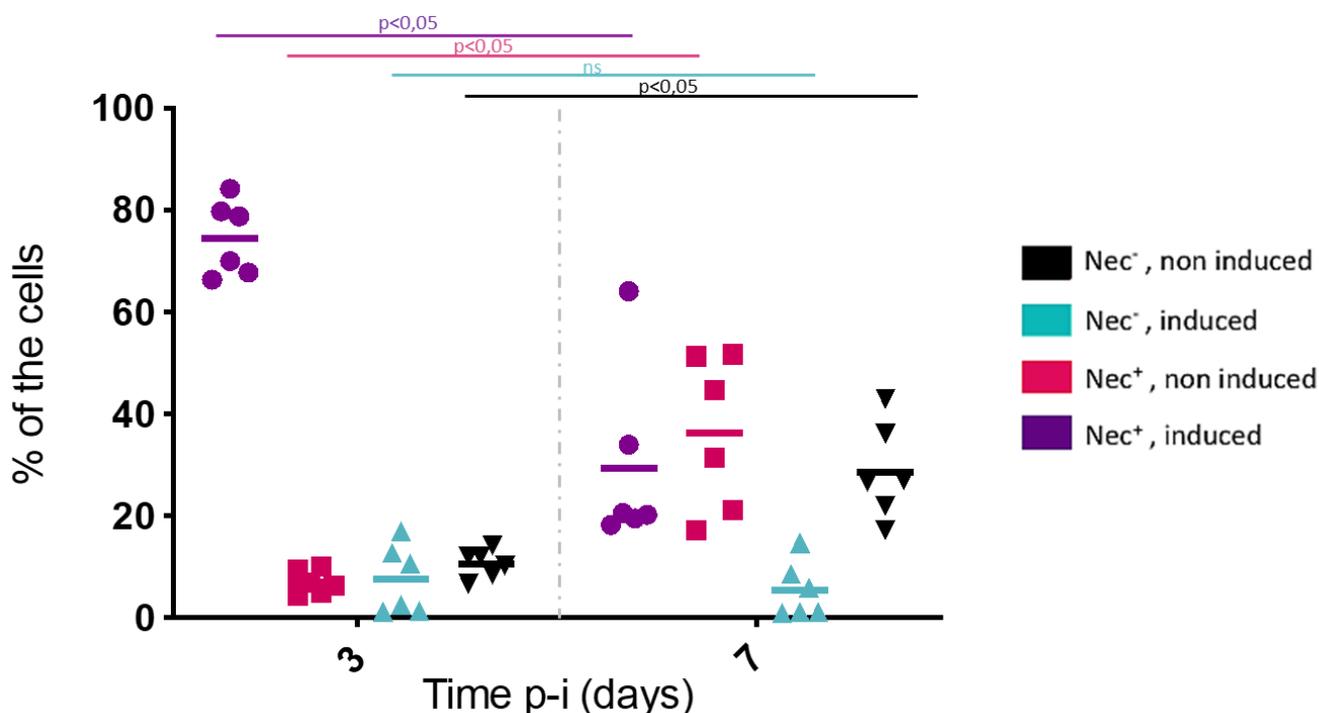
La première expérience de caractérisation de l'état physiologique des cellules non-nécrotrophes et non-sporulantes, consistait à déterminer si les cellules Nec<sup>-</sup> sont capables de synthétiser des protéines. Une souche portant les 2 fusions suivantes a été construite : un rapporteur de nécrotrophisme associé à la mCherry en combinaison avec un promoteur inductible au xylose associé à la GFP. Au cours de cette expérience, les cellules extraites de l'insecte sont incubées dans un milieu adapté et supplémenté en xylose afin d'observer leur capacité de synthèse protéique. La première problématique était donc de trouver un milieu d'incubation qui maintienne les cellules extraites de l'insecte viables tout en les empêchant de croître. L'eau physiologique et le TAE s'avérant inadaptés suite à des tests préliminaires, le HCT conditionné a été mis au point et testé (composition détaillée dans le matériel et méthodes) (figure 19).

La figure 19 représente l'effet de l'incubation des bactéries cultivées *in vitro* en HCT conditionné (figure 19 a.). La densité optique reste stable au cours de l'incubation dans le HCT conditionné et des observations microscopiques démontrent que les cellules ne sont pas lysées. Le HCT conditionné+xylose est également adapté pour des cellules extraites de l'insecte à différents temps post-infection (3 et 7 jours, (figure 19 b. et c.)). Les variations observées dépendent de la larve analysée, mais globalement la densité optique reste assez stable, ce qui valide l'utilisation du HCT conditionné.



**Figure 19. Effet de l'incubation de *Bacillus thuringiensis* en HCT conditionné** - **a.** Suivi de culture de Bt407 WT (pHT304) en HCT ou HCT conditionné à 37°C. Toutes les demi-heures la densité optique de la culture est mesurée. La courbe rose représente la croissance de la culture en HCT à 37°C. La courbe verte représente les cellules à DO=1 (phase exponentielle notée exp) lavées et réinoculées en HCT conditionné. La courbe violette représente des cellules à DO=6 (phase stationnaire notée stat) lavées et réinoculées en HCT conditionné. **b.** Densité optique des cellules extraites des cadavres de Gm à 3 jpi. **c.** à 7 jpi. Les résultats sont présentés pour 3 larves, 1,2,3. La densité optique des cellules est mesurée sans xylose (« control », avant ajout de xylose) et avec xylose (« xylose », après ajout de xylose), à 0 h d'incubation (blanc), après 2 h d'incubation (bleu, condition 2 h) et après 4 h d'incubation (rose, condition 4 h), à 37°C.

Par la suite la fusion  $pPxyl+'gfp_{bte}$  a été couplée avec la fusion  $PnprA'mCherry$  pour déterminer si les cellules non-nécrotrophes synthétisent la GFP (figure 20).



**Figure 20. Activité des promoteurs  $Pxyl+$  et  $PnprA$  des cellules isolées des cadavres d'insectes -**

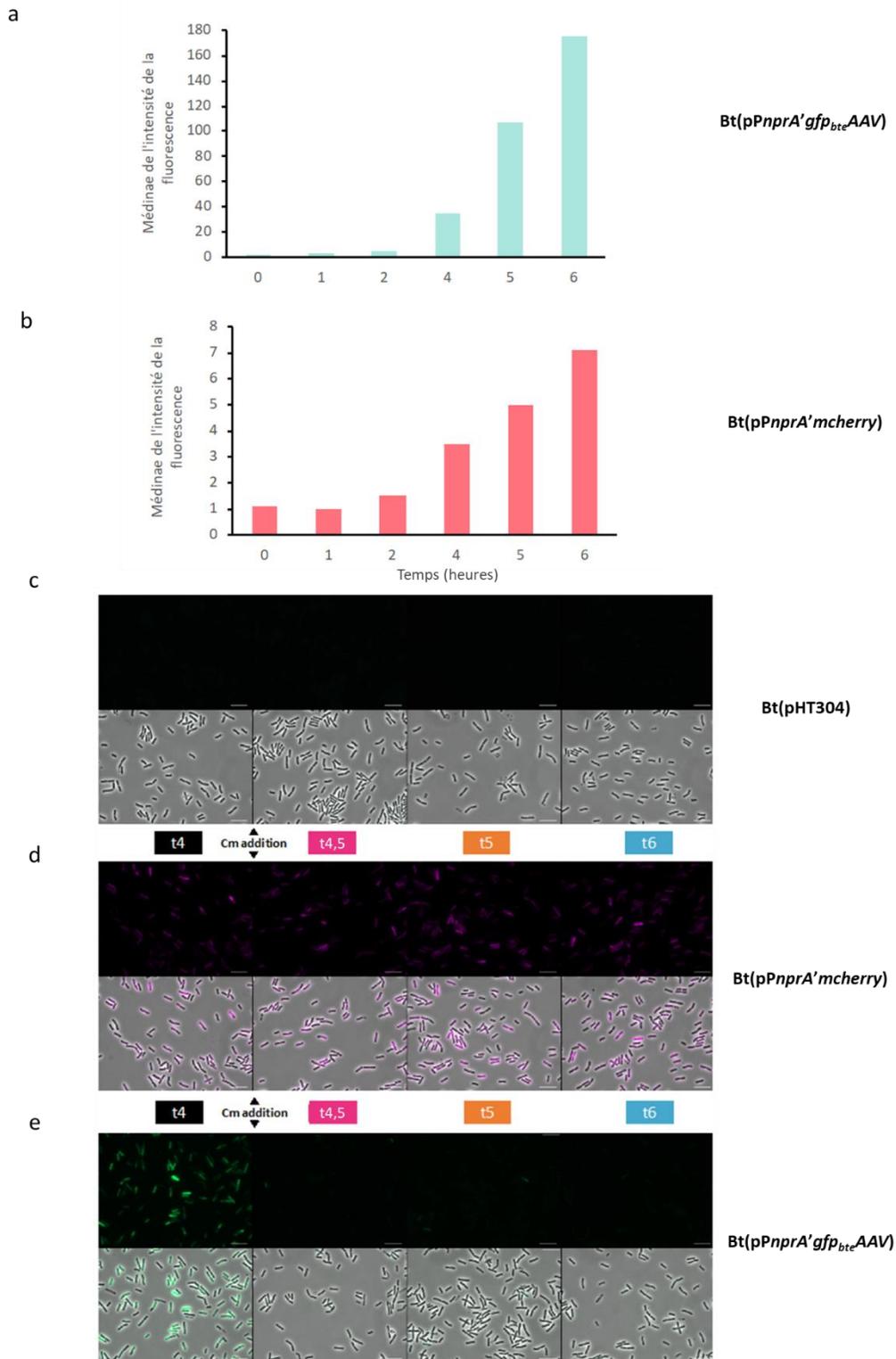
Analyse par cytométrie en flux de Bt407 ( $pPxyl+'gfp_{bte}-PnprA'mCherry$ ) après extraction des cellules des cadavres de Gm. Les cellules sont collectées à 3 et 7 jpi par injection intra-hémocoelique et incubées dans du HCT conditionné + xylose 25mM à 37°C pendant 2 h. Le pourcentage de chaque catégorie de cellules est représenté en fonction du temps post-infection. Chaque phénotype est associé à une couleur : non-induit et non-nécrotrophe (noir) ; non-nécrotrophe et induit (vert) ; nécrotrophe et non-induit (rose) ; nécrotrophe et induit (violet). Chaque symbole représente les bactéries extraites d'une larve (3 larves par point-temps, 6 au total, la barre centrale étant la moyenne des 6 points). Les barres horizontales au-dessus du graphique représentent la significativité des résultats après un test de Kruskal-Wallis suivi d'un test post-hoc de Dunn.

Cette expérience démontre qu'à 3 jpi, la majorité des cellules est nécrotrophe et capable de synthétiser la GFP (Nec<sup>+</sup>, induced). A 7 jpi, la proportion de cellules qui ne synthétisent pas la GFP augmente, notamment parmi les cellules nécrotrophes. De ce constat, l'hypothèse formulée est que la proportion de ces cellules comptabilisées comme nécrotrophes, soient dans l'état physiologique indéterminé (non-nécrotrophes). Sachant que la mCherry présente une grande stabilité (demi-vie de plus de 50 h), les cellules fluoresçant dans le rouge peuvent être déterminées comme

nécrotrophes à cause de cette stabilité de la mCherry et non de l'activité du promoteur de nécrotrophisme.

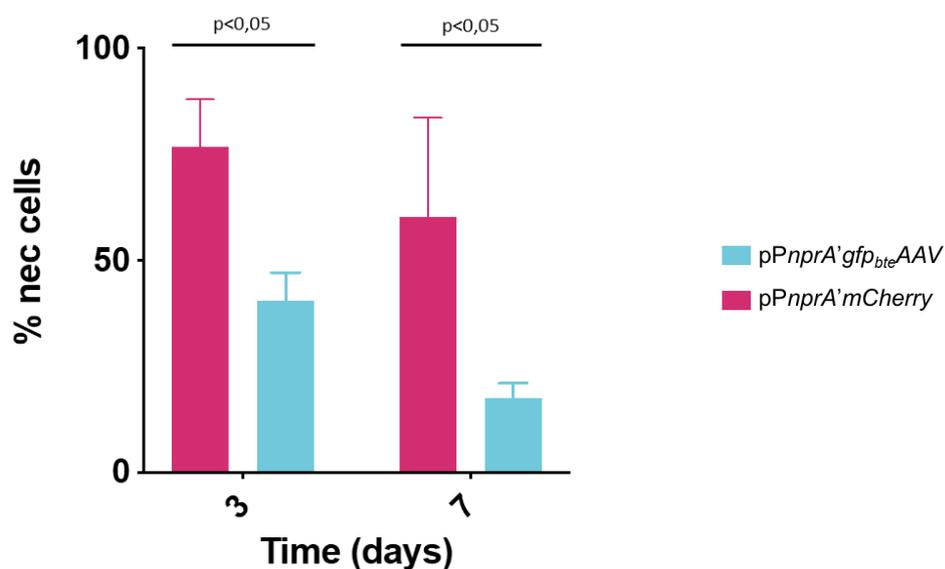
## 2. Etude du nécrotrophisme avec une GFP instable

Le nécrotrophisme ayant été possiblement surestimé à cause de la stabilité de la mCherry, une souche portant un promoteur de nécrotrophisme (*PnprA*) couplé à une GFP instable a été construite : p*PnprA'**gfp<sub>bte</sub>AAV*. L'activité du promoteur de nécrotrophisme a été comparé *in vitro* entre deux souches : l'une portant *PnprA* couplé à la *gfp<sub>bte</sub>AAV* instable et l'autre portant *PnprA* couplé la *mCherry* stable (figure 21). Le but de cette analyse est de déterminer l'absence de biais lié au fluorophore, de confirmer la cinétique de l'activité du promoteur et l'effectivité de la GFP instable. La figure 29 présente l'activité du promoteur *PnprA* selon le fluorophore, en LB à 37°C. La cinétique d'activité de *PnprA* est comparable pour les deux souches, bien que l'intensité de fluorescence soit plus forte pour la GFP (figure 21 a. et b.). L'ajout de chloramphénicol (antibiotique bactériostatique) empêche la synthèse de GFP et la fluorescence verte n'est plus détectée, ce qui confirme bien l'instabilité du variant *gfp<sub>bte</sub>AAV* (figure 21 c., d., e.).



**Figure 21. Activité de *PnprA'gfp<sub>bte</sub>AAV* et de *PnprA'mCherry* in vitro à 37°C** - Analyse par cytométrie en flux de Bt407 (*pPnprA'gfp<sub>Bte</sub>AAV*) (bleu, **a.**) et de Bt407 (*pPnprA'mCherry*) (rose, **b.**) après fixation des cellules en LB à 37°C. La médiane de l'intensité de fluorescence de 20 000 cellules est représentée en fonction du temps après l'entrée en phase stationnaire de croissance (0 h) ; Analyse par microscopie à fluorescence de Bt407(*pHT304*) (**c.**) ; de Bt407 (*pPnprA'mCherry*) (**d.**) et de Bt407 (*pPnprA'gfp<sub>Bte</sub>AAV*) (**e.**) cultivées en LB à 37°C, avant et après ajout de chloramphénicol (Cm addition) 4 h suivant l'entrée en phase stationnaire (t4). Les panels du haut représentent les photos obtenues par épifluorescence, ceux du bas les photos obtenues par épifluorescence+contraste de phase. La barre blanche représente l'échelle de 10 micromètres.

L'ensemble de ces vérifications ont permis l'utilisation de la fusion *PnprA'gfpbteAAV* au cours de l'infection pour vérifier si la proportion de cellules nécrotrophes a été précédemment surestimée à cause de la stabilité de la mCherry (figure 22).



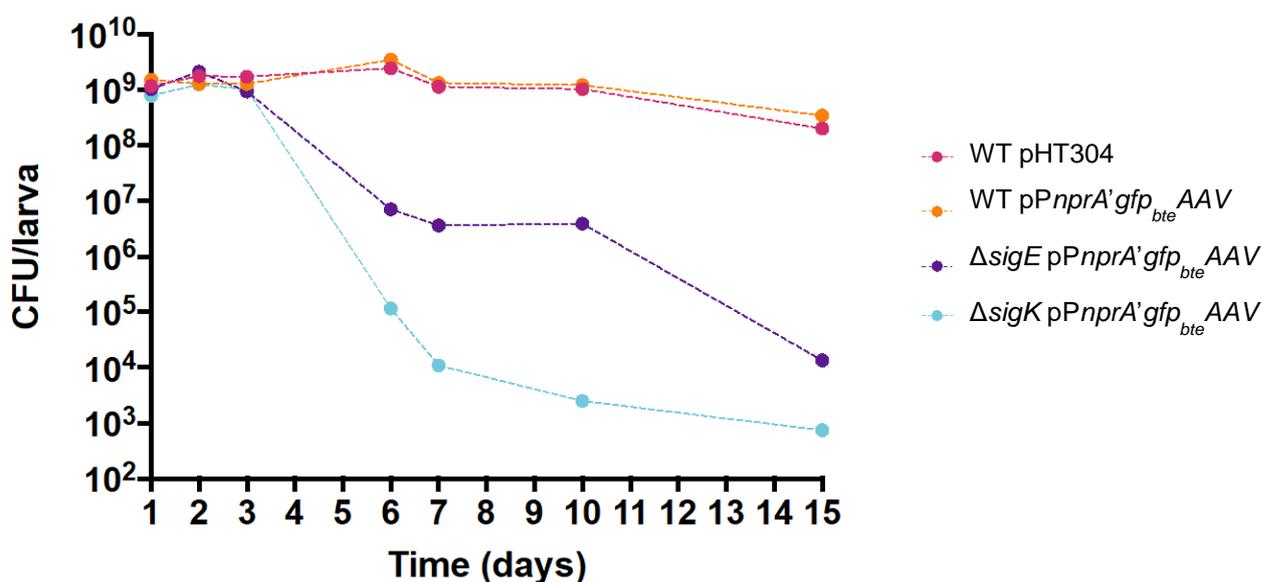
**Figure 22. Activité du promoteur *PnprA'gfp<sub>bte</sub>AAV* et *PnprA'mCherry* des cellules isolées des cadavres d'insectes** - Analyse par cytométrie en flux de Bt407 (*pPnprA'gfp<sub>Bte</sub>AAV*) (bleu) et Bt407 (*pPnprA'mCherry*) (rose) après extraction des cellules des cadavres de Gm. Les cellules sont collectées à 3 et 7 jpi par injection intra-hémocoelique. Le pourcentage de cellules nécrotrophes est représenté en fonction du temps post-infection. Les bactéries sont extraites de 3 larves par répétition et par point-temps, soit 6 larves au total. Les barres horizontales représentent la significativité des résultats après un test de Kruskal-Wallis suivi d'un test post-hoc de Dunn.

D'après la figure 22, nous constatons que le pourcentage de cellules nécrotrophes est plus faible lorsque le promoteur de nécrotrophisme est couplé à une GFP instable à différents temps post-infection. Ceci confirme donc que la population nécrotrophe était surestimée à cause de la forte stabilité de la mCherry. Une fois cette constatation effectuée et la discrimination des cellules non-nécrotrophes affinée, il a fallu trouver un moyen d'étudier les cellules non-sporulantes.

