

## Armand Lablaine

« Assemblage des couches externes des spores de *Bacillus cereus* : Acteurs et mécanismes » . 05 Juillet 2021

### Résumé

Les spores formées par le groupe *Bacillus cereus sensu lato* sont d'un intérêt sanitaire et économique particulier. Les agents pathogènes *B. cereus* et *B. anthracis* sont notamment et respectivement responsables de toxi-infections alimentaires très fréquentes et, de l'anthrax, une maladie rare mais souvent mortelle pour les mammifères. Les spores formées par ces espèces sont enveloppées par un exosporium, un feuillet protéique, par ailleurs absent de la bactérie modèle *B. subtilis*. L'exosporium est important pour contrôler les molécules qui accèdent aux couches plus internes de la spore et la protège ainsi d'évènements de germination dans des conditions qui seraient impropres à soutenir l'émergence d'une population bactérienne. Dans le cadre de l'anthrax, le lieu de germination de la spore est critique pour l'établissement d'une infection. Malgré ces fonctions importantes pour la bactérie, la connaissance des mécanismes moléculaires de l'assemblage de l'exosporium et plus largement des couches protéiques externes des spores de *B. cereus* demeure parcellaire. Dans le cadre de cette thèse, nous avons utilisé pour la première fois une approche de microscopie de fluorescence super-résolution « Structure Illumination » (SR-SIM) pour étudier la cinétique de sporulation de cellules de *B. cereus*. Cette approche nous a permis d'observer directement le développement des couches protéiques externes des spores et de déterminer le positionnement relatif des protéines importantes pour la genèse de l'exosporium. Ainsi, nous avons mis en évidence l'existence d'une armature faite de protéines morphogénétiques présentes autour de la spore, avant que les couches protéiques externes ne soient visibles. Par ailleurs, l'étude d'une souche de *B. cereus* dans laquelle l'engulfment est inachevé a révélé une divergence importante entre *B. subtilis* et *B. cereus* dans le contrôle de l'activation des facteurs sigma de la sporulation. Enfin, en prenant avantage de l'homogénéité particulière induite par une température de sporulation sous-optimale, nous avons mis en évidence les protéines associées à l'armature des couches protéiques externes qui se distinguent des protéines intervenant dans la maturation ultérieure de cette matrice en un coat, un interspace et un exosporium. L'ensemble de nos travaux posent de nouveaux jalons dans la compréhension des mécanismes moléculaires de l'assemblage des couches protéiques externes des spores de *B. cereus*.

### Abstract

The spores formed by the *Bacillus cereus sensu lato* group are of particular sanitary and economic interest. The pathogens *B. cereus* and *B. anthracis* are respectively responsible for very frequent food poisoning and anthrax, a rare but often fatal disease for mammals. The spores formed by these species are enveloped by an exosporium, a proteinaceous layer, which is absent in the model bacteria *B. subtilis*. The exosporium is important for controlling the molecules that access the innermost layers of the spore and thus protects it from germination events under conditions that would be unsuitable to support the emergence of a bacterial population. In the context of anthrax, the germination site of the spore is critical for the establishment of an infection. Despite these important functions for the bacteria, knowledge of the molecular mechanisms of exosporium assembly and more broadly of the outer protein layers of *B. cereus* spores remains mysterious. In this thesis, we used for the first time a super-resolution fluorescence microscopy "Structure Illumination" (SR-SIM) approach to study the sporulation kinetics of *B. cereus* cells. This approach allowed us to directly visualize the development of the outer protein layers of the spores and to determine the relative positioning of proteins important for the morphogenesis of the exosporium. Thus, we have demonstrated the existence of a scaffold made of morphogenetic proteins present around the spore, before the external protein layers are visible. Furthermore, the study of a *B. cereus* strain in which engulfment is incomplete revealed an important divergence between *B. subtilis* and *B. cereus* in the control of the activation of sigma factors of sporulation. Finally, taking advantage of the particular homogeneity induced by a suboptimal sporulation temperature, we have identified

proteins associated with the framework of the outer protein layers that are distinct from proteins involved in the subsequent maturation of this matrix into a coat, interspace and exosporium. All our work sets new milestones in the understanding of the molecular mechanisms of *B. cereus* spores outerlayers assembly.