



HAL
open science

Etude de la spore de *Bacillus subtilis* : caractérisation des structures impliquées dans sa résistance

Pauline Loison

► **To cite this version:**

Pauline Loison. Etude de la spore de *Bacillus subtilis* : caractérisation des structures impliquées dans sa résistance. Biotechnologies. Université de Bourgogne, 2013. Français. NNT : 2013DIJOS078 . tel-01124213

HAL Id: tel-01124213

<https://theses.hal.science/tel-01124213v1>

Submitted on 6 Mar 2015

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.

Université de Bourgogne
Ecole Doctorale Environnement - Santé - STIC - N°490

Thèse présentée à
AgroSup - Dijon

Pour obtenir le titre de
Docteur de l'Université de Bourgogne
Discipline : Sciences de l'alimentation
Spécialité : Microbiologie

par Pauline Loison

Etude de la spore de *Bacillus subtilis* : caractérisation
des structures impliquées dans sa résistance

Soutenue le 10 Octobre 2013

Devant la commission d'examen :

Pr. N. ORANGE	Université de Rouen	Rapporteur
Dr. D. MARGUET	CIML, Marseille	Rapporteur
Pr. JM. PERRIER-CORNET	AgroSup, Dijon	Directeur de thèse
Pr. D. CHAMPION	AgroSup, Dijon	Co-directeur de thèse
Pr. P. GERVAIS	AgroSup, Dijon	Examineur
Dr. F. WAHARTE	Institut Curie, Paris	Examineur

Remerciements

Ce travail de recherche a été réalisé à l'UMR Procédés Alimentaires et Microbiologiques, au sein de l'équipe Procédés Microbiologiques et Biotechnologiques, sous la direction du Professeur Jean-Marie Perrier-Cornet et du Professeur Dominique Champion.

Merci au Ministère de l'Éducation Nationale de la Recherche et de Technologie (MENRT) pour le financement de cette thèse.

Je tiens tout d'abord à remercier le Professeur Nicole Orange et le Docteur Didier Marguet d'avoir accepté la lourde tâche d'être mes rapporteurs de thèse. Je remercie également le Professeur Patrick Gervais et le Docteur François Waharte d'avoir accepté de participer à mon jury de thèse.

Je tiens aussi à remercier le Professeur Patrick Gervais, directeur de l'UMR PAM, de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire et de m'avoir permis d'effectuer cette thèse. Merci aussi pour votre aide et vos conseils.

J'adresse également mes remerciements à mes encadrants de thèse. Merci au Professeur Dominique Champion pour m'avoir encadré dans ce travail, pour sa disponibilité, sa gentillesse, ses précieux conseils et pour m'avoir ouvert les portes du monde des Sciences des matériaux. Je remercie aussi particulièrement le Professeur Jean-Marie Perrier-Cornet. Merci d'avoir accepté d'encadrer mon travail, pour tes précieux conseils et pour toutes nos discussions sur cette thèse. Merci également pour ta sympathie, ta disponibilité et ta gentillesse.

Je remercie également tout particulièrement les Docteurs Marina K. Kuimova et Neveen A. Hosny pour tous leurs conseils et leur gentillesse. Leur aide m'a été très précieuse, elles m'ont ouvert les portes de l'imagerie en temps de vie et particulièrement des rotors moléculaires. Merci de m'avoir permis de travailler avec le Bodipy-C₁₂.

Je remercie les membres de mon comité de thèse, Yvan Leguerinel et Marc Descamps, qui au cours des réunions annuelles m'ont prodigué de précieux conseils.

Merci à mes stagiaires, Emilie, Kevin et Fabienne avec qui j'ai eu le plaisir de travailler. Cette thèse est aussi leur travail et je les en remercie profondément.

Je tiens également à adresser un grand remerciement à tout le personnel de l'équipe PMB comprenant l'ensemble des Maitres de conférences et Professeurs. En particulier, merci à Eric, Rémy, Stéphane, Hélène et Mélanie. Laurent, je te remercie pour m'avoir initié au monde de la recherche. Je remercie particulièrement Sylvie pour sa disponibilité et sa gentillesse, merci d'être notre petite Maman du laboratoire ! Merci aussi au personnel administratif pour leur efficacité et leur aide à gérer les problèmes administratifs et en particulier Emmanuelle, Hélène, Karine et Florence. Merci également à Bernadette Rolin de l'équipe PAPC pour son aide et sa gentillesse!