### 3. Etude du nécrotrophisme dans des mutants de sporulation

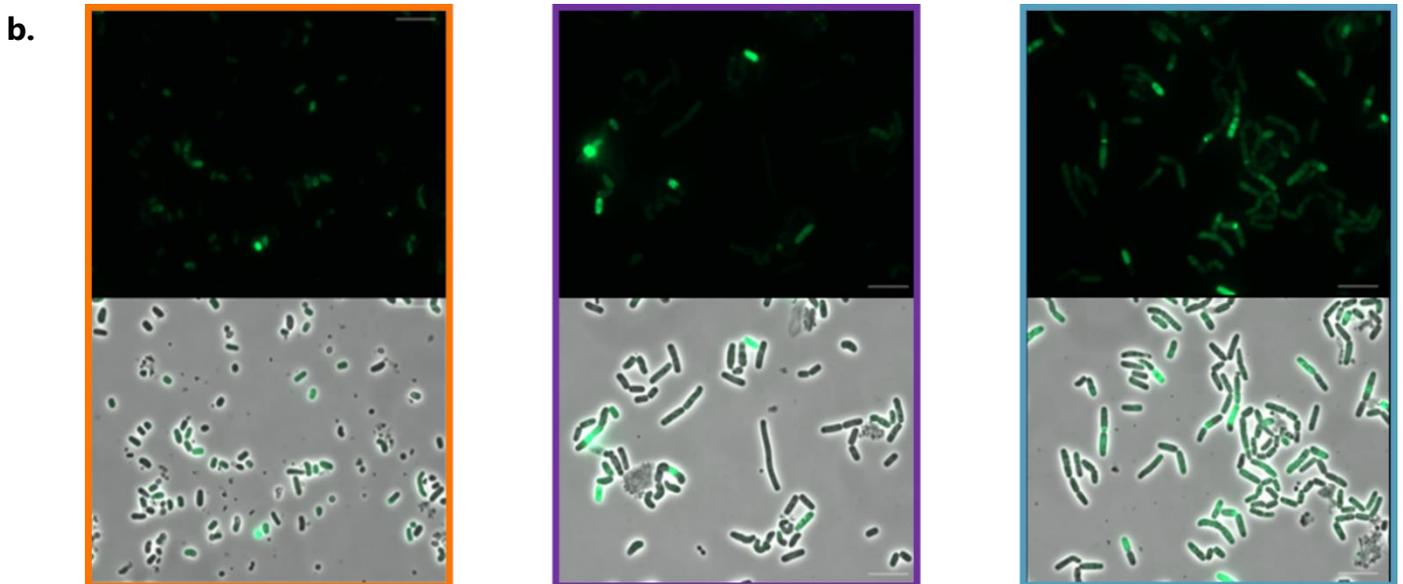
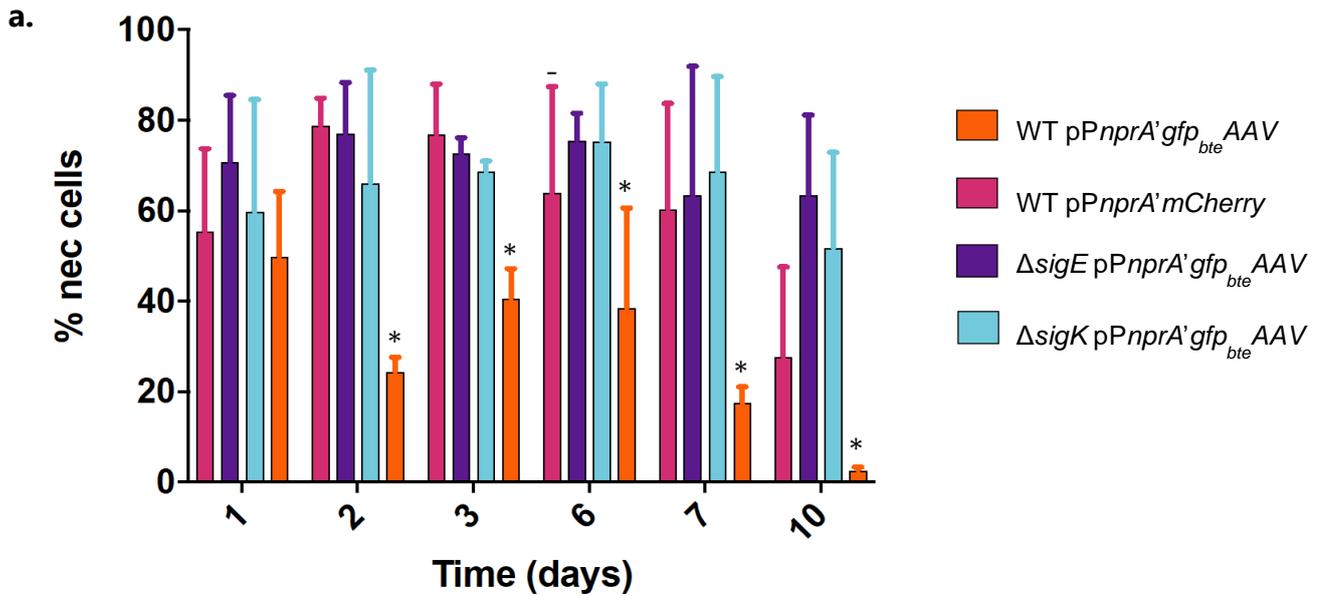
Le but de l'étude étant de caractériser l'état physiologique des cellules non-

nécrotrophes mais également non-sporulantes, il a été question d'utiliser des mutants de sporulation afin de ne travailler qu'avec la population d'intérêt et d'alléger les contraintes techniques. Des mutants impliqués à différentes étapes de la cascade de sporulation ont été testés,  $\Delta sigE$  impliqué précocement et  $\Delta sigK$  impliqué plus tardivement. Ces mutants ont été transformés avec  $pPnprA'gfp_{bte}AAV$  pour comparer l'expression du nécrotrophisme entre la souche sauvage et les mutants. La première étape fut d'évaluer la survie de ces mutants au cours de l'infection dans nos conditions (figure 23).



**Figure 23. Survie dans le cadavre d'insecte des souches WT, Bt  $\Delta sigK$ , Bt  $\Delta sigE$**  – Nombre de UFC/larve après broyage et étalement des cadavres de Gm pour la souche Bt407 WT (pHT304) (rose); Bt407 WT (pPnprA'gfp<sub>Bte</sub>AAV) (orange); Bt407  $\Delta sigE$  (pPnprA'gfp<sub>Bte</sub>AAV) (violet); Bt407  $\Delta sigK$  (pPnprA'gfp<sub>Bte</sub>AAV) (bleu) en fonction du temps post-infection.

Les mutants de sporulation survivent jusqu'à 15 jours dans le cadavre de l'insecte, cependant il ne reste que 1000 à 10000 UFC par larve. Néanmoins, à 7 jpi, le mutant  $\Delta sigE$  ne présente que 2 logs de UFC/larve en moins que la WT. La survie étant toutefois amoindrie, il convenait d'étudier plus en détails les cellules des souches mutantes en terme de nécrotrophisme et de morphologie (figure 24).



**Figure 24. Expression du nécrotrophisme des souches WT, ΔsigK, ΔsigE et observations microscopiques** – **a.** Analyse par cytométrie en flux de Bt407 WT (pNprA'gfp<sub>Bte</sub>AAV) (orange); Bt407 WT (pNprA'mCherry) (rose); Bt407 ΔsigE (pNprA'gfp<sub>Bte</sub>AAV) (violet); Bt407 ΔsigK (pNprA'gfp<sub>Bte</sub>AAV) (bleu) après extraction des cellules des cadavres de Gm. Les cellules sont collectées jusqu'à 10 jpi par injection intra-hémocoelique. Le pourcentage de cellules nécrotrophes est représenté en fonction du temps post-infection. Les bactéries sont extraites de 3 larves par répétition et par point-temps, soit 6 larves au total. \* : p<0.05 ; - : ns (Test de Kruskal-Wallis suivi d'un test post-hoc de Dunn). **b.** Observations au microscope à fluorescence de Bt407 WT (pNprA'gfp<sub>Bte</sub>AAV) (orange); Bt407 ΔsigE (pNprA'gfp<sub>Bte</sub>AAV) (violet); Bt407 ΔsigK (pNprA'gfp<sub>Bte</sub>AAV) (bleu) à 6 jpi. Les images du haut sont les photos obtenues par épifluorescence, les photos du bas celles obtenues par épifluorescence+contraste de phase. La barre blanche représente l'échelle de 10 micromètres.

La [figure 24](#) démontre que le profil de nécrotrophisme des mutants de sporulation diffère de la souche sauvage, les mutants ont une population majoritairement nécrotrophe tout au long de l'infection. De plus, pour les souches mutantes, la morphologie des cellules est aberrante et beaucoup de cellules ont une intégrité cellulaire compromise. Le contexte génétique est différent d'une souche sauvage et les phénotypes varient, une souche sauvage a donc été utilisée pour la suite de l'étude.

#### **4. Utilisation d'une souche WT portant un rapporteur de nécrotrophisme associé à une GFP instable et un rapporteur de sporulation associé à une mCherry stable**

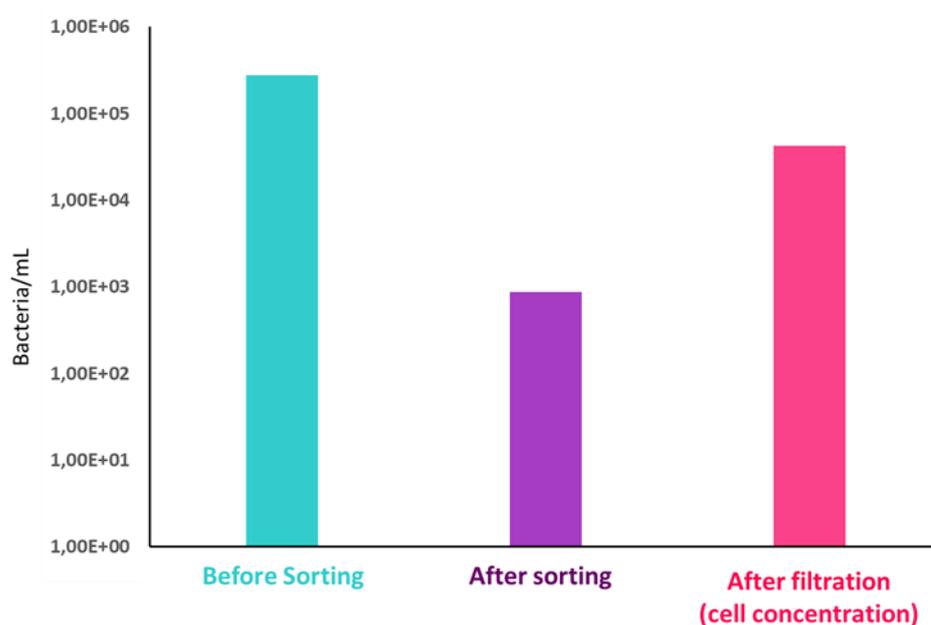
La souche WT suivante a été construite : *pPnprA'gfp<sub>Bte</sub>AAV-PspolIQ'mCherry*. Elle porte donc un rapporteur de nécrotrophisme associé à une GFP instable ainsi qu'un rapporteur de sporulation associé à une mCherry stable. Cette souche permet de discriminer la sous-population d'intérêt : les cellules non-nécrotrophes et non-sporulantes (soit les cellules non-fluorescentes). Cette souche a été utilisée dans l'article, elle a permis de déterminer que le nécrotrophisme est transitoire au début de la survie dans le cadavre de l'insecte. Elle a également permis d'observer que le taux de sporulation est stable jusqu'à 14 jpi.

La stratégie initiale était de trier les cellules non-nécrotrophes et non-sporulantes à différents temps post-infection pour en extraire l'ARN et réaliser un RNA-Seq, le but étant de caractériser la réponse adaptative des bactéries au cours de la survie dans le cadavre de l'insecte.

#### **5. Tentative de tri par FACS**

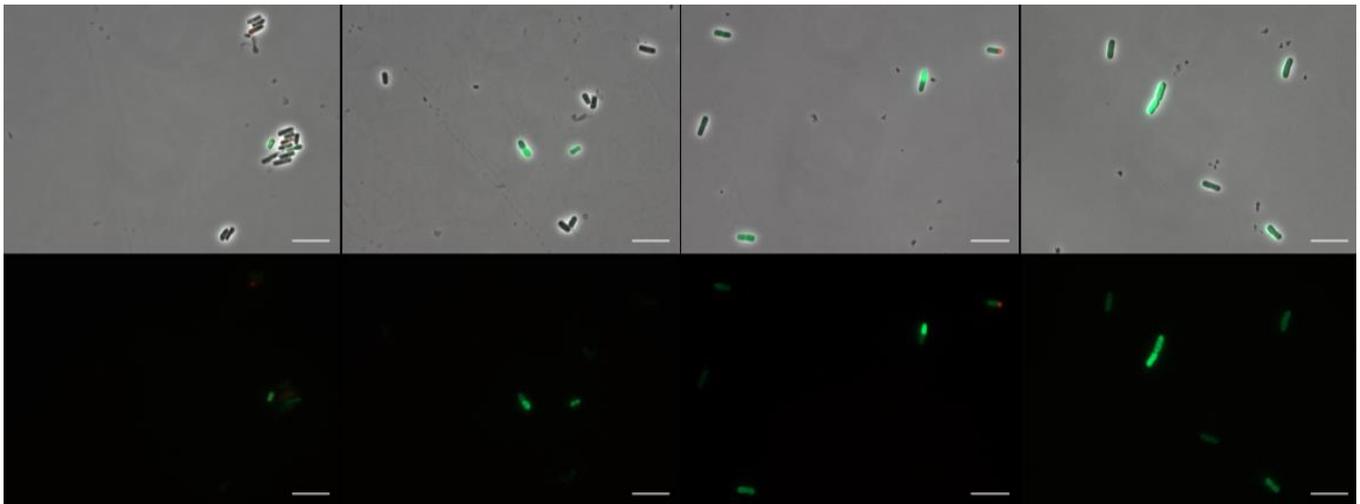
L'acronyme FACS, pour Fluorescence Activated Cell Sorting en anglais, est une technique de tri cellulaire induit par fluorescence. Selon la fluorescence des cellules, l'appareil est capable d'isoler et de récolter une sous-population d'intérêt. Cette machine a été utilisée pour tenter de trier les cellules non-fluorescentes (non-nécrotrophes et non-sporulantes). Pour garder les cellules dans le même état

physiologique après extraction de Bt du cadavre d'insecte, différentes techniques de fixation ont été testées. Le RNA-later, une solution de stabilisation et de préservation de l'ARN en attendant l'extraction, réduit l'intensité de fluorescence des cellules. La fixation au formaldéhyde 4% ou au zinc (Christensen *et al.*, 2011) ont alors été retenues. La compatibilité d'une extraction d'ARN de bonne qualité avec ces techniques de fixation a également été testée et les résultats avec le formaldéhyde ont été les plus concluants. Les premières tentatives de tri ont donc été effectuées sur des cellules fixées au formaldéhyde avec le trieur disponible au laboratoire (figure 25).



**Figure 25. Rendement après tri cellulaire d'une population extraite de l'insecte** - Après extraction des cellules à 7 jpi et fixation au formaldéhyde 4%, les bactéries non-fluorescentes ont été comptées avant tri cellulaire (bleu), après tri cellulaire (violet) et après filtration sur membrane (0,22µm) pour concentrer l'échantillon (rose). Après filtration les cellules ont été comptées dans 2 mL d'eau physiologique.

D'après la figure 25, nous observons que la procédure de tri entraîne la dilution de l'échantillon (violet) et la perte de cellules (de l'ordre de 1 log, rose). Le trieur à disposition n'était donc pas adapté, dans la mesure où il n'était pas capable de concentrer l'échantillon. En effet, les volumes de sortie étaient trop conséquents : 300mL pour récolter 10<sup>5</sup> cellules alors que le minimum pour réaliser un RNA-Seq est de 10<sup>6</sup> cellules. Cette limite technique nous a dirigés vers un autre trieur qui s'est avéré également peu efficace (figure 25).



**Figure 26. Observations au microscope après tri supposé de la sous-population Nec<sup>-</sup> Spo<sup>-</sup> à 18 hpi**

- Observations au microscope à fluorescence de Bt407 WT (p*PnprA'**gfp*<sub>Bte</sub>*AAV-PspollQ'**mCherry*) à 18 hpi, après tri de la sous-population Nec<sup>-</sup>Spo<sup>-</sup>. Les panels du haut représentent les photos obtenues par épifluorescence, ceux du bas les photos obtenues par épifluorescence+contraste de phase. La barre blanche représente l'échelle de 10 micromètres.

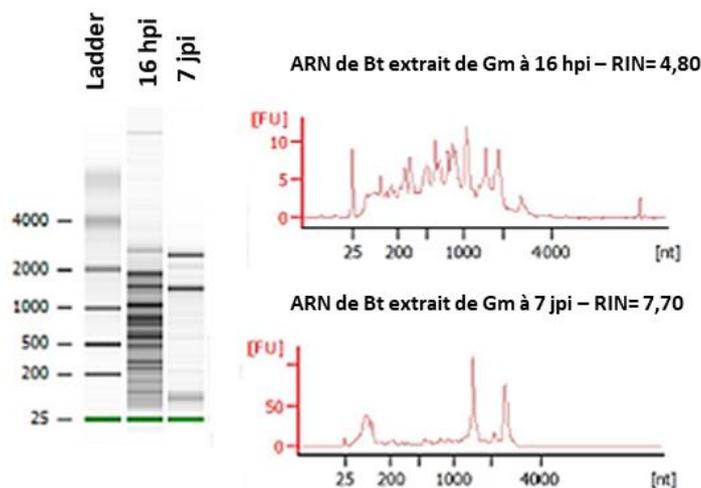
Les images de la figure 26 nous démontrent que la pureté de l'échantillon trié n'est pas bonne. Nous devons isoler la sous-population non-nécrotrophe et non-sporulante, censée être non fluorescente. Cependant nous observons des cellules fluorescentes dans notre échantillon, de plus, certaines cellules semblent abîmées.

Au vu du temps restant pour le projet et de l'échec expérimental de la procédure de tri, nous avons procédé au RNA-Seq sans trier les cellules au préalable. De ce fait, la fixation au formaldéhyde n'était plus nécessaire. Nous avons utilisé du RNA-later et adapté les conditions choisies. Nous avons donc décidé de sélectionner le tout début de l'infection avant l'expression du nécrotrophisme (à 16 hpi) et le stade avancé de l'infection, une fois que le nécrotrophisme n'est plus exprimé (à 7 jpi). Ce choix a dû être validé en testant que notre protocole ne permettait pas l'extraction de l'ARN des spores. Nous avons également choisi des cellules *in vitro*, en phase exponentielle de croissance et en phase stationnaire pour comparer l'expression différentielle des gènes et déterminer si ces cellules ont un transcriptome proche des cellules de l'une de ces phases de croissance.

## 6. Extraction de l'ARN

Les expériences d'extraction de l'ARN étaient assez complexes. Il fallait extraire les cellules de Bt des larves, filtrer les échantillons pour les nettoyer des débris de l'insecte, en prélever un aliquot, vérifier leurs profils en terme de nécrotrophisme et de sporulation au cytomètre pour confirmer l'homogénéité des échantillons, incuber le reste du broyat dans du RNA-later puis procéder à l'extraction de l'ARN. (Le tout en surestimant le nombre d'échantillons, au cas où il y aurait les profils de nécrotrophisme et de sporulation hétérogènes ou qu'il y aurait un problème pendant l'extraction d'ARN).

L'extraction de l'ARN des échantillons à 16 hpi a été tentée à de très nombreuses reprises mais elle a donné toujours le même résultat : une dégradation de l'ARN non-observée pour les échantillons à 7 jpi (figure 27). Les échantillons devant être comparables, la condition 16 hpi a dû être exclue car la valeur de RIN (RNA Integrity Number) de ces échantillons n'a jamais approché la valeur acceptable de 7. L'hypothèse explicative est la dégradation des ARN de Bt par des composés présents dans les larves, encore actifs aux temps précoces de l'infection.



