



HAL
open science

Communication cellulaire et adaptation au cours du cycle de vie de *Bacillus thuringiensis*

Leyla Slamti

► **To cite this version:**

Leyla Slamti. Communication cellulaire et adaptation au cours du cycle de vie de *Bacillus thuringiensis*. Sciences du Vivant [q-bio]. Université paris sud, 2018. tel-04282914

HAL Id: tel-04282914

<https://hal.inrae.fr/tel-04282914>

Submitted on 13 Nov 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.

Mémoire présenté pour l'obtention du
diplôme d'habilitation à diriger des recherches

Spécialité : Microbiologie

**Communication cellulaire et adaptation au
cours du cycle de vie de *Bacillus thuringiensis***

Par
Leyla Slamti

Chargée de Recherche

Equipe Génétique Microbienne et Environnement
Institut Micalis, UMR 1319, INRA

Le 27 novembre 2018

Devant le jury composé de :

Mme Véronique Broussolle, DR INRA
M. Yves Dessaux, DR CNRS
M. Alain Givaudan, DR INRA
Mme Isabelle Martin-Verstraete, Pr. Université Denis Diderot
Mme Sylvie Nessler, Pr. Université Paris-Sud

Rapporteur
Rapporteur
Rapporteur
Examinatrice
Présidente

Sommaire

Curriculum vitae	3
Activités de recherche	4
Travaux antérieurs à mon recrutement (2000-2010).....	4
<i>Le régulon PlcR au sein du groupe Bacillus cereus : communication cellulaire, expression génétique et diversité</i>	4
<i>Caractérisation de la réponse au stress chez Vibrio cholerae via le facteur sigma alternatif RpoH et le système à deux-composant Cpx</i>	5
<i>Caractérisation de déterminants morphologiques chez les Leptospires</i>	7
Travaux effectués depuis mon recrutement à l'INRA en 2010	9
<i>Introduction</i>	9
Le groupe <i>Bacillus cereus</i>	9
La communication cellulaire et les RNPP	12
La communication cellulaire est requise tout au long du cycle de vie de <i>Bacillus thuringiensis</i> ..	13
<i>Résultats</i>	14
Communication cellulaire et virulence	15
Intégration de signaux environnementaux par le système PlcR-PapR.....	15
Etude de la coopérativité du système PlcR-PapR lors de l'infection.....	17
Mécanisme d'activation de PlcR par PapR.....	18
Perturbation du système PlcR-PapR et inhibition de la virulence.....	19
Communication cellulaire et survie	20
Influence des systèmes de communication cellulaire sur le devenir des cellules au sein de la population.....	20
Rôle de la kurstakine.....	22
Signalisation, différenciation et division du travail	23
<i>Perspectives</i>	26
Références bibliographiques	29
Expériences d'encadrement et d'enseignement	34
Réalisations à destination de la communauté scientifique	36
Autres réalisations	38
Publications.....	39

Curriculum vitae

Leyla Slamti

Née le 22 février 1977

Equipe GME – Institut Micalis – INRA Jouy-en-Josas

leyla.slamti@inra.fr

01 34 65 23 82

PARCOURS PROFESSIONNEL

Chargée de recherche Classe Normale - Depuis septembre 2017

Chargée de recherche 1^{ère} classe - Octobre 2014 - Août 2017

Chargée de recherche 2^{ème} classe - Octobre 2010 - Septembre 2014

Equipe GME, Institut Micalis, UMR-1319, INRA.

Sujet : Communication cellulaire, signalisation et expression génétique chez les bacilles sporulants à Gram positif

Assistante de recherche - Mars 2009 - Septembre 2010

Unité Biologie des Spirochètes dirigée par le Dr Mathieu Picardeau, Institut Pasteur, Paris.

Sujet : Caractérisation de déterminants morphologiques chez les Leptospires

Employée par l'Institut Pasteur.

Associée de recherche - Mars 2004 - Février 2009

Laboratoire du Pr Matthew K. Waldor, Harvard Medical School/Brigham and Women's Hospital, Boston, MA, USA.

Sujet : Caractérisation de la réponse au stress chez *Vibrio cholerae* via le facteur sigma alternatif RpoH et le système à deux-composant Cpx

Employée par le Howard Hughes Medical Institute.

FORMATION

Thèse de Microbiologie et Biologie Moléculaire - Janvier 2004

Ecole Doctorale B2M, Université Paris VII, sous la direction du Dr Didier Lereclus, Unité de Biochimie Microbienne, Institut Pasteur, Paris.

Sujet : Le régulon PlcR au sein du groupe *Bacillus cereus* : communication cellulaire, expression génétique et diversité

Bourse de recherche du Ministère de l'Education Nationale, de la Recherche et de la Technologie.

Bourse Pasteur-Weizman.

DEA de Microbiologie - Octobre 2000

Université Paris VII, sous la direction du Dr Didier Lereclus, Unité de Biochimie Microbienne, Institut Pasteur, Paris.

Sujet : Expression du régulon PlcR chez *Bacillus thuringiensis*

Bourse d'enseignement supérieur sur critères universitaires.

Diplôme de Microbiologie Générale - Décembre 1999

Institut Pasteur, Paris.

Maîtrise de Biochimie Moléculaire et Cellulaire option Microbiologie - Juin 1999

Université Paris VII.

Licence de Biochimie option Biotechnologies - Juin 1998

Université Paris VII.

Activités de recherche

J'ai débuté dans le domaine de la recherche en rejoignant l'Unité de Biochimie Microbienne à l'Institut Pasteur pour réaliser un DEA puis une thèse sous la direction de Didier Lereclus en 1999. Le sujet de cette thèse sur la communication cellulaire chez *Bacillus thuringiensis* faisait écho à un travail bibliographique que Didier avait proposé lors du DEA, et qui m'avait beaucoup intéressée, sur le contrôle de la sporulation par des peptides de signalisation chez *Bacillus subtilis*. En plus de l'apprentissage de la mise en place d'une démarche scientifique, cette thèse m'a permis d'acquérir notamment des compétences en génétique bactérienne et en biologie moléculaire, dans un cadre idéal aussi bien humainement que scientifiquement. Suite à l'obtention de mon doctorat, j'ai rejoint le laboratoire de Matthew Waldor à Boston, MA. J'y ai découvert un environnement enrichissant et un nouveau modèle bactérien en travaillant sur la réponse au stress chez *Vibrio cholerae*. Lors de mon retour en France, j'ai intégré l'Unité Biologie des Spirochètes dirigée par Mathieu Picardeau à l'Institut Pasteur. Ce laboratoire était pionnier dans le développement d'outils génétiques chez les leptospires, bactéries difficilement manipulables. J'ai pu y développer un projet sur la caractérisation des déterminants morphologiques de ces bactéries spiralées, avant d'intégrer l'INRA et de travailler à nouveau sur *B. thuringiensis*.

Travaux antérieurs à mon recrutement (2000-2010)

Le régulon PlcR au sein du groupe *Bacillus cereus* : communication cellulaire, expression génétique et diversité

Doctorat de Microbiologie et Biologie Moléculaire, Ecole Doctorale B2M, Université Paris VII, Unité de Biochimie Microbienne, Institut Pasteur, Paris.

Octobre 2000 - Janvier 2004

Ces travaux ont principalement permis de montrer, au moyen de techniques de génétique et de biochimie, que la régulation de l'expression du régulon de virulence PlcR au sein du groupe *Bacillus cereus* dépend d'un système de communication cellulaire.

Une introduction plus détaillée concernant le groupe *B. cereus* ainsi que la communication cellulaire est proposée dans la partie concernant mes recherches en cours.

Le groupe *B. cereus* est composé d'espèces bactériennes sporulantes à Gram positif. Il comprend notamment *B. thuringiensis*, une bactérie entomopathogène, *B. cereus*, responsable de toxi-infections alimentaires, et *B. anthracis*, l'agent de la maladie du charbon (Ceuppens *et al.*, 2013). Les gènes impliqués dans la virulence de *B. thuringiensis* et *B. cereus* sont sous le contrôle de l'activateur transcriptionnel PlcR (Lereclus *et al.*, 1996; Agaisse *et al.*, 1999; Gohar *et al.*,

2008). En revanche, le gène *plcR* est interrompu chez *B. anthracis* (Agaisse *et al.*, 1999; Slamti *et al.*, 2004).

Nous avons rapporté la première démonstration de l'activation directe d'un activateur transcriptionnel (PlcR) par un peptide de signalisation (PapR). Nous avons montré que le peptide était sécrété, importé dans le cytoplasme de la bactérie et qu'il permettait alors la fixation du régulateur sur sa séquence ADN cible (Slamti *et al.*, 2002). Nous avons également montré que ce mécanisme était spécifique de groupes de souches. L'analyse d'un arbre phylogénétique construit par comparaison des séquences peptidiques de PlcR et PapR de 29 souches différentes du groupe *B. cereus*, ainsi que des analyses génétiques, ont permis de définir quatre groupes de paires PlcR-PapR correspondant à quatre phénotypes différents. Une souche au sein d'un phénotype est capable d'activer l'expression du régulon PlcR d'une autre souche du même phénotype, mais pas (ou peu) d'une souche d'un autre phénotype (Slamti *et al.*, 2005).

Nous nous sommes également intéressés au fait que certaines souches de *B. cereus* et *B. thuringiensis*, à l'instar de *B. anthracis*, ont perdu des caractéristiques phénotypiques qui sont sous le contrôle de PlcR. L'analyse du gène *plcR* de différentes souches de *B. anthracis* a révélé qu'ils présentent la même mutation et que celle-ci semble spécifique de cette espèce. En revanche, divers types de mutation dans le gène *plcR* sont à l'origine de la perte de l'expression du régulon PlcR dans les autres souches du groupe *B. cereus* analysées (Slamti *et al.*, 2004). Il est possible que l'expression du régulon PlcR a été abolie dans ces souches en raison de son coût biologique dans certains écosystèmes.

Mes travaux ont abouti à la publication de cinq papiers pendant ma thèse et à deux articles subséquents, sur la base de travaux que j'ai initiés pendant cette période.

Caractérisation de la réponse au stress chez *Vibrio cholerae* via le facteur sigma alternatif RpoH et le système à deux-composant Cpx

Laboratoire du Pr Matthew K. Waldor, Tufts University, Boston, MA (USA), puis Harvard Medical School/Brigham and Women's Hospital, Boston, MA (USA).

Mars 2004 - Février 2009

Mes travaux ont porté sur la caractérisation de certaines facettes de la réponse au stress chez *Vibrio cholerae*. J'ai étudié le rôle du facteur sigma alternatif RpoH dans la physiologie de cette bactérie, ainsi que la fonction et la stimulation du système à deux-composants Cpx, à l'aide de techniques de génétique, d'analyses transcriptomiques globales et de modèles animaux.

V. cholerae, l'agent étiologique du choléra, est un pathogène facultatif. Il peut se développer dans une variété d'environnements en dehors de l'hôte humain, notamment dans les écosystèmes aquatiques, y compris les eaux saumâtres (Reidl *et al.*, 2002). Au cours de l'infection, ce pathogène doit s'adapter à des changements environnementaux importants, y compris à la température élevée du tractus gastro-intestinal humain.

J'ai évalué le rôle de σ^{32} dans la physiologie de *V. cholerae* (Slamti *et al.*, 2007). Ce facteur sigma alternatif codé par *rpoH*, active la transcription des gènes impliqués dans la réponse au choc thermique chez plusieurs espèces bactériennes (Yura *et al.*, 1999). Nos résultats ont montré que σ^{32} favorise la croissance de *V. cholerae* à des températures allant au moins de 15°C à 42°C. La croissance du mutant *rpoH* est également fortement atténuée dans l'intestin de souris par rapport à sa croissance *in vitro*, ce qui suggère que les gènes régulés par σ^{32} sont essentiels pour l'adaptation de *V. cholerae* aux conditions rencontrées dans le tractus gastro-intestinal. Nous avons défini le régulon RpoH chez *V. cholerae* et déterminé que la plupart des gènes sous le contrôle de ce facteur codent des protéines telles que des protéases et des chaperons, impliquées dans l'homéostasie des protéines, ou sont de fonction inconnue. L'analyse bioinformatique de ces données a permis de définir une séquence consensus de liaison de σ^{32} à l'ADN et d'identifier les gènes susceptibles d'être directement régulés par RpoH dans l'ensemble du génome de *V. cholerae*.

Je me suis également intéressée au système à deux composants Cpx, considéré comme médiateur de la réponse au stress d'enveloppe chez de nombreuses bactéries à Gram négatif et impliqué dans la pathogénicité de plusieurs agents pathogènes entériques (Nakayama *et al.*, 1998; Humphreys *et al.*, 2004; Nevesinjac *et al.*, 2005). Bien que certains signaux activant le système Cpx d'*Escherichia coli* aient été identifiés, le mécanisme moléculaire à l'origine de la stimulation de cette voie n'était pas bien compris (Mileykovskaya *et al.*, 1997; Danese *et al.*, 1998; Yamamoto *et al.*, 2005). J'ai étudié les stimuli qui déclenchent ce système chez *V. cholerae* (Slamti *et al.*, 2009). Plusieurs stimuli connus de la voie Cpx chez *E. coli* étaient sans effet sur l'expression de ce système chez *V. cholerae*. Je n'ai observé aucun défaut de colonisation intestinale chez les mutants *cpx* de *V. cholerae*, allant à l'encontre de l'hypothèse selon laquelle cette voie favorise l'adaptation de ce pathogène aux conditions rencontrées chez l'hôte mammifère. J'ai découvert que les ions chlorure activent la voie Cpx de *V. cholerae* suggérant que ce système de transduction de signal permet à ce microorganisme de détecter et de répondre à des modifications de la salinité. Une mutagenèse transpositionnelle aléatoire m'a permis d'identifier des mutants dans lesquels la voie Cpx est activée. Ces mutations affectent principalement des gènes codant des protéines localisées dans l'enveloppe de la bactérie. Certaines de ces mutations inactivent des gènes dont les produits sont nécessaires à l'isomérisation des liaisons disulfure dans le périplasma, indiquant que l'accumulation périplasmique des protéines avec des ponts disulfure aberrants déclenche la voie Cpx de *V. cholerae*.

Mes travaux sur la réponse au stress chez *V. cholerae* ont permis d'élucider certains aspects des interactions de cette bactérie avec son environnement. Ces travaux ont donné lieu à la publication de deux articles lors de mon séjour dans ce laboratoire et d'un article après mon retour.

Caractérisation de déterminants morphologiques chez les Leptospires

Unité Biologie des Spirochètes dirigée par le Dr Mathieu Picardeau, Institut Pasteur, Paris.

Mars 2009 - Septembre 2010

J'ai développé un projet axé sur l'identification de facteurs impliqués dans la morphologie des leptospires et en particulier les déterminants de leur forme hélicoïdale. Plusieurs approches ont été envisagées pour mener à bien cette recherche, dont une approche globale de mutagenèse aléatoire. En parallèle, j'ai entrepris une approche ciblée d'analyse fonctionnelle afin de définir l'implication du gène *mreB* dans la morphogenèse des leptospires.

La morphologie des bactéries est un aspect biologique fondamental qui peut affecter diverses facettes de la physiologie des cellules, comme la mobilité, la pathogénicité ou l'acquisition de nutriments (Young, 2006). Les caractères morphologiques de bactéries modèles sont liés à des protéines impliquées dans le métabolisme du peptidoglycane (telles que les penicillin-binding-proteins ou PBP) ou à des protéines du cytosquelette (comme MreB), mais de nombreux aspects du processus d'acquisition de la forme sont encore à explorer (den Blaauwen *et al.*, 2008; Chastanet *et al.*, 2012). Les leptospires appartiennent au groupe des spirochètes qui sont des bactéries hélicoïdales très mobiles qui possèdent des endoflagelles (Paster *et al.*, 1991). Ces particularités leur permettent de se déplacer dans des matériaux très visqueux comme les tissus conjonctifs (Charon *et al.*, 2002). Les leptospires pathogènes sont responsables de la leptospirose, une zoonose de plus en plus répandue dans les pays émergents ainsi que dans les pays industrialisés (Costa *et al.*, 2015; Torgerson *et al.*, 2015). Bien que le lien entre leur forme spiralée et leur virulence n'a pas été montré, il est probable que cette caractéristique joue un rôle important dans leur pouvoir pathogène.

La mobilité des leptospires étant liée à leur forme caractéristique, j'ai entrepris une mutagenèse aléatoire afin d'isoler des mutants de *Leptospira biflexa* affectés dans leur capacité à se mouvoir dans une gélose molle. Cette méthode permettait à la fois d'isoler des mutants de gènes impliqués directement dans la mobilité ou indirectement par le biais de changements morphologiques. Les gènes inactivés dans un tiers des mutants obtenus codent des protéines de fonction inconnues. De façon intéressante, cinq des mutations sont dans des gènes annotés comme participant à la forme de la bactérie. Je me suis plus particulièrement intéressée à un mutant dont les extrémités ne présentaient pas la forme caractéristique en crochet. Le gène interrompu dans ce mutant code pour une protéine de fonction inconnue que j'ai montrée comme faisant partie de la structure des flagelles de la bactérie. Sans cette protéine les flagelles sont droits, et non incurvés comme dans la souche sauvage, et ne peuvent pas remplir leur fonction de traction sur l'extrémité de la bactérie qui sert normalement de propulseur. Celle-ci présente alors une forme qui ne permet pas à la bactérie de se mouvoir correctement. Cette protéine a été désignée FcpB pour Flagellar coiling protein B (Wunder, Slamti *et al.*, 2018).