Un merci tout particulier à la « spore team », Hué, Alex et Julia. Le spore c'est la vie ! Merci pour toutes nos discussions au travail mais surtout hors laboratoire! Mes remerciements vont également à mes voisins de bureau, Seb et Gui, sans qui le bureau n'aurait pas été pareil ! Merci également à Yann et Cyril mais aussi à Romain, Charline, Célia, Samira et Florence de la PPB. J'ai également une pensée particulière pour Mathieu. Merci à vous tous, c'est grâce à vous que ces années passées au laboratoire furent de franches rigolades, sans vous ça n'aurait pas été pareil!

Je tiens à remercier ma famille et tout particulièrement mes parents pour m'avoir continuellement soutenu et m'avoir laissé le choix de faire ce qui me plaisait.

Enfin, mes remerciements vont bien entendu à Bruno qui m'a accompagné tout au long de cette aventure. Merci d'avoir été là pour moi tout au long de cette thèse, pour ton soutien et ta présence au quotidien. Merci particulièrement pour ton aide et tes petits plats de ces six derniers mois, tu m'as aidé à tenir ! L'aventure continue maintenant...à Nancy !

En espérant n'avoir oublié personne.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION.....	1
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	7
1. La spore bactérienne, sa structure et son cycle de vie.....	7
1.1. Structure et spécificité d'une spore « mature »	7
1.1.1. L'exosporium	8
1.1.2. Le manteau (ou enveloppe).....	8
1.1.3. Le cortex.....	9
1.1.4. Les membranes interne et externe	10
1.1.5. Le protoplaste ou noyau	11
1.2. La sporulation	13
1.2.1. Induction de la sporulation.....	13
1.2.2. Formation d'une spore mature : la sporulation	14
1.3. Le retour à l'état végétatif : la germination et le développement.....	17
1.3.1. L'activation : une étape facultative	17
1.3.2. La germination : un phénomène complexe et multifactoriel.....	18
1.3.3. Le développement (ou émergence)	21
1.4. Les spores bactériennes : impact pour l'alimentation humaine et la santé.....	22
1.4.1. Pathogénicité	22
1.4.2. Spores comme agents probiotiques et vecteurs « thérapeutiques ».....	24
2. Résistance extrême de la spore aux stress environnementaux	27
2.1. Comparaison entre cellules végétatives et spores.....	27
2.2. Propriétés du protoplaste impliquées dans la résistance extrême des spores	28
2.2.1. Faible hydratation et mobilité réduite des composants du protoplaste	28
2.2.2. Composition minérale du protoplaste	29
2.2.3. Les protéines SASPs	29
2.2.4. L'acide dipicolinique (DPA).....	30
2.2.5. Les systèmes de réparation de l'ADN.....	31
2.3. La membrane interne : structure impliquée dans la faible perméabilité de la spore .	32
2.3.1. Rôle du manteau et du cortex dans la perméabilité.....	32
2.3.2. Composition de la membrane interne.....	33
2.3.3. Propriétés spécifiques de la membrane interne	36
2.3.4. Modulation des propriétés membranaires	38