**Figure 27. Exemple d'analyse qualité d'un échantillon d'ARN de *Bacillus thuringiensis* extrait des cadavres d'insectes à 16 hpi vs à 7 jpi** - Le profil bioanalyser ci-joint nous permet de constater la dégradation de l'ARN de Bt extrait du cadavre de l'insecte à 16 hpi. Le profil du 7 jpi présente les 2 pics fins caractéristiques de l'ARNr 16S et 23S, tandis que celui du 16 hpi présente un profil typique de dégradation.

A partir de cette étape, nous avons eu une approche davantage focalisée sur les cellules extraites des cadavres à 7 jpi. Le jour 7 post-infection a été sélectionné car il correspond à un stade tardif de l'infection pour lequel le cadavre reste intègre et en bon état, sans signe de déshydratation. Il permet également d'optimiser le temps de l'expérimentation en limitant la collecte des échantillons à 7 jours et non au-delà. L'ajout d'une condition culture *in vitro* à 7 jours en LB à 30°C, en plus de la culture de cellules en phase exponentielle et stationnaire de croissance est impossible. Cela se justifie car les cellules sont pour la plupart sous-forme de spores et parmi les non-sporulantes beaucoup sont endommagées.

### **7. Caractérisation de l'état physiologique des Spo<sup>-</sup>**

La suite de l'étude s'est donc faite en comparant l'état physiologique des cellules Spo<sup>-</sup> à 7 jpi versus l'état physiologique des cellules en phase stationnaire et en phase exponentielle de croissance. Pour certaines expériences nous avons aussi inclus les cellules à 1 jpi et à 3 jpi pour suivre l'évolution de l'activité métabolique, constatant que le nécrotrophisme diminuait drastiquement dans la plupart des larves après 24h. Nous nous sommes donc affranchis de l'utilisation du rapporteur de nécrotrophisme et les expériences ont été conduites en utilisant la souche fluoresçant dans le rouge Bt407 WT (pPspollQ'*mCherry*). Cette souche a ainsi permis l'utilisation de marqueurs commerciaux fluorescents verts et l'utilisation de promoteurs d'intérêt associés à la GFP. Cette configuration permet donc de quantifier la fluorescence verte, des cellules négatives pour la fluorescence rouge (les cellules non-sporulantes, Spo<sup>-</sup>).

## 5 DISCUSSION ET PERSPECTIVES

---

Ces travaux ont permis d'étudier l'état physiologique de Bt à des stades tardifs de l'infection. Ils ont permis la caractérisation de certains traits des cellules non-sporulantes persistant dans le cadavre de l'insecte et ont démontré l'adaptation de ces bactéries à l'environnement méconnu du cadavre de Gm.

### 5.1 Bt dans l'environnement particulier du cadavre de l'insecte

Gm est communément utilisée comme une alternative aux modèles mammifères pour étudier la virulence bactérienne et la colonisation de l'hôte (Tsai *et al.*, 2016). L'environnement des insectes est complexe et réactif : dès les premiers stades de l'infection, les bactéries font face aux réponses immunitaires innées cellulaires et humorales de leur hôte (Nielsen-Leroux *et al.*, 2012). Dans l'hémocœle, les bactéries sont exposées à des protéines ou des peptides antimicrobiens, tels que le lysozyme, la gallerimycine ou la gloverine, pendant au moins 48 hpi (Dubovskiy *et al.*, 2016 ; Sheehan *et al.*, 2019). La réponse immunitaire de Gm induit aussi la production de mélanine. Cette réaction peut durer plusieurs jours et génère la libération d'ERO, ce qui expose Bt à un stress oxydatif (Nakhleh *et al.*, 2017 ; Cerenius *et al.*, 2008 ; Nappi *et al.*, 2009). L'ensemble de ces molécules constituent un environnement défavorable pour les bactéries. Elles parviennent néanmoins à surmonter ces stress et se maintiennent dans le cadavre de l'insecte, sous forme de spores ou non, jusqu'à plus de 30 jpi (observations personnelles). Cette forte capacité de persistance serait peut-être mieux comprise si l'environnement de Bt « cadavre d'insecte » était mieux caractérisé. Des études portant sur la stabilité dans le temps des molécules antimicrobiennes produites par Gm seraient intéressantes. Elles permettraient de déterminer si la nature de l'environnement de Bt continue d'être réactive, une fois les réponses immunitaires vaincues.

Une fois que Bt a résisté aux défenses immunitaires de Gm, les nutriments

disponibles dans le cadavre de l'hôte sont utilisés via un mode de vie nécrotrophe (Dubois *et al.* 2016 ; Verplaetse *et al.*, 2015). Lors de cette étude, nous avons démontré que le nécrotrophisme est un état transitoire lors des premiers stades de la survie dans le cadavre de l'insecte qui permet à la bactérie de s'y maintenir à des stades précoces. Ensuite les bactéries s'engagent ou non en sporulation. Rappelons que 30 à 55% de la population de Bt sporule dans le cadavre de l'insecte. La sporulation étant un mode de survie activé en réponse à un stress incluant les carences nutritives, nous pouvons émettre l'hypothèse que le cadavre de l'insecte ne constitue pas un environnement des plus favorables pour Bt. Comme indiqué précédemment, il reste à caractériser cet environnement.

Durant cette thèse, la mise au point d'un milieu insecte a été réalisée en utilisant le surnageant du broyat des cadavres d'insectes. Bien que ce milieu s'éloigne de la nature d'un cadavre d'insecte en terme d'humidité, d'oxygénation, de structures, il s'est avéré être un milieu peu favorable à une croissance rapide, dans la mesure où les bactéries mettent 4 fois plus de temps à pousser que sur un milieu riche de type LB. Par ailleurs, ce milieu s'est avéré mieux adapté pour les cellules extraites de l'insecte à des stades tardifs de l'infection. La composition de ce milieu étant inconnue, au même titre que celle du cadavre des insectes, des analyses par spectrométrie de masse, si réalisables techniquement, pourraient apporter des connaissances intéressantes et permettre de mieux comprendre la réponse génétique et l'adaptation de l'état physiologique des bactéries à ce milieu.

## **5.2 Caractéristiques de l'état physiologique spécifique de Bt après passage dans l'insecte**

Comme évoqué dans le paragraphe ci-dessus, nous avons montré que les cellules à 3 et 7 jpi étaient mieux adaptées au milieu insecte car nous comptons le même nombre d'UFC/mL sur LB et sur milieu insecte. Cependant, ce nombre diminue drastiquement pour les cellules cultivées *in vitro*, indiquant qu'il s'agit d'un milieu défavorable pour ces bactéries. Cette expérience démontre l'adaptation des cellules

extraites du cadavre de l'insecte à un milieu proche duquel elles sont issues. De plus, une analyse de microscopie time-lapse en « milieu insecte » non montrée, révèle que les spores issues de l'insecte ne germent pas en 4 h d'expérience tandis qu'elles germent dans les mêmes conditions sur LB, confirmant que ce milieu n'est pas aussi favorable que le LB. Cependant, à plus long terme qu'une expérience time-lapse, les dénombrements en milieu LB et milieu « insecte » sont similaires pour les cellules à 3 et 7 jpi, indiquant que les spores issues des cadavres insectes ont été capables de germer. Si la germination des spores n'avait pas eu lieu, 30% à 55% de cellules en moins auraient été comptées (taux moyen de sporulation à 3 et 7 jpi). A contrario, les spores préparées *in vitro* n'ont pas germé en milieu insecte. Cette observation indique que des spores préparées *in vitro* ou dans le cadavre de l'insecte n'ont pas les mêmes propriétés de germination sur un même milieu. Il a déjà été montré que les propriétés de germination variaient selon les paramètres physico-chimiques de sporulation, l'âge des spores, l'état de leur ARN et des molécules présentes dans les cellules végétatives puis dans la spore (Broussolle *et al.*, 2008 ; Gounina-Allouane *et al.*, 2008 ; Segev *et al.*, 2011 ; Mutlu *et al.*, 2018 ; Bressuire-Isoard *et al.*, 2018). Il est possible que les spores germent dans le cadavre de l'insecte, si des agents de germination deviennent accessibles ou encore si les cellules germent de façon spontanée (Van Vliet, 2015). Les lysats bactériens peuvent servir de nutriments comme déjà évoqué auparavant et donc être des agents de germination. L'utilisation de marqueurs moléculaires commerciaux et des observations microscopiques réalisées au cours de la thèse, indiquent qu'une partie de la population meurt dans les cadavres d'insectes. Il serait intéressant de déterminer si cette mortalité est due aux antimicrobiens présents dans le cadavre de l'insecte comme précédemment évoqué, au manque de nutriments dans les cadavres d'insectes ou autre (conditions physico-chimiques peu favorables). Outre le fait de servir d'agents de germination, les cellules mortes peuvent éventuellement fournir des nutriments aux cellules non-sporulantes et favoriser leur survie. Plusieurs études ont rapporté que dans un environnement limité en nutriments, la lyse des cellules bactériennes peut favoriser la croissance des bactéries vivantes voisines (Takano *et al.*,

2017 ; Schink *et al.*, 2019, Smakman et Hall., 2022 ; Gray *et al.*, 2019). De plus, chez Bs, les bactéries qui se sont engagées dans la sporulation libèrent des facteurs de destruction pour lyser les cellules non-sporulantes comme déjà abordé en introduction (Gonzalez-Pastor, 2003). Pour tester si la lyse bactérienne supporte la survie des cellules non-sporulantes du cadavre de l'insecte il serait possible d'extraire les cellules de l'insecte et de les incuber dans du milieu insecte liquide avec ou sans lysats bactériens (issus de cellules extraites du cadavre d'insecte par exemple), puis de mesurer la croissance bactérienne.

Dans cette étude, nous avons également montré que plus de 40% de la population est capable de synthétiser la GFP, ce qui est en accord avec la capacité des cellules de Bs à synthétiser des protéines après 14 jours de carences nutritives (Gray *et al.*, 2019). Cependant, la capacité des cellules Spo<sup>-</sup> à synthétiser des protéines lors de l'induction au xylose est réduite par rapport aux cellules *in vitro* ou aux premiers stades de survie, ce qui indique un éventuel ralentissement métabolique. Nous pouvons émettre l'hypothèse que les cellules à 7 jpi sont moins adaptées au changement de milieu, car cette expérience a été réalisée dans du HCT conditionné. Les cellules extraites de l'insecte sont peut-être plus sensibles à ce passage dans un milieu épuisé de ses nutriments, sachant qu'elles sont éventuellement carencées dans le cadavre de l'insecte. Elles ont peut-être mis en place un phénomène d'hibernation des ribosomes, un mécanisme qui permet de cesser la coûteuse synthèse protéique lors de signaux de stress (Wang *et al.*, 2020 ; Zegarra *et al.*, 2022). L'hypothèse selon laquelle le changement de milieu est un stress difficile à surmonter pour des cellules déjà stressées est également soutenue par une croissance des cellules à 7 jpi plus lente après réinoculation en milieu LB par rapport aux cellules *in vitro* et aux cellules à 1 jpi.

Néanmoins, les cellules extraites tardivement de l'insecte, sont mieux adaptées au milieu insecte. Ce milieu ne cause peut-être pas le stress subi par un changement drastique de milieu, bien que ce milieu ne soit pas exactement le même qu'un cadavre d'insecte. Il est également possible que ces cellules développent une mémoire

phénotypique, leur conférant un avantage dans ce milieu, via la reconnaissance de signaux similaires rencontrés dans le cadavre de l'insecte. La mémoire phénotypique est un mécanisme qui confère un avantage adaptatif aux bactéries lorsqu'elles sont capables de reproduire un phénotype lié à certaines conditions déjà rencontrées, sans modifications de leur génome. Ceci est notamment possible quand les bactéries acquièrent des composants cellulaires qui laissent des « marques » de leur passé. Par exemple, chez *E. coli* l'opéron *lac* a la capacité de transmettre des informations métaboliques à plusieurs générations lors de changements de sources de carbone glucose/lactose grâce à la transmission des protéines Lac, en particulier LacZ et dans une moindre mesure LacY (Lambert et Kussell., 2014). La mémoire phénotypique a déjà été décrite dans la littérature à plusieurs reprises (Mutlu *et al.*, 2018 ; Tagkopoulos *et al.*, 2008 ; Mitchell *et al.*, 2009 ; Kamp *et al.*, 2013 ; Lambert et Kussell, 2014 ; Kordes *et al.*, 2019). Par exemple, il a été précédemment rapporté que les cellules de *Vibrio cholerae* passées par l'hôte présentaient un avantage de survie dans un étang par rapport aux cellules en phase de croissance exponentielle et stationnaire (Kamp *et al.*, 2013). La mémoire phénotypique a également été démontrée dans le contexte de l'adaptation bactérienne avec l'exemple de *Pseudomonas aeruginosa* qui adopte un phénotype de virulence après plusieurs passages dans Gm sans présenter de variations génétiques. Cette mémoire serait induite par les acide gras polyinsaturés retrouvés dans le corps de Gm et entraînerait une reprogrammation transcriptionnelle marquée par l'expression de facteurs de virulence et de gènes impliqués dans la motilité (Kordes *et al.*, 2019).

### **5.3 Profil transcriptomique de Bt lors de la survie à long terme dans le cadavre de son hôte et pistes pour la compréhension des mécanismes de survie**

Pour essayer de comprendre ce qui favorise l'adaptation et la survie à long terme de Bt dans le cadavre de Gm, nous avons effectué une analyse par RNA-Seq sur les cellules à 7 jpi en les comparant aux cellules en phase exponentielle et en phase

stationnaire. Le profil transcriptomique des échantillons à 7 jpi se démarque de celui des autres cellules, indiquant que ces bactéries ne sont ni en phase exponentielle ni en phase stationnaire. L'analyse de la transcription des gènes de sporulation et de germination suggère une légère contamination par de l'ARN issu des spores mais indique que les cellules analysées ne sont pas sporulantes et que la germination reste un phénomène limité. Les analyses confirment également que bien qu'un nécrotrophisme résiduel est détecté, il n'explique pas la survie à long-terme de Bt dans le cadavre de l'insecte.

Tous les gènes de motilité sont régulés négativement, ce qui suggère une potentielle conformation en biofilms dans les cadavres d'insectes. De plus, les locus *calY*, *tasA* et *eps2*, connus comme des facteurs de biofilm, sont surexprimés dans les cellules à 7 jpi par rapport aux cellules en phase de croissance exponentielle (Candela *et al.*, 2019 ; Caro-Astorga *et al.*, 2020). Il a été montré que les bactéries agrégées empêchent la phagocytose par les macrophages de l'hôte, ce qui indique l'avantage de la formation de biofilms pendant l'infection (Galdiero *et al.*, 1988 ; Ochiai *et al.*, 1993). Récemment, une étude a rapporté que les cellules de Bt exposées à de l'hémolymphe formaient davantage d'agrégats en culture liquide et qu'un peptide présentant une homologie avec la flagelline était moins produit par une analyse protéomique (Sun *et al.*, 2021). Comme les bactéries auto-agrégées sont moins sensibles aux antimicrobiens et au stress oxydatif généré par les cellules immunitaires de l'hôte (Caceres *et al.*, 2014), l'auto-agrégation peut donc conférer un avantage pour la survie précoce lorsque le système immunitaire de l'hôte est actif et favoriser la survie à long-terme en protégeant du stress oxydatif.

Dans cette étude, nous avons montré que parmi les gènes les plus exprimés, les catégories les plus représentées sont la réponse au stress oxydatif, l'homéostasie du fer, la recombinaison de l'ADN, la réplication et la réparation. Au cours de l'infection de Gm par Bc, l'importance de l'homéostasie du fer a été rapportée, les gènes de l'homéostasie du fer étant particulièrement exprimés. L'hypothèse émise est que le fer

aide à la colonisation de l'hôte et que les bactéries vont essayer d'acquérir au maximum le peu de fer disponible en initiant une forte expression génétique des gènes de l'homéostasie du fer, contrôlés par le régulateur Fur (Consentino *et al.*, 2021). Chez Bs, il a également été montré que la limitation en fer active l'expression de systèmes de captation du fer, ainsi que la biosynthèse de la bacillibactine (Pi et Helmann, 2017 ; Miethke *et al.* 2006). Effectivement, dans nos résultats, les gènes contrôlés par Fur, dont l'opéron de la bacillibactine sont exprimés et ce à tous les stades de l'infection.

Plusieurs études ont établi un lien entre l'homéostasie du fer et la réparation de l'ADN pour surmonter le stress oxydatif et ont montré l'expression de gènes impliqués dans ces processus lors de l'exposition au H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Fu *et al.*, 2017 ; Wu *et al.*, 2022). Récemment, une étude a rapporté que du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> était produit dans l'hémolymphe de Gm pendant une infection par *Salmonella* (Bismuth *et al.*, 2021). La quantification de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans les cadavres d'insectes à 7 jpi peut éventuellement permettre d'expliquer l'expression des gènes de réponse au stress oxydatif. Le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> réagit avec le fer non incorporé (Henle *et al.*, 1999) et produit des radicaux hydroxyles qui oxydent les bases et le ribose de l'ADN, entraînant des lésions multiples. Dps, une protéine de la classe des ferritines, supprime la quantité de dommages à l'ADN en séquestrant le fer non incorporé (Grant *et al.*, 1998, réf Altuvia *et al.*, 1994). *dps2* est exprimé à 7 jpi d'après l'expérience de RNA-Seq. Par ailleurs, la superoxyde dismutase peut également protéger les cellules en détruisant les radicaux d'anions superoxydes générés lors de la décomposition de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Touati *et al.*, 1995). Ceci peut expliquer pourquoi *sodA1* et les gènes de réparation de l'ADN sont plus exprimés à 7 jpi. La catalase de Bt, *katE1*, est un homologue de Bs *katE*, un paralogue de *katA*. KatE est une protéine générale de stress, impliqué dans la dégradation du peroxyde d'hydrogène (UniProt). Il a été démontré que la production de la protéine KatE de Bs par *Lactococcus lactis* conférait une augmentation de la survie lors de l'exposition au peroxyde d'hydrogène d'un facteur 800 (Rochat *et al.*, 2005). De manière similaire, il a été rapporté que la survie de *Bifidobacterium longum* est augmentée d'un facteur 100 et que l'accumulation de novo

de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est diminuée après la production de KatE (He *et al.*, 2012). Il pourrait être intéressant de tester si KatE1 a un rôle dans la survie de Bt au cours de l'infection.

*BTB\_c10430* s'est également avéré être spécifique de la survie tardive dans les cadavres Gm. Le produit de *BTB\_c10430* est SigX selon la base de données des séquences de référence NCBI, cependant *sigX* est méconnu chez Bt et Bc. Selon la base de données Subtiwiki, le gène *sigX* de Bs est un facteur sigma de type ECF, requis pour la résistance aux peptides antimicrobiens cationiques et pour la résistance temporaire aux phages. Comme les Gm produisent des défensines qui sont des peptides de défense cationiques (Tsai *et al.*, 2015), il serait intéressant de déterminer si ces peptides sont présents dans les cadavres d'insectes à 7 jpi et s'ils déclenchent l'expression de *BTB\_c10430*. Les facteurs sigma de type ECF maintiennent l'homéostasie de l'enveloppe cellulaire et activent les gènes de résistance aux agents pouvant compromettre l'intégrité de l'enveloppe, qui constitue la première défense contre les menaces environnementales (Helman, 2016). Par ailleurs *sigX* a été démontré comme impliqué dans la survie à long terme chez les cellules non-sporulantes carencées en nutriments, dans la mesure où un mutant  $\Delta sigX$  présente une survie diminuée à 14 jours de carences nutritives (Gray *et al.*, 2019).

L'ensemble des éléments rassemblés au cours de cette thèse ouvrent la voie à l'étude des mécanismes spécifiquement impliqués dans la survie à long terme de Bt dans le cadavre de Gm. A titre de perspectives et de conclusion de ce chapitre, les expériences que j'aurais mis en place pour compléter cette étude vont être décrites dans les prochains paragraphes.