Je me suis en parallèle intéressée à des déterminants spécifiques et nous avons montré

que le peptidoglycane de *L. biflexa* conserve une forme hélicoïdale ce qui indique que la forme spiralée des cellules est liée à la forme du sacculus (Slamti *et al.*, 2011), contrairement à ce qui a été montré chez une autre bactérie de la famille des spirochètes, *Borrelia burgdorferi* (Motaleb *et al.*, 2000). En effet, chez cette dernière, un mutant ne possédant pas de flagelle perd sa forme spiralée. De plus, la composition en mucopeptides de *L. biflexa* est différente de celle du modèle *E. coli*, ce qui indique que des enzymes spécifiques pourraient être actives sur cette macromolécule. Bien que les manipulations génétiques de *Leptospira* spp. étaient peu courantes, nous avons pu obtenir un mutant du gène codant pour PBP3. La perte de cette protéine conduit à une élongation des cellules, suggérant son implication dans la division cellulaire. J'ai également généré une souche de *L. biflexa* qui exprime conditionnellement le gène *mreB*. La perte de MreB a entraîné des anomalies morphologiques telles qu'une augmentation de diamètre localisée et une longueur des cellules hétérogène. Un épuisement prolongé de MreB conduit à la lyse cellulaire, ce qui suggère que cette protéine est essentielle, comme chez d'autres bactéries telles que *E. coli* ou *B. subtilis* (Chastanet *et al.*, 2012). Ces résultats fournissent un point de départ pour une meilleure compréhension de l'implication des protéines du cytosquelette et de la biogenèse du peptidoglycane dans la morphogénèse dans ces bactéries atypiques.

A mon arrivée au laboratoire, j'ai contribué à la finalisation d'expériences pour un article décrivant la mise au point d'outils génétiques permettant l'utilisation d'un rapporteur fluorescent chez les leptospires. Le travail concernant MreB a été valorisé par une publication. Nous avons également publié avec M. Picardeau un chapitre de livre rapportant la méthode de construction de la banque de mutants. Depuis mon départ, les travaux concernant FcpB ont été poursuivis par un autre chercheur et nous avons récemment publié ces résultats.

Travaux effectués depuis mon recrutement à l'INRA en 2010

CR2, CR1 puis CRCN dans l'équipe Génétique Microbienne et Environnement (GME)

Institut Micalis, INRA, Jouy-en-Josas.

L'équipe GME appartient au pôle Adaptation Bactérienne et Pathogénèse de l'Institut Micalis. Ce pôle regroupe des équipes qui s'intéressent notamment aux mécanismes d'adaptation à l'environnement -dont l'hôte- de microorganismes pathogènes opportunistes associés à l'alimentation. Les recherches menées par l'équipe GME ont pour objectif la compréhension du pouvoir pathogène et adaptatif des bactéries sporulantes appartenant au groupe *Bacillus cereus sensu lato* ainsi que *Clostridium difficile*. J'ai été recrutée en 2010 dans l'équipe afin de développer un projet ayant pour objectif l'étude des mécanismes de communication cellulaire chez les bactéries du groupe *B. cereus* et leur implication dans la régulation du pouvoir pathogène de ces microorganismes. Ceci m'a amené plus récemment à axer mes recherches vers la compréhension de l'adaptation de ces bactéries à leur environnement, notamment à leur survie lors du cycle infectieux. Je travaille en forte interaction sur ces sujets avec le responsable d'équipe D. Lereclus et plusieurs autres agents –permanents et non-permanents– de l'équipe GME.

Introduction

Le groupe *Bacillus cereus*

Le groupe *B. cereus* est composé d'au moins 7 espèces sporulantes à Gram positif dont les trois espèces les plus étudiées sont *Bacillus anthracis* (Ba), *B. cereus sensu stricto* (Bc) et *Bacillus thuringiensis* (Bt). Ba est considéré comme l'agent étiologique de la maladie du charbon (Mock *et al.*, 2001), Bc est responsable d'intoxications alimentaires et a également été associé à des infections locales et systémiques (Stenfors Arnesen *et al.*, 2008; Bottone, 2010) et Bt possède des propriétés entomopathogènes (Schnepf *et al.*, 1998).

Les espèces qui composent le groupe *B. cereus* sont très proches génétiquement et les séquences de leurs ARN 16s présentent 99% de similitude (Ash *et al.*, 1991). Il a été d'ailleurs proposé que Ba, Bc et Bt forment une seule et même espèce (Helgason *et al.*, 2000). Ces bactéries possèdent néanmoins des caractéristiques qui permettent de les distinguer, aussi bien phénotypiquement que sur la base de leur pathogénicité. Ces particularités sont, pour la plupart, liées à la présence de plasmides. Bt est probablement l'espèce la plus simple à différencier des autres. En effet, une souche est définie comme appartenant à l'espèce Bt si elle produit une inclusion cristalline parasporale constituée de protéines de la famille des toxines Cry et Cyt. Les gènes codants pour ces toxines sont portés par une large variété de plasmides (Kronstad *et al.*, 1984; Lereclus *et al.*, 1984; Berry *et al.*, 2002). Ces toxines confèrent à Bt son caractère entomopathogène, ce qui a amené cette bactérie à être largement utilisé pour le contrôle des

insectes ravageurs de cultures (Sanahuja *et al.*, 2011; Sanchis, 2011). Ba contient les plasmides pXO1 et pXO2 qui portent respectivement les gènes codant pour des toxines et pour la synthèse d'une capsule qui lui confèrent sa capacité à provoquer la maladie du charbon (Okinaka *et al.*, 1999). Bc est un contaminant alimentaire responsable d'intoxications qui peuvent être de type diarrhéique ou émétique. La capacité de Bc à provoquer des intoxications alimentaires de type diarrhéique a été décrite comme étant due à la production des complexes protéiques Nhe et Hbl ainsi qu'à la toxine CytK (Stenfors Arnesen *et al.*, 2008). Les souches de Bc ne portent pas de plasmides qui permettent de les différencier des autres espèces du groupe, sauf celles produisant le céréulide, responsable de symptômes émétiques lors de son ingestion (Ehling-Schulz *et al.*, 2005). Les gènes responsables de la synthèse de cette toxine sont portés par le plasmide pCER270 (Ehling-Schulz *et al.*, 2006; Rasko *et al.*, 2007). La frontière entre les espèces Bc et Ba est rendue de plus en plus floue par le fait que certaines souches de Bc portant des plasmides de type pXO1 et pXO2 et responsables d'infections respiratoires ou cutanées du même type que celles provoquées par Ba sont en émergence. Ces souches ont été désignées Bc biovar *anthracis* (Hoffmaster *et al.*, 2004; Klee *et al.*, 2006; Brezillon *et al.*, 2015).

Mis à part leurs facteurs de virulence spécifiques, Bc et Bt secrètent de grandes quantités d'enzymes dégradatives et de toxines (Drobniewski, 1993). Il a été montré que ces protéines sont spécifiées par des gènes chromosomiques sous le contrôle du régulateur PlcR (Lereclus *et al.*, 1996; Gohar *et al.*, 2002). L'expression des gènes sous le contrôle de PlcR se déclenche lors de la transition entre la phase exponentielle de croissance et la phase stationnaire et l'activité de PlcR dépend de sa liaison au peptide PapR (Lereclus *et al.*, 1996; Slamti *et al.*, 2002). PlcR forme avec son peptide de signalisation PapR le système de communication cellulaire le mieux décrit chez les bactéries du groupe *B. cereus*. L'interruption de *plcR* se traduit par une réduction drastique de la virulence de Bt et Bc dans des modèles d'infection par voie orale chez l'insecte et par instillation nasale chez la souris (Salamitou *et al.*, 2000) ainsi que dans un modèle d'endophtalmitis chez le lapin (Callegan *et al.*, 2003). Bien que Ba possède la plupart des gènes appartenant au régulon PlcR (Read *et al.*, 2003), il ne produit pas les facteurs décrits ci-dessus (Mignot *et al.*, 2001). Cette particularité est due au fait que le gène *plcR* est interrompu chez Ba (Agaisse *et al.*, 1999). L'expression des gènes du régulon PlcR est restaurée suite à l'introduction d'une copie fonctionnelle de *plcR* chez Ba (Mignot *et al.*, 2001). 2% des isolats naturels de Bt et de Bc ne produisent également plus les facteurs de virulence dépendants de PlcR, et la moitié de ces souches présentent un gène *plcR* non fonctionnel, à l'instar de Ba (Slamti *et al.*, 2004). En revanche, contrairement à Ba chez lequel toutes les souches présentent la même mutation non-sens, diverses mutations sont à l'origine de la perte d'expression du régulon PlcR chez ces autres souches. Il a été proposé que l'interruption de *plcR* chez Ba résulte de l'incompatibilité entre le régulon PlcR et le régulon AtxA qui comprend notamment les gènes portés par pXO1 et pXO2 (Mignot *et al.*, 2001). La souche Ba complétée avec une copie fonctionnelle de *plcR* présente une réduction drastique de sa capacité à sporuler. La complémentation des souches de Bt/Bc chez lesquelles PlcR est inactif avec une copie fonctionnelle de *plcR* n'a pas entraîné de défaut de croissance ou de réduction du taux de sporulation en conditions standard de

laboratoire, suggérant que la contre-sélection de *plcR* ne résulte pas d'une incompatibilité avec un autre élément. L'émergence de souches possédant un gène *plcR* inactivé est peut-être due au coût biologique du régulon PlcR dans certains écosystèmes.

Les bactéries du groupe *B. cereus* sont retrouvées sous forme de spores de façon ubiquitaire dans l'environnement (Stenfors Arnesen *et al.*, 2008; Raymond *et al.*, 2010). Il est difficile de déterminer si elles sont présentes sous forme végétative étant donné que les méthodes d'isolation sont en général réalisées de façon à se débarrasser des autres espèces bactériennes par chauffage, tirant parti du fait que les spores vont être résistantes à ce traitement. L'écologie de *Ba* est la plus documentée en raison de la sévérité de la maladie que cette bactérie provoque. La maladie du charbon peut se développer après inhalation ou ingestion de spores de *Ba* ou suite à une contamination par voie cutanée *via* une blessure. Les ovins et les bovins d'élevage sont encore régulièrement touchés par cette maladie contractée lors de la pâture dans des champs contaminés par des spores issus des précédents cadavres qui se sont décomposés sur le site (Barandongo *et al.*, 2018). Un cycle parallèle peut également être décrit pour cette bactérie (Jensen *et al.*, 2003). En effet, des spores de *Ba* peuvent être transportées dans le tractus digestif -et donc disséminées dans les fèces- d'insectes se nourrissant de charognes contaminées par cette bactérie (Braack *et al.*, 1990). Il a également été publié que des mouches et des moustiques, nourris de sang d'animaux contaminés par *Ba*, pouvaient transmettre par piqûres la maladie du charbon à des animaux sains (Turell *et al.*, 1987). Il a récemment été rapporté que *Ba* est aussi capable de germer et de se multiplier dans des amibes (Dey *et al.*, 2012). Chez *Bc* il n'existe pas de cycle pathogénique spécifique reconnu ; bien que l'on puisse considérer que ses propriétés diarrhéiques lui en confèrent un. En effet les symptômes causés sont propices à la dissémination. *Bc* a été identifié dans l'intestin de nombreux arthropodes sous la forme filamenteuse *Arthromitus* (Margulis *et al.*, 1998). Les auteurs proposent que les bacilles sont ingérés par les arthropodes puis qu'ils forment de courtes cellules filamenteuses qui s'accrochent aux substrats disponibles dans l'intestin de l'hôte. Lorsque les cellules sont libérées dans l'environnement, *via* les fèces, l'oxygène et le manque de nutriments induisent la sporulation. Les souches de *Bc biovar anthracis* récemment décrites sont quant à elles à l'origine d'épidémies décimant notamment les primates dans les forêts tropicales d'Afrique subsaharienne et ces bactéries ont également été identifiées dans des mouches se nourrissant de charognes contaminées (Hoffmann *et al.*, 2017). Les souches *Bc biovar anthracis* semble affecter un plus grand nombre d'espèces mammifères que les souches de *Ba* ; ceci est probablement dû au fait que la faune est plus diverse dans les écosystèmes tropicaux que dans les écosystèmes où *Ba* est retrouvé. Concernant *Bt*, il a été proposé que cette bactérie peut être naturellement présente dans l'intestin d'insectes de façon symbiotique (Jensen *et al.*, 2003)). Il est toutefois certain que *Bt* possède un arsenal de facteurs qui, lorsqu'il entre en contact avec une larve d'insecte (par ingestion ou par blessure), lui permettent de résister aux défenses immunitaires de l'hôte, d'éliminer les bactéries concurrentes et d'envahir cet hôte (Raymond *et al.*, 2010). Les spores et les cristaux peuvent être ingérés par les larves directement à partir des cadavres ou suite à la consommation de feuilles contaminées. La publication des génomes de *Bc* ATCC 14579

et Ba Ames (Ivanova *et al.*, 2003; Read *et al.*, 2003) a permis de montrer que, comparé à *Bacillus subtilis*, Bc et Ba possèdent un nombre plus important de gènes dont les produits sont impliqués dans le clivage et l'utilisation de chitine, un des constituants de la membrane périthroïque des intestins d'insectes. De plus, contrairement aux bactéries du sol *B. subtilis* et *Streptomyces* spp., Bc et Ba sont dépourvus des gènes spécifiant les enzymes impliquées dans le métabolisme de composés dérivés de plantes (comme la cellulose). Il a également été montré que Bt forme des spores dans le sol mais ne se multiplie pas dans cet environnement (Vilas-Boas *et al.*, 2000). Ceci suggère que les bactéries du groupe *B. cereus* ne sont pas de vraies bactéries du sol. Leur habitat naturel serait préférentiellement l'intestin d'insectes.

La communication cellulaire et les RNPP

La communication cellulaire (ou quorum-sensing) contrôle d'importants processus adaptatifs chez les bactéries, tels que la conjugaison, la virulence, la sporulation ou la compétence (Dunny *et al.*, 1997). Le quorum-sensing repose sur l'accumulation de molécules de signalisation, ou autoinducteurs (AI), dans le milieu extracellulaire. Ces molécules sont senties par les bactéries et leur permettent de déclencher une action synchronisée lorsqu'une concentration critique d'AI est atteinte. Les AI peuvent être de plusieurs natures : i/ les acyl-homosérine lactones (AI-1) utilisées par les bactéries à Gram négatif, ii/ les petits oligopeptides (AIP) utilisés par les bactéries à Gram positif et iii/ les composés cycliques à base de furanone (AI-2) utilisés à la fois par les bactéries à Gram négatif et à Gram positif (pour revues (Ng *et al.*, 2009; Rutherford *et al.*, 2012)). Les systèmes à base de peptides peuvent être encore classés en deux catégories, selon que la cible du peptide est à l'extérieur ou à l'intérieur de la cellule (figure 1). Les AIP à action extracellulaire sont reconnus par une histidine kinase membranaire qui phosphoryle un régulateur de réponse lors de la liaison du peptide. Cela modifie l'activité du régulateur de réponse, lui permettant de réguler l'expression de gènes cibles. Un exemple bien étudié de ce type de QS est le système Agr de *Staphylococcus aureus* qui contrôle l'expression des gènes de virulence (Ji *et al.*, 1995; Novick *et al.*, 2008). Les AIP à action intracellulaire sont internalisés dans la cellule par des oligopeptide-perméases. Ils se lient alors au régulateur, perturbant son interaction avec une autre protéine ou affectant son activité transcriptionnelle. Ceci est illustré respectivement par les paires Rap-Phr impliquées dans la sporulation et la compétence chez *B. subtilis* (Perego *et al.*, 1996; Lazazzera *et al.*, 1997; Perego, 2013) et par le système PlcR-PapR qui contrôle l'expression de gènes de virulence chez Bt et Bc (Slamti *et al.*, 2002, 2005).