3.	Effets de perturbations environnementales sur les structures de la spore	40
3.1.	Traitements physiques	40
3.1.1.	Pression hydrostatique.....	40
3.1.2.	Température	41
3.2.	Traitements chimiques.....	42
3.2.1.	Agents oxydants	43
3.2.2.	Autres composés chimiques	44
	CONCLUSION ET PROBLEMATIQUE DE LA THESE	47
	MATERIEL & METHODES	51
1.	Matériel biologique	51
1.1.	Souches utilisées et techniques de culture	51
1.1.1.	Souches bactériennes.....	51
1.1.2.	Production de spores	51
1.1.3.	Purification des productions de spores.....	53
1.1.4.	Production de cellules végétatives	53
1.2.	Germination des spores	54
1.2.1.	Conditions de germination	54
1.2.2.	Suivi de la germination	54
1.2.3.	Obtention de fragments d'enveloppe après germination.....	55
1.3.	Production de spores sans enveloppe (traitement chimique).....	55
2.	Caractérisation des structures de la spore par méthodes physicochimiques	56
2.1.	Etude de la mobilité par la résonance magnétique nucléaire (RMN).....	56
2.1.1.	Principe de la RMN.....	56
2.1.2.	Préparation des spores déshydratées	57
2.1.3.	Acquisition et traitement des signaux	57
2.2.	Utilisation de la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR)	59
2.2.1.	Principe de la spectroscopie infrarouge	59
2.2.2.	Préparation des échantillons et acquisition du signal.....	61
2.2.3.	Suivi de la germination	62
3.	Utilisation de la fluorescence pour étudier les structures de la spore	62
3.1.	Spectrofluorimétrie	62
3.1.1.	Principe.....	62
3.1.2.	Mesure de l'anisotropie de fluorescence	63
3.1.3.	Détermination du temps d'insertion de la sonde.....	63

3.1.4.	Réalisation d'une rampe de température	64
3.2.	Microscopie confocale.....	64
3.2.1.	Mesure de la perméabilité des spores aux sondes fluorescentes	64
3.2.2.	Acquisition d'image	66
3.3.	Imagerie en temps de vie de fluorescence (FLIM).....	66
3.3.1.	Principe.....	66
3.3.2.	Détermination de la viscosité	68
3.3.3.	Intégration de la sonde	71
3.4.	Cellules de visualisation	73
3.4.1.	Fixation des spores	73
3.4.2.	Germination.....	73
3.4.3.	Modification de la température	73
4.	Evaluation de l'effet d'un traitement éthanol sur les spores bactériennes	74
4.1.	Barèmes des traitements utilisés.....	74
4.2.	Estimation de la viabilité	75
4.2.1.	Pourcentage d'inactivation sur spores lavées.....	75
4.2.2.	Pourcentage d'inactivation sur spores non lavées.....	76
4.3.	Estimation de la perméabilisation des spores	76
4.4.	Evaluation de la viscosité des spores traitées	77
5.	Traitement statistique des données.....	77
	RESULTATS	80
1.	Caractérisation des structures de la spore impliquées dans sa faible perméabilité	80
1.1.	Approche non intrusive des structures et de la dynamique de la spore.....	81
1.1.1.	RMN pulsée à bas champ.....	81
1.1.2.	Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR)	84
1.2.	Approche de la structure de la spore par la fluorescence	86
1.2.1.	Incorporation de sondes fluorescentes dans les spores	87
1.2.2.	Mesure de la mobilité des membranes et des structures hydrophobes d'une population de spores par le DPH.....	89
1.2.3.	Mesure de la viscosité des membranes et des structures hydrophobes de spores individuelles par le Bodipy-C ₁₂	90
2.	Modification de la perméabilité de la spore et de la fluidité de ses membranes.....	100
2.1.	Modification « naturelle » des structures : la germination	100
2.1.1.	Libération de l'acide dipicolinique	100

2.1.2.	Modification de la membrane interne et de l'enveloppe.....	101
2.2.	Effet de la température sur les structures de la spore	107
2.2.1.	Modification de la fluidité membranaire et autres structures hydrophobes d'une population de spores.....	107
2.2.2.	Modélisation de l'état de rigidité de la membrane interne.....	108
2.2.3.	Mesures individuelles de l'évolution de la viscosité de la membrane interne des spores en fonction de la température.....	109
2.3.	Effet couplé de l'éthanol et de la température.....	111
2.3.1.	Impact de l'éthanol sur l'inactivation des spores	111
2.3.2.	Modification des structures	114
DISCUSSION GENERALE		125
Étude des propriétés de la membrane interne des spores bactériennes		125
Effet de la température sur les structures de la spore.....		133
Impact de l'éthanol sur les structures de la spore.....		138
CONCLUSIONS – PERSPECTIVES.....		145
BIBLIOGRAPHIE		151