Premièrement, la construction de mutants des cibles identifiés lors du RNA-Seq paraît un moyen pertinent de mettre en évidence un mécanisme moléculaire directement impliqué dans la survie à long terme. Cependant, cette survie peut s'avérer multifactorielle. Néanmoins, un mutant de délétion de *BTB\_c10430* est à tester, ainsi que des mutants empêchant la détoxification de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> comme des mutants de

délétion de *katE1* ou *sodA1*. En lien avec cet aspect, il serait intéressant de prendre contact avec la plateforme de spectrométrie de masse, pour déterminer s'il est possible d'analyser la composition du surnageant de broyat de cadavre d'insecte. Si des défensines ou des peptides antimicrobiens spécifiques de Gm sont retrouvés, cela apporterait des éléments de réponses pour justifier l'expression des gènes identifiés (réponse au stress oxydatif par exemple).

Dans un second temps, l'analyse du statut physiologique des cellules extraites de l'insecte serait poussée pour déterminer si les cellules sont par exemple capables de se diviser dans le cadavre de l'insecte. A la manière de Gray et collaborateurs, l'utilisation d'un promoteur témoignant de la division bactérienne couplée à une protéine fluorescente apporterait des réponses quant à la division des cellules dans le cadavre de l'insecte. Nous avons voulu utiliser le rapporteur de croissance TIMER<sup>bac</sup> utilisé par Claudi et collaborateurs en 2014 pour étudier la croissance bactérienne (Claudi *et al.*, 2014) mais le clonage n'a pas fonctionné chez Bt dans nos conditions. Ce rapporteur change de fluorescence en passant du vert au vert/orange grâce à un temps de maturation différent entre les fluorophores verts (rapides) et oranges (lents). Les cellules qui ne se divisent pas sont fluorescentes dans le vert et l'orange car elles accumulent les 2 fluorophores, tandis que les cellules qui se divisent, accumulent le fluorophore vert (qui mature plus rapidement) en concentration plus importante. L'expérience de la croissance de cellules extraites de l'insecte à 7 jpi en présence ou en absence de lysats cellulaires bactériens serait également conduite et développée (différentes concentrations de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pourrait également être incorporées et testées).

Les cellules extraites du cadavre à 7 jpi devraient aussi être comparées pour la capacité à former un biofilm par rapport aux cellules *in vitro*. Un test de motilité simple utilisant de la gélose semi-solide peut être mis en place avec différents milieux (LB ou milieu insecte). Si la gélose devient trouble la motilité n'est pas affectée, mais si les bactéries restent concentrées au lieu d'inoculation, cela démontre qu'elles sont affectées dans leur motilité. Malheureusement le fait que les cellules soient au sein d'un

cadavre d'insecte opaque empêche l'exploration au microscope confocal. De manière générale, à 7 jpi les cadavres d'insectes sont fragiles, ils sont « ramollis » et leur manipulation risque de dénaturer les structures ce qui limite également les expériences.

Pour conclure, ce projet passionnant ouvre le champ des possibles. Cette thèse a initié la caractérisation des cellules non-sporulantes, mais beaucoup reste à faire pour comprendre le processus adaptatif de Bt à l'environnement du cadavre d'insecte et la persistance de ces bactéries sous forme non-sporulée. Cette étude a permis de confirmer que les cellules qui survivent tardivement dans l'insecte sont dans un état physiologique particulier, non expliqué par le nécrotrophisme. Le rôle de la réponse au stress oxydatif et les mécanismes qui permettent à ces bactéries de survivre restent à déterminer. D'autres caractérisations sont à faire, en déterminant notamment comment les cellules subsistent, si elles bénéficient d'un apport nutritif et quelles sont les voies métaboliques empruntées. Enfin, ces cellules peuvent aussi être dormantes et leur métabolisme ralenti leur permettrait de résister aux carences nutritives. Des perspectives plus générales sont également à explorer. Il serait intéressant de comprendre ce qui supporte l'hétérogénéité de la population au cours de l'infection et pourquoi seulement une partie de la population sporule. Il conviendrait également d'étudier si l'état physiologique des cellules non-sporulantes confère aux bactéries des avantages en terme de valeur sélective et si l'entrée dans cet état physiologique se fait sous le contrôle de régulateurs génétiques spécifiques.

## 6 ANNEXES

---

### 6.1 Valorisation de la thèse

Communications orales :

- **Colloque Doc'Micalis** : « Toward the characterization of a *Bacillus thuringiensis* subpopulation in an unknown physiological state », [Hasna Toukabri](#), Didier Lereclus, Leyla Slamti. Jouy-en-Josas (Octobre 2020).
- **Congrès BACT 2021** « Toward the characterization of a *Bacillus thuringiensis* subpopulation in an unknown physiological state », [Hasna Toukabri](#), Didier Lereclus, Leyla Slamti. En ligne (Avril 2021), « Mention honorable ».

Communication sous forme de posters :

- **ABIES days, poster vidéo** : « Toward the characterization of a *Bacillus thuringiensis* subpopulation in an unknown physiological state », [Hasna Toukabri](#), Didier Lereclus, Leyla Slamti. En ligne (Mai 2021), « Prix du meilleur poster ».
- **Congrès BACT 2022** « Phenotypic and transcriptomic profile of non-sporulated *Bacillus thuringiensis* during long-term survival in insect cadavers », [Hasna Toukabri](#), Didier Lereclus, Leyla Slamti. Paris (Avril 2022).

### 6.2 Posters réalisés

# Toward the characterization of a *Bacillus thuringiensis* subpopulation in an unknown physiological state during infection

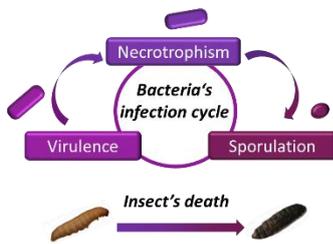
Hasna TOUKABRI, Didier LERECLUS, Leyla SLAMTI

Micalis Institute, Institut National de la Recherche Agronomique, Jouy-en-Josas, France

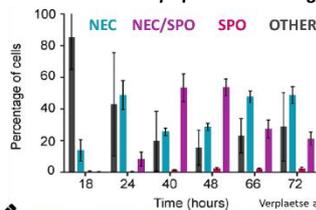
## Abstract

*Bacillus thuringiensis* (Bt), an entomopathogenic bacteria, is able to complete a full developmental cycle in its insect host (*Galleria mellonella*, in this study). It was shown that these bacteria were sequentially able to kill their host (virulence), to survive in its cadaver (necrotrophism) and to form spores (sporulation). Results suggest that there is a non necrotrophic and non sporulating subpopulation in an unknown physiological state (Verplaetse and al., 2015; Ben Rejeb and al, 2017). This subpopulation may have developed an alternative to sporulation which is a costly, complex and irreversible process. The Nec-Spo<sup>-</sup> cells represent at least 30% of the total population. First experiments, to study cells metabolic activity, reveals heterogeneity. This study will help understand the adaptation, survival and persistence of bacteria in their environment and especially for bacteria of the *B. cereus* group, that appears today as an important emerging pathogen.

## Introduction

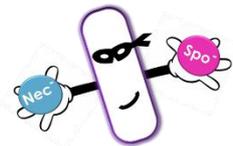


Evolution of the Bt population during infection



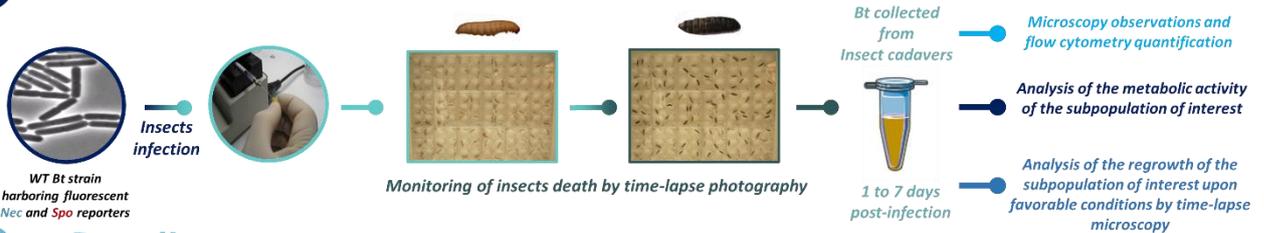
Characterization of the unknown physiological state that allows Bt to survive without engaging into necrotrophism or sporulation

Objective of the Ph.D project



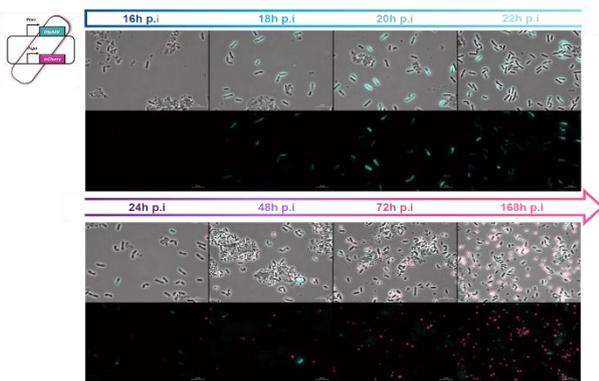
Subpopulation of interest Nec<sup>-</sup>Spo<sup>-</sup>

## Material & Methods

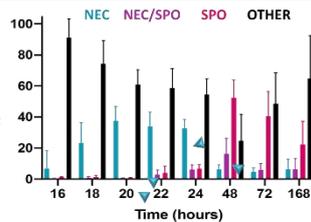


## Results

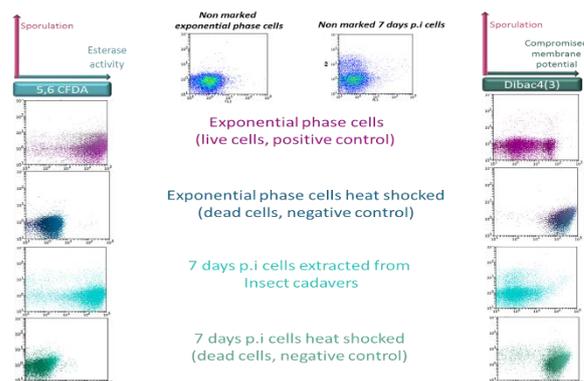
Necrotrophism and sporulation expression during infection assessed with an unstable Nec reporter and a Spo reporter by microscopy and flow cytometry



Necrotrophism is detected from 18h p.i to 48h p.i for up to 40% of the population, then sporulation occurs. About 30% to 50% of the population is composed of spores



Metabolic activity of the Nec-Spo<sup>-</sup> subpopulation at 7 days p.i assessed by flow cytometry (via molecular dyes) and microscopy (time-lapse on LBA)



At 7 days p.i, Bt cells extracted from insects are polarized and have an esterase activity, however they are not able to divide after 4h on LBA.

## Discussion

- Assessment of necrotrophism with an unstable fluorescent protein reveals that the Nec<sup>-</sup>Spo<sup>-</sup> subpopulation was previously underestimated
- The Nec<sup>-</sup>Spo<sup>-</sup> subpopulation represents at least 30% of the total population
- The Nec<sup>-</sup>Spo<sup>-</sup> subpopulation at 7d p.i is polarized and have an esterase activity but cells are not able to divide 4 hours after inoculation on LBA pads

Further steps will focus on other metabolic assessments and on the RNA-Seq analysis of this subpopulation to characterize gene expression

E. Verplaetse, L. Slamti, M. Gohar, D. Lereclus. Mol Microbiol (2015)  
S. Ben Rejeb, D. Lereclus, L. Slamti. Front Microbiol, (2017)

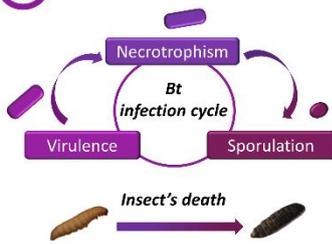
# Phenotypic and transcriptomic profile of non-sporulated *Bacillus thuringiensis* cells during long-term survival in insect cadavers

Hasna **TOUKABRI**, Didier **LERECLUS**, Leyla **SLAMTI**  
Micalis Institute, Institut National de la Recherche Agronomique, Jouy-en-Josas, France

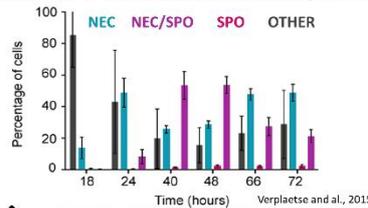
## Abstract

*Bacillus thuringiensis* (Bt) is able to complete a full developmental cycle in its insect host (*Galleria mellonella*, in this study). It was shown that these bacteria were able to kill their host, to survive in its cadaver via necrotrophism and to form spores by sequentially activating virulence, necrotrophism (Nec) and sporulation (Spo) genes. Previous results show that there are non necrotrophic and non sporulating cells in an unknown physiological state (Verplaetse and al., 2015; Ben Rejeb and al, 2017) that may have developed an alternative to sporulation -a costly, complex and irreversible process- to persist in the environment. We show that during the course of an infection, Bt is transiently necrotrophic, then a subpopulation undergoes a metabolic slow-down but remains viable until 14 days post-infection. RNA-Seq performed on late-infection stage bacteria revealed the importance of genes involved in iron homeostasis and oxidative stress response during long-term survival in insect cadavers.

## Introduction

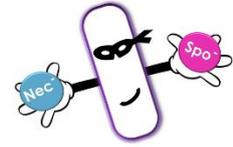


Evolution of the Bt population during infection



Characterization of the unknown physiological state that allows Bt to survive without engaging into necrotrophism or sporulation

Objective of the Ph.D project



Subpopulation of interest Nec<sup>-</sup>Spo<sup>-</sup>

Identification of a non necrotrophic and non sporulating subpopulation (OTHER)

## Material & Methods



WT Bt strain harboring Nec and/or Spo fluorescent reporters

Insects injection



Insects death occurs between 8 and 12 h post-infection



Bt is collected from insect cadavers from 1 to 14 days post-infection

Necrotrophism and sporulation expression during infection using Nec and Spo fluorescent reporters with flow cytometry

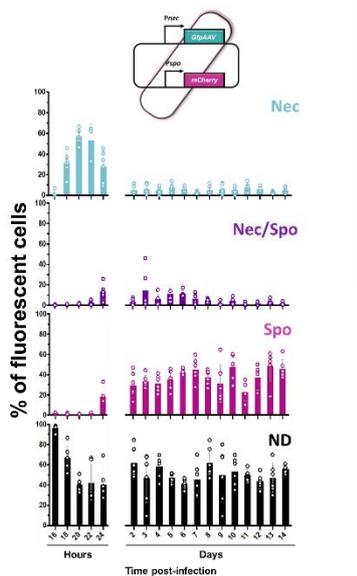
Metabolic assessment of the Spo<sup>-</sup> cells via protein synthesis assay and molecular dyes with flow cytometry

Recovery assessment of the cells extracted from insect cadavers on LBA and Insect agar using colony assay and microscopy

RNA-Seq on the Spo<sup>-</sup> cells at 7 days pi and identification of target genes

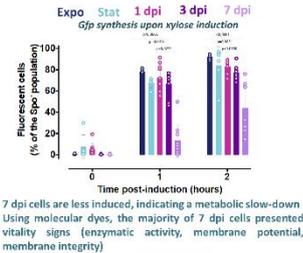
## Results

### I. Necrotrophism and sporulation expression during infection



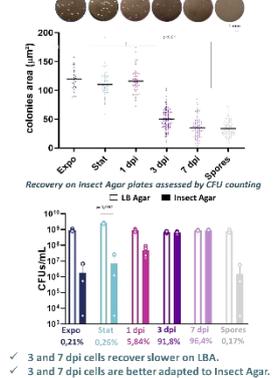
- Necrotrophism is transiently detected from 18 hpi to 24 hpi for up to 60% of the population, then sporulation occurs.
- About 30% to 55% of the population is composed of spores during 14 days post-infection (14 dpi).
- Until 14 dpi, up to 70% of the cells are non-necrotrophic and non-sporulating (ND).

### II. Physiological assessment of the Spo<sup>-</sup> cells



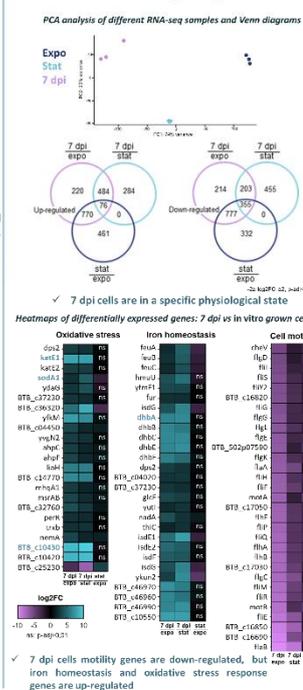
7 dpi cells are less induced, indicating a metabolic slow-down. Using molecular dyes, the majority of 7 dpi cells presented vitality signs (enzymatic activity, membrane potential, membrane integrity).

### III. Recovery assessment of cells extracted from insect cadavers on LBA and Insect Agar



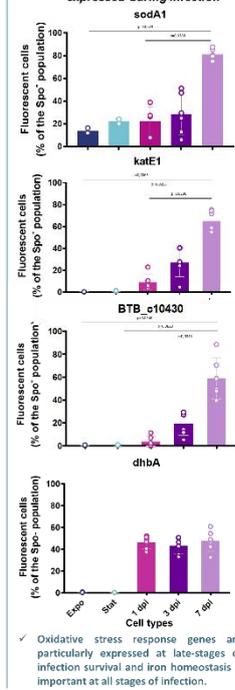
- 3 and 7 dpi cells recover slower on LBA.
- 3 and 7 dpi cells are better adapted to Insect Agar.

### IV. RNA-Seq on 7 dpi cells



- 7 dpi cells are in a specific physiological state.
- Heatmaps of differentially expressed genes: 7 dpi vs in vitro grown cells.
- 7 dpi cells motility genes are down-regulated, but iron homeostasis and oxidative stress response genes are up-regulated.

### IV. RNA-Seq identified genes expressed during infection



- Oxidative stress response genes are particularly expressed at late-stages of infection survival and iron homeostasis is important at all stages of infection.

## Discussion

- Until 14 dpi, up to 70% of the total population is composed of non-necrotrophic and non-sporulating cells in the insect cadavers.
- Protein synthesis and a growth recovery assay indicated that they are in a metabolically slowed-down state. Interestingly, they were found to be extremely resistant to the cadaver environment which proved deadly for in-vitro grown vegetative cells.
- RNA-Seq experiment on this subpopulation at 7 dpi revealed a signature profile of this state.
- Oxidative stress response genes are particularly expressed in these cells, indicating that oxidative stress response is involved in long-term survival. Moreover, as motility genes are down-regulated, 7 dpi cells might adopt a biofilm conformation in insect cadavers.
- Altogether, these data indicate that non-sporulated bacteria engage in a profound adaptation process that leads to their persistence in the host cadaver.