L'activité de PlcR dépend du peptide de signalisation PapR qui est sécrété dans le milieu extracellulaire (Slamti *et al.*, 2002) et réimporté par l'oligopeptide perméase Opp (Gominet *et al.*, 2001). PapR est un peptide de 48 acides-aminés possédant une séquence signal d'export *via* le système de sécrétion Sec d'environ 20 acides aminés dans sa région N-terminale (Slamti *et al.*, 2002). Il a été rapporté que le peptide est mûré hors de la cellule par la protéase NprB (Pomerantsev *et al.*, 2009), mais d'autres protéases sont probablement également impliquées

dans ce processus. La forme mature de PapR est un peptide de 7 acides aminés correspondant à la partie C-terminale du pré-propeptide (Bouillaut *et al.*, 2008). Une fois à l'intérieur de la cellule, PapR se lie à PlcR qui va alors se fixer à la boîte PlcR, une séquence palindromique située en amont de gènes dont il va activer l'expression. PlcR possède un domaine de liaison à l'ADN de type HTH et 5 domaines de type TPR, connus pour être impliqués dans les interactions protéine-protéine (Lamb *et al.*, 1995; Blatch *et al.*, 1999). Une étude structurale ayant pour objectif la caractérisation moléculaire du mécanisme d'activation de PlcR par PapR a montré que PlcR-PapR est un dimère et que le peptide se fixe dans une poche formée par les hélices des domaines TPR (Declerck *et al.*, 2007). Cette étude a également mis en évidence une similitude structurale entre PlcR et PrgX, un régulateur de quorum-sensing qui contrôle la conjugaison chez *Enterococcus faecalis* (Suzuki *et al.*, 1984; Kozłowicz *et al.*, 2004; Cook *et al.*, 2014), et une similitude de séquence avec les protéines Rap et la protéine NprR chez Bt. Les auteurs ont mis en avant le fait que ces protéines partagent également le fait d'être des régulateurs de quorum-sensing auxquels le peptide de signalisation se lie directement, que ce peptide est spécifié par un gène juste en aval du gène codant pour le régulateur, et qu'ils sont retrouvés uniquement chez les bactéries appartenant au phylum des firmicutes. La famille des RNPP (pour Rap-NprR-PrgX-PlcR, les membres définissant cette famille) a donc été créée pour regrouper les régulateurs partageant ces caractéristiques (Figure 2). Récemment, les régulateurs Rgg ont été montrés comme faisant aussi partie de cette famille (Mashburn-Warren *et al.*, 2010; Chang *et al.*, 2011; Parashar *et al.*, 2011). Ces régulateurs contrôlent des fonctions aussi diverses que la formation des biofilms, la compétence ou la virulence chez les Streptocoques (Jimenez *et al.*, 2014).

La communication cellulaire est requise tout au long du cycle de vie de *Bacillus thuringiensis*

Afin de comprendre les mécanismes impliqués dans la pathogénicité de Bt l'équipe GME utilise le modèle insecte *Galleria mellonella* depuis environ 20 ans. Ce modèle a permis de caractériser de nombreux gènes nécessaires à la pathogénicité de Bt et Bc (Salamitou *et al.*, 2000; Fedhila *et al.*, 2006; Raymond *et al.*, 2010). Bt est capable d'effectuer un cycle de développement complet dans son hôte insecte et la virulence n'est pas la seule étape de ce cycle à être contrôlée par le QS (Slamti *et al.*, 2014). Le nécrotrophisme et la sporulation dépendent également de systèmes de communication cellulaire de type RNPP. La figure 3 récapitule les différentes étapes du cycle de vie de Bt dans l'insecte et la connexion entre les systèmes de communication cellulaire qui contrôlent ces étapes. En début d'infection, le complexe PlcR-PapR active l'expression des gènes de virulence, ce qui entraîne la mort de l'insecte (Salamitou *et al.*, 2000; Slamti *et al.*, 2002). PlcR régule l'expression d'environ 45 gènes chez Bc et Bt, incluant son expression et celle de *papR* (Lereclus *et al.*, 1996; Agaisse *et al.*, 1999; Gohar *et al.*, 2008). La plupart des gènes contrôlés par ce régulateur codent pour des protéines sécrétées dont les fonctions sont liées à l'acquisition de nutriments et à la virulence (phospholipases, protéases, hémolysines et toxines) et ainsi qu'à l'intégration de signaux environnementaux (systèmes à

deux-composants). Un autre système de communication cellulaire, NprR-NprX, a été décrit comme contrôlant la transcription du gène codant pour la protéase NprA, composant majoritaire du secrétome de Bt en conditions de sporulation (Perchat *et al.*, 2011). Il a ensuite été montré que NprR-NprX contrôle l'expression d'au moins 40 gènes codant pour des enzymes dégradatives, un système d'import de peptides ainsi qu'un système de synthèse peptidique non ribosomale (Dubois *et al.*, 2016) et que la transcription de *nprR-nprX* est sous le contrôle de PlcR-PapR (Dubois *et al.*, 2013). Ce système est requis pour la survie de Bt dans le cadavre de son hôte, probablement en rendant possible l'exploitation par la bactérie des ressources nutritionnelles environnantes ce qui lui permet de s'engager dans un mode de vie nécrotrophe. En plus de sa fonction de régulateur transcriptionnel, il a été récemment publié que la protéine NprR possède une autre activité (Perchat *et al.*, 2016). En l'absence du peptide NprX, NprR agit comme une phosphatase Rap et réprime la sporulation en interagissant avec Spo0F. Cette protéine fait partie du phosphorelais qui permet un transfert de phosphate entre des kinases qui intègrent des signaux environnementaux, et la protéine Spo0A qui est notamment le régulateur majeur de l'entrée en sporulation. Lorsque les conditions sont propices à la sporulation, les kinases s'autophosphorylent et transfèrent leur phosphate à Spo0F qui le transfère à son tour à Spo0B. Cette dernière va phosphoryler Spo0A qui va ainsi devenir actif. Les phosphatases Rap et NprR bloquent le transfert de phosphates en interagissant avec Spo0F, ce qui empêche la phosphorylation de Spo0A, rendant ce dernier inactif (Perchat *et al.*, 2016). De la même façon que les peptides Phr avec les protéines Rap, la liaison de NprX à NprR réprime cette fonction. Le complexe NprR-NprX va quant à lui activer l'expression des gènes impliqués dans le nécrotrophisme. Les bactéries peuvent alors survivre et sporuler dans le cadavre de l'insecte. Il a également été montré que le régulateur Spo0A-P réprime la transcription de *plcR* (Lereclus *et al.*, 2000), permettant l'extinction du système d'expression des gènes de virulence lorsque les conditions sont propices à la sporulation. Ces données montrent l'interdépendance de ces systèmes liés par des réseaux de régulation complexe accrue par les étapes de sécrétion, maturation et import des peptides, ainsi que par l'impact des paramètres environnementaux.

Résultats

Depuis que le terme quorum-sensing a fait son apparition dans les bases de données bibliographiques en 1994, de nombreux travaux ont permis d'approfondir notre connaissance de ces systèmes, aussi bien chez les bactéries à Gram positif qu'à Gram négatif, entraînant certains changements dans la notion de quorum-sensing. Le quorum-sensing impliquait initialement que les bactéries avaient uniquement besoin de sentir le signal qu'elles avaient produit pour déclencher la réponse concertée de toute la population, générant ainsi une action plus efficace que si elle avait été initiée par quelques bactéries seulement. Il est aujourd'hui démontré que, dans certains cas, les signaux intégrés sont plus complexes que la seule perception de la densité cellulaire (Roux *et al.*, 2014; Moreno-Gamez *et al.*, 2017) permettant un contrôle plus fin du déclenchement de la réponse. Il a également été montré que la perception du signal n'engendre pas nécessairement une réponse homogène dans la population, ce qui va à l'encontre du concept

de quorum-sensing (Maamar *et al.*, 2005; Anetzberger *et al.*, 2009; Lopez *et al.*, 2010). De nouvelles approches comme celles permettant l'analyse de sous-populations ou comme la socio-microbiologie (Whiteley *et al.*, 2017)) peuvent nous permettre d'améliorer notre compréhension des mécanismes régissant les interactions liées au quorum-sensing au sein des populations bactériennes et peuvent notamment aider au développement de stratégies de lutte contre les bactéries pathogènes.

L'accumulation de connaissance sur les systèmes de communication cellulaire en général, et chez Bt en particulier, ainsi que l'utilisation de nouvelles méthodes d'étude ont été à la base des recherches que j'ai entreprises ces dernières années sur les mécanismes d'adaptation de Bt lors de son cycle infectieux. Je me suis tout d'abord focalisée sur la poursuite de la caractérisation du système de communication cellulaire PlcR-PapR, puis je me suis intéressée au devenir des cellules au sein de la population de Bt lors de la phase tardive de l'infection. Je suis également impliquée dans l'étude du rôle d'un système à deux-composants dans la différenciation d'une souche de Bt dont une partie de la population présente un comportement altruiste.

Communication cellulaire et virulence

Intégration de signaux environnementaux par le système PlcR-PapR

L'activité du régulateur transcriptionnel PlcR dépend de sa liaison au peptide de signalisation PapR (Slamti *et al.*, 2002), qui est importé par l'oligopeptide perméase Opp (Gominet *et al.*, 2001). La régulation du système PlcR-PapR est complexe car elle implique plusieurs régulateurs. PlcR active sa propre transcription, et celle de *papR*, à la fin de la phase de croissance exponentielle (Lereclus *et al.*, 1996; Agaisse *et al.*, 1999). De plus, le régulateur majeur de la sporulation, Spo0A, réprime directement la transcription de *plcR* pendant la phase stationnaire (Lereclus *et al.*, 2000; Gominet *et al.*, 2001). Il a également été récemment rapporté que le régulateur transcriptionnel pléiotrope CodY était requis pour l'expression des gènes dépendant de *plcR* et de PlcR chez Bc (Frenzel *et al.*, 2012; Lindback *et al.*, 2012). Cependant, le mécanisme grâce auquel CodY influence l'expression des facteurs de virulence n'avait pas été décrit et ne semble pas être dû à une liaison directe de CodY aux régions promotrices de *plcR* ou des gènes dépendant de PlcR. CodY est un acteur majeur de la phase de transition et permet à la cellule d'adapter son métabolisme à des conditions de croissance en milieu carencé (Sonenshein, 2005, 2007). Son activité dépend de co-facteurs tels que les acides-aminés branchés et le GTP. La baisse de disponibilité en nutriments induit une chute de la concentration en GTP et en acides-aminés, ce qui induit une perte de l'activité de CodY. En plus de la réponse directe aux conditions de croissance, CodY est impliqué –directement ou indirectement- dans la régulation de l'expression de facteurs de virulence chez plusieurs pathogènes tels que Ba, C. *difficile* ou S. *aureus* (Sonenshein, 2005; Stenz *et al.*, 2011; Richardson *et al.*, 2015). J'ai examiné le rôle de ce facteur sur l'activité de PlcR-PapR chez Bt.

La première étape de cette étude (Slamti *et al.*, 2016) a été l'inactivation du gène codant pour *codY* dans notre souche de référence Bt 407⁻. Les tentatives d'inactivation classiques ayant été infructueuses, nous avons tenté d'interrompre ce gène en présence ou en l'absence d'une copie en *trans* de ce gène. Aucun mutant n'a pu être obtenu en l'absence de la copie en *trans*, suggérant que CodY est essentiel dans cette souche. Afin de confirmer ce résultat nous avons entrepris de perdre le plasmide portant *codY* dans le mutant. Contrairement à ce que nous attendions, nous avons obtenus des clones $\Delta codY$ ayant perdu le plasmide. Il est possible que ces clones portent des mutations compensatrices qui devront être caractérisées. La production de facteurs de virulence est drastiquement réduite dans le mutant Bt $\Delta codY$, mais est restaurée lorsque le gène *codY* est introduit en *trans* dans cette souche. Etant donné que l'expression de *plcR* est autorégulée, nous devons déterminer si CodY agissait directement sur la transcription de *plcR* ou sur son activité. La transcription de *plcR* a été découplée de l'activité du régulateur en introduisant dans la souche Bt $\Delta codY$ un plasmide portant le gène *plcR* sous le contrôle d'un promoteur inductible. Dans cette souche, la production des facteurs de virulence n'est pas restaurée. Ceci indique que CodY contrôle l'activité de PlcR. Comme celle-ci dépend de sa liaison au peptide de signalisation PapR, j'ai examiné la possibilité que CodY ait un effet sur l'une des étapes de production de PapR (export, maturation ou import). En utilisant la spectrométrie de masse, nous avons déterminé que la forme mature de PapR est présente en plus faible quantité dans le surnageant de la souche Bt $\Delta codY$ que dans celui de la souche sauvage. En revanche, des expériences de complémentation ont montré que cette quantité était suffisante pour déclencher l'expression du régulon PlcR dans une souche ne produisant pas PapR. Ceci indique que le mutant Bt $\Delta codY$ produit suffisamment de PapR pour activer PlcR. L'utilisation de peptides synthétiques correspondant aux formes mature et non mature de PapR a permis de montrer que la maturation de PapR ne semblait pas affectée dans le mutant Bt $\Delta codY$ mais que le peptide était inefficacement importé dans cette souche. PapR est importé dans les cellules par l'oligopeptide perméase Opp (Gominet *et al.*, 2001). Les oligopeptides perméases sont des transporteurs de peptides composés de cinq protéines : deux protéines intégrales de membrane qui forment le pore (OppB et OppC), deux ATPases liées aux protéines membranaires qui fournissent l'énergie nécessaire à la translocation (OppD et OppF) et une protéine membranaire de liaison au substrat (SBP), ancrée à l'extérieur de la cellule (OppA) (Hiles *et al.*, 1987; Higgins, 1992; Hiron, 2007). Bien qu'il ait été rapporté que OppB-C-D-F étaient nécessaires à l'import de PapR (Gominet *et al.*, 2001), l'implication de OppA n'a pas été décrite. La surexpression de la SBP OppA dans Bt $\Delta codY$ a permis la restauration de l'activité de PlcR dans ce mutant. En revanche, l'inactivation du gène *oppA* dans la souche sauvage n'a pas aboli la production des facteurs de virulence. Ceci suggérerait que la SBP OppA était impliquée dans l'import de PapR mais qu'elle n'était probablement pas la seule. Etant donné que le génome de la souche Bt 407⁻ porte 40 gènes prédits pour encoder des protéines de systèmes Opp, j'ai choisi d'utiliser une approche globale afin de déterminer quels composants étaient impliqués dans l'import de PapR. Des fractions membranaires de la souche sauvage et de la souche Bt $\Delta codY$ ont été soumises à une analyse par spectrométrie de masse. Ceci a révélé que OppA et d'autres SBP étaient

différentiellement produites dans le mutant Bt $\Delta codY$ par rapport à la souche sauvage. En induisant l'expression des gènes codant pour les SBP d'intérêt dans la souche mutée pour *codY*, nous avons pu montrer que plusieurs d'entre-elles étaient capables d'induire la restauration de la production des facteurs de virulence. Nous avons ainsi démontré que CodY contrôle l'expression du régulon PlcR *via* l'import de PapR et que OppA n'est pas la seule SBP impliquée dans la reconnaissance de PapR. Plusieurs autres protéines de type OppA peuvent permettre l'import de ce peptide. Cette étude et d'autres montrent que les protéines de type Opp peuvent être contrôlées négativement ou positivement par CodY (Molle *et al.*, 2003; Chateau *et al.*, 2011; Lindback *et al.*, 2012). En modifiant le profil de production des Opp, CodY peut potentiellement contrôler le type de peptides susceptibles d'entrer dans la cellule, influençant ainsi l'apport en nutriments et en peptides de signalisation. Ces résultats nous permettent de compléter le modèle d'expression des gènes de virulence de Bt (figure 4) et montrent que les conditions environnementales, en plus de la densité cellulaire, sont intégrées par la bactérie *via* le système de quorum-sensing PlcR-PapR.

Etude de la coopérativité du système PlcR-PapR lors de l'infection

Les systèmes de communication cellulaire utilisent des molécules secrétées pour se déclencher et peuvent induire l'expression de gènes codant pour des facteurs également secrétés. Ces molécules produites dans le milieu extracellulaire constituent des biens publics potentiellement accessibles à tous, mais n'ont un coût que pour les bactéries qui les produisent. Ces caractéristiques ont amené les sociobiologistes à se demander, d'une part, si le quorum-sensing était un phénomène social, c'est-à-dire un processus affectant le comportement de l'individu qui le met en place et le comportement d'individus receveurs, et, d'autre part, pourquoi ces systèmes étaient maintenus si ces biens publics pouvaient être efficacement exploités par d'autres (appelés tricheurs) au détriment des individus producteurs (Whiteley *et al.*, 2017).

Le but de ces travaux était de comprendre la fonction du système PlcR-PapR chez l'hôte insecte en utilisant des méthodes de biologie évolutive. Nous souhaitons en particulier déterminer si ce système était un phénomène coopératif et donc si les signaux, ainsi que la réponse engendrée par ces signaux, pouvaient être partagés au sein de la population et si ce système pouvait être exploité par des bactéries tricheuses. Ces travaux ont été supervisés par B. Raymond (University of Exeter, Royaume-Uni), spécialiste en écologie microbienne. J'ai encadré L. Zhou, étudiante en thèse sur ce projet dans le laboratoire mentionné ci-dessus, pendant 3 mois pour des expériences de biologie moléculaire.