Liste des symboles et abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
AED	Analyse enthalpique différentielle
AGFK	Asparagine, Glucose, Fructose et KCl
ANOVA	Analyse de la variance
AO	Acridine orange
ARN	Acide ribonucléique
ATP	Adénosine triphosphate
ATR	Réflectance totale atténuée
a_w	Activité de l'eau
BCP	Pourpre de bromocrésol
Bodipy-C ₁₂	Meso-phenyl-4,4'-difluoro-4-bora-3a,4adiaza-s-indacene
Ca ²⁺	Calcium
CL	Cardiolipide
ClO ₂	Dioxyde de chlore
CPMG	Carr-Purcell-Meiboom-Gill
DAPI	4',6'-diamidino-2-phénylindole
DCVJ	4-(Dicyanovinyl) Julolidine
dGDG	Digalactosyldiacylglycérol
DMPC	Dimyrystoylphosphatidylcholine
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DO	Densité optique
DP ²⁻	Anion dipicolinate
DPA	Acide pyridine-2,6-dicarboxylique ou Acide dipicolinique
DPH	1,6-Diphényl-1,3,5-Hexatriène
DPPC	Dipalmitoylphosphatidylcholine
Fi	Intensité fractionnelle
FID	Free Induction Decay
FLIM	Imagerie par durée de vie de fluorescence
FRAP	« Fluorescence recovery after photobleaching » – Redistribution de fluorescence après photoblanchiment
FTIR	Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier

FWHM	« Full Width Half Maximum » – Largeur à mi-hauteur
GFP	« Green Fluorescent Protein »
GP	Polarisation généralisée
GUV	Liposomes géants unilamellaires
H ⁺	Hydrogène
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène
HCl	Chlorure d'hydrogène
IP	Iodure de propidium
IRF	« Instrumental response function » – Réponse de l'instrument
K ⁺	Ion potassium
KCl	Chlorure de potassium
Laurdan	6-dodécanoyl-2-diméthylaminonaphthalène
LB	Luria Broth
LE	« Planar excited state » – Emission de fluorescence à partir de l'état excité « plan »
l-PG	Lysylphosphatidylglycérol
MAL	Résidus δ-lactam muramiques
Mg ²⁺	Ion manganèse divalent
Mn ²⁺	Ion magnésium divalent
NAG	N-acétyl-glucosamine
NAM	N-acétyl-muramique
NaOH	Hydroxyde de sodium
PBS	Tampon phosphate salin
PE	Phosphatidyléthanolamine
PG	Phosphatidylglycérol
pH	Potentiel hydrogène
PHB	Acide poly-β-hydroxybutyrique
r	Anisotropie de fluorescence
Rh 6G	Rhodamine 6G
Rh B	Rhodamine B
RMN	Résonance magnétique nucléaire
RPE	Résonance paramagnétique électronique
SASP	« Small Acid Soluble Proteins » – Petites protéines solubles dans l'acide

SG	Schaeffer's-glucose
SNK	Student-Newman-Keuls
SP	Photo-produits
SPAD	Single-photon avalanche diode
T ₂	Temps de relaxation spin-spin
TCSPC	Time-Correlated Single Photon Counting
T _g	Température de transition vitreuse
THF	Tétrahydrofurane
TICT	« Twisted intra-molecular charge transfer » – Relaxation non fluorescente à partir de l'état de torsion
TTFC	Fragment C de la toxine tétanique
UFC	Unité formant colonie
UV	Ultra-violet
ZnSe	Sélénure de zinc
η	Viscosité
η̃	Microviscosité apparente
χ ²	Valeur du Chi 2 réduit
τ	Temps de vie de fluorescence