E. Verplaetse, L. Slamti, M. Gohar, D. Lereclus, Mbio, (2015)  
S. Ben Rejeb, D. Lereclus, L. Slamti. Front Microbiol, (2017)



## 7 REFERENCES

---

- Aathmanathan, V. S., Jothi, N., Prajapati, V. K., & Krishnan, M. (2018). Investigation of immunogenic properties of Hemolin from silkworm, *Bombyx mori* as carrier protein: an immunoinformatic approach. *Scientific Reports*, 8(1), 6957. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25374-z>
- Agaisse, H., Gominet, M., Okstad, O. A., Kolstø, A. B., & Lereclus, D. (1999). PlcR is a pleiotropic regulator of extracellular virulence factor gene expression in *Bacillus thuringiensis*. *Molecular Microbiology*, 32(5), 1043–1053. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01419.x>
- Agaisse, H., & Lereclus, D. (1995). How does *Bacillus thuringiensis* produce so much insecticidal crystal protein? *Journal of Bacteriology*, 177(21), 6027–6032. <https://doi.org/10.1128/jb.177.21.6027-6032.1995>
- Alcaraz, L. D., Moreno-Hagelsieb, G., Eguiarte, L. E., Souza, V., Herrera-Estrella, L., & Olmedo, G. (2010). Understanding the evolutionary relationships and major traits of *Bacillus* through comparative genomics. *BMC Genomics*, 11(1), 332. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-332>
- Altincicek, B., Stötzel, S., Wygrecka, M., Preissner, K. T., & Vilcinskas, A. (2008). Host-derived extracellular nucleic acids enhance innate immune responses, induce coagulation, and prolong survival upon infection in insects. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 181(4), 2705–2712. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.4.2705>
- Amato, S. M., Orman, M. A., & Brynildsen, M. P. (2013). Metabolic control of persister formation in *Escherichia coli*. *Molecular Cell*, 50(4), 475–487. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.04.002>
- Anderson, I., Sorokin, A., Kapatral, V., Reznik, G., Bhattacharya, A., Mikhailova, N., Burd, H., Joukov, V., Kaznadzey, D., Walunas, T., Markd'Souza, null, Larsen, N., Pusch, G., Liolios, K., Grechkin, Y., Lapidus, A., Goltsman, E., Chu, L., Fonstein, M., ... Ivanova, N. (2005).

- Comparative genome analysis of *Bacillus cereus* group genomes with *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiology Letters*, 250(2), 175–184. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.07.008>
- Antequera-Gómez, M. L., Díaz-Martínez, L., Guadix, J. A., Sánchez-Tévar, A. M., Sopena-Torres, S., Hierrezuelo, J., Doan, H. K., Leveau, J. H. J., Vicente, A., & Romero, D. (2021). Sporulation is dispensable for the vegetable-associated life cycle of the human pathogen *Bacillus cereus*. *Microbial Biotechnology*, 14(4), 1550–1565. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13816>
- Arnaouteli, S., Bamford, N. C., Stanley-Wall, N. R., & Kovács, Á. T. (2021). *Bacillus subtilis* biofilm formation and social interactions. *Nature Reviews Microbiology*, 19(9), 600–614. <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00540-9>
- Ash, C., & Collins, M. D. (1992). Comparative analysis of 23S ribosomal RNA gene sequences of *Bacillus anthracis* and emetic *Bacillus cereus* determined by PCR-direct sequencing. *FEMS Microbiology Letters*, 73(1–2), 75–80. [https://doi.org/10.1016/0378-1097\(92\)90586-d](https://doi.org/10.1016/0378-1097(92)90586-d)
- Ash, C., Farrow, J. A., Dorsch, M., Stackebrandt, E., & Collins, M. D. (1991). Comparative analysis of *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and related species on the basis of reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 41(3), 343–346. <https://doi.org/10.1099/00207713-41-3-343>
- Ayrapetyan, M., Williams, T. C., Baxter, R., & Oliver, J. D. (2015). Viable but Nonculturable and Persister Cells Coexist Stochastically and Are Induced by Human Serum. *Infection and Immunity*, 83(11), 4194–4203. <https://doi.org/10.1128/IAI.00404-15>
- Ayrapetyan, M., Williams, T. C., & Oliver, J. D. (2015). Bridging the gap between viable but non-culturable and antibiotic persistent bacteria. *Trends in Microbiology*, 23(1), 7–13. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2014.09.004>

- Ayrapetyan, M., Williams, T., & Oliver, J. D. (2018). Relationship between the Viable but Nonculturable State and Antibiotic Persister Cells. *Journal of Bacteriology*, 200(20), e00249-18. <https://doi.org/10.1128/JB.00249-18>
- Bacon, R. (1267). *De Scientia experimentalis, Opus majus*.
- Baldwin, V. M. (2020). You Can't *B. cereus* – A Review of *Bacillus cereus* Strains That Cause Anthrax-Like Disease. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2020.01731>
- Banville, N., Browne, N., & Kavanagh, K. (2012). Effect of nutrient deprivation on the susceptibility of *Galleria mellonella* larvae to infection. *Virulence*, 3(6), 497–503. <https://doi.org/10.4161/viru.21972>
- Barlass, P. J., Houston, C. W., Clements, M. O., & Moir, A. (2002). Germination of *Bacillus cereus* spores in response to L-alanine and to inosine: the roles of *gerL* and *gerQ* operons cThe GenBank accession numbers for the *gerL* and *gerQ* operons reported in this paper are AF387344 and AY037930, respectively. *Microbiology*, 148(7), 2089–2095. <https://doi.org/10.1099/00221287-148-7-2089>
- Ben Rejeb, S., Lereclus, D., & Slamti, L. (2017). Analysis of *abrB* Expression during the Infectious Cycle of *Bacillus thuringiensis* Reveals Population Heterogeneity. *Frontiers in Microbiology*, 8, 2471. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02471>
- Bigger, J. (1944). TREATMENT OF STAPHYLOCOCCAL INFECTIONS WITH PENICILLIN BY INTERMITTENT STERILISATION. *The Lancet*, 244(6320), 497–500. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)74210-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)74210-3)
- Billings, N., Birjiniuk, A., Samad, T. S., Doyle, P. S., & Ribbeck, K. (2015). Material properties of biofilms-a review of methods for understanding permeability and mechanics. *Reports on Progress in Physics. Physical Society (Great Britain)*, 78(3), 036601. <https://doi.org/10.1088/0034-4885/78/3/036601>

- Blair, K. M., Turner, L., Winkelman, J. T., Berg, H. C., & Kearns, D. B. (2008). A molecular clutch disables flagella in the *Bacillus subtilis* biofilm. *Science (New York, N.Y.)*, *320*(5883), 1636–1638. <https://doi.org/10.1126/science.1157877>
- Boaretti, M., Lleò, M. M., Bonato, B., Signoretto, C., & Canepari, P. (2003). Involvement of *rpoS* in the survival of *Escherichia coli* in the viable but non-culturable state. *Environmental Microbiology*, *5*(10), 986–996. <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2003.00497.x>
- Boles, B. R., & Horswill, A. R. (2012). Swimming cells promote a dynamic environment within biofilms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *109*(32), 12848–12849. <https://doi.org/10.1073/pnas.1210297109>
- Bressuire-Isoard, C., Broussolle, V., & Carlin, F. (2018). Sporulation environment influences spore properties in *Bacillus*: evidence and insights on underlying molecular and physiological mechanisms. *FEMS Microbiology Reviews*, *42*(5), 614–626. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuy021>
- Brillard, J., Dupont, C. M. S., Berge, O., Dargaignaratz, C., Oriol-Gagnier, S., Doussan, C., Broussolle, V., Gillon, M., Clavel, T., & Bérard, A. (2015). The Water Cycle, a Potential Source of the Bacterial Pathogen *Bacillus cereus*. *BioMed Research International*, *2015*, 356928. <https://doi.org/10.1155/2015/356928>
- Brivio, M. F., Mastore, M., & Nappi, A. J. (2010). A pathogenic parasite interferes with phagocytosis of insect immunocompetent cells. *Developmental and Comparative Immunology*, *34*(9), 991–998. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2010.05.002>
- Broussolle, V., Gauillard, F., Nguyen-The, C., & Carlin, F. (2008). Diversity of spore germination in response to inosine and L-alanine and its interaction with NaCl and pH in the *Bacillus cereus* group. *Journal of Applied Microbiology*, *105*(4), 1081–1090. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.03847.x>

- Brown, M. R., Allison, D. G., & Gilbert, P. (1988). Resistance of bacterial biofilms to antibiotics: a growth-rate related effect? *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 22(6), 777–780.  
<https://doi.org/10.1093/jac/22.6.777>
- Brown, S. E., Howard, A., Kasprzak, A. B., Gordon, K. H., & East, P. D. (2009). A peptidomics study reveals the impressive antimicrobial peptide arsenal of the wax moth *Galleria mellonella*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 39(11), 792–800.  
<https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2009.09.004>
- Browne, N., Heelan, M., & Kavanagh, K. (2013). An analysis of the structural and functional similarities of insect hemocytes and mammalian phagocytes. *Virulence*, 4(7), 597–603.  
<https://doi.org/10.4161/viru.25906>
- Buisson, C., Gohar, M., Huillet, E., & Nielsen-Leroux, C. (2019). *Bacillus thuringiensis* Spores and Vegetative Bacteria: Infection Capacity and Role of the Virulence Regulon PlcR Following Intrahaemocoel Injection of *Galleria mellonella*. *Insects*, 10(5), E129.  
<https://doi.org/10.3390/insects10050129>
- Caceres, S. M., Malcolm, K. C., Taylor-Cousar, J. L., Nichols, D. P., Saavedra, M. T., Bratton, D. L., Moskowitz, S. M., Burns, J. L., & Nick, J. A. (2014). Enhanced in vitro formation and antibiotic resistance of nonattached *Pseudomonas aeruginosa* aggregates through incorporation of neutrophil products. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(11), 6851–6860.  
<https://doi.org/10.1128/AAC.03514-14>
- Cairo, J., Gherman, I., Day, A., & Cook, P. E. (2022). *Bacillus cytotoxicus* —A potentially virulent food-associated microbe. *Journal of Applied Microbiology*, 132(1), 31–40.  
<https://doi.org/10.1111/jam.15214>
- Candela, T., Fagerlund, A., Buisson, C., Gilois, N., Kolstø, A.-B., Økstad, O. A., Aymerich, S., Nielsen-Leroux, C., Lereclus, D., & Gohar, M. (2019). CalY is a major virulence factor and a

- biofilm matrix protein. *Molecular Microbiology*, *111*(6), 1416–1429.  
<https://doi.org/10.1111/mmi.14184>
- Cao, J.-X., Wang, F., Li, X., Sun, Y.-Y., Wang, Y., Ou, C.-R., Shao, X.-F., Pan, D.-D., & Wang, D.-Y. (2018). The Influence of Microwave Sterilization on the Ultrastructure, Permeability of Cell Membrane and Expression of Proteins of *Bacillus Cereus*. *Frontiers in Microbiology*, *9*, 1870. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01870>
- Cardoso, P. de F., Perchat, S., Vilas-Boas, L. A., Lereclus, D., & Vilas-Bôas, G. T. (2019). Diversity of the Rap-Phr quorum-sensing systems in the *Bacillus cereus* group. *Current Genetics*, *65*(6), 1367–1381. <https://doi.org/10.1007/s00294-019-00993-9>
- Caro-Astorga, J., Álvarez-Mena, A., Hierrezuelo, J., Guadix, J. A., Heredia-Ponce, Z., Arboleda-Estudillo, Y., González-Munoz, E., de Vicente, A., & Romero, D. (2020). Two genomic regions encoding exopolysaccharide production systems have complementary functions in *B. cereus* multicellularity and host interaction. *Scientific Reports*, *10*(1), 1000. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-57970-3>
- Caro-Astorga, J., Pérez-García, A., de Vicente, A., & Romero, D. (2014). A genomic region involved in the formation of adhesin fibers in *Bacillus cereus* biofilms. *Frontiers in Microbiology*, *5*, 745. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00745>
- Carpentier, B., & Cerf, O. (1993). Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry. *The Journal of Applied Bacteriology*, *75*(6), 499–511. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1993.tb01587.x>
- Carroll, L. M., Wiedmann, M., & Kovac, J. (2020). Proposal of a Taxonomic Nomenclature for the *Bacillus cereus* Group Which Reconciles Genomic Definitions of Bacterial Species with Clinical and Industrial Phenotypes. *MBio*, *11*(1), e00034–20. <https://doi.org/10.1128/mBio.00034-20>

- Cerenius, L., Lee, B. L., & Söderhäll, K. (2008). The proPO-system: pros and cons for its role in invertebrate immunity. *Trends in Immunology*, 29(6), 263–271. <https://doi.org/10.1016/j.it.2008.02.009>
- Chastanet, A., Vitkup, D., Yuan, G.-C., Norman, T. M., Liu, J. S., & Losick, R. M. (2010). Broadly heterogeneous activation of the master regulator for sporulation in *Bacillus subtilis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(18), 8486–8491. <https://doi.org/10.1073/pnas.1002499107>
- Chateau, A., Lunderberg, J. M., Oh, S. Y., Abshire, T., Friedlander, A., Quinn, C. P., Missiakas, D. M., & Schneewind, O. (2018). Galactosylation of the Secondary Cell Wall Polysaccharide of *Bacillus anthracis* and Its Contribution to Anthrax Pathogenesis. *Journal of Bacteriology*, 200(5), e00562-17. <https://doi.org/10.1128/JB.00562-17>
- Checinska, A., Paszczynski, A., & Burbank, M. (2015). *Bacillus* and other spore-forming genera: variations in responses and mechanisms for survival. *Annual Review of Food Science and Technology*, 6, 351–369. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-030713-092332>
- Chen, M. L., & Tsen, H. Y. (2002). Discrimination of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* with 16S rRNA and *gyrB* gene based PCR primers and sequencing of their annealing sites. *Journal of Applied Microbiology*, 92(5), 912–919. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2002.01606.x>
- Chen, R. Y., & Keddie, B. A. (2021). *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) Hemocytes Release Extracellular Traps That Confer Protection Against Bacterial Infection in the Hemocoel. *Journal of Insect Science (Online)*, 21(6), 17. <https://doi.org/10.1093/jisesa/ieab092>
- Christensen, R., Owens, D. M., Thomsen, A., Pedersen, S., & Jensen, U. B. (2011). Zinc fixation for flow cytometry analysis of intracellular and surface epitopes, DNA content, and cell proliferation. *Current Protocols in Cytometry*, Chapter 7, Unit 7.40. <https://doi.org/10.1002/0471142956.cy0740s57>

- Christie, G., & Setlow, P. (2020). *Bacillus* spore germination: Knowns, unknowns and what we need to learn. *Cellular Signalling*, *74*, 109729. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2020.109729>
- Chu, F., Kearns, D. B., McLoon, A., Chai, Y., Kolter, R., & Losick, R. (2008). A novel regulatory protein governing biofilm formation in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, *68*(5), 1117–1127. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06201.x>
- Chung, M.-C., Popova, T. G., Millis, B. A., Mukherjee, D. V., Zhou, W., Liotta, L. A., Petricoin, E. F., Chandhoke, V., Bailey, C., & Popov, S. G. (2006). Secreted neutral metalloproteases of *Bacillus anthracis* as candidate pathogenic factors. *The Journal of Biological Chemistry*, *281*(42), 31408–31418. <https://doi.org/10.1074/jbc.M605526200>
- Claudi, B., Spröte, P., Chirkova, A., Personnic, N., Zankl, J., Schürmann, N., Schmidt, A., & Bumann, D. (2014). Phenotypic variation of *Salmonella* in host tissues delays eradication by antimicrobial chemotherapy. *Cell*, *158*(4), 722–733. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.06.045>
- Cohen, N. R., Lobritz, M. A., & Collins, J. J. (2013). Microbial persistence and the road to drug resistance. *Cell Host & Microbe*, *13*(6), 632–642. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2013.05.009>
- Consentino, L., Rejasse, A., Crapart, N., Bevilacqua, C., & Nielsen-Leroux, C. (2021). Laser capture microdissection to study *Bacillus cereus* iron homeostasis gene expression during *Galleria mellonella* in vivo gut colonization. *Virulence*, *12*(1), 2104–2121. <https://doi.org/10.1080/21505594.2021.1959790>
- Contreras-Pérez, M., Hernández-Salmerón, J., Rojas-Solís, D., Rocha-Granados, C., Orozco-Mosqueda, M. D. C., Parra-Cota, F. I., de Los Santos-Villalobos, S., & Santoyo, G. (2019). Draft genome analysis of the endophyte, *Bacillus toyonensis* COPE52, a blueberry (*Vaccinium* spp. var. Biloxi) growth-promoting bacterium. *3 Biotech*, *9*(10), 370. <https://doi.org/10.1007/s13205-019-1911-5>
- Cook, S. M., & McArthur, J. D. (2013). Developing *Galleria mellonella* as a model host for human pathogens. *Virulence*, *4*(5), 350–353. <https://doi.org/10.4161/viru.25240>

- Cosby, W. M., Vollenbroich, D., Lee, O. H., & Zuber, P. (1998). Altered *srf* expression in *Bacillus subtilis* resulting from changes in culture pH is dependent on the Spo0K oligopeptide permease and the ComQX system of extracellular control. *Journal of Bacteriology*, *180*(6), 1438–1445. <https://doi.org/10.1128/JB.180.6.1438-1445.1998>
- Crickmore, N., Baum, J., Bravo, A., Lereclus, D., Narva, K., Sampson, K., Schepf, E., Sun, M., & Zeigler, D. (2018). *Bacillus thuringiensis toxin nomenclature*.
- Cutuli, M. A., Petronio Petronio, G., Vergalito, F., Magnifico, I., Pietrangelo, L., Venditti, N., & Di Marco, R. (2019). *Galleria mellonella* as a consolidated in vivo model hosts: New developments in antibacterial strategies and novel drug testing. *Virulence*, *10*(1), 527–541. <https://doi.org/10.1080/21505594.2019.1621649>
- Dai, Z., Sirard, J. C., Mock, M., & Koehler, T. M. (1995). The *atxA* gene product activates transcription of the anthrax toxin genes and is essential for virulence. *Molecular Microbiology*, *16*(6), 1171–1181. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1995.tb02340.x>
- Declerck, N., Bouillaut, L., Chaix, D., Rugani, N., Slamti, L., Hoh, F., Lereclus, D., & Arold, S. T. (2007). Structure of PlcR: Insights into virulence regulation and evolution of quorum sensing in Gram-positive bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*(47), 18490–18495. <https://doi.org/10.1073/pnas.0704501104>
- Deist, B., Rausch, M., Fernandez-Luna, M., Adang, M., & Bonning, B. (2014). Bt Toxin Modification for Enhanced Efficacy. *Toxins*, *6*(10), 3005–3027. <https://doi.org/10.3390/toxins6103005>
- Deng, C., Peng, Q., Song, F., & Lereclus, D. (2014). Regulation of *cry* gene expression in *Bacillus thuringiensis*. *Toxins*, *6*(7), 2194–2209. <https://doi.org/10.3390/toxins6072194>
- Dewachter, L., Bollen, C., Wilmaerts, D., Louwagie, E., Herpels, P., Matthay, P., Khodaparast, L., Khodaparast, L., Rousseau, F., Schymkowitz, J., & Michiels, J. (2021). The Dynamic Transition of Persistence toward the Viable but Nonculturable State during Stationary Phase Is

Driven by Protein Aggregation. *MBio*, 12(4), e0070321. <https://doi.org/10.1128/mBio.00703-21>