Au moment où ce projet a été initié, quelques études portant sur cette problématique avaient montré que les signaux et la réponse aux signaux de quorum-sensing peuvent être coopératifs. Mais ces résultats avaient été générés en conditions standards de laboratoire ou *in vivo* mais à l'aide de modèles ne reflétant pas les conditions d'infection naturelles (Diggle *et al.*, 2007; Sandoz *et al.*, 2007; Rumbaugh *et al.*, 2009). Nous avons choisi de réaliser nos expériences dans un modèle naturel d'infection (Zhou *et al.*, 2014). Des expériences de co-

infection de larves de *Plutella xylostella* ont été réalisées avec différentes proportions de la souche sauvage et des mutants affectés à différents niveaux du processus de communication cellulaire. Nous avons utilisé le mutant Bt Δ papR qui ne produit pas de signal mais qui peut y répondre et le mutant Bt Δ plcR qui ne peut pas répondre au signal. La distribution de chaque type de cellule a été analysée au cours du temps. Les résultats indiquent que plus la densité de l'inoculum est forte, plus la valeur adaptative (*i.e.* fitness) de Bt augmente et que plus la fréquence des mutants dans l'inoculum augmente plus leur valeur adaptative diminue. Ceci indique que la communication cellulaire est un processus coopératif dans l'hôte insecte. Mais, contrairement à ce qui a été montré chez *P. aeruginosa* en milieu de culture (Diggle *et al.*, 2007), les mutants ne tirent pas avantage de la présence des cellules sauvages de façon efficace. En effet, les mutants ne sont capables d'envahir la population que lorsqu'ils sont très rares (moins de 10% de la population), c'est-à-dire lorsque de nombreux biens publics sont mis à disposition par les cellules sauvages. En revanche, les mutants ont un meilleur fitness que les cellules sauvages lorsqu'ils sont mis en compétition dans un broyat d'insecte, c'est-à-dire lorsque la structure spatiale de l'hôte est détruite. Le fait que les mutants sont de mauvais tricheurs est donc probablement dû à l'éloignement spatial des cellules lors des premiers stages de l'infection dans l'intestin des larves. Une expérience menée en utilisant des cellules fluorescentes différenciellement marquées et en réalisant des coupes d'intestin de larves, a montré qu'en effet, en début d'infection les bactéries forment des microcolonies isolées dans l'intestin de la larve. Ceci peut expliquer pourquoi peu de mutants de quorum-sensing émergent dans les populations naturelles de Bt (Slamti *et al.*, 2004; Raymond *et al.*, 2010). La figure 5 présente une schématisation de ces résultats. Ces données montrent l'importance des conditions expérimentales pour l'étude du quorum-sensing, notamment si l'on souhaite le manipuler à des fins thérapeutiques.

Mécanisme d'activation de PlcR par PapR

Dans le cadre de l'ANR Cell.com, l'équipe GME a collaboré avec le groupe de S. Nessler (université Paris-Sud) concernant l'analyse structurale et fonctionnelle de PlcR afin d'établir le mode d'activation de PlcR par PapR. La structure de PlcR associé à PapR était connue (Declerck *et al.*, 2007). Il s'agit d'un dimère de molécules possédant un domaine HTH de fixation à l'ADN relié par une longue hélice à un domaine permettant la fixation du peptide. Il a été montré que le peptide se fixe dans une poche formée par les hélices des domaines TPR (Declerck *et al.*, 2007), mais le mécanisme d'activation de PlcR par PapR restait à déterminer. La structure de la forme apo de PlcR, ainsi que celle du couple PlcR-PapR associé à l'ADN, ont été résolues (Grenha *et al.*, 2013). Cela a permis de montrer que la fixation de PapR induit un léger changement de conformation qui va se propager le long de l'hélice reliant les deux domaines et entraîner une modification conformationnelle drastique par la suite (Figure 6). En effet, lors de sa propagation ce changement de conformation va fragiliser les interactions entre deux résidus de chaque domaine au niveau de l'hélice (Y64 et I68) rendant la conformation globale de PlcR plus flexible et permettant à la protéine de lier l'ADN. La structure ternaire (PlcR-PapR-ADN) montre que l'hélice est pliée au niveau du résidu I68. Je me suis investie dans ce projet, en partie à travers

l'encadrement d'un étudiant en Master 1, notamment en recherchant des mutants de PlcR dont l'activité ne dépendait plus de PapR. Pour cela, une mutagenèse aléatoire par PCR sur le gène *plcR* a été entreprise. Nous avons obtenu des clones pour lesquelles la version mutée de PlcR était constitutivement active. Le séquençage du gène codant pour la protéine présentant une activité similaire à celle de la protéine sauvage en présence de son peptide signal a révélé trois mutations. L'introduction de chacune de ces mutations dans PlcR a montré que celle responsable de l'activité de PlcR était I68N, confirmant donc le rôle charnière de ce résidu dans l'activation de PlcR par PapR (Grenha *et al.*, 2013). Cette étude a permis de caractériser le mécanisme d'activation de PlcR par PapR et d'obtenir un mutant capable d'activer l'expression des gènes de virulence indépendamment du quorum-sensing. L'effet de cette modification sur la valeur adaptative de la bactérie pourra être étudié par la suite en collaboration avec B. Raymond.

Perturbation du système PlcR-PapR et inhibition de la virulence

Les systèmes de QS contrôlent des processus bactériens tels que la production de facteurs de virulence, la formation de biofilm ou la sporulation, ce qui en fait des cibles de choix pour le développement de nouvelles stratégies antimicrobiennes. La plupart des études réalisées en ce sens portent sur les systèmes présents chez les bactéries à Gram négatif comme *P. aeruginosa* (revue (Grandclement *et al.*, 2016; Haque *et al.*, 2018)), ou à Gram positif mais impliquant principalement des systèmes à deux composants comme chez *S. aureus* (Thoendel *et al.*, 2010). Notre objectif était de déterminer s'il était possible d'interférer avec la production des facteurs de virulence chez Bt et Bc, en se basant sur les données acquises sur le système PlcR-PapR, représentatif des systèmes de type RNPP. Ce travail a été réalisé en collaboration avec l'équipe de Z. Hayouka (The Hebrew University of Jerusalem, Israël), composée de chimistes intéressés par le développement d'antimicrobiens dirigés contre les contaminants alimentaires.

Les résultats obtenus lors des études structurales et fonctionnelles concernant l'activation de PlcR par PapR ont permis de mettre en évidence des spécificités d'interaction entre ces deux molécules. Une étude examinant le polymorphisme du système PlcR-PapR dans le groupe *B. cereus* suggérait que la leucine et les deux acides aminés aromatiques du pentapeptide PapR₅ (LPFEF) étaient importants pour la spécificité d'interaction de PapR à PlcR et qu'ils permettaient de définir des phénotypes au sein du groupe *B. cereus* (Figure 7) (Slamti *et al.*, 2005). Il a également été montré que le pentapeptide PapR₅ (LPFEF) était capable d'activer PlcR de façon similaire à l'heptapeptide natif PapR₇ (ADLPFEF) (Bouillaut *et al.*, 2008). Les travaux sur la structure de PlcR rapportés plus haut ont montré que PapR entre dans sa poche de liaison à PlcR par son extrémité C-terminale (Declerck *et al.*, 2007). L'analyse structurale indique également que l'activation de PlcR par PapR₇ est déclenchée par les interactions hydrophobes de la leucine et des deux phénylalanines et que le résidu proline central permet à PapR de s'adapter à sa poche de liaison à PlcR (Grenha *et al.*, 2013).

L'effet de mutations sur la capacité du peptide PapR à activer PlcR a été évalué. Chaque acide aminé de PapR₇ (ADLPFEF) a été remplacé soit par une alanine (Ala-scan), soit par son équivalent stéréoisomérique (D-scan), afin de déterminer l'importance, respectivement, des chaînes latérales et des stéréocentres. L'effet des peptides sur l'activité de PlcR a tout d'abord été évalué en mesurant l'expression d'une fusion transcriptionnelle entre le promoteur du gène *plcA* et le gène rapporteur *lacZ*. *plcA* appartient au régulon PlcR et sa transcription reflète directement l'activité de PlcR. L'utilisation de ces analogues a permis de montrer que la modification des acides-aminés 3 à 7 entraîne une incapacité des peptides à activer PlcR dans une souche ne produisant pas PapR, mais que la modification de l'un des 2 premiers acides aminés en N-terminal n'affectait pas ou peu leur capacité d'activation. Ceci est en accord avec le fait que les pentapeptides sont capables d'activer PlcR comme indiqué plus haut. Les peptides analogues ont ensuite été ajoutés à une culture de cellules sauvages afin d'examiner leur capacité à entrer en compétition avec le peptide PapR endogène. Seuls les analogues possédant une alanine à la position P4, E6 ou F7 ou un stéréoisomère en position E6 ou F7 ont été capables de diminuer l'expression de *plcA* d'environ 60 à 70%. Ces résultats concordent avec ceux de l'analyse structurale. L'effet des peptides modifiés est durable et persiste au moins 24h après leur ajout à la culture. La capacité de ces inhibiteurs à empêcher la production de certains facteurs de virulence dépendants de PlcR, tels que les hémolysines, a ensuite été testée. Les résultats montrent que les peptides précédemment identifiés comme inhibiteurs induisent la perte de l'activité hémolytique de Bt (Figure 8A). Afin d'élargir cette étude, l'effet des peptides inhibiteurs a été testé sur une souche de Bc type (ATCC14579) appartenant au même phérotypage que la souche Bt 407. Cette souche perd également sa capacité à induire la lyse des érythrocytes lorsqu'elle est mise en présence des peptides inhibiteurs (Figure 8B). Cette étude a permis de créer des peptides synthétiques inhibiteurs de la production de facteurs de virulence chez Bt et Bc, sans affecter la croissance des bactéries. Le mode d'action de ces peptides devra par la suite être caractérisé.

Communication cellulaire et survie

Influence des systèmes de communication cellulaire sur le devenir des cellules au sein de la population

Afin de mieux comprendre le développement des bactéries lors de leur cycle de vie, une étude dans laquelle j'ai été fortement impliquée lors de mon arrivée au laboratoire a été entreprise par E. Verplaetse, post-doctorante au laboratoire. J'ai été impliquée dans ce projet au niveau de la conception des expériences, de l'analyse des résultats et de la rédaction d'un manuscrit. Nous avons également développé ensemble un système d'imagerie au cours du temps adapté à l'étude de Bt/Bc. Ces travaux ont été initiés suite à l'observation que seuls 30% de la population isolée du cadavre sont sous forme de spores dès 48h post-infection (Dubois *et al.*, 2016) ; la mort de l'insecte intervenant en moyenne 6h post-infection (Gelis-Jeanvoine, résultats non publiés). Le

reste des cellules est sous une forme non résistante au traitement thermique utilisé pour sélectionner les formes sporulées. De plus, un mutant $\Delta sigK$, ne formant pas de spores viables, est capable de survivre dans le cadavre d'insecte pendant au moins 96h post-infection. Ceci suggérait que différentes populations bactériennes peuvent coexister dans ces conditions et que Bt est capable de se maintenir dans le cadavre de son hôte *via* un mécanisme indépendant de la sporulation. C'est pourquoi le lignage et la différenciation de Bt ont été suivis, en culture standard de laboratoire, en biofilm et dans l'hôte insecte, au niveau de la cellule (Verplaetse *et al.*, 2016). Les promoteurs de *plcB* (reflétant l'activité de PlcR-PapR), *spoIID* (gène contrôlé par le facteur SigmaE, spécifique de la sporulation) et *nprA* (contrôlé par NprR-NprX, spécifique de l'état de nécrotrophisme) ont été fusionnés à des gènes codant pour des rapporteurs fluorescents. Ces fusions transcriptionnelles ont été transformées dans la souche Bt 407⁻ et des cinétiques d'expression et le dénombrement des bactéries exprimant un ou deux rapporteurs ont été menés en microscopie et cytométrie en flux. Cette étude a permis de montrer que les régulateurs de la virulence, du nécrotrophisme et de la sporulation sont activés successivement dans la même cellule, mais que la population est plus hétérogène en biofilm et dans l'insecte qu'en condition de culture classique. Les résultats montrent également que le nécrotrophisme ne se déclenche que dans une partie de la population dans le cadavre d'insecte et en biofilm, suggérant une spécificité d'activation liée à l'environnement. Pour pouvoir analyser les échantillons nous avons dû extraire les bactéries des cadavres d'insectes et dissocier les biofilms. Il ne nous a donc pas été possible d'examiner si les cellules bactériennes avaient un profil d'expression particulier en fonction de leur localisation. Il serait intéressant de déterminer si les contraintes physico-chimiques ont une influence sur les processus menant à cette hétérogénéité phénotypique. Nous avons également montré que la sporulation 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 (Perchat *et al.*, 2016). La figure 9 récapitule l'évolution de la population de Bt dans les conditions testées. Une autre étude utilisant la même méthodologie a montré que des cellules cultivées en biofilm dans un milieu promouvant la sporulation se comportent différemment (Verplaetse *et al.*, 2016). Les gènes de virulence ne sont pas exprimés, probablement parce que l'expression de *plcR* est inhibée par Spo0A-P et que ces conditions de culture favorisent la phosphorylation de Spo0A. Les cellules s'engagent dans la voie nécrotrophe et la sporulation de façon plus précoce que décrit précédemment. Nous avons également observé une sous-population de cellules engagée en sporulation sans avoir activé le régulon de nécrotrophisme. Ceci suggère que l'activité phosphatase de NprR a été contournée par une forte activité du phosphorelais dans cette condition.

Cette étude a mis en évidence qu'environ 20% des cellules n'exprimant aucun des rapporteurs décrits plus haut coexistaient avec les autres populations en biofilm et dans le cadavre d'insecte. Nous avons souhaité examiner l'état physiologique de cette catégorie de cellules. Afin de pouvoir réaliser ces travaux, j'ai présenté un dossier de maître d'apprentissage à l'INRA. Suite à l'obtention de cette qualification j'ai pu recruter et employer S. Ben Rejeb, sur

contrat d'apprentissage en M2 pendant 1 an. Nous avons cherché à déterminer si ces bactéries étaient en phase de croissance active en mesurant l'activité du promoteur du gène *abrB* lors de l'infection à l'aide d'un rapporteur fluorescent. Ce gène code pour le régulateur de transition de phase AbrB et est transcrit dès la transition entre la phase de latence et la phase exponentielle et pendant la phase exponentielle précoce (O'Reilly *et al.*, 1997; Lucking *et al.*, 2009). Il a été montré que AbrB réprime l'expression de gènes de phase stationnaire chez *B. subtilis* (Perego *et al.*, 1988; Strauch *et al.*, 1993), ainsi que la synthèse de la toxine céréulide et l'expression du gène codant pour la métalloprotéase InhA1 chez Bc (Grandvalet *et al.*, 2001; Lucking *et al.*, 2009). Les protéines fluorescentes utilisées lors de l'étude précédente possèdent une demi-vie longue (plus de 24h) (Verplaetse *et al.*, 2015). Cette caractéristique est intéressante car elle permet de visualiser le lignage des cellules mais elle ne permet pas de caractériser de façon simple des fluctuations de l'expression de gènes dans les conditions que nous avons testées. Afin de pouvoir suivre ces fluctuations, nous avons conçu un allèle de la sfGFP (Pedelacq *et al.*, 2006) adapté à Bt et nous avons déstabilisé la protéine obtenue en utilisant le système SsrA d'adressage de protéines au complexe de dégradation Clp (Keiler *et al.*, 1996; Gottesman *et al.*, 1998; Wiegert *et al.*, 2001). Nous avons désigné cet outil Gfp_{BteAAV}. Nous avons introduit les fusions transcriptionnelles *PabrB'gfp_{BteAAV}* et *nprA'mcherry* (Verplaetse *et al.*, 2015) dans Bt (Figure 10A) et nous avons mesuré leur expression. Nous avons montré que le gène *abrB* est exprimé au début de l'infection, puis, de façon inattendue, à un stade ultérieur du processus uniquement dans les cellules étant déjà passées par l'état nécrotrophe (Figure 10B). Il est possible que certaines cellules ayant exprimé *nprA* soient sorties de l'état de nécrotrophisme pour entrer à nouveau en phase végétative. Il est également possible que certaines spores aient germées ; en effet, la fluorescence liée à l'expression de *nprA* persiste dans les spores et *abrB'gfp_{BteAAV}* est exprimé très précocement lors de la germination (Slamti, résultats non publiés). L'utilisation d'une fusion transcriptionnelle entre un gène spécifiquement exprimé pendant la phase stationnaire de croissance et le rapporteur *gfp_{BteAAV}* suggère que les cellules indéfinies précédemment ne sont pas non plus en phase stationnaire (Ben Rejeb, résultats non publiés). Cette étude n'a pas permis de caractériser l'état physiologique dans lequel sont les cellules n'ayant pas exprimé les rapporteurs utilisés. Nous nous sommes néanmoins assurés que cette population était composée de cellules viables et nous avons montré que plus de 60% de ces cellules sont vivantes.