INTRODUCTION

INTRODUCTION

De nombreux microorganismes procaryotes et eucaryotes peuvent produire des spores, que ce soit pour leur reproduction ou pour leur protection face à des conditions environnementales drastiques. Selon leur structure, leur mode de formation et leur origine, les spores bactériennes sont classées en quatre catégories : les arthrospores ou conidies, produites par les actinomycètes par exemple ; les kystes, produits par certaines bactéries Gram négatives ; les exospores, observées chez certaines cyanobactéries et les endospores (Sonenshein, 2000a). Dans le cadre de cette étude nous ne nous intéresserons qu'à cette dernière catégorie de spores, dont la formation et la maturation ont lieu à l'intérieur de la cellule mère. Cette catégorie concerne principalement des bactéries Gram positives, appartenant notamment aux genres *Bacillus* et *Clostridium* (qui appartiennent à la branche phylogénétique des *Firmicutes*) et qui sont largement répandues dans l'environnement (Carlin, 2011). Le genre *Bacillus* correspond à des bactéries en forme de bâtonnets (1,2 à 10 µm de long), chimio-hétérotrophes, généralement mobiles (présence de flagelles péritriches), habituellement présentes dans le sol. Ce sont des bactéries aérobies strictes ou facultatives. Le genre *Clostridium* correspond également à des bactéries Gram-positives, mais qui sont fermentaires, anaérobies et habituellement chimio-organotrophes. Les bacilles de ce genre font environ 1,5 à 20 µm de long et se retrouvent généralement dans les sols ainsi que dans le microbiote intestinal du tractus digestif (Cossart *et al.*, 2004; Prescott *et al.*, 2010). Dans ce travail, nous nous intéresserons plus particulièrement à la bactérie *Bacillus subtilis*. *B. subtilis* est « l'espèce type » du genre et la bactérie Gram-positive la plus étudiée. Son génome a ainsi été l'un des premiers à être complètement séquencé (Kunst *et al.*, 1997). En réponse à des conditions défavorables, ces bactéries ont donc la capacité de former par enkystement des endospores (appelées spores dans ce mémoire) métaboliquement inactives et qui peuvent survivre sous cette forme plusieurs millions d'années (Nicholson *et al.*, 2000).

Les spores résistent efficacement à de nombreuses perturbations environnementales comme des traitements thermiques à plus de 140 °C, à des pressions de plus de 4 GPa, à un manque de nutriments, à la plupart des agents antimicrobiens mais également aux rayonnements UV et γ . Elles sont en outre capables de germer même après de longues périodes de dormance (Nicholson *et al.*, 2000; Driks, 2002; Nicholson *et al.*, 2002; Errington, 2003). En effet, lorsque les conditions redeviennent favorables pour la croissance, la spore peut retourner à

son état végétatif (*via* la germination) et coloniser l'environnement par multiplication. Ces spores représentent une préoccupation majeure des industries alimentaires, car elles sont responsables de détérioration d'aliments et de toxi-infections alimentaires en raison de leur haute résistance aux procédés de conservation des aliments. Les spores bactériennes sont également connues pour être des agents infectieux animaux et humains. Elles sont responsables de pathologies comme la gangrène gazeuse (*Clostridium perfringens*), le tétanos (*Clostridium tetani*), le botulisme (*Clostridium botulinum*) ou encore la maladie du charbon (*Bacillus anthracis*). Du fait de leur extrême résistance, notamment à la déshydratation, ces spores sont des armes biologiques potentielles. Elles peuvent en effet être disséminées rapidement à travers le monde. Ainsi, en 2001, des spores de *B. anthracis* ont été utilisées comme arme biologique (Prescott *et al.*, 2010). Il serait néanmoins intéressant d'utiliser cette capacité à résister à des conditions environnementales drastiques pour protéger, conserver et délivrer des molécules d'intérêt (Setlow, 2005).

Cette résistance des spores est due à leur structure particulière et compartimentée (Atrih and Foster, 2002). En effet les spores sont formées de plusieurs couches superposées les unes aux autres et caractérisées par des propriétés différentes : un manteau protéique, un cortex fait de peptidoglycanes, deux membranes phospholipidiques et, enfin, le protoplaste contenant le matériel génétique et possédant une faible teneur en eau. A ce jour, bien qu'il y ait eu des avancées majeures dans la compréhension de la résistance extrême des spores bactériennes, les points clés de cette résistance ne sont pas complètement élucidés. La spore est une structure particulièrement peu perméable et possédant une faible mobilité de ses structures. La membrane interne par exemple est particulièrement intéressante car elle est généralement définie comme la principale barrière de perméabilité ; ses propriétés et sa structure sont cependant encore mal connues (Cowan *et al.*, 2004; Griffiths and Setlow, 2009). Cette imperméabilité est d'ailleurs très utile à la spore car elle lui permet de maintenir l'état déshydraté du protoplaste et donc son état de dormance. Le manque de données sur les structures de la spore et notamment ses structures les plus internes provient notamment de sa faible taille (~1 μm) et de sa compartimentation.