- Di Franco, C., Beccari, E., Santini, T., Pisaneschi, G., & Tecce, G. (2002). Colony shape as a genetic trait in the pattern-forming *Bacillus mycoides*. *BMC Microbiology*, 2, 33. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-2-33>
- Dietrich, R., Jessberger, N., Ehling-Schulz, M., Märtlbauer, E., & Granum, P. E. (2021). The Food Poisoning Toxins of *Bacillus cereus*. *Toxins*, 13(2), 98. <https://doi.org/10.3390/toxins13020098>
- do Canto Canabarro, M., Meneghetti, K. L., Geimba, M. P., & Corção, G. (2022). Biofilm formation and antibiotic susceptibility of *Staphylococcus* and *Bacillus* species isolated from human allogeneic skin. *Brazilian Journal of Microbiology: [Publication of the Brazilian Society for Microbiology]*, 53(1), 153–160. <https://doi.org/10.1007/s42770-021-00642-9>
- Domínguez-Arrizabalaga, M., Villanueva, M., Escriche, B., Ancín-Azpilicueta, C., & Caballero, P. (2020). Insecticidal Activity of *Bacillus thuringiensis* Proteins Against Coleopteran Pests. *Toxins*, 12(7), E430. <https://doi.org/10.3390/toxins12070430>
- Donovan, W. P., Tan, Y., & Slaney, A. C. (1997). Cloning of the *nprA* gene for neutral protease A of *Bacillus thuringiensis* and effect of in vivo deletion of *nprA* on insecticidal crystal protein. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(6), 2311–2317. <https://doi.org/10.1128/aem.63.6.2311-2317.1997>
- Dörr, T., Lewis, K., & Vulić, M. (2009). SOS response induces persistence to fluoroquinolones in *Escherichia coli*. *PLoS Genetics*, 5(12), e1000760. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000760>
- Drysdale, M., Bourgogne, A., Hilsenbeck, S. G., & Koehler, T. M. (2004). *atxA* controls *Bacillus anthracis* capsule synthesis via *acpA* and a newly discovered regulator, *acpB*. *Journal of Bacteriology*, 186(2), 307–315. <https://doi.org/10.1128/JB.186.2.307-315.2004>

- Dubois, T., Faegri, K., Gélis-Jeanvoine, S., Perchat, S., Lemy, C., Buisson, C., Nielsen-Leroux, C., Gohar, M., Jacques, P., Ramarao, N., Slamti, L., Kolstø, A.-B., & Lereclus, D. (2016). Correction: Necrotrophism Is a Quorum-Sensing-Regulated Lifestyle in *Bacillus thuringiensis*. *PLoS Pathogens*, *12*(11), e1006049. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006049>
- Dubois, T., Lemy, C., Perchat, S., & Lereclus, D. (2019). The signaling peptide NprX controlling sporulation and necrotrophism is imported into *Bacillus thuringiensis* by two oligopeptide permease systems. *Molecular Microbiology*, *112*(1), 219–232. <https://doi.org/10.1111/mmi.14264>
- Dubois, T., Perchat, S., Verplaetse, E., Gominet, M., Lemy, C., Aumont-Nicaise, M., Grenha, R., Nessler, S., & Lereclus, D. (2013). Activity of the *Bacillus thuringiensis* NprR-NprX cell-cell communication system is co-ordinated to the physiological stage through a complex transcriptional regulation. *Molecular Microbiology*, *88*(1), 48–63. <https://doi.org/10.1111/mmi.12168>
- Dubovskiy, I. M., Grizanov, E. V., Whitten, M. M. A., Mukherjee, K., Greig, C., Alikina, T., Kabilov, M., Vilcinskas, A., Glupov, V. V., & Butt, T. M. (2016). Immuno-physiological adaptations confer wax moth *Galleria mellonella* resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Virulence*, *7*(8), 860–870. <https://doi.org/10.1080/21505594.2016.1164367>
- Dworkin, J., & Losick, R. (2005). Developmental commitment in a bacterium. *Cell*, *121*(3), 401–409. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.02.032>
- EFSA. (2014). Scientific Opinion on the safety and efficacy of Toyocerin® (*Bacillus toyonensis*) as a feed additive for chickens for fattening, weaned piglets, pigs for fattening, sows for reproduction, cattle for fattening and calves for rearing and for rabbits for fattening. *EFSA Journal*, *2014*;12(7):3766. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2014.3766>
- Ehling-Schulz, M., Guinebretiere, M.-H., Montháñ, A., Berge, O., Fricker, M., & Svensson, B. (2006). Toxin gene profiling of enterotoxic and emetic *Bacillus cereus*: Toxin gene profiling of

- enterotoxigenic and emetic *B. cereus*. *FEMS Microbiology Letters*, 260(2), 232–240.  
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2006.00320.x>
- Ehling-Schulz, M., Lereclus, D., & Koehler, T. M. (2019). The *Bacillus cereus* Group: *Bacillus* Species with Pathogenic Potential. *Microbiology Spectrum*, 7(3).  
<https://doi.org/10.1128/microbiolspec.GPP3-0032-2018>
- El-Aziz, N. K. A., Tartor, Y. H., El-Aziz Gharib, A. A., & Ammar, A. M. (2018). Propidium Monoazide Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction for Enumeration of Some Viable but Nonculturable Foodborne Bacteria in Meat and Meat Products. *Foodborne Pathogens and Disease*, 15(4), 226–234. <https://doi.org/10.1089/fpd.2017.2356>
- Eleftherianos, I., & Revenis, C. (2011). Role and importance of phenoloxidase in insect hemostasis. *Journal of Innate Immunity*, 3(1), 28–33. <https://doi.org/10.1159/000321931>
- El-Khoury, N., Bennaceur, I., Verplaetse, E., Aymerich, S., Lereclus, D., Kallassy, M., & Gohar, M. (2021). Massive Integration of Planktonic Cells within a Developing Biofilm. *Microorganisms*, 9(2), 298. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9020298>
- El-Khoury, N., Majed, R., Perchat, S., Kallassy, M., Lereclus, D., & Gohar, M. (2016). Spatio-Temporal Evolution of Sporulation in *Bacillus thuringiensis* Biofilm. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1222. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01222>
- Enosi Tuipulotu, D., Mathur, A., Ngo, C., & Man, S. M. (2021). *Bacillus cereus*: Epidemiology, Virulence Factors, and Host-Pathogen Interactions. *Trends in Microbiology*, 29(5), 458–471. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2020.09.003>
- Fakruddin, M., Mannan, K. S. B., & Andrews, S. (2013). Viable but nonculturable bacteria: food safety and public health perspective. *ISRN Microbiology*, 2013, 703813. <https://doi.org/10.1155/2013/703813>

- Farag, M. M. S., Moghannem, S. A. M., Shehabeldine, A. M., & Azab, M. S. (2020). Antitumor effect of exopolysaccharide produced by *Bacillus mycooides*. *Microbial Pathogenesis*, *140*, 103947. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103947>
- Fasani, R. A., & Savageau, M. A. (2013). Molecular mechanisms of multiple toxin-antitoxin systems are coordinated to govern the persister phenotype. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*(27), E2528-2537. <https://doi.org/10.1073/pnas.1301023110>
- Fernandes, S., Gomes, I. B., Sousa, S. F., & Simões, M. (2022). Antimicrobial Susceptibility of Persister Biofilm Cells of *Bacillus cereus* and *Pseudomonas fluorescens*. *Microorganisms*, *10*(1), 160. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10010160>
- Flemming, H.-C., & Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nature Reviews. Microbiology*, *8*(9), 623–633. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2415>
- Flemming, H.-C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S. A., & Kjelleberg, S. (2016). Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nature Reviews. Microbiology*, *14*(9), 563–575. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.94>
- Fouet, A., & Mock, M. (1996). Differential influence of the two *Bacillus anthracis* plasmids on regulation of virulence gene expression. *Infection and Immunity*, *64*(12), 4928–4932. <https://doi.org/10.1128/iai.64.12.4928-4932.1996>
- Fouet, A., & Mock, M. (2006). Regulatory networks for virulence and persistence of *Bacillus anthracis*. *Current Opinion in Microbiology*, *9*(2), 160–166. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2006.02.009>
- Frankland, G. C., & Frankland, P. (1887). XI. Studies on some new micro-organisms obtained from air. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. (B.)*, *178*, 257–287. <https://doi.org/10.1098/rstb.1887.0011>

- Frawley, K. L., Praekunatham, H., Cronican, A. A., Peterson, J., & Pearce, L. L. (2019). Assessing modulators of cytochrome c oxidase activity in *Galleria mellonella* larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 219, 77–86. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2019.02.009>
- Frenzel, E., Doll, V., Pauthner, M., Lücking, G., Scherer, S., & Ehling-Schulz, M. (2012). CodY orchestrates the expression of virulence determinants in emetic *Bacillus cereus* by impacting key regulatory circuits. *Molecular Microbiology*, 85(1), 67–88. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2012.08090.x>
- Fu, J., Qi, L., Hu, M., Liu, Y., Yu, K., Liu, Q., & Liu, X. (2017). *Salmonella* proteomics under oxidative stress reveals coordinated regulation of antioxidant defense with iron metabolism and bacterial virulence. *Journal of Proteomics*, 157, 52–58. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2017.02.004>
- Fujita, M., González-Pastor, J. E., & Losick, R. (2005). High- and low-threshold genes in the Spo0A regulon of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 187(4), 1357–1368. <https://doi.org/10.1128/JB.187.4.1357-1368.2005>
- Fujita, M., & Losick, R. (2005). Evidence that entry into sporulation in *Bacillus subtilis* is governed by a gradual increase in the level and activity of the master regulator Spo0A. *Genes & Development*, 19(18), 2236–2244. <https://doi.org/10.1101/gad.1335705>
- Galdiero, F., Romano Carratelli, C., Nuzzo, I., Bentivoglio, C., & Galdiero, M. (1988). Phagocytosis of bacterial aggregates by granulocytes. *European Journal of Epidemiology*, 4(4), 456–460. <https://doi.org/10.1007/BF00146398>
- Gefen, O., & Balaban, N. Q. (2009a). The importance of being persistent: heterogeneity of bacterial populations under antibiotic stress. *FEMS Microbiology Reviews*, 33(4), 704–717. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00156.x>

- Gelens, L., Hill, L., Vandervelde, A., Danckaert, J., & Loris, R. (2013). A general model for toxin-antitoxin module dynamics can explain persister cell formation in *E. coli*. *PLoS Computational Biology*, 9(8), e1003190. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1003190>
- Gingichashvili, S., Duanis-Assaf, D., Shemesh, M., Featherstone, J. D. B., Feuerstein, O., & Steinberg, D. (2019). The Adaptive Morphology of *Bacillus subtilis* Biofilms: A Defense Mechanism against Bacterial Starvation. *Microorganisms*, 8(1), E62. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8010062>
- Giordan A., (1976), « Rien ne sert de courir, il faut partir à point », tentatives d'appropriation de la démarche scientifique expérimentale par des enfants de 9 à 14 ans, universités de Paris V et Paris VII.
- Gohar, M., Faegri, K., Perchat, S., Ravnum, S., Økstad, O. A., Gominet, M., Kolstø, A.-B., & Lereclus, D. (2008). The PlcR virulence regulon of *Bacillus cereus*. *PloS One*, 3(7), e2793. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002793>
- Gohar, M., Økstad, O. A., Gilois, N., Sanchis, V., Kolstø, A.-B., & Lereclus, D. (2002). Two-dimensional electrophoresis analysis of the extracellular proteome of *Bacillus cereus* reveals the importance of the PlcR regulon. *Proteomics*, 2(6), 784–791. [https://doi.org/10.1002/1615-9861\(200206\)2:6<784::AID-PROT784>3.0.CO;2-R](https://doi.org/10.1002/1615-9861(200206)2:6<784::AID-PROT784>3.0.CO;2-R)
- Gominet, M., Slamti, L., Gilois, N., Rose, M., & Lereclus, D. (2001). Oligopeptide permease is required for expression of the *Bacillus thuringiensis plcR* regulon and for virulence. *Molecular Microbiology*, 40(4), 963–975. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02440.x>
- González-Pastor, J. E. (2011). Cannibalism: a social behavior in sporulating *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiology Reviews*, 35(3), 415–424. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2010.00253.x>
- González-Pastor, J. E., Hobbs, E. C., & Losick, R. (2003). Cannibalism by sporulating bacteria. *Science (New York, N.Y.)*, 301(5632), 510–513. <https://doi.org/10.1126/science.1086462>

- Goormaghtigh, F., & Van Melderen, L. (2019). Single-cell imaging and characterization of *Escherichia coli* persister cells to ofloxacin in exponential cultures. *Science Advances*, 5(6), eaav9462. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aav9462>
- Gounina-Allouane, R., Broussolle, V., & Carlin, F. (2008). Influence of the sporulation temperature on the impact of the nutrients inosine and l-alanine on *Bacillus cereus* spore germination. *Food Microbiology*, 25(1), 202–206. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2007.08.002>
- Graham, M. L., & Prescott, M. J. (2015). The multifactorial role of the 3Rs in shifting the harm-benefit analysis in animal models of disease. *European Journal of Pharmacology*, 759, 19–29. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.03.040>
- Gray, D. A., Dugar, G., Gamba, P., Strahl, H., Jonker, M. J., & Hamoen, L. W. (2019). Extreme slow growth as alternative strategy to survive deep starvation in bacteria. *Nature Communications*, 10(1), 890. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08719-8>
- Grenha, R., Slamti, L., Nicaise, M., Refes, Y., Lereclus, D., & Nessler, S. (2013). Structural basis for the activation mechanism of the PlcR virulence regulator by the quorum-sensing signal peptide PapR. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(3), 1047–1052. <https://doi.org/10.1073/pnas.1213770110>
- Grmek, M. D. (1973). *Raisonnement expérimental et recherches toxicologiques chez Claude Bernard* (Vol. 5). Librairie Droz.
- Guérin, A., Rønning, H. T., Dargaignaratz, C., Clavel, T., Broussolle, V., Mahillon, J., Granum, P. E., & Nguyen-The, C. (2017). Cereulide production by *Bacillus weihenstephanensis* strains during growth at different pH values and temperatures. *Food Microbiology*, 65, 130–135. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.02.006>
- Guinebretière, M.-H., Auger, S., Galleron, N., Contzen, M., De Sarrau, B., De Buyser, M.-L., Lamberet, G., Fagerlund, A., Granum, P. E., Lereclus, D., De Vos, P., Nguyen-The, C., & Sorokin, A. (2013). *Bacillus cytotoxicus* sp. nov. is a novel thermotolerant species of the

- Bacillus cereus* Group occasionally associated with food poisoning. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63(Pt 1), 31–40.  
<https://doi.org/10.1099/ijs.0.030627-0>
- Harms, A., Maisonneuve, E., & Gerdes, K. (2016). Mechanisms of bacterial persistence during stress and antibiotic exposure. *Science (New York, N.Y.)*, 354(6318), aaf4268.  
<https://doi.org/10.1126/science.aaf4268>
- Harshey, R. M. (2003). Bacterial motility on a surface: many ways to a common goal. *Annual Review of Microbiology*, 57, 249–273.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.micro.57.030502.091014>
- Harshman, R. B., & Yamazaki, H. (1971). Formation of ppGpp in a relaxed and stringent strain of *Escherichia coli* during diauxic lag. *Biochemistry*, 10(21), 3980–3982.  
<https://doi.org/10.1021/bi00797a027>
- Harvie, D. R., Vílchez, S., Steggles, J. R., & Ellar, D. J. (2005). *Bacillus cereus* Fur regulates iron metabolism and is required for full virulence. *Microbiology (Reading, England)*, 151(Pt 2), 569–577. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27744-0>
- Haurlyuk, V., Atkinson, G. C., Murakami, K. S., Tenson, T., & Gerdes, K. (2015a). Recent functional insights into the role of (p)ppGpp in bacterial physiology. *Nature Reviews. Microbiology*, 13(5), 298–309. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3448>
- Helgason, E., Okstad, O. A., Caugant, D. A., Johansen, H. A., Fouet, A., Mock, M., Hegna, I., & Kolstø, A. B. (2000). *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis*--one species on the basis of genetic evidence. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(6), 2627–2630. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.6.2627-2630.2000>
- Helgason, E., Tourasse, N. J., Meisal, R., Caugant, D. A., & Kolstø, A.-B. (2004). Multilocus sequence typing scheme for bacteria of the *Bacillus cereus* group. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(1), 191–201. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.1.191-201.2004>

- Hill, K. K., Ticknor, L. O., Okinaka, R. T., Asay, M., Blair, H., Bliss, K. A., Laker, M., Pardington, P. E., Richardson, A. P., Tonks, M., Beecher, D. J., Kemp, J. D., Kolstø, A.-B., Wong, A. C. L., Keim, P., & Jackson, P. J. (2004). Fluorescent Amplified Fragment Length Polymorphism Analysis of *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis* Isolates. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(2), 1068–1080. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.2.1068-1080.2004>
- Hong, H. A., Duc, L. H., & Cutting, S. M. (2005). The use of bacterial spore formers as probiotics. *FEMS Microbiology Reviews*, 29(4), 813–835. <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2004.12.001>
- Horneck, G., Bücker, H., & Reitz, G. (1994). Long-term survival of bacterial spores in space. *Advances in Space Research*, 14(10), 41–45. [https://doi.org/10.1016/0273-1177\(94\)90448-0](https://doi.org/10.1016/0273-1177(94)90448-0)
- Houry, A., Briandet, R., Aymerich, S., & Gohar, M. (2010). Involvement of motility and flagella in *Bacillus cereus* biofilm formation. *Microbiology (Reading, England)*, 156(Pt 4), 1009–1018. <https://doi.org/10.1099/mic.0.034827-0>
- Houry, A., Gohar, M., Deschamps, J., Tischenko, E., Aymerich, S., Gruss, A., & Briandet, R. (2012). Bacterial swimmers that infiltrate and take over the biofilm matrix. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(32), 13088–13093. <https://doi.org/10.1073/pnas.1200791109>
- Hubrecht, R. C., & Carter, E. (2019). The 3Rs and Humane Experimental Technique: Implementing Change. *Animals: An Open Access Journal from MDPI*, 9(10), E754. <https://doi.org/10.3390/ani9100754>
- Jensen, G. B., Hansen, B. M., Eilenberg, J., & Mahillon, J. (2003). The hidden lifestyles of *Bacillus cereus* and relatives. *Environmental Microbiology*, 5(8), 631–640. <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2003.00461.x>
- Jiménez, G., Blanch, A. R., Tamames, J., & Rosselló-Mora, R. (2013). Complete Genome Sequence of *Bacillus toyonensis* BCT-7112T, the Active Ingredient of the Feed Additive

- Preparation Toyocerin. *Genome Announcements*, 1(6), e01080-13.  
<https://doi.org/10.1128/genomeA.01080-13>
- Jiménez, G., Urdiain, M., Cifuentes, A., López-López, A., Blanch, A. R., Tamames, J., Kämpfer, P., Kolstø, A.-B., Ramón, D., Martínez, J. F., Codoñer, F. M., & Rosselló-Móra, R. (2013). Description of *Bacillus toyonensis* sp. nov., a novel species of the *Bacillus cereus* group, and pairwise genome comparisons of the species of the group by means of ANI calculations. *Systematic and Applied Microbiology*, 36(6), 383–391.  
<https://doi.org/10.1016/j.syapm.2013.04.008>
- Kamar, R., Réjasse, A., Jéhanno, I., Attieh, Z., Courtin, P., Chapot-Chartier, M.-P., Nielsen-Leroux, C., Lereclus, D., El Chamy, L., Kallassy, M., & Sanchis-Borja, V. (2017). DltX of *Bacillus thuringiensis* Is Essential for D-Alanylation of Teichoic Acids and Resistance to Antimicrobial Response in Insects. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1437.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01437>
- Kamp, H. D., Patimalla-Dipali, B., Lazinski, D. W., Wallace-Gadsden, F., & Camilli, A. (2013). Gene fitness landscapes of *Vibrio cholerae* at important stages of its life cycle. *PLoS Pathogens*, 9(12), e1003800. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003800>
- Kazek, M., Kaczmarek, A., Wrońska, A. K., & Boguś, M. I. (2019). Diet influences the bacterial and free fatty acid profiles of the cuticle of *Galleria mellonella* larvae. *PloS One*, 14(2), e0211697. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0211697>
- Kim, J.-S., & Wood, T. K. (2016). Persistent Persister Misperceptions. *Frontiers in Microbiology*, 7, 2134. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02134>
- Koch, R. (2018). Die Ätiologie der Milzbrand-Krankheit, begründet auf die Entwicklungsgeschichte des *Bacillus Anthracis* (1876). In C. Gradmann, *Robert Koch* (pp. 19–43). Springer Berlin Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/978-3-662-56454-7\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-662-56454-7_2)