Rôle de la kurstakine

Le système de communication cellulaire NprR-NprX contrôle la transcription de gènes impliqués dans la synthèse d'un lipopeptide désigné kurstakine. Les lipopeptides présentent des propriétés physiques d'intérêt pour divers secteurs industriels. Ils peuvent être utilisés notamment comme agents tensioactifs, émulsifiants, antifongiques ou antibactériens. Bien que la kurstakine ne soit pas indispensable au nécrotrophisme, il a été montré que sa production dans un mutant $\Delta nprR-nprX$ permettait de restaurer partiellement la survie de Bt dans le cadavre d'insecte (Dubois *et al.*, 2016; Gelis-Jeanvoine *et al.*, 2017). L'implication de cette molécule dans le

déroulement du cycle de vie de Bt et son intérêt industriel potentiel nous ont incités à étudier sa régulation et son rôle plus en détails. Ces travaux ont été réalisés par S. Gélis-Jeanvoine, étudiant en thèse que j'ai co-encadré avec D. Lereclus. La kurstakine est produite par synthèse non-ribosomique médiée par le locus *krs* (Figure 11) formant un opéron de 6 gènes comprenant 3 synthétases (*krsA*, *krsB* et *krsC*), une phosphopantéthéinyl transférase (*sfp*) et une thioestérase (*krsD*). Le premier gène de l'opéron, *krsE*, est prédit pour être un pore membranaire (Gelis-Jeanvoine et al., 2017). Nous avons défini et analysé la région promotrice de ce locus et étudié son expression dans diverses conditions. Nous avons notamment montré que la transcription de *krs* est augmentée dans un mutant $\Delta spo0A$, suggérant que la production de kurstakine est réduite en conditions favorisant la sporulation. Les propriétés biophysiques potentielles de la kurstakine et sa sécrétion probable via KrsE suggéraient que ce lipopeptide pouvait jouer un rôle dans la formation de biofilms. La quantité de biofilm formé en puits de plaque de PVC ne semble pas affectée par l'absence de kurstakine. En revanche, la pellicule à l'interface air-liquide du biofilm est différente entre la souche sauvage et le mutant ne produisant pas le lipopeptide (Figure 12A). Au niveau macroscopique, ce dernier présente une structure en larges pétales tandis que le biofilm de la souche sauvage semble composé d'un réseau dense de petites alvéoles. La pellicule formée par le mutant est également moins fermement attachée au matériau que celle formée par la souche sauvage. L'examen en microscopie confocale des 2 pellicules montre que celle formée par la souche sauvage est dense, tandis que celle formée en l'absence de kurstakine est formée d'amas de cellules dispersés (Figure 12B). Ce lipopeptide est donc impliqué dans la structuration des biofilms de Bt. La recherche du locus *krs* dans la base de données GenBank n'a permis de le trouver que dans les génomes du groupe *B. cereus*, ce qui suggère que ce lipopeptide est spécifique de ce groupe. Il est intéressant de noter que le locus *krs* a été trouvé principalement chez l'espèce Bt. 50% des souches de Bt analysées possèdent un locus *krs* potentiellement fonctionnel, tandis que seulement 11% des souches de Bc analysées possèdent ce locus. Ces gènes sont absents chez Ba. Deux loci *krs* complets ont également été trouvés sur des plasmides de haut poids moléculaire, suggérant que ces gènes pourraient être transféré entre souches par conjugaison.

Signalisation, différenciation et division du travail

Dans notre étude de la régulation de la pathogénicité chez Bt, nous nous sommes intéressés à une souche de Bt présentant un phénotype rare de différenciation. Chez Bt, la formation de cristaux composés des toxines insecticides Cry est concomitante de la sporulation. Seuls deux mécanismes de régulation de l'expression des gènes *cry* ont été décrits (Deng et al., 2014a). La plupart de ces gènes sont sous le contrôle des facteurs sigma de sporulation SigE et/ou SigK, tandis que l'expression du gène *cry3A* est indépendante de la sporulation et est probablement sous le contrôle du facteur sigma végétatif SigA. Dans tous les cas, le cristal va se former dans la cellule-mère (Figure 13A) et sera relargué lors de la lyse de cette dernière, en même temps que la spore. Nous avons caractérisé une nouvelle souche de Bt qui présente un

phénotype rare : la moitié de la population forme des spores tandis que l'autre moitié produit des cristaux (Deng *et al.*, 2014b) (Figure 13B). Notre intérêt principal était la compréhension du mécanisme générant cette hétérogénéité. Ce travail a été réalisé par C. Deng, étudiant co-dirigé par GME et par le laboratoire de F. Song (Chinese academy of agricultural sciences, Beijing, Chine). J'ai co-encadré cet étudiant pendant son séjour dans l'équipe. Nous avons montré que la souche LM1212 produit au moins 7 toxines Cry dont certaines sont apparentées aux parasporines, toxines actives contre certains types cellulaires cancéreux. Nous n'avons pas pu déterminer la cible des toxines produites par cette souche aussi bien lors de tests contre des insectes que contre des lignées cellulaires eucaryotes. Afin d'étudier la régulation de l'expression des gènes de toxines, nous avons utilisé des fusions transcriptionnelles entre les promoteurs de ces gènes et les gènes rapporteurs *lacZ* et *gfp*. Les résultats indiquent que le phénotype particulier de la LM1212 est la conséquence d'un nouveau mode de régulation pour les gènes codant les toxines Cry. En effet, ces gènes ne s'expriment que dans les cellules qui n'entrent pas en sporulation et leur région promotrice ne contient pas de séquences reconnues par les facteurs sigma connus. Nous avons ensuite examiné si le phénotype particulier de la souche LM1212 lui conférait un avantage. En économie, il est prédit que le bénéfice du partage des tâches serait d'augmenter la productivité par le biais de la spécialisation. Si nous faisons le parallèle avec la microbiologie, le phénotype présenté par cette souche devrait lui permettre d'être plus compétitive, c'est à dire de produire plus de spores, que d'autres souches de Bt. En effet, cette souche a un avantage sélectif en compétition avec une souche de référence (produisant le cristal et la spore de façon concomitante dans toutes les cellules). Ceci est probablement dû au fait que la production de cristaux dans toutes les cellules a un coût métabolique important. Cet avantage sélectif est très net, bien que la moitié de la population soit sacrifiée et ne puisse pas sporuler. En effet, au terme de leur croissance, les cellules productrices de cristal meurent et ne peuvent donc pas transmettre leur matériel génétique par le biais de la spore. Cette souche présente une spécialisation considérée altruiste.

Ces travaux ont été poursuivis notamment par R. Zhang, étudiante en co-tutelle entre GME et le laboratoire de F. Song mentionné plus haut. Je co-encadre cette étudiante avec D. Lereclus. Des expériences de mutagenèse et un crible génétique ont permis d'identifier un locus impliqué dans le contrôle de l'expression des gènes *cry* de la souche LM1212. Ce locus comprend un gène codant pour un régulateur transcriptionnel de type régulateur de réponse et un gène codant pour une histidine kinase (Figure 14). Nous avons désigné ce régulateur CpcR pour Crystal-producing cell Regulator. Une fois dépourvue de *cpcR*, la souche LM1212 produit uniquement des cellules sporulantes. En revanche, si *cpcR* est surexprimé, la population est composée presque exclusivement de cellules produisant des cristaux. *cpcR* est localisé sur le plasmide qui porte la plupart des gènes codant pour les toxines Cry. L'analyse des séquences du groupe *B. cereus* indique que la présence de ce régulateur est restreinte à la souche LM1212. En revanche, des homologues de la kinase codée par ce locus est retrouvée dans plusieurs souches de Bt. CpcR présente les caractéristiques d'un régulateur de réponse et le résultat de mutations d'un site de phosphorylation potentiel suggère que CpcR doit être phosphorylé pour

être actif. En revanche, la kinase située dans l'environnement de CpcR n'est pas indispensable à cette phosphorylation. Nous poursuivons ces travaux dans le but de caractériser le mode d'activation et d'action de ce régulateur afin de comprendre sa connexion avec les réseaux de régulations menant à la sporulation.

Perspectives

Je souhaite axer la suite de mes recherches dans la continuité des travaux présentés ci-dessus, construits autour de la compréhension des mécanismes menant à l'hétérogénéité phénotypique, principalement autour du devenir des cellules de Bt au sein de la population, en particulier sur la capacité de cette bactérie sporulante à persister indépendamment de la sporulation. La caractérisation de l'activation et de l'activité du régulateur CpcR fait également partie de mes objectifs.

Nous avons montré que les étapes du processus infectieux se déclenchent successivement dans les cellules mais que toutes les bactéries ne les empruntent pas, générant une hétérogénéité phénotypique et qu'une sous-population de cellules était dans un état physiologique que nous n'avons pas pu caractériser jusqu'à présent (Verplaetse *et al.*, 2015; Dubois *et al.*, 2016; Ben Rejeb *et al.*, 2017). L'ensemble de ces résultats suggère que ces bactéries sporulantes ont développé des alternatives à leur mode ultime de résistance au stress (la spore) afin de survivre dans certaines conditions, y compris lors de l'infection. Des études ont rapporté que certaines bactéries Gram-négatives et Gram-positives non sporulantes étaient capables de persister dans un état de dormance caractérisé par un arrêt de la croissance et une diminution de leur activité métabolique (Rittershaus *et al.*, 2013; Manina *et al.*, 2015; Verstraeten *et al.*, 2016). Chez les bactéries sporulantes, un tel mécanisme de survie constituerait une alternative permettant aux bactéries de persister sans avoir à s'engager dans la sporulation qui est un processus complexe et irréversible. Un état stationnaire de dormance permettrait un retour rapide à une croissance exponentielle si des nutriments devenaient à nouveau disponibles ou si un signal de ressuscitation différent de celui de la germination était senti. Nous caractériserons l'état des bactéries qui persistent sans avoir emprunté la voie de la sporulation lors de l'infection. Ces travaux font l'objet de la thèse de H. Toukabri qui a rejoint l'équipe GME en octobre 2018 et que j'encadre.

L'importance de Spo0A dans les processus de sporulation, de formation de biofilm et de production de facteurs de virulence chez Bt (Lereclus *et al.*, 1995; Lereclus *et al.*, 2000; Fagerlund *et al.*, 2014) nous a conduit à examiner le rôle de ce régulateur dans le cycle infectieux de cette bactérie. Cette étude a été menée par S. Gélis-Jeanvoine lors de sa thèse (résultats non publiés). Ces travaux ont montré que Spo0A n'est pas nécessaire aux étapes initiales d'infection par piqure. En effet, le taux de mortalité induit par le mutant $\Delta spo0A$ est similaire à celui induit par des cellules sauvages. En revanche, les larves meurent plus tard lorsqu'elles sont infectées par le mutant $\Delta spo0A$ que lorsqu'elles sont infectées avec des cellules sauvages (respectivement 10h et 6h post-infection en moyenne). Ce retard est potentiellement corrélé au fait que la souche $\Delta spo0A$ présente, *in vitro*, un léger retard de croissance par rapport à la souche sauvage. En revanche, Spo0A est nécessaire au nécrotrophisme. En effet, un mutant $\Delta spo0A$ ne survit pas aussi bien que la souche sauvage dans le cadavre de l'insecte. Les fonctions dépendantes de Spo0A et nécessaires à cette survie devraient être indépendantes de la sporulation étant donné qu'un mutant $\Delta sigK$, incapable de former des spores viables, survit dans les mêmes conditions.

De plus, Bt est retrouvé majoritairement sous forme non sporulée dans les cadavres d'insectes infectés avec des cellules sauvages, jusqu'à 7 jours post-infection. Nous avons identifié les gènes contrôlés par Spo0A chez Bt en conditions standards de laboratoire en utilisant la technique de RNA-Seq. De la même façon, nous avons entrepris de déterminer quels gènes étaient contrôlés par Spo0A et importants pour la survie de Bt chez l'insecte. Les résultats issus de ces expériences sont en cours d'analyse.

Les résultats montrant que le mutant $\Delta spo0A$ est affecté dans sa capacité à survivre dans le cadavre d'insecte nous ont mené à tester si cette incapacité était liée à une potentielle hypoxie de cet environnement. J'ai comparé la capacité à survivre du mutant $\Delta spo0A$ en phase stationnaire en condition hypoxique et en culture aérée. Ces expériences *in vitro* ont montré que ce mutant était capable de survivre en présence d'un taux d'oxygène faible tandis qu'il mourrait en culture aérée (Slamti, résultats non publiés). Ceci indique que le manque d'oxygène n'est probablement pas à l'origine de l'incapacité du mutant $\Delta spo0A$ à survivre dans le cadavre de l'hôte. La composition de la population dans le mutant $\Delta spo0A$ en hypoxie par rapport à une culture standard sera caractérisée ainsi que le profil transcriptomique des bactéries dans ces conditions.

Comme mentionné ci-dessus, les expériences réalisées sur le devenir des cellules au sein de la population de Bt lors de l'infection ont montré que cette population était hétérogène bien que les cellules soient identiques génétiquement. Ces résultats sont différents de ceux obtenus en conditions de cultures homogènes qui montrent que les cellules répondent de façon plus collective aux signaux de quorum-sensing (Verplaetse *et al.*, 2015). Les travaux réalisés en collaboration avec B. Raymond ont également montré que des mutants du système *plcR-papR* ne sont pas capables d'exploiter les facteurs de virulence produits par des cellules sauvages *in vivo*, à l'inverse de ce qu'il se passe *in vitro*, probablement en raison de l'éloignement spatial des bactéries (Zhou *et al.*, 2014). Ceci nous a mené à nous intéresser à l'activation des systèmes de communication cellulaire en conditions naturelles d'infection. Notre objectif est de comprendre comment les spécificités d'expression des régulateurs RNPP et leur interaction avec les peptides de signalisation, ainsi que la distribution spatiale des bactéries affectent l'activation de ces systèmes de quorum-sensing dans une microcolonie ou un insecte. L'influence de l'effet de la mutation I68N, rendant l'activation de PlcR indépendante de son peptide de signalisation PapR, sur le fitness de Bt durant l'infection sera également examinée. Ce travail ne pourra être réalisé que dans le cadre d'une collaboration avec le laboratoire du Dr B. Raymond et si nous avons accès à un laboratoire maîtrisant des méthodes d'imagerie avancées.

L'accumulation de données sur les systèmes de quorum-sensing nous ont permis d'orienter nos recherches vers la prévention de la production des facteurs de virulence de Bt et Bc en perturbant la communication entre les bactéries. D'un point de vue fondamental, ces travaux sont la preuve de concept que des peptides peuvent être conçus pour bloquer la communication cellulaire d'un système de type RNPP. En termes d'applications, il pourrait être intéressant d'élargir ce concept à d'autres bactéries pathogènes dont l'expression de facteurs de

virulence est sous le contrôle de tels systèmes, comme les streptocoques. Ceci sera envisagé dans le cadre de collaborations.

Enfin, je souhaite également continuer à m'impliquer dans la caractérisation du régulateur CpcR et du mécanisme grâce auquel il intervient dans les réseaux de régulation menant à la sporulation. Nous souhaitons identifier la kinase qui permet la phosphorylation de CpcR et mettre en évidence l'interaction du régulateur avec ses gènes cibles. Nous planifions également de déterminer quelles étapes du processus de sporulation sont affectées par CpcR. Cette étude sera poursuivie en collaboration avec le laboratoire du Dr F. Song.