- Kolenbrander, P. E., Palmer, R. J., Periasamy, S., & Jakubovics, N. S. (2010). Oral multispecies biofilm development and the key role of cell-cell distance. *Nature Reviews. Microbiology*, 8(7), 471–480. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2381>
- Kolstø, A. B., Lereclus, D., & Mock, M. (2002). Genome structure and evolution of the *Bacillus cereus* group. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 264(2), 95–108.
- Koné, K. M., Hinnekens, P., Jovanovic, J., Rajkovic, A., & Mahillon, J. (2021). New Insights into the Potential Cytotoxic Role of *Bacillus cytotoxicus* Cytotoxin K-1. *Toxins*, 13(10), 698. <https://doi.org/10.3390/toxins13100698>
- Kordes, A., Grahl, N., Koska, M., Preusse, M., Arce-Rodriguez, A., Abraham, W.-R., Kaefer, V., & Häussler, S. (2019). Establishment of an induced memory response in *Pseudomonas aeruginosa* during infection of a eukaryotic host. *The ISME Journal*, 13(8), 2018–2030. <https://doi.org/10.1038/s41396-019-0412-1>
- Korelitz, B. I., & Sommers, S. C. (1975). Responses to drug therapy in ulcerative colitis. Evaluation by rectal biopsy and histopathological changes. *The American Journal of Gastroenterology*, 64(5), 365–370.
- Kotiranta, A., Lounatmaa, K., & Haapasalo, M. (2000). Epidemiology and pathogenesis of *Bacillus cereus* infections. *Microbes and Infection*, 2(2), 189–198. [https://doi.org/10.1016/s1286-4579\(00\)00269-0](https://doi.org/10.1016/s1286-4579(00)00269-0)
- Kumar, G., & Khan, M. S. (2018). Study of the life cycle of greater wax moth (*Galleria mellonella*) under storage conditions in relation to different weather conditions. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 6(3), 444–447. <https://www.entomoljournal.com/archives/?year=2018&vol=6&issue=3&ArticleId=3600>
- Kumar, J., Ramlal, A., Mallick, D., & Mishra, V. (2021). An Overview of Some Biopesticides and Their Importance in Plant Protection for Commercial Acceptance. *Plants (Basel, Switzerland)*, 10(6), 1185. <https://doi.org/10.3390/plants10061185>

- Kurniawan, A., & Chuang, H.-W. (2022). Rhizobacterial *Bacillus mycoides* functions in stimulating the antioxidant defence system and multiple phytohormone signalling pathways to regulate plant growth and stress tolerance. *Journal of Applied Microbiology*, *132*(2), 1260–1274. <https://doi.org/10.1111/jam.15252>
- Kwadha, C. A., Ong'amo, G. O., Ndegwa, P. N., Raina, S. K., & Fombong, A. T. (2017). The Biology and Control of the Greater Wax Moth, *Galleria mellonella*. *Insects*, *8*(2), E61. <https://doi.org/10.3390/insects8020061>
- Lacey, L. A., Grzywacz, D., Shapiro-Ilan, D. I., Frutos, R., Brownbridge, M., & Goettel, M. S. (2015). Insect pathogens as biological control agents: Back to the future. *Journal of Invertebrate Pathology*, *132*, 1–41. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2015.07.009>
- Lambert, G., Kussell, E., & Kussel, E. (2014). Memory and fitness optimization of bacteria under fluctuating environments. *PLoS Genetics*, *10*(9), e1004556. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004556>
- Lange, A., Beier, S., Huson, D. H., Parusel, R., Iglauer, F., & Frick, J.-S. (2018). Genome Sequence of *Galleria mellonella* (Greater Wax Moth). *Genome Announcements*, *6*(2), e01220-17. <https://doi.org/10.1128/genomeA.01220-17>
- Lapidus, A., Goltsman, E., Auger, S., Galleron, N., Ségurens, B., Dossat, C., Land, M. L., Broussolle, V., Brillard, J., Guinebretiere, M.-H., Sanchis, V., Nguen-the, C., Lereclus, D., Richardson, P., Wincker, P., Weissenbach, J., Ehrlich, S. D., & Sorokin, A. (2008). Extending the *Bacillus cereus* group genomics to putative food-borne pathogens of different toxicity. *Chemico-Biological Interactions*, *171*(2), 236–249. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2007.03.003>
- Lechner, S., Mayr, R., Francis, K. P., Prüss, B. M., Kaplan, T., Wiessner-Gunkel, E., Stewart, G. S., & Scherer, S. (1998). *Bacillus weihenstephanensis* sp. nov. is a new psychrotolerant species of the *Bacillus cereus* group. *International Journal of Systematic Bacteriology*, *48 Pt 4*, 1373–1382. <https://doi.org/10.1099/00207713-48-4-1373>

- Lereclus, D., Agaisse, H., Gominet, M., Salamitou, S., & Sanchis, V. (1996). Identification of a *Bacillus thuringiensis* gene that positively regulates transcription of the phosphatidylinositol-specific phospholipase C gene at the onset of the stationary phase. *Journal of Bacteriology*, *178*(10), 2749–2756. <https://doi.org/10.1128/jb.178.10.2749-2756.1996>
- Lereclus, D., Agaisse, H., Grandvalet, C., Salamitou, S., & Gominet, M. (2000). Regulation of toxin and virulence gene transcription in *Bacillus thuringiensis*. *International Journal of Medical Microbiology: IJMM*, *290*(4–5), 295–299. [https://doi.org/10.1016/S1438-4221\(00\)80024-7](https://doi.org/10.1016/S1438-4221(00)80024-7)
- Lewis, K. (2010). Persister cells. *Annual Review of Microbiology*, *64*, 357–372. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.112408.134306>
- Li, H., Ai, C., Zhao, X., Pang, B., Xu, X., Wu, W., Liu, G., Jiang, C., Pan, Z., & Shi, J. (2022). The capability of *Bacillus pseudomycooides* from soil to remove Cu(II) in water and prevent it from entering plants. *Journal of Applied Microbiology*, *132*(3), 1914–1925. <https://doi.org/10.1111/jam.15343>
- Li, L., Mendis, N., Trigui, H., Oliver, J. D., & Faucher, S. P. (2014). The importance of the viable but non-culturable state in human bacterial pathogens. *Frontiers in Microbiology*, *5*, 258. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00258>
- Liang, X., Zhu, J., Zhao, Z., Zheng, F., Zhang, H., Wei, J., Ji, Y., & Ji, Y. (2017). The *pag* Gene of pXO1 Is Involved in Capsule Biosynthesis of *Bacillus anthracis* Pasteur II Strain. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *7*, 203. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00203>
- Lin, Y., Briandet, R., & Kovács, Á. T. (2022). *Bacillus cereus sensu lato* biofilm formation and its ecological importance. *Biofilm*, *4*, 100070. <https://doi.org/10.1016/j.bioflm.2022.100070>
- Liu, S., Brul, S., & Zaat, S. A. J. (2021). Isolation of Persister Cells of *Bacillus subtilis* and Determination of Their Susceptibility to Antimicrobial Peptides. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(18), 10059. <https://doi.org/10.3390/ijms221810059>

- Liu, W., He, Z., Gao, F., Yan, J., & Huang, X. (2018). Sensor kinase KinB and its pathway-associated key factors sense the signal of nutrition starvation in sporulation of *Bacillus subtilis*. *MicrobiologyOpen*, 7(3), e00566. <https://doi.org/10.1002/mbo3.566>
- Liu, Y., Lai, Q., Göker, M., Meier-Kolthoff, J. P., Wang, M., Sun, Y., Wang, L., & Shao, Z. (2015). Genomic insights into the taxonomic status of the *Bacillus cereus* group. *Scientific Reports*, 5, 14082. <https://doi.org/10.1038/srep14082>
- Lotoux, A., Milohanic, E., & Bierne, H. (2022). The Viable But Non-Culturable State of *Listeria monocytogenes* in the One-Health Continuum. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12, 849915. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.849915>
- Lu, A., Zhang, Q., Zhang, J., Yang, B., Wu, K., Xie, W., Luan, Y.-X., & Ling, E. (2014). Insect prophenoloxidase: the view beyond immunity. *Frontiers in Physiology*, 5, 252. <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00252>
- Lücking, G., Dommel, M. K., Scherer, S., Fouet, A., & Ehling-Schulz, M. (2009). Cereulide synthesis in emetic *Bacillus cereus* is controlled by the transition state regulator AbrB, but not by the virulence regulator PlcR. *Microbiology (Reading, England)*, 155(Pt 3), 922–931. <https://doi.org/10.1099/mic.0.024125-0>
- Luo, T., Hou, S., Yang, L., Qi, G., & Zhao, X. (2018). Nematodes avoid and are killed by *Bacillus mycoides*-produced styrene. *Journal of Invertebrate Pathology*, 159, 129–136. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2018.09.006>
- Madriz-Ordeñana, K., Pazarlar, S., Jørgensen, H. J. L., Nielsen, T. K., Zhang, Y., Nielsen, K. L., Hansen, L. H., & Thordal-Christensen, H. (2022). The *Bacillus cereus* Strain EC9 Primes the Plant Immune System for Superior Biocontrol of *Fusarium oxysporum*. *Plants*, 11(5), 687. <https://doi.org/10.3390/plants11050687>
- Majeed, M., Majeed, S., Nagabhushanam, K., Punnapuzha, A., Philip, S., & Mundkur, L. (2018). Rapid assessment of viable but non-culturable *Bacillus coagulans* MTCC 5856 in commercial

- formulations using Flow cytometry. *PloS One*, *13*(2), e0192836.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192836>
- Mandic-Mulec, I., Doukhan, L., & Smith, I. (1995). The *Bacillus subtilis* SinR protein is a repressor of the key sporulation gene *spo0A*. *Journal of Bacteriology*, *177*(16), 4619–4627.  
<https://doi.org/10.1128/jb.177.16.4619-4627.1995>
- Maravilla, E., Le, D. P., Tran, J. J., Chiu, M. H., Prenner, E. J., & Weers, P. M. M. (2020). Apolipoprotein III interaction with phosphatidylglycerol and lipopolysaccharide: A potential mechanism for antimicrobial activity. *Chemistry and Physics of Lipids*, *229*, 104909.  
<https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2020.104909>
- Mazzantini, D., Celandroni, F., Salvetti, S., Gueye, S. A., Lupetti, A., Senesi, S., & Ghelardi, E. (2016). FlhF Is Required for Swarming Motility and Full Pathogenicity of *Bacillus cereus*. *Frontiers in Microbiology*, *7*, 1644. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01644>
- McCoy, W. F., Bryers, J. D., Robbins, J., & Costerton, J. W. (1981). Observations of fouling biofilm formation. *Canadian Journal of Microbiology*, *27*(9), 910–917.  
<https://doi.org/10.1139/m81-143>
- Mehrotra, T., Zaman, M. N., Prasad, B. B., Shukla, A., Aggarwal, S., & Singh, R. (2020). Rapid immobilization of viable *Bacillus pseudomycoloides* in polyvinyl alcohol/glutaraldehyde hydrogel for biological treatment of municipal wastewater. *Environmental Science and Pollution Research International*, *27*(9), 9167–9180. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-07296-z>
- Ménard, G., Rouillon, A., Cattoir, V., & Donnio, P.-Y. (2021). *Galleria mellonella* as a Suitable Model of Bacterial Infection: Past, Present and Future. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *11*, 782733. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.782733>
- Mendoza-Almanza, G., Esparza-Ibarra, E. L., Ayala-Luján, J. L., Mercado-Reyes, M., Godina-González, S., Hernández-Barrales, M., & Olmos-Soto, J. (2020). The Cytocidal Spectrum of

- Bacillus thuringiensis* Toxins: From Insects to Human Cancer Cells. *Toxins*, 12(5), 301.  
<https://doi.org/10.3390/toxins12050301>
- Méric, G., Mageiros, L., Pascoe, B., Woodcock, D. J., Mourkas, E., Lambie, S., Bowden, R., Jolley, K. A., Raymond, B., & Sheppard, S. K. (2018). Lineage-specific plasmid acquisition and the evolution of specialized pathogens in *Bacillus thuringiensis* and the *Bacillus cereus* group. *Molecular Ecology*, 27(7), 1524–1540. <https://doi.org/10.1111/mec.14546>
- Michiels, J. E., Van den Bergh, B., Verstraeten, N., & Michiels, J. (2016). Molecular mechanisms and clinical implications of bacterial persistence. *Drug Resistance Updates: Reviews and Commentaries in Antimicrobial and Anticancer Chemotherapy*, 29, 76–89.  
<https://doi.org/10.1016/j.drug.2016.10.002>
- Mirouze, N., & Dubnau, D. (2013). Chance and Necessity in *Bacillus subtilis* Development. *Microbiology Spectrum*, 1(1). <https://doi.org/10.1128/microbiolspectrum.TBS-0004-2012>
- Mitchell, A., Romano, G. H., Groisman, B., Yona, A., Dekel, E., Kupiec, M., Dahan, O., & Pilpel, Y. (2009). Adaptive prediction of environmental changes by microorganisms. *Nature*, 460(7252), 220–224. <https://doi.org/10.1038/nature08112>
- Moayeri, M., Leppla, S. H., Vrentas, C., Pomerantsev, A. P., & Liu, S. (2015). Anthrax Pathogenesis. *Annual Review of Microbiology*, 69(1), 185–208.  
<https://doi.org/10.1146/annurev-micro-091014-104523>
- Moir, A., & Cooper, G. (2015). Spore Germination. *Microbiology Spectrum*, 3(6).  
<https://doi.org/10.1128/microbiolspec.TBS-0014-2012>
- Mols, M., & Abee, T. (2011). *Bacillus cereus* responses to acid stress: *Bacillus cereus* responses to acid stress. *Environmental Microbiology*, 13(11), 2835–2843.  
<https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02490.x>

- Mowlds, P., & Kavanagh, K. (2008). Effect of pre-incubation temperature on susceptibility of *Galleria mellonella* larvae to infection by *Candida albicans*. *Mycopathologia*, 165(1), 5–12. <https://doi.org/10.1007/s11046-007-9069-9>
- Mutlu, A., Trauth, S., Ziesack, M., Nagler, K., Bergeest, J.-P., Rohr, K., Becker, N., Höfer, T., & Bischofs, I. B. (2018). Phenotypic memory in *Bacillus subtilis* links dormancy entry and exit by a spore quantity-quality tradeoff. *Nature Communications*, 9(1), 69. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02477-1>
- Nakamura, L. K. (1998). *Bacillus pseudomycooides* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 48 Pt 3, 1031–1035. <https://doi.org/10.1099/00207713-48-3-1031>
- Nakhleh, J., Christophides, G. K., & Osta, M. A. (2017). The serine protease homolog CLIPA14 modulates the intensity of the immune response in the mosquito *Anopheles gambiae*. *The Journal of Biological Chemistry*, 292(44), 18217–18226. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.797787>
- Nappi, A., Poirié, M., & Carton, Y. (2009). The role of melanization and cytotoxic by-products in the cellular immune responses of *Drosophila* against parasitic wasps. *Advances in Parasitology*, 70, 99–121. [https://doi.org/10.1016/S0065-308X\(09\)70004-1](https://doi.org/10.1016/S0065-308X(09)70004-1)
- Nielsen-Leroux, C., Gaudriault, S., Ramarao, N., Lereclus, D., & Givaudan, A. (2012). How the insect pathogen bacteria *Bacillus thuringiensis* and *Xenorhabdus/Photorhabdus* occupy their hosts. *Current Opinion in Microbiology*, 15(3), 220–231. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2012.04.006>
- Ochiai, K., Kurita-Ochiai, T., Kamino, Y., & Ikeda, T. (1993). Effect of co-aggregation on the pathogenicity of oral bacteria. *Journal of Medical Microbiology*, 39(3), 183–190. <https://doi.org/10.1099/00222615-39-3-183>

- Oliver, J. D., Nilsson, L., & Kjelleberg, S. (1991). Formation of nonculturable *Vibrio vulnificus* cells and its relationship to the starvation state. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(9), 2640–2644. <https://doi.org/10.1128/aem.57.9.2640-2644.1991>
- Parashar, V., Mirouze, N., Dubnau, D. A., & Neiditch, M. B. (2011). Structural basis of response regulator dephosphorylation by Rap phosphatases. *PLoS Biology*, 9(2), e1000589. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000589>
- Paredes, C. J., Alsaker, K. V., & Papoutsakis, E. T. (2005). A comparative genomic view of clostridial sporulation and physiology. *Nature Reviews Microbiology*, 3(12), 969–978. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1288>
- Perchat, S., Talagas, A., Poncet, S., Lazar, N., Li de la Sierra-Gallay, I., Gohar, M., Lereclus, D., & Nessler, S. (2016). How Quorum Sensing Connects Sporulation to Necrotrophism in *Bacillus thuringiensis*. *PLoS Pathogens*, 12(8), e1005779. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005779>
- Pereira, T. C., de Barros, P. P., Fugisaki, L. R. de O., Rossoni, R. D., Ribeiro, F. de C., de Menezes, R. T., Junqueira, J. C., & Scorzoni, L. (2018). Recent Advances in the Use of *Galleria mellonella* Model to Study Immune Responses against Human Pathogens. *Journal of Fungi (Basel, Switzerland)*, 4(4), E128. <https://doi.org/10.3390/jof4040128>
- Phillips, Z. E. V., & Strauch, M. A. (2002). *Bacillus subtilis* sporulation and stationary phase gene expression. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 59(3), 392–402. <https://doi.org/10.1007/s00018-002-8431-9>
- Piggot, P. J., & Coote, J. G. (1976). Genetic aspects of bacterial endospore formation. *Bacteriological Reviews*, 40(4), 908–962. <https://doi.org/10.1128/br.40.4.908-962.1976>
- Piggot, P. J., & Hilbert, D. W. (2004). Sporulation of *Bacillus subtilis*. *Current Opinion in Microbiology*, 7(6), 579–586. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2004.10.001>

- Popp, P. F., & Mascher, T. (2019). Coordinated Cell Death in Isogenic Bacterial Populations: Sacrificing Some for the Benefit of Many? *Journal of Molecular Biology*, *431*(23), 4656–4669. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.04.024>
- Pramanik, S. K., Mahmud, S., Paul, G. K., Jabin, T., Naher, K., Uddin, M. S., Zaman, S., & Saleh, M. A. (2021). Fermentation optimization of cellulase production from sugarcane bagasse by *Bacillus pseudomycooides* and molecular modeling study of cellulase. *Current Research in Microbial Sciences*, *2*, 100013. <https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2020.100013>
- Premkrishnan, B. N. V., Heinle, C. E., Uchida, A., Purbojati, R. W., Kushwaha, K. K., Putra, A., Santhi, P. S., Khoo, B. W. Y., Wong, A., Vettath, V. K., Drautz-Moses, D. I., Junqueira, A. C. M., & Schuster, S. C. (2021). The genomic characterisation and comparison of *Bacillus cereus* strains isolated from indoor air. *Gut Pathogens*, *13*(1), 6. <https://doi.org/10.1186/s13099-021-00399-4>
- Rasko, D. A., Altherr, M. R., Han, C. S., & Ravel, J. (2005). Genomics of the *Bacillus cereus* group of organisms. *FEMS Microbiology Reviews*, *29*(2), 303–329. <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2004.12.005>
- Rasko, D. A., Rosovitz, M. J., Økstad, O. A., Fouts, D. E., Jiang, L., Cer, R. Z., Kolstø, A.-B., Gill, S. R., & Ravel, J. (2007). Complete sequence analysis of novel plasmids from emetic and periodontal *Bacillus cereus* isolates reveals a common evolutionary history among the *B. cereus*-group plasmids, including *Bacillus anthracis* pXO1. *Journal of Bacteriology*, *189*(1), 52–64. <https://doi.org/10.1128/JB.01313-06>
- Raymond, B., Johnston, P. R., Nielsen-Leroux, C., Lereclus, D., & Crickmore, N. (2010). *Bacillus thuringiensis*: an impotent pathogen? *Trends in Microbiology*, *18*(5), 189–194. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2010.02.006>
- Réjasse, A., Gilois, N., Barbosa, I., Huillet, E., Bevilacqua, C., Tran, S., Ramarao, N., Stenfors Arnesen, L. P., & Sanchis, V. (2012). Temperature-dependent production of various PlcR-