Références bibliographiques

- Agaisse, H., Gominet, M., Okstad, O.A., Kolsto, A.B., and Lereclus, D. (1999) PlcR is a pleiotropic regulator of extracellular virulence factor gene expression in *Bacillus thuringiensis*. *Mol Microbiol* **32**: 1043-1053.
- Anetzberger, C., Pirch, T., and Jung, K. (2009) Heterogeneity in quorum sensing-regulated bioluminescence of *Vibrio harveyi*. *Mol Microbiol* **73**: 267-277.
- Ash, C., Farrow, J.A., Dorsch, M., Stackebrandt, E., and Collins, M.D. (1991) Comparative analysis of *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and related species on the basis of reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. *Int J Syst Bacteriol* **41**: 343-346.
- Barandongo, Z.R., Mfune, J.K.E., and Turner, W.C. (2018) Dust-Bathing Behaviors of African Herbivores and the Potential Risk of Inhalational Anthrax. *J Wildl Dis* **54**: 34-44.
- Ben Rejeb, S., Lereclus, D., and Slamti, L. (2017) Analysis of *abrB* expression during the infectious cycle of *Bacillus thuringiensis* reveals population heterogeneity. *Front Microbiol*.
- Berry, C., O'Neil, S., Ben-Dov, E., Jones, A.F., Murphy, L., Quail, M.A. *et al.* (2002) Complete sequence and organization of pBtoxis, the toxin-coding plasmid of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Appl Environ Microbiol* **68**: 5082-5095.
- Blatch, G.L., and Lassle, M. (1999) The tetratricopeptide repeat: a structural motif mediating protein-protein interactions. *Bioessays* **21**: 932-939.
- Bottone, E.J. (2010) *Bacillus cereus*, a volatile human pathogen. *Clin Microbiol Rev* **23**: 382-398.
- Bouillaut, L., Perchat, S., Arold, S., Zorrilla, S., Slamti, L., Henry, C. *et al.* (2008) Molecular basis for group-specific activation of the virulence regulator PlcR by PapR heptapeptides. *Nucleic Acids Res* **36**: 3791-3801.
- Braack, L.E., and De Vos, V. (1990) Feeding habits and flight range of blow-flies (*Chrysomyia* spp.) in relation to anthrax transmission in the Kruger National Park, South Africa. *Onderstepoort J Vet Res* **57**: 141-142.
- Brezillon, C., Haustant, M., Dupke, S., Corre, J.P., Lander, A., Franz, T. *et al.* (2015) Capsules, toxins and AtxA as virulence factors of emerging *Bacillus cereus* biovar *anthracis*. *PLoS Negl Trop Dis* **9**: e0003455.
- Callegan, M.C., Kane, S.T., Cochran, D.C., Gilmore, M.S., Gominet, M., and Lereclus, D. (2003) Relationship of PlcR-regulated factors to *Bacillus endophthalmitis* virulence. *Infect Immun* **71**: 3116-3124.
- Ceuppens, S., Boon, N., and Uyttendaele, M. (2013) Diversity of *Bacillus cereus* group strains is reflected in their broad range of pathogenicity and diverse ecological lifestyles. *FEMS Microbiol Ecol* **84**: 433-450.
- Chang, J.C., LaSarre, B., Jimenez, J.C., Aggarwal, C., and Federle, M.J. (2011) Two group A streptococcal peptide pheromones act through opposing Rgg regulators to control biofilm development. *PLoS Pathog* **7**: e1002190.
- Charon, N.W., and Goldstein, S.F. (2002) Genetics of motility and chemotaxis of a fascinating group of bacteria: the spirochetes. *Annu Rev Genet* **36**: 47-73.
- Chastanet, A., and Carballido-Lopez, R. (2012) The actin-like MreB proteins in *Bacillus subtilis*: a new turn. *Front Biosci (Schol Ed)* **4**: 1582-1606.
- Chateau, A., van Schaik, W., Six, A., Aucher, W., and Fouet, A. (2011) CodY regulation is required for full virulence and heme iron acquisition in *Bacillus anthracis*. *FASEB J* **25**: 4445-4456.
- Cook, L.C., and Federle, M.J. (2014) Peptide pheromone signaling in *Streptococcus* and *Enterococcus*. *FEMS Microbiol Rev* **38**: 473-492.
- Costa, F., Wunder, E.A., Jr., De Oliveira, D., Bisht, V., Rodrigues, G., Reis, M.G. *et al.* (2015) Patterns in *Leptospira* Shedding in Norway Rats (*Rattus norvegicus*) from Brazilian Slum Communities at High Risk of Disease Transmission. *PLoS Negl Trop Dis* **9**: e0003819.
- Danese, P.N., and Silhavy, T.J. (1998) CpxP, a stress-combative member of the Cpx regulon. *J Bacteriol* **180**: 831-839.
- Declerck, N., Bouillaut, L., Chaix, D., Rugani, N., Slamti, L., Hoh, F. *et al.* (2007) Structure of PlcR: Insights into virulence regulation and evolution of quorum sensing in Gram-positive bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 18490-18495.
- den Blaauwen, T., de Pedro, M.A., Nguyen-Disteche, M., and Ayala, J.A. (2008) Morphogenesis of rod-shaped sacculi. *FEMS Microbiol Rev* **32**: 321-344.
- Deng, C., Peng, Q., Song, F., and Lereclus, D. (2014a) Regulation of *cry* gene expression in *Bacillus thuringiensis*. *Toxins*.
- Deng, C., Slamti, L., Raymond, B., Liu, G., Lemy, C., Gominet, M. *et al.* (2014b) Division of labour and terminal differentiation in a novel *Bacillus thuringiensis* strain. *ISME J*.
- Dey, R., Hoffman, P.S., and Glomski, I.J. (2012) Germination and amplification of anthrax spores by soil-dwelling amoebas. *Appl Environ Microbiol* **78**: 8075-8081.
- Diggie, S.P., Griffin, A.S., Campbell, G.S., and West, S.A. (2007) Cooperation and conflict in quorum-sensing bacterial populations. *Nature* **450**: 411-414.
- Drobniewski, F.A. (1993) *Bacillus cereus* and related species. *Clin Microbiol Rev* **6**: 324-338.
- Dubois, T., Perchat, S., Verplaetse, E., Gominet, M., Lemy, C., Aumont-Nicaise, M. *et al.* (2013) Activity of the *Bacillus thuringiensis* NprR-NprX cell-cell communication system is co-ordinated to the physiological stage through a complex transcriptional regulation. *Mol Microbiol* **88**: 48-63.
- Dubois, T., Faegri, K., Gelis-Jeanvoine, S., Perchat, S., Lemy, C., Buisson, C. *et al.* (2016) Correction: Necrotrophism Is a Quorum-Sensing-Regulated Lifestyle in *Bacillus thuringiensis*. *PLoS Pathog* **12**: e1006049.
- Dunny, G.M., and Leonard, B.A. (1997) Cell-cell communication in gram-positive bacteria. *Annu Rev Microbiol* **51**: 527-564.

- Ehling-Schulz, M., Fricker, M., Grallert, H., Rieck, P., Wagner, M., and Scherer, S. (2006) Cereulide synthetase gene cluster from emetic *Bacillus cereus*: structure and location on a mega virulence plasmid related to Bacillus anthracis toxin plasmid pXO1. *BMC Microbiol* **6**: 20.
- Ehling-Schulz, M., Svensson, B., Guinebretiere, M.H., Lindback, T., Andersson, M., Schulz, A. *et al.* (2005) Emetic toxin formation of *Bacillus cereus* is restricted to a single evolutionary lineage of closely related strains. *Microbiology* **151**: 183-197.
- Fagerlund, A., Dubois, T., Okstad, O.A., Verplaetse, E., Gilois, N., Bennaceur, I. *et al.* (2014) SinR controls enterotoxin expression in *Bacillus thuringiensis* biofilms. *PLoS One* **9**: e87532.
- Fedhila, S., Daou, N., Lereclus, D., and Nielsen-LeRoux, C. (2006) Identification of *Bacillus cereus* internalin and other candidate virulence genes specifically induced during oral infection in insects. *Mol Microbiol* **62**: 339-355.
- Frenzel, E., Doll, V., Pauthner, M., Lucking, G., Scherer, S., and Ehling-Schulz, M. (2012) CodY orchestrates the expression of virulence determinants in emetic *Bacillus cereus* by impacting key regulatory circuits. *Mol Microbiol* **85**: 67-88.
- Gelis-Jeanvoine, S., Canette, A., Gohar, M., Caradec, T., Lemy, C., Gominet, M. *et al.* (2017) Genetic and functional analyses of krs, a locus encoding kurstakin, a lipopeptide produced by *Bacillus thuringiensis*. *Res Microbiol* **168**: 356-368.
- Gohar, M., Okstad, O.A., Gilois, N., Sanchis, V., Kolsto, A.B., and Lereclus, D. (2002) Two-dimensional electrophoresis analysis of the extracellular proteome of *Bacillus cereus* reveals the importance of the PlcR regulon. *Proteomics* **2**: 784-791.
- Gohar, M., Faegri, K., Perchat, S., Ravnum, S., Okstad, O.A., Gominet, M. *et al.* (2008) The PlcR virulence regulon of *Bacillus cereus*. *PLoS One* **3**: e2793.
- Gominet, M., Slamti, L., Gilois, N., Rose, M., and Lereclus, D. (2001) Oligopeptide permease is required for expression of the *Bacillus thuringiensis* *plcR* regulon and for virulence. *Mol Microbiol* **40**: 963-975.
- Gottesman, S., Roche, E., Zhou, Y., and Sauer, R.T. (1998) The ClpXP and ClpAP proteases degrade proteins with carboxy-terminal peptide tails added by the SsrA-tagging system. *Genes Dev* **12**: 1338-1347.
- Grandclement, C., Tannieres, M., Morera, S., Dessaux, Y., and Faure, D. (2016) Quorum quenching: role in nature and applied developments. *FEMS Microbiol Rev* **40**: 86-116.
- Grandvalet, C., Gominet, M., and Lereclus, D. (2001) Identification of genes involved in the activation of the *Bacillus thuringiensis* *inhA* metalloprotease gene at the onset of sporulation. *Microbiology* **147**: 1805-1813.
- Grenha, R., Slamti, L., Nicaise, M., Refes, Y., Lereclus, D., and Nessler, S. (2013) Structural basis for the activation mechanism of the PlcR virulence regulator by the quorum-sensing signal peptide PapR. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**: 1047-1052.
- Haque, S., Ahmad, F., Dar, S.A., Jawed, A., Mandal, R.K., Wahid, M. *et al.* (2018) Developments in strategies for Quorum Sensing virulence factor inhibition to combat bacterial drug resistance. *Microb Pathog* **121**: 293-302.
- Helgason, E., Okstad, O.A., Caugant, D.A., Johansen, H.A., Fouet, A., Mock, M. *et al.* (2000) *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis*—one species on the basis of genetic evidence. *Appl Environ Microbiol* **66**: 2627-2630.
- Higgins, C.F. (1992) ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu Rev Cell Biol* **8**: 67-113.
- Hiles, I.D., Gallagher, M.P., Jamieson, D.J., and Higgins, C.F. (1987) Molecular characterization of the oligopeptide permease of *Salmonella typhimurium*. *J Mol Biol* **195**: 125-142.
- Hiron, A. (2007) Les transporteurs de peptides de *Staphylococcus aureus*. In *MICA*. INRA, Jouy-en-Josas: AgroParisTech, p. 243.
- Hoffmann, C., Zimmermann, F., Biek, R., Kuehl, H., Nowak, K., Mundry, R. *et al.* (2017) Persistent anthrax as a major driver of wildlife mortality in a tropical rainforest. *Nature* **548**: 82-86.
- Hoffmaster, A.R., Ravel, J., Rasko, D.A., Chapman, G.D., Chute, M.D., Marston, C.K. *et al.* (2004) Identification of anthrax toxin genes in a *Bacillus cereus* associated with an illness resembling inhalation anthrax. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 8449-8454.
- Humphreys, S., Rowley, G., Stevenson, A., Anjum, M.F., Woodward, M.J., Gilbert, S. *et al.* (2004) Role of the two-component regulator CpxAR in the virulence of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium. *Infect Immun* **72**: 4654-4661.
- Ivanova, N., Sorokin, A., Anderson, I., Galleron, N., Candelon, B., Kapatral, V. *et al.* (2003) Genome sequence of *Bacillus cereus* and comparative analysis with *Bacillus anthracis*. *Nature* **423**: 87-91.
- Jensen, G.B., Hansen, B.M., Eilenberg, J., and Mahillon, J. (2003) The hidden lifestyles of *Bacillus cereus* and relatives. *Environ Microbiol* **5**: 631-640.
- Ji, G., Beavis, R.C., and Novick, R.P. (1995) Cell density control of staphylococcal virulence mediated by an octapeptide pheromone. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 12055-12059.
- Jimenez, J.C., and Federle, M.J. (2014) Quorum sensing in group A Streptococcus. *Front Cell Infect Microbiol* **4**: 127.
- Keiler, K.C., Waller, P.R., and Sauer, R.T. (1996) Role of a peptide tagging system in degradation of proteins synthesized from damaged messenger RNA. *Science* **271**: 990-993.
- Klee, S.R., Ozel, M., Appel, B., Boesch, C., Ellerbrok, H., Jacob, D. *et al.* (2006) Characterization of *Bacillus anthracis*-like bacteria isolated from wild great apes from Cote d'Ivoire and Cameroon. *J Bacteriol* **188**: 5333-5344.
- Kozlowski, B.K., Bae, T., and Dunny, G.M. (2004) *Enterococcus faecalis* pheromone-responsive protein PrgX: genetic separation of positive autoregulatory functions from those involved in negative regulation of conjugative plasmid transfer. *Mol Microbiol* **54**: 520-532.
- Kronstad, J.W., and Whiteley, H.R. (1984) Inverted repeat sequences flank a *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene. *J Bacteriol* **160**: 95-102.

- Lamb, J.R., Tugendreich, S., and Hieter, P. (1995) Tetratricopeptide repeat interactions: to TPR or not to TPR? *Trends Biochem Sci* **20**: 257-259.
- Lazazzera, B.A., Solomon, J.M., and Grossman, A.D. (1997) An exported peptide functions intracellularly to contribute to cell density signaling in *Bacillus subtilis*. *Cell* **89**: 917-925.
- Lereclus, D., Agaisse, H., Gominet, M., and Chaufaux, J. (1995) Overproduction of encapsulated insecticidal crystal proteins in a *Bacillus thuringiensis spo0A* mutant. *Biotechnology (N Y)* **13**: 67-71.
- Lereclus, D., Ribier, J., Klier, A., Menou, G., and Lecadet, M.M. (1984) A transposon-like structure related to the delta-endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis*. *EMBO J* **3**: 2561-2567.
- Lereclus, D., Agaisse, H., Gominet, M., Salamitou, S., and 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. *J Bacteriol* **178**: 2749-2756.
- Lereclus, D., Agaisse, H., Grandvalet, C., Salamitou, S., and Gominet, M. (2000) Regulation of toxin and virulence gene transcription in *Bacillus thuringiensis*. *Int J Med Microbiol* **290**: 295-299.
- Lindback, T., Mols, M., Basset, C., Granum, P.E., Kuipers, O.P., and Kovacs, A.T. (2012) CodY, a pleiotropic regulator, influences multicellular behaviour and efficient production of virulence factors in *Bacillus cereus*. *Environ Microbiol* **14**: 2233-2246.
- Lopez, D., and Kolter, R. (2010) Extracellular signals that define distinct and coexisting cell fates in *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol Rev* **34**: 134-149.
- Lucking, G., Dommel, M.K., Scherer, S., Fouet, A., and 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* **155**: 922-931.
- Maamar, H., and Dubnau, D. (2005) Bistability in the *Bacillus subtilis* K-state (competence) system requires a positive feedback loop. *Mol Microbiol* **56**: 615-624.
- Manina, G., Dhar, N., and McKinney, J.D. (2015) Stress and host immunity amplify *Mycobacterium tuberculosis* phenotypic heterogeneity and induce nongrowing metabolically active forms. *Cell Host Microbe* **17**: 32-46.
- Margulis, L., Jorgensen, J.Z., Dolan, S., Kolchinsky, R., Rainey, F.A., and Lo, S.C. (1998) The Arthromitus stage of *Bacillus cereus*: intestinal symbionts of animals. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 1236-1241.
- Mashburn-Warren, L., Morrison, D.A., and Federle, M.J. (2010) A novel double-tryptophan peptide pheromone controls competence in *Streptococcus* spp. via an Rgg regulator. *Mol Microbiol* **78**: 589-606.
- Mignot, T., Mock, M., Robichon, D., Landier, A., Lereclus, D., and Fouet, A. (2001) The incompatibility between the PlcR- and AtxA-controlled regulons may have selected a nonsense mutation in *Bacillus anthracis*. *Mol Microbiol* **42**: 1189-1198.
- Mileykovskaya, E., and Dowhan, W. (1997) The Cpx two-component signal transduction pathway is activated in *Escherichia coli* mutant strains lacking phosphatidylethanolamine. *J Bacteriol* **179**: 1029-1034.
- Mock, M., and Fouet, A. (2001) Anthrax. *Annu Rev Microbiol* **55**: 647-671.
- Molle, V., Nakaura, Y., Shivers, R.P., Yamaguchi, H., Losick, R., Fujita, Y., and Sonenshein, A.L. (2003) Additional targets of the *Bacillus subtilis* global regulator CodY identified by chromatin immunoprecipitation and genome-wide transcript analysis. *J Bacteriol* **185**: 1911-1922.
- Moreno-Gamez, S., Sorg, R.A., Domenech, A., Kjos, M., Weissing, F.J., van Doorn, G.S., and Veening, J.W. (2017) Quorum sensing integrates environmental cues, cell density and cell history to control bacterial competence. *Nat Commun* **8**: 854.
- Motaleb, M.A., Corum, L., Bono, J.L., Elias, A.F., Rosa, P., Samuels, D.S., and Charon, N.W. (2000) *Borrelia burgdorferi* periplasmic flagella have both skeletal and motility functions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 10899-10904.
- Nakayama, S., and Watanabe, H. (1998) Identification of *cpxR* as a positive regulator essential for expression of the *Shigella sonnei virF* gene. *J Bacteriol* **180**: 3522-3528.
- Nevesinjac, A.Z., and Raivio, T.L. (2005) The Cpx envelope stress response affects expression of the type IV bundle-forming pili of enteropathogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **187**: 672-686.
- Ng, W.L., and Bassler, B.L. (2009) Bacterial quorum-sensing network architectures. *Annu Rev Genet* **43**: 197-222.
- Novick, R.P., and Geisinger, E. (2008) Quorum sensing in *Staphylococci*. *Annu Rev Genet* **42**: 541-564.
- O'Reilly, M., and Devine, K.M. (1997) Expression of AbrB, a transition state regulator from *Bacillus subtilis*, is growth phase dependent in a manner resembling that of Fis, the nucleoid binding protein from *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **179**: 522-529.
- Okinaka, R.T., Cloud, K., Hampton, O., Hoffmaster, A.R., Hill, K.K., Keim, P. *et al.* (1999) Sequence and organization of pXO1, the large *Bacillus anthracis* plasmid harboring the anthrax toxin genes. *J Bacteriol* **181**: 6509-6515.
- Parashar, V., Mirouze, N., Dubnau, D.A., and Neiditch, M.B. (2011) Structural basis of response regulator dephosphorylation by Rap phosphatases. *PLoS Biol* **9**: e1000589.
- Paster, B.J., Dewhirst, F.E., Weisburg, W.G., Tordoff, L.A., Fraser, G.J., Hespell, R.B. *et al.* (1991) Phylogenetic analysis of the spirochetes. *J Bacteriol* **173**: 6101-6109.
- Pedelacq, J.D., Cabantous, S., Tran, T., Terwilliger, T.C., and Waldo, G.S. (2006) Engineering and characterization of a superfolder green fluorescent protein. *Nat Biotechnol* **24**: 79-88.
- Perchat, S., Talagas, A., Poncet, S., Lazar, N., Li de la Sierra-Gallay, I., Gohar, M. *et al.* (2016) How Quorum Sensing Connects Sporulation to Necrotrophism in *Bacillus thuringiensis*. *PLoS Pathog* **12**: e1005779.
- Perchat, S., Dubois, T., Zouhir, S., Gominet, M., Poncet, S., Lemy, C. *et al.* (2011) A cell-cell communication system regulates protease production during sporulation in bacteria of the *Bacillus cereus* group. *Mol Microbiol* **82**: 619-633.

- Perego, M. (2013) Forty years in the making: understanding the molecular mechanism of peptide regulation in bacterial development. *PLoS Biol* **11**: e1001516.
- Perego, M., Spiegelman, G.B., and Hoch, J.A. (1988) Structure of the gene for the transition state regulator, *abrB*: regulator synthesis is controlled by the *spo0A* sporulation gene in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **2**: 689-699.
- Perego, M., Glaser, P., and Hoch, J.A. (1996) Aspartyl-phosphate phosphatases deactivate the response regulator components of the sporulation signal transduction system in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **19**: 1151-1157.
- Pomerantsev, A.P., Pomerantseva, O.M., Camp, A.S., Mukkamala, R., Goldman, S., and Leppla, S.H. (2009) PapR peptide maturation: role of the NprB protease in *Bacillus cereus* 569 PlcR/PapR global gene regulation. *FEMS Immunol Med Microbiol* **55**: 361-377.
- Rasko, D.A., Rosovitz, M.J., Okstad, O.A., Fouts, D.E., Jiang, L., Cer, R.Z. *et al.* (2007) Complete sequence analysis of novel plasmids from emetic and periodontal *Bacillus cereus* isolates reveals a common evolutionary history among the *B. cereus*-group plasmids, including *Bacillus anthracis* pXO1. *J Bacteriol* **189**: 52-64.
- Raymond, B., Johnston, P.R., Nielsen-LeRoux, C., Lereclus, D., and Crickmore, N. (2010) *Bacillus thuringiensis*: an impotent pathogen? *Trends Microbiol* **18**: 189-194.
- Read, T.D., Peterson, S.N., Tourasse, N., Baillie, L.W., Paulsen, I.T., Nelson, K.E. *et al.* (2003) The genome sequence of *Bacillus anthracis* Ames and comparison to closely related bacteria. *Nature* **423**: 81-86.
- Reidl, J., and Klose, K.E. (2002) *Vibrio cholerae* and cholera: out of the water and into the host. *FEMS Microbiol Rev* **26**: 125-139.
- Richardson, A.R., Somerville, G.A., and Sonenshein, A.L. (2015) Regulating the Intersection of Metabolism and Pathogenesis in Gram-positive Bacteria. *Microbiol Spectr* **3**.
- Rittershaus, E.S., Baek, S.H., and Sassetti, C.M. (2013) The normalcy of dormancy: common themes in microbial quiescence. *Cell Host Microbe* **13**: 643-651.
- Roux, A., Todd, D.A., Velazquez, J.V., Cech, N.B., and Sonenshein, A.L. (2014) CodY-mediated regulation of the *Staphylococcus aureus* Agr system integrates nutritional and population density signals. *J Bacteriol* **196**: 1184-1196.
- Rumbaugh, K.P., Diggie, S.P., Watters, C.M., Ross-Gillespie, A., Griffin, A.S., and West, S.A. (2009) Quorum sensing and the social evolution of bacterial virulence. *Curr Biol* **19**: 341-345.
- Rutherford, S.T., and Bassler, B.L. (2012) Bacterial quorum sensing: its role in virulence and possibilities for its control. *Cold Spring Harb Perspect Med* **2**.
- Salamatou, S., Ramiise, F., Brehelin, M., Bourguet, D., Gilois, N., Gominet, M. *et al.* (2000) The PlcR regulon is involved in the opportunistic properties of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus* in mice and insects. *Microbiology* **146 (Pt 11)**: 2825-2832.
- Sanahuja, G., Banakar, R., Twyman, R.M., Capell, T., and Christou, P. (2011) *Bacillus thuringiensis*: a century of research, development and commercial applications. *Plant Biotechnol J* **9**: 283-300.
- Sanchis, V. (2011) From microbial sprays to insect-resistant transgenic plants: history of the biopesticide *Bacillus thuringiensis*. A review. *Agron Sustain Dev* **31**: 217-231.
- Sandoz, K.M., Mitzimberg, S.M., and Schuster, M. (2007) Social cheating in *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 15876-15881.
- Schnepf, E., Crickmore, N., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J. *et al.* (1998) *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**: 775-806.
- Slamti, L., and Lereclus, D. (2002) A cell-cell signaling peptide activates the PlcR virulence regulon in bacteria of the *Bacillus cereus* group. *EMBO J* **21**: 4550-4559.
- Slamti, L., and Lereclus, D. (2005) Specificity and polymorphism of the PlcR-PapR quorum-sensing system in the *Bacillus cereus* group. *J Bacteriol* **187**: 1182-1187.
- Slamti, L., and Waldor, M.K. (2009) Genetic analysis of activation of the *Vibrio cholerae* Cpx pathway. *J Bacteriol* **191**: 5044-5056.
- Slamti, L., Livny, J., and Waldor, M.K. (2007) Global gene expression and phenotypic analysis of a *Vibrio cholerae* *rpoH* deletion mutant. *J Bacteriol* **189**: 351-362.
- Slamti, L., de Pedro, M.A., Guichet, E., and Picardeau, M. (2011) Deciphering morphological determinants of the helix-shaped *Leptospira*. *J Bacteriol* **193**: 6266-6275.
- Slamti, L., Perchat, S., Huillet, E., and Lereclus, D. (2014) Quorum Sensing in *Bacillus thuringiensis* Is Required for Completion of a Full Infectious Cycle in the Insect. *Toxins (Basel)* **6**: 2239-2255.
- Slamti, L., Lemy, C., Henry, C., Guillot, A., Huillet, E., and Lereclus, D. (2016) CodY Regulates the Activity of the Virulence Quorum Sensor PlcR by Controlling the Import of the Signaling Peptide PapR in *Bacillus thuringiensis*. *Front Microbiol* **6**: 1501.
- Slamti, L., Perchat, S., Gominet, M., Vilas-Boas, G., Fouet, A., Mock, M. *et al.* (2004) Distinct mutations in PlcR explain why some strains of the *Bacillus cereus* group are nonhemolytic. *J Bacteriol* **186**: 3531-3538.
- Sonenshein, A.L. (2005) CodY, a global regulator of stationary phase and virulence in Gram-positive bacteria. *Curr Opin Microbiol* **8**: 203-207.
- Sonenshein, A.L. (2007) Control of key metabolic intersections in *Bacillus subtilis*. *Nat Rev Microbiol* **5**: 917-927.
- Stenfors Arnesen, L.P., Fagerlund, A., and Granum, P.E. (2008) From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiol Rev* **32**: 579-606.
- Stenz, L., Francois, P., Whiteson, K., Wolz, C., Linder, P., and Schrenzel, J. (2011) The CodY pleiotropic repressor controls virulence in gram-positive pathogens. *FEMS Immunol Med Microbiol* **62**: 123-139.

- Strauch, M.A., and Hoch, J.A. (1993) Transition-state regulators: sentinels of *Bacillus subtilis* post-exponential gene expression. *Mol Microbiol* **7**: 337-342.
- Suzuki, A., Mori, M., Sakagami, Y., Isogai, A., Fujino, M., Kitada, C. *et al.* (1984) Isolation and structure of bacterial sex pheromone, cPD1. *Science* **226**: 849-850.
- Thoendel, M., and Horswill, A.R. (2010) Biosynthesis of peptide signals in gram-positive bacteria. *Adv Appl Microbiol* **71**: 91-112.
- Torgerson, P.R., Hagan, J.E., Costa, F., Calcagno, J., Kane, M., Martinez-Silveira, M.S. *et al.* (2015) Global Burden of Leptospirosis: Estimated in Terms of Disability Adjusted Life Years. *PLoS Negl Trop Dis* **9**: e0004122.
- Turell, M.J., and Knudson, G.B. (1987) Mechanical transmission of *Bacillus anthracis* by stable flies (*Stomoxys calcitrans*) and mosquitoes (*Aedes aegypti* and *Aedes taeniorhynchus*). *Infect Immun* **55**: 1859-1861.
- Verplaetse, E., Slamti, L., Gohar, M., and Lereclus, D. (2015) Cell Differentiation in a *Bacillus thuringiensis* Population during Planktonic Growth, Biofilm Formation, and Host Infection. *MBio* **6**: e00138-00115.
- Verplaetse, E., Slamti, L., Gohar, M., and Lereclus, D. (2016) Two distinct pathways lead *Bacillus thuringiensis* to commit to sporulation in biofilm. *Res Microbiol*.
- Verstraeten, N., Knapen, W., Fauvart, M., and Michiels, J. (2016) A Historical Perspective on Bacterial Persistence. *Methods Mol Biol* **1333**: 3-13.
- Vilas-Boas, L.A., Vilas-Boas, G.F., Saridakis, H.O., Lemos, M.V., Lereclus, D., and Arantes, O.M. (2000) Survival and conjugation of *Bacillus thuringiensis* in a soil microcosm. *FEMS Microbiol Ecol* **31**: 255-259.
- Whiteley, M., Diggle, S.P., and Greenberg, E.P. (2017) Progress in and promise of bacterial quorum sensing research. *Nature* **551**: 313-320.
- Wiegert, T., and Schumann, W. (2001) SsrA-mediated tagging in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **183**: 3885-3889.
- Wunder, E.A., Jr., Slamti, L., Suwondo, D.N., Gibson, K.H., Shang, Z., Sindelar, C.V. *et al.* (2018) FcpB Is a Surface Filament Protein of the Endoflagellum Required for the Motility of the Spirochete *Leptospira*. *Front Cell Infect Microbiol* **8**: 130.
- Yamamoto, K., and Ishihama, A. (2005) Transcriptional response of *Escherichia coli* to external copper. *Mol Microbiol* **56**: 215-227.
- Young, K.D. (2006) The selective value of bacterial shape. *Microbiol Mol Biol Rev* **70**: 660-703.
- Yura, T., and Nakahigashi, K. (1999) Regulation of the heat-shock response. *Curr Opin Microbiol* **2**: 153-158.
- Zhou, L., Slamti, L., Nielsen-LeRoux, C., Lereclus, D., and Raymond, B. (2014) The social biology of quorum sensing in a naturalistic host pathogen system. *Curr Biol* **24**: 2417-2422.

Expériences d'encadrement et d'enseignement

Une des aspects de la recherche que j'apprécie le plus est de pouvoir former des étudiants, quel que soit leur niveau d'étude. J'ai eu l'opportunité d'être responsable de plusieurs étudiants au cours de ces dernières années.

ENCADREMENT DE STAGIAIRES EN MASTER 2 OU DE DOCTORANTS

Octobre 2018 – Octobre 2021

- Hasna Toukabri, étudiante en thèse (Ecole Doctorale ABIES).

Encadrement technique et scientifique à 100%.

Hasna a obtenu une bourse doctorale pour l'étude des "Stratégies de survie chez les bacilles sporulants à Gram positif".

Octobre 2017 – Juin 2019 (sur une thèse de 3 ans)

- Ruibin Zhang, étudiante en thèse en co-direction avec le State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests (Institute of Plant Protection, CAAS, Beijing, China) Directeurs de thèse : D. Lereclus et F. Song

Encadrement scientifique à 50%, technique à 85%.

Ruibin effectue la moitié de son doctorat en France dans le cadre du programme PHC Cai Yuanpei. Elle caractérise le régulateur CpcR et son implication dans la différenciation des cellules de la souche Bt LM1212. Une publication est en cours d'écriture pour la valorisation d'une partie de ses travaux.

Décembre 2016 – Juin 2017

- Stéphanie Henry, étudiante en M2 Immunologie, Microbiologie, Virologie et Infectiologie (Université Paris VII)

Encadrement technique et scientifique à 100%.

Stéphanie avait pour sujet l'étude du rôle du facteur sigma alternatif SigmaB dans le cycle infectieux de *B. thuringiensis*. Ce travail sera valorisé prochainement.

Suite à son stage au laboratoire, Stéphanie a effectué un CDD de quelques semaines pendant lequel elle a mis à profit les compétences acquises en cytométrie en flux. Elle a actuellement un CDD d'assistante ingénieure au CNR des mycobactéries à l'hôpital de la Pititié-Salpêtrière.

Septembre 2015 – Septembre 2016

- Samia Ben Rejeb, étudiante apprentie en M2 Microbiologie et Génie Biologique (Université Paris-Saclay)

Encadrement technique et scientifique à 100% en tant que maître d'apprentissage.

La travail de stage de Samia a porté sur la caractérisation des types cellulaires composant la population de *B. thuringiensis* lors du cycle infectieux. Son travail a été valorisé par la publication 25.

Samia a rejoint l'équipe GME en tant qu'ingénieure d'étude depuis le 15 mars 2017 pour 3 ans sur le projet BioSafe.

Novembre 2012 – Janvier 2016 (3 ans et 2 mois)

- Sébastien Gélis-Jeanvoine, étudiant en thèse (Ecole Doctorale ABIES).
Directeur de thèse : D. Lereclus

Encadrement scientifique à 50%, technique à 85%.

Sébastien a réalisé une thèse portant sur l'étude de la kurstakine et de Spo0A, deux facteurs d'adaptation de *B. thuringiensis*. Ce doctorat a été valorisé par la publication 24. Le reste de ce travail est en cours de valorisation.

Sébastien s'est réorienté dans le domaine de la programmation informatique.

Janvier 2013 – Décembre 2013 (sur une thèse de 3 ans)

- Chao Deng, étudiant en thèse en co-direction avec le State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests (Institute of Plant Protection, CAAS, Beijing, China).
Directeurs de thèse : D. Lereclus et F. Song

Encadrement technique et scientifique à 50%.

Le doctorat de Chao a porté sur l'étude de la différenciation en cellules productrices de cristaux et en cellules sporulantes chez la souche LM1212. Ce travail a fait l'objet de la publication 19.

Chao a obtenu un poste en Chine au Development Center for Science and Technology qui dépend du Ministère de l'Agriculture et des Affaires Rurales.

Novembre 2011 – Janvier 2012 (sur une thèse de 4 ans)

- Liqin Zhou, étudiante en thèse dans le laboratoire de notre collaborateur, le Dr. B. Raymond (Exeter University, Royaume-Uni)
Directeur de thèse : B. Raymond

Encadrement technique à 100%.

Liqin a travaillé sur l'étude de l'influence du système PlcR-PapR sur la valeur adaptative de *B. thuringiensis*. Son travail en collaboration avec notre équipe a été valorisé par la publication 18. Une seconde publication est en cours de préparation.

Liqin est actuellement en post-doctorat.

En plus des étudiants mentionnés ci-dessus, j'ai également encadré Yacine Réfès, stagiaire en Master 1 en 2012, et Morgane Girault, étudiante en L3 en 2015. Yacine a poursuivi en Master 2 puis en thèse et est actuellement en post-doctorat. Morgane a quant à elle choisi de s'orienter vers le marketing de la santé.

ENSEIGNEMENT

Participation à la préparation et à la supervision du cours de Microbiologie Générale de l'Institut Pasteur, Paris. Novembre - Décembre 2001

Sujet : Un régulon de virulence chez les *Bacillus* pathogènes

Réalisations à destination de la communauté scientifique

PARTICIPATION A PROJETS FINANCES

Coordination

J'ai obtenu un financement pour une bourse de thèse auprès de l'école doctorale ABIES et H. Toukabri a concouru pour obtenir cette allocation doctorale. Elle a commencé son doctorat sur l'étude des "Stratégies de survie chez les bacilles sporulants à Gram positif" en octobre 2018.

Je suis co-coordinatrice (avec D. Lereclus et V. Sanchis) du projet maturation BioSafe qui est financé par la SATT depuis mars 2017 pour une durée de 3 ans. Ce projet vise à produire des biopesticides efficaces et sûrs à base de *B. thuringiensis*. Ce projet est directement en lien avec les travaux réalisés sur la souche LM1212 mentionnés plus haut.

Participation à la conception/réalisation

J'ai participé à la conception du projet pré-compétitif BioCap qui est financé par TWB depuis octobre 2018 pour une durée de 2 ans. Ce projet consiste à mettre au point un processus de production de protéines encapsulées et sous forme de cristal dans *B. thuringiensis*.