- controlled virulence factors in *Bacillus weihenstephanensis* strain KBAB4. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(8), 2553–2561. <https://doi.org/10.1128/AEM.07446-11>
- Rittershaus, E. S. C., Baek, S.-H., & Sasseti, C. M. (2013a). The normalcy of dormancy: common themes in microbial quiescence. *Cell Host & Microbe*, 13(6), 643–651. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2013.05.012>
- Rittershaus, E. S. C., Baek, S.-H., & Sasseti, C. M. (2013b). The normalcy of dormancy: common themes in microbial quiescence. *Cell Host & Microbe*, 13(6), 643–651. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2013.05.012>
- Rittershaus, E. S. C., Baek, S.-H., & Sasseti, C. M. (2013c). The normalcy of dormancy: common themes in microbial quiescence. *Cell Host & Microbe*, 13(6), 643–651. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2013.05.012>
- Robben, C., Witte, A. K., Schoder, D., Stessl, B., Rossmanith, P., & Mester, P. (2019). A Fast and Easy ATP-Based Approach Enables MIC Testing for Non-resuscitating VBNC Pathogens. *Frontiers in Microbiology*, 10, 1365. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01365>
- Rocha-Estrada, J., Aceves-Diez, A. E., Guarneros, G., & de la Torre, M. (2010). The RNPP family of quorum-sensing proteins in Gram-positive bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87(3), 913–923. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2651-y>
- Rojas-Solis, D., Vences-Guzmán, M. A., Sohlenkamp, C., & Santoyo, G. (2020). *Bacillus toyonensis* COPE52 Modifies Lipid and Fatty Acid Composition, Exhibits Antifungal Activity, and Stimulates Growth of Tomato Plants Under Saline Conditions. *Current Microbiology*, 77(10), 2735–2744. <https://doi.org/10.1007/s00284-020-02069-1>
- Romero, D., Vlamakis, H., Losick, R., & Kolter, R. (2011). An accessory protein required for anchoring and assembly of amyloid fibres in *B. subtilis* biofilms. *Molecular Microbiology*, 80(5), 1155–1168. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07653.x>

- Rousset, L., Alpha-Bazin, B., Château, A., Armengaud, J., Clavel, T., Berge, O., & Duport, C. (2020). Groundwater promotes emergence of asporogenic mutants of emetic *BACILLUS CEREBUS*. *Environmental Microbiology*, 22(12), 5248–5264. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15203>
- Rowan, N. J. (2004). Viable but non-culturable forms of food and waterborne bacteria: *Quo Vadis?* *Trends in Food Science & Technology*, 15(9), 462–467. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2004.02.009>
- Salamitou, S., Ramisse, F., Brehélin, M., Bourguet, D., Gilois, N., Gominet, M., Hernandez, E., & Lereclus, D. (2000). The *plcR* regulon is involved in the opportunistic properties of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus* in mice and insects. *Microbiology*, 146(11), 2825–2832. <https://doi.org/10.1099/00221287-146-11-2825>
- Sánchez-Romero, M. A., & Casadesús, J. (2014). Contribution of phenotypic heterogeneity to adaptive antibiotic resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(1), 355–360. <https://doi.org/10.1073/pnas.1316084111>
- Santos, F. D. S., Maubrigades, L. R., Gonçalves, V. S., Alves Ferreira, M. R., Brasil, C. L., Cunha, R. C., Conceição, F. R., & Leite, F. P. L. (2021). Immunomodulatory effect of short-term supplementation with *Bacillus toyonensis* BCT-7112T and *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745 in sheep vaccinated with *Clostridium chauvoei*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 237, 110272. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2021.110272>
- Santos, F. D. S., Menegon, Y. A., Piraine, R. E. A., Rodrigues, P. R. C., Cunha, R. C., & Leite, F. P. L. (2018). *Bacillus toyonensis* improves immune response in the mice vaccinated with recombinant antigen of bovine herpesvirus type 5. *Beneficial Microbes*, 9(1), 133–142. <https://doi.org/10.3920/BM2017.0021>
- Schink, S. J., Biselli, E., Ammar, C., & Gerland, U. (2019). Death Rate of *E. coli* during Starvation Is Set by Maintenance Cost and Biomass Recycling. *Cell Systems*, 9(1), 64–73.e3. <https://doi.org/10.1016/j.cels.2019.06.003>

- Schmidt, T. R., Scott, E. J., & Dyer, D. W. (2011). Whole-genome phylogenies of the family *Bacillaceae* and expansion of the sigma factor gene family in the *Bacillus cereus* species-group. *BMC Genomics*, *12*, 430. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-430>
- Schnepf, E., Crickmore, N., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., Zeigler, D. R., & Dean, D. H. (1998). *Bacillus thuringiensis* and Its Pesticidal Crystal Proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *62*(3), 775–806. <https://doi.org/10.1128/MMBR.62.3.775-806.1998>
- Schultz, D., Wolynes, P. G., Jacob, E. B., & Onuchic, J. N. (2009). Deciding fate in adverse times: Sporulation and competence in *Bacillus subtilis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *106*(50), 21027–21034. <https://doi.org/10.1073/pnas.0912185106>
- Schwartz, M. (2009). Dr. Jekyll and Mr. Hyde: a short history of anthrax. *Molecular Aspects of Medicine*, *30*(6), 347–355. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2009.06.004>
- Segev, E., Smith, Y., & Ben-Yehuda, S. (2012). RNA Dynamics in Aging Bacterial Spores. *Cell*, *148*(1–2), 139–149. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.11.059>
- Segond, D., Abi Khalil, E., Buisson, C., Daou, N., Kallassy, M., Lereclus, D., Arosio, P., Bou-Abdallah, F., & Nielsen Le Roux, C. (2014). Iron acquisition in *Bacillus cereus*: the roles of IIsA and bacillibactin in exogenous ferritin iron mobilization. *PLoS Pathogens*, *10*(2), e1003935. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003935>
- Shafikhani, S. H., Mandic-Mulec, I., Strauch, M. A., Smith, I., & Leighton, T. (2002). Postexponential regulation of sin operon expression in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, *184*(2), 564–571. <https://doi.org/10.1128/JB.184.2.564-571.2002>
- Shaik, H. A., Mishra, A., & Sehnal, F. (2017). Silk recycling in larvae of the wax moth, *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae). *European Journal of Entomology*. <https://www.eje.cz/artkey/eje-201701->

0009\_Silk\_recycling\_in\_larvae\_of\_the\_wax\_moth\_Galleria\_mellonella\_Lepidoptera\_Pyralid  
ae.php

- Sheehan, G., Dixon, A., & Kavanagh, K. (2019). Utilization of *Galleria mellonella* larvae to characterize the development of *Staphylococcus aureus* infection. *Microbiology*, *165*(8), 863–875. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000813>
- Sheehan, G., Garvey, A., Croke, M., & Kavanagh, K. (2018). Innate humoral immune defences in mammals and insects: The same, with differences? *Virulence*, *9*(1), 1625–1639. <https://doi.org/10.1080/21505594.2018.1526531>
- Sheehan, G., Konings, M., Lim, W., Fahal, A., Kavanagh, K., & van de Sande, W. W. J. (2020). Proteomic analysis of the processes leading to *Madurella mycetomatis* grain formation in *Galleria mellonella* larvae. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *14*(4), e0008190. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008190>
- Singh, R. K., Singh, P., Li, H.-B., Song, Q.-Q., Guo, D.-J., Solanki, M. K., Verma, K. K., Malviya, M. K., Song, X.-P., Lakshmanan, P., Yang, L.-T., & Li, Y.-R. (2020). Diversity of nitrogen-fixing rhizobacteria associated with sugarcane: a comprehensive study of plant-microbe interactions for growth enhancement in *Saccharum spp.* *BMC Plant Biology*, *20*(1), 220. <https://doi.org/10.1186/s12870-020-02400-9>
- Slamti, L., & Lereclus, D. (2002). A cell-cell signaling peptide activates the PlcR virulence regulon in bacteria of the *Bacillus cereus* group. *The EMBO Journal*, *21*(17), 4550–4559. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdf450>
- Slamti, L., Perchat, S., Huillet, E., & Lereclus, D. (2014). Quorum sensing in *Bacillus thuringiensis* is required for completion of a full infectious cycle in the insect. *Toxins*, *6*(8), 2239–2255. <https://doi.org/10.3390/toxins6082239>

- Smakman, F., & Hall, A. R. (2022). Exposure to lysed bacteria can promote or inhibit growth of neighboring live bacteria depending on local abiotic conditions. *FEMS Microbiology Ecology*, 98(2), fiac011. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiac011>
- Smith, T. L. (1938). Genetical Studies on the Wax Moth *Galleria Mellonella* Linn. *Genetics*, 23(1), 115–137. <https://doi.org/10.1093/genetics/23.1.115>
- Solmaz, K. B., Ozcan, Y., Mercan Dogan, N., Bozkaya, O., & Ide, S. (2018). Characterization and Production of Extracellular Polysaccharides (EPS) by *Bacillus Pseudomycoides* U10. *Environments*, 5(6), 63. <https://doi.org/10.3390/environments5060063>
- Soufiane, B., & Côté, J.-C. (2013). *Bacillus weihenstephanensis* characteristics are present in *Bacillus cereus* and *Bacillus mycoides* strains. *FEMS Microbiology Letters*, 341(2), 127–137. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12106>
- Stączek, S., Zdybicka-Barabas, A., Mak, P., Sowa-Jasiłek, A., Kedracka-Krok, S., Jankowska, U., Suder, P., Wydrych, J., Grygorczuk, K., Jakubowicz, T., & Cytryńska, M. (2018). Studies on localization and protein ligands of *Galleria mellonella* apolipoprotein III during immune response against different pathogens. *Journal of Insect Physiology*, 105, 18–27. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2017.12.009>
- Stenfors Arnesen, L. P., Fagerlund, A., & Granum, P. E. (2008). From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiology Reviews*, 32(4), 579–606. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00112.x>
- Stevens, M. J. A., Tasara, T., Klumpp, J., Stephan, R., Ehling-Schulz, M., & Johler, S. (2019). Whole-genome-based phylogeny of *Bacillus cytotoxicus* reveals different clades within the species and provides clues on ecology and evolution. *Scientific Reports*, 9(1), 1984. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36254-x>
- Sun, Y., Yang, L., Rodríguez-Cabrera, L., Ding, Y., Leng, C., Qiao, H., Huang, S., Kan, Y., Yao, L., Wright, D. J., Li, D., & Ayra-Pardo, C. (2021). Tandem Mass Tag-Based Quantitative

- Proteomics and Virulence Phenotype of Hemolymph-Treated *Bacillus thuringiensis kurstaki* Cells Reveal New Insights on Bacterial Pathogenesis in Insects. *Microbiology Spectrum*, 9(2), e0060421. <https://doi.org/10.1128/Spectrum.00604-21>
- Tagkopoulos, I., Liu, Y.-C., & Tavazoie, S. (2008). Predictive behavior within microbial genetic networks. *Science (New York, N.Y.)*, 320(5881), 1313–1317. <https://doi.org/10.1126/science.1154456>
- Takano, S., Pawlowska, B. J., Gudelj, I., Yomo, T., & Tsuru, S. (2017). Density-Dependent Recycling Promotes the Long-Term Survival of Bacterial Populations during Periods of Starvation. *MBio*, 8(1), e02336-16. <https://doi.org/10.1128/mBio.02336-16>
- Trapezar, M., Leouffre, T., Faure, M., Jensen, H. E., Granum, P. E., Cencic, A., & Hardy, S. P. (2011). The use of a porcine intestinal cell model system for evaluating the food safety risk of *Bacillus cereus* probiotics and the implications for assessing enterotoxigenicity. *APMIS: Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica*, 119(12), 877–884. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2011.02797.x>
- Tsai, C. J.-Y., Loh, J. M. S., & Proft, T. (2016). *Galleria mellonella* infection models for the study of bacterial diseases and for antimicrobial drug testing. *Virulence*, 7(3), 214–229. <https://doi.org/10.1080/21505594.2015.1135289>
- Van den Bergh, B., Fauvart, M., & Michiels, J. (2017). Formation, physiology, ecology, evolution and clinical importance of bacterial persisters. *FEMS Microbiology Reviews*, 41(3), 219–251. <https://doi.org/10.1093/femsre/fux001>
- Van Vliet, S. (2015). Bacterial Dormancy: How to Decide When to Wake Up. *Current Biology*, 25(17), R753–R755. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.07.039>
- Vega, N. M., & Gore, J. (2014). Collective antibiotic resistance: mechanisms and implications. *Current Opinion in Microbiology*, 21, 28–34. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2014.09.003>

- Vepachedu, V. R., & Setlow, P. (2007). Role of SpoVA proteins in release of dipicolinic acid during germination of *Bacillus subtilis* spores triggered by dodecylamine or lysozyme. *Journal of Bacteriology*, *189*(5), 1565–1572. <https://doi.org/10.1128/JB.01613-06>
- Verplaetse, E., Slamti, L., Gohar, M., & Lereclus, D. (2015). Cell Differentiation in a *Bacillus thuringiensis* Population during Planktonic Growth, Biofilm Formation, and Host Infection. *MBio*, *6*(3), e00138-00115. <https://doi.org/10.1128/mBio.00138-15>
- Verplaetse, E., Slamti, L., Gohar, M., & Lereclus, D. (2017). Two distinct pathways lead *Bacillus thuringiensis* to commit to sporulation in biofilm. *Research in Microbiology*, *168*(4), 388–393. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2016.03.006>
- Vlamakis, H., Aguilar, C., Losick, R., & Kolter, R. (2008). Control of cell fate by the formation of an architecturally complex bacterial community. *Genes & Development*, *22*(7), 945–953. <https://doi.org/10.1101/gad.1645008>
- Vlamakis, H., Chai, Y., Beauregard, P., Losick, R., & Kolter, R. (2013). Sticking together: building a biofilm the *Bacillus subtilis* way. *Nature Reviews. Microbiology*, *11*(3), 157–168. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2960>
- Wagley, S., Morcrette, H., Kovacs-Simon, A., Yang, Z. R., Power, A., Tennant, R. K., Love, J., Murray, N., Titball, R. W., & Butler, C. S. (2021). Bacterial dormancy: A subpopulation of viable but non-culturable cells demonstrates better fitness for revival. *PLoS Pathogens*, *17*(1), e1009194. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009194>
- Wang, Q., Ren, M., Liu, X., Xia, H., & Chen, K. (2019). Peptidoglycan recognition proteins in insect immunity. *Molecular Immunology*, *106*, 69–76. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2018.12.021>
- Wang, S., Zheng, Y., Gu, C., He, C., Yang, M., Zhang, X., Guo, J., Zhao, H., & Niu, D. (2018). *Bacillus cereus* AR156 Activates Defense Responses to *Pseudomonas syringae* pv. tomato in

- Arabidopsis thaliana* Similarly to flg22. *Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI*, 31(3), 311–322. <https://doi.org/10.1094/MPMI-10-17-0240-R>
- Wang, T., Liang, C., Zheng, M., Liu, L., An, Y., Xu, H., Xiao, S., & Nie, L. (2020). Ribosome Hibernation as a Stress Response of Bacteria. *Protein and Peptide Letters*, 27(11), 1082–1091. <https://doi.org/10.2174/0929866527666200610142118>
- Watson, S. P., Clements, M. O., & Foster, S. J. (1998). Characterization of the starvation-survival response of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, 180(7), 1750–1758. <https://doi.org/10.1128/JB.180.7.1750-1758.1998>
- Wenner, K. A., & Kenner, J. R. (2004). Anthrax. *Dermatologic Clinics*, 22(3), 247–256, v. <https://doi.org/10.1016/j.det.2004.03.001>
- Williams, L. D., Burdock, G. A., Jiménez, G., & Castillo, M. (2009). Literature review on the safety of Toyocerin, a non-toxigenic and non-pathogenic *Bacillus cereus* var. toyoi preparation. *Regulatory Toxicology and Pharmacology: RTP*, 55(2), 236–246. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2009.07.009>
- Wojda, I. (2017). Immunity of the greater wax moth *Galleria mellonella*. *Insect Science*, 24(3), 342–357. <https://doi.org/10.1111/1744-7917.12325>
- Wood, T. K., Knabel, S. J., & Kwan, B. W. (2013). Bacterial persister cell formation and dormancy. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(23), 7116–7121. <https://doi.org/10.1128/AEM.02636-13>
- Wu, G., Liu, Y., Ding, Y., & Yi, Y. (2016). Ultrastructural and functional characterization of circulating hemocytes from *Galleria mellonella* larva: Cell types and their role in the innate immunity. *Tissue & Cell*, 48(4), 297–304. <https://doi.org/10.1016/j.tice.2016.06.007>
- Wu, J.-J., Huang, J.-W., & Deng, W.-L. (2020). Phenylacetic Acid and Methylphenyl Acetate From the Biocontrol Bacterium *Bacillus mycooides* BM02 Suppress Spore Germination in

- Fusarium oxysporum* f. sp. lycopersici. *Frontiers in Microbiology*, 11, 569263.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.569263>
- Wu, M., Shan, W., Zhao, G.-P., & Lyu, L.-D. (2022). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration-dependent kinetics of gene expression: linking the intensity of oxidative stress and mycobacterial physiological adaptation. *Emerging Microbes & Infections*, 11(1), 573–584.  
<https://doi.org/10.1080/22221751.2022.2034484>
- Wu, N., He, L., Cui, P., Wang, W., Yuan, Y., Liu, S., Xu, T., Zhang, S., Wu, J., Zhang, W., & Zhang, Y. (2015). Ranking of persister genes in the same *Escherichia coli* genetic background demonstrates varying importance of individual persister genes in tolerance to different antibiotics. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1003. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01003>
- Xu, H.-S., Roberts, N., Singleton, F. L., Attwell, R. W., Grimes, D. J., & Colwell, R. R. (1982). Survival and viability of nonculturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in the estuarine and marine environment. *Microbial Ecology*, 8(4), 313–323.  
<https://doi.org/10.1007/BF02010671>
- Yi, Y., Li, Z., Song, C., & Kuipers, O. P. (2018). Exploring plant-microbe interactions of the rhizobacteria *Bacillus subtilis* and *Bacillus mycoides* by use of the CRISPR-Cas9 system. *Environmental Microbiology*, 20(12), 4245–4260. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14305>
- Zegarra, V., Bedrunka, P., Bange, G., & Czech, L. (2022). How to save a bacterial ribosome in times of stress. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, S1084-9521(22)00082-9.  
<https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2022.03.015>
- Zou, J., Kou, S.-H., Xie, R., VanNieuwenhze, M. S., Qu, J., Peng, B., & Zheng, J. (2020). Non-walled spherical *Acinetobacter baumannii* is an important type of persister upon  $\beta$ -lactam antibiotic treatment. *Emerging Microbes & Infections*, 9(1), 1149–1159.  
<https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1770630>

Zou, J., Peng, B., Qu, J., & Zheng, J. (2021). Are Bacterial Persisters Dormant Cells Only?

*Frontiers in Microbiology*, 12, 708580. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.708580>