J'ai participé à la conception du dossier PHC Cai Yuanpei pour l'étude de la différenciation de la souche *B. thuringiensis* LM1212 en partenariat avec nos collaborateurs de l'Institute of Plant Protection, CASS (Beijing, Chine). Ce projet est financé de juillet 2017 à juillet 2019.

Avant le projet maturation BioSafe, j'ai pris part à la conception et à la réalisation du projet AAP prématuration IDEX 2014-2015 (Bio-Safe) sur le même thème. Ce projet a donné lieu au dépôt d'un brevet (Cf Publications).

J'ai participé à la réalisation du projet ANR Cell.com (2009-2013) qui a donné lieu à plusieurs publications dont les publication 20 et 23 auxquelles je suis associée (Cf Publications).

ORGANISATION DE CONGRES

Je suis membre du comité d'organisation du prochain congrès "Bacillus ACT" qui se tiendra à Paris à l'automne 2020. Ce congrès se réunit en général tous les 2 ans et rassemble environ 200 participants parmi des scientifiques et des partenaires privés du monde entier, depuis presque 15 ans, autour des dernières avancées scientifiques dans le domaine de la recherche concernant *B. anthracis*, *B. cereus* et *B. thuringiensis*.

COLLABORATIONS ET PUBLICATIONS ASSOCIEES

- Céline Henry et Alain Guillot (Plateforme PAPPSO, Unité Micalis)
Slamti *et al.*, 2016 - 22
- Pr Sylvie Nessler (I2BC, Université Paris-Sud)
Grenha *et al.*, 2013 - 14
- Dr Ben Raymond (University of Exeter, Royaume-Uni)
Zhou *et al.*, 2014 - 18 ; Zhou *et al.* - en préparation
- Pr Anne-Brit Kolstø (Universitetet i Oslo, Norvège)
Vörös *et al.*, 2014 - 15
- Dr James E. Bina (University of Pittsburg, PA, Etats-Unis)
Taylor *et al.*, 2014 - 16
- Pr Fuping Song (Institute of Plant Protection, CASS, Beijing, Chine)
Deng *et al.*, 2015 - 19
- Dr Zvi Hayouka (The Hebrew University of Jerusalem, Israël)
Yehuda *et al.*, 2018 – 27

RESPONSABILITES EDITORIALES

J'ai été éditrice associée du Topic "Cell-cell communication in Gram-positive bacteria: from understanding to control" dans *Frontiers in Microbiology* (2013-2015) et je suis éditrice de revue pour le même journal dans la section "Microbial physiology and metabolism" depuis 2018.

EXPERTISE ET ETUDES

J'ai participé à une étude, portée par D. Lereclus, pour la société NBTA qui souhaitait démontrer qu'une de leurs souches bactériennes, supposée être un *B. thuringiensis* ou un *B. cereus*, ne possède pas les gènes qui codent pour les toxines connues de *B. cereus*.

Autres réalisations

REALISATIONS CONTRIBUANT AU FONCTIONNEMENT DU COLLECTIF

Je suis membre de la Commission Consultative de Spécialistes de l'Université (Paris-Sud, sections 64-69) (2014 à aujourd'hui). A ce titre, j'ai participé à un recrutement de Maître de Conférence lors des concours 2016.

J'anime le "comité d'animation scientifique Micalis" qui a été créé fin 2012 dans le but de dynamiser et d'unifier les différentes activités de présentations scientifiques (séminaires d'unité ainsi que séminaires invités) au sein de l'unité.

Je fais partie des représentants des chercheurs au Conseil d'Unité Micalis.

REALISATIONS CONTRIBUANT A L'INTERACTION SCIENCE-SOCIETE

J'ai pris part à la vulgarisation de nos connaissances lors d'un séminaire de 3 jours, organisé par le service communication du centre INRA de Jouy-en Josas, pour les étudiants en Master 1 de l'école de journalisme Institut Français de Presse (2016).

Publications

h-index (Web of Knowledge): 14

27. Yehuda A., **Slamti L.**, Bochnik-Tamir R., Malach E., Lereclus D. and Hayouka Z. (2018) Turning off *Bacillus cereus* quorum-sensing system with peptidic analogs **Chem. Comm.**, doi: 10.1039/c8cc05496g
26. Wunder E.A.* , **Slamti L.***, Suwondo D.N., Gibson K.H., Shang Z., Sindelar C.H., Trajtenberg F., Buschiazzi A., Ko A.I. and Picardeau M. (2018) FcpB is a surface filament protein of the endoflagellum required for the motility of the spirochete *Leptospira* **Front. Cell. Infect. Microbiol.** doi: 10.3389/fcimb.2018.00130
25. Ben Rejeb S., Lereclus D., **Slamti L.*** (2017) Analysis of *abrB* Expression during the Infectious Cycle of *Bacillus thuringiensis* Reveals Population Heterogeneity **Front. Microbiol.** 12;8:2471
24. Gélis-Jeanvoine S., Canette A., Gohar M., Caradec T., Lemy C., Gominet M., Jacques P., Lereclus D.* , **Slamti L.***. (2017) Genetic and functional analyses of *krs*, a locus encoding kurstakin, a lipopeptide produced by *Bacillus thuringiensis*. **Res Microbiol.** S0923-2508(16)30062-6.
23. Verplaetse E, **Slamti L.**, Gohar M, Lereclus D. (2017) Two distinct pathways lead *Bacillus thuringiensis* to commit to sporulation in biofilm. **Res Microbiol.** S0923-2508(16)30003-1.
22. **Slamti L.***, Lemy C, Henry C, Guillot A, Huillet E, Lereclus D. (2016) CodY regulates the activity of the virulence quorum-sensor PlcR by controlling the import of the signaling peptide PapR in *Bacillus thuringiensis*. **Front. Microbiol.** 6;6:1501.
21. 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 AB, Lereclus D. (2016) Correction: Necrotrophism Is a Quorum-Sensing-Regulated Lifestyle in *Bacillus thuringiensis*. **PLoS Pathog.** 12(11):e1006049. doi: 10.1371/journal.ppat.1006049.
20. 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.** 28;6(3).
19. Deng C., **Slamti L.**, Raymond B., Liu G., Lemy C., Gominet M., Yang J., Wang H., Peng Q., Zhang J., Lereclus D., Song F. (2015) Division of labour and terminal differentiation in a novel *Bacillus thuringiensis* strain. **ISME J.** doi: 10.1038/ismej.2014.122.
18. Zhou L., **Slamti L.**, Nielsen-LeRoux C., Lereclus D., Raymond B. (2014) The social biology of quorum-sensing in a naturalistic host pathogen system. **Curr. Biol.** 24(20):2417-22.
17. **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** (Basel). 6(8):2239-55. *Revue*
16. Taylor D.L., Bina X.R., **Slamti L.**, Waldor M.K., Bina J.E. (2014) Reciprocal Regulation of Resistance-Nodulation-Division Efflux Systems and the Cpx Two-Component System in *Vibrio cholerae*. **Infect Immun.** 82(7):2980-91.
15. Vörös A., Simm R., **Slamti L.**, McKay M.J., Hegna I.K., Nielsen-LeRoux C., Hassan K.A., Paulsen I.T., Lereclus D., Okstad O.A., Molloy M.P., Kolstø A.B. (2014) SecDF as part of the Sec-translocase facilitates efficient secretion of *Bacillus cereus* toxins and cell wall-associated proteins. **PLoS One.** 9(8):e103326.
14. 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. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 110(3):1047-52.
13. **Slamti L.**, Picardeau M. (2012) Construction of a library of random mutants in the spirochete *Leptospira biflexa* using a mariner transposon. **Methods Mol Biol.** 859:169-76. *Chapitre de livre*
12. **Slamti L.**, de Pedro M., Guichet M. and Picardeau M. (2011) Deciphering morphological determinants of the helix-shaped *Leptospira*. **J Bacteriol.** 193: 6266-6275.
11. Aviat F., **Slamti L.**, Cerqueira G. M., Lourdault K., Picardeau M. (2010) Expanding the genetic toolbox for *Leptospira* species by generation of fluorescent bacteria. **Appl Environ Microb.** 76 :8135-8142.
10. Choi A.H.K., **Slamti L.**, Avci F.Y., Pier G.B., Maira-Litrán T. (2009) The *pgaABCD* locus of *Acinetobacter baumannii* encodes the production of Poly-β-1-6-N-acetyl-glucosamine PNAG that is critical for biofilm formation. **J Bacteriol.** 191: 5953-5963.
9. **Slamti L.**, Waldor M.K. (2009) Genetic analysis of the *Vibrio cholerae* Cpx system. **J Bacteriol.** 191: 5044-5056.
8. Bouillaut L., Perchat S., Arold S.T., Zorrilla S., **Slamti L.**, Henry C., Gohar M., Declerck N., Lereclus D. (2008) Molecular basis for group-specific activation of the virulence regulator PlcR by PapR heptapeptides. **Nucleic Acids Res.** 36(11):3791-801.

7. 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. *Proc Natl Acad Sci. U S A.* 104: 18490-18495. Recommandé par Faculty of 1000 Biology.
6. **Slamti L.**, Livny J., Waldor M.K. (2007) Global gene expression and phenotypic analysis of a *Vibrio cholerae* *rpoH* deletion mutant. *J Bacteriol.* 189: 351-362.
5. **Slamti L.** and Lereclus D. (2005). Specificity and polymorphism of the PlcR-PapR quorum-sensing system in the *Bacillus cereus* group. *J Bacteriol.* 187: 1182-1187.
4. **Slamti L.**, Perchat S., Gominet M., Vilas-Bôas G., Fouet A., Mock M., Sanchis V., Chaufaux J., Gohar M., and Lereclus D. (2004). Distinct mutations in PlcR explain why some strains in the *Bacillus cereus* group are nonhemolytic. *J Bacteriol.* 186: 3531-3538.
3. Fedhila S., Gohar M., **Slamti L.**, Nel P. and Lereclus D. (2003). The *Bacillus thuringiensis* PlcR-regulated gene *inhA2* is necessary, but not sufficient, for virulence. *J Bacteriol.* 185: 2820-2825.
2. **Slamti L.** and Lereclus D. (2002). A cell-cell signaling peptide activates the PlcR virulence regulon in bacteria of the *Bacillus cereus* group. *EMBO J.* 21: 1-10. Recommandé par Faculty of 1000 Biology.
1. Gominet M., **Slamti L.**, Gilois N., Rose M. and Lereclus D. (2001). Oligopeptide permease is required for expression of the *Bacillus thuringiensis* PlcR regulon and for virulence. *Mol Microbiol.* 40: 963-975.

NB:

* = Auteur de correspondance

* = Egale contribution au travail

BREVET

Lereclus D., Song F., **Slamti L.**, Deng C., Zhang J. Characterization of an expression system for the production of Cry proteins in *Bacillus spp.* (EP17305011.3)

PRÉSENTATIONS ORALES À DES CONGRÈS

- **Slamti L.** and **Lereclus D.** Quorum sensing coordinates virulence, necrotrophism and sporulation in *Bacillus thuringiensis*. **19th International Conference on Bacilli and Gram-Positive Bacteria** – Berlin, Allemagne – 11/15 June 2017.
- **Slamti L.**, Lemy C., Henry C., Guillot A., Huillet E., Lereclus D. CodY supervises cell-cell communication in the *Bacillus cereus* group. **BACELL 2016** – Paris, France – 26/27 avril 2016.
- Zhou L., **Slamti L.**, Nielsen-LeRoux C., Lereclus D., Raymond B. The social biology of quorum-sensing in a naturally co-evolved host-pathogen model. **5th ASM Conference on Cell-Cell Communication in Bacteria** – San Antonio, Texas, USA – 18/21 octobre 2014.
- Huillet E., Perchat S., **Slamti L.**, André-Leroux G., Nessler S., **Lereclus D.** Virulence and adaptive properties of *Bacillus thuringiensis* are sequentially regulated by several quorum-sensing systems. **Bacillus ACT 2013, the international conference on Bacillus anthracis, B. cereus and B. thuringiensis** – Victoria, British Columbia, Canada – 01/05 septembre 2013.
- Grenha R., **Slamti L.**, Zouhir S., Nicaise M., Lereclus D., **Nessler S.** The RNPP family of quorum-sensing regulators: structure-function analysis. **Bacillus ACT 2013, the international conference on Bacillus anthracis, B. cereus and B. thuringiensis** – Victoria, British Columbia, Canada – 01/05 septembre 2013.
- **Huillet E.**, André-Leroux G., Perchat S., **Slamti L.**, Martin-Vestraete I., Lereclus D. A new rôle for the signaling peptide PapR in *Bacillus cereus*. **7th International Conference on Gram-Positive Microorganisms, 17th International Conference on Bacilli** – Montecatini Terme, Italie – 23/27 juin 2013.
- Grenha R., **Slamti L.**, Zouhir S., Nicaise M., Lereclus D., **Nessler S.** The RNPP family of quorum-sensing regulators: structure-function analysis. **7th International Conference on Gram-Positive Microorganisms, 17th International Conference on Bacilli** – Montecatini Terme, Italie – 23/27 juin 2013.
- **Slamti L.**, Mazouni K., **Picardeau M.** Characterization of genes involved in the morphogenesis of helical-shaped cells. **Gordon Research Conference, Biology of Spirochetes** – Ventura, CA, USA – 31 janvier/05 février 2010.
- **Slamti L.** and Lereclus D. A cell-cell signaling peptide activates the PlcR virulence regulon in bacteria of the *Bacillus cereus* group. **5th International conference on Anthrax, 3rd International Workshop on the Molecular Biology of Bacillus cereus, B. anthracis and B. thuringiensis** – Nice, France – 30 mars/03 avril, 2003.
- **Slamti L.** and Lereclus D. A cell-cell signaling peptide activates the PlcR virulence regulon in bacteria of the *Bacillus cereus* group. **Society for Invertebrate Pathology (SIP) 35th Annual Meeting, VI International Conference on Bacillus thuringiensis (ICBt)** – Foz do Iguassu, Brazil – 18/23 août, 2002.
- Gominet M., **Slamti L.**, Gilois N. and **Lereclus D.** Regulation of virulence gene expression in *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus*. **Functional Genomics of Gram-Positive Microorganisms** – San Diego, California, USA – 24/28 juin, 2001.

AFFICHES À DES CONGRÈS

- **Slamti L.**, Ma L., Lemy C., Guo S., Zhang J., Song F. and Lereclus D. CpcR, a novel cellular differentiation regulator in *Bacillus thuringiensis*. **19th International Conference on Bacilli and Gram-Positive Bacteria** – Berlin, Allemagne – 11/15 June 2017.
- **Slamti L.**, Lemy C. and Lereclus D. Integration of environmental signals and cell density for efficient cell-cell

communication in the *Bacillus cereus* group. **5th ASM Conference on Cell-Cell Communication in Bacteria** – San Antonio, Texas, USA – 18/21 octobre **2014**.

- **Slamti L.**, Grenha R., Nicaise M., Refes Y., Lereclus D., Nessler S. From sensing to quenching: structural basis for the activation mechanism of the quorum sensor PlcR. **7th International Conference on Gram-Positive Microorganisms, 17th International Conference on Bacilli** – Montecatini Terme, Italie – 23/27 juin **2013**.
- Verplaetse E., **Slamti L.**, Gélis S., Dubois T., Nielsen-Le Roux C., Gohar M., Lereclus D. Interconnections between virulence, necrotrophic and sporulation pathways in *Bacillus thuringiensis*. **7th International Conference on Gram-Positive Microorganisms, 17th International Conference on Bacilli** – Montecatini Terme, Italie – 23/27 juin **2013**.
- **Slamti L.**, Aviat F., Cerqueira G. M., Lourdault K., Picardeau M. Expanding the genetic toolbox of leptospire: generation of fluorescent bacteria. **6th International Leptospirosis Society Meeting - LeptoCON 2009** – Cochin, India – 21/24 septembre **2009**.
- **Slamti L.**, Waldor M. K. The *Vibrio cholerae* Cpx stress response system. **Gordon Research Conference, Bacterial Cell Surfaces** – New London, New Hampshire, USA – 22/27 juin **2008**.
- **Slamti L.**, Waldor M. K. The *Vibrio cholerae* Cpx stress response system. **Boston Bacterial Meeting** – Boston, MA, USA – 12/13 juin **2008**.
- **Slamti L.**, Livny J., Waldor M. K. The Heat-shock response and the RpoH regulon in *Vibrio cholerae*. **Molecular Genetics of Bacteria and Phages** – Madison, Wisconsin, USA – 02/07 août, **2005**.
- **Slamti L.**, Perchat S., Vilas-Bôas G., Gominet M., Fouet A., Mock M., Sanchis V., Chaufaux J., Gohar M., and Lereclus D. The PlcR regulon in the *Bacillus cereus* group: why some strains are non hemolytic. **Functional Genomics of Gram-Positive Microorganisms** – Baveno, Italy – 22/27 juin, **2003**.
- Gohar M., Økstad, O. A., Fedhila S., **Slamti L.**, Sanchis V., Kolstø A.-B. and Lereclus D. PlcR and virulence factors in *Bacillus cereus*. **5th International conference on Anthrax, 3rd International Workshop on the Molecular Biology of Bacillus cereus, B. anthracis and B. thuringiensis** – Nice, France – 30 mars/03 avril, **2003**.