Dans ce contexte, l'objectif de cette étude est de mieux comprendre la formation et la structure spécifique d'une spore bactérienne et de les relier à sa résistance. Cette meilleure compréhension pourra permettre d'une part d'améliorer les procédés d'inactivation des spores et d'autre part d'utiliser la spore bactérienne comme modèle pour l'encapsulation de

molécules d'intérêts qui seraient internalisées dans son protoplaste. Pour ce faire, il est important de mettre au point de nouvelles méthodes d'investigation ou d'utiliser des techniques de caractérisation issues d'autres domaines, comme les sciences des matériaux et qui sont applicables à la spore bactérienne. Ces méthodes permettront d'analyser la faible perméabilité et la faible mobilité des structures de la spore. Elles permettront également d'observer l'effet de différentes perturbations, connues pour modifier ces propriétés, sur les structures de la spore.

Ce mémoire de thèse est divisé en quatre chapitres. Il débute par une étude bibliographique qui établit l'état des connaissances sur les spores bactériennes. Une description du cycle de vie des spores (sporulation, germination) est ainsi présentée après avoir donné une brève description de la structure de la spore. Ensuite, les spécificités de la structure sporale impliquées dans la résistance sont présentées dans une seconde partie. Un détail de la composition des différentes couches et leurs rôles dans les différentes résistances de la spore est donné. Plus particulièrement, les connaissances sur la structure la plus impliquée dans la faible perméabilité et rigidité de la spore, la membrane interne, sont détaillées. Enfin, la troisième et dernière partie aborde certaines perturbations environnementales responsables de modifications des structures et notamment permettant de moduler la perméabilité et la rigidité de la spore.

Le second chapitre du mémoire rassemble les matériels et méthodes utilisés pour réaliser les travaux de recherches et détaille notamment les techniques utilisées et développées pour suivre l'évolution des structures internes de la spore. Une méthode innovante d'investigation des membranes utilisant la fluorescence dans le temps est développée.

Le troisième chapitre présente l'ensemble des résultats obtenus au cours de ce travail de thèse. La première partie concerne la mise en place et l'utilisation de méthodes de caractérisation des structures afin d'étudier la faible perméabilité et la rigidité de la spore. Ces méthodes sont issues d'une part des sciences des matériaux et d'autre part de l'utilisation de sondes fluorescentes aux propriétés spécifiques. Dans une seconde partie, différentes perturbations modulant les propriétés de la spore sont utilisées. Ainsi, la germination, méthode dite « naturelle » est étudiée. L'effet de la température, notamment dans la gamme de température permettant l'activation thermique de la germination, est également observé. Enfin, l'effet de traitements combinant à la fois l'éthanol et la température, connus pour perméabiliser les

structures de la spore, est caractérisé. Les modifications structurales de la spore en relation avec son inactivation sont ainsi abordées dans cette dernière partie.

Enfin, une discussion de l'ensemble des résultats présentés dans ce mémoire fera l'objet du quatrième et dernier chapitre de ce mémoire.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1. La spore bactérienne, sa structure et son cycle de vie

1.1. Structure et spécificité d'une spore « mature »

Certaines bactéries, appartenant aux genres *Bacillus*, *Clostridium* (bâtonnets) ou *Sporosarcina* (coques) sont capables dans des conditions défavorables, de produire une structure de résistance particulière : l'endospore. La sporulation est le processus qui conduira à la formation de cette forme cellulaire de résistance qui s'appuie sur une morphologie unique et remarquable. En 1876, Robert Koch et Ferdinand Cohn publient la première description morphologique des endospores de *B. anthracis* et *B. subtilis* (Eichenberger, 2007). La Figure 1 présente ainsi une schématisation de cette structure de résistance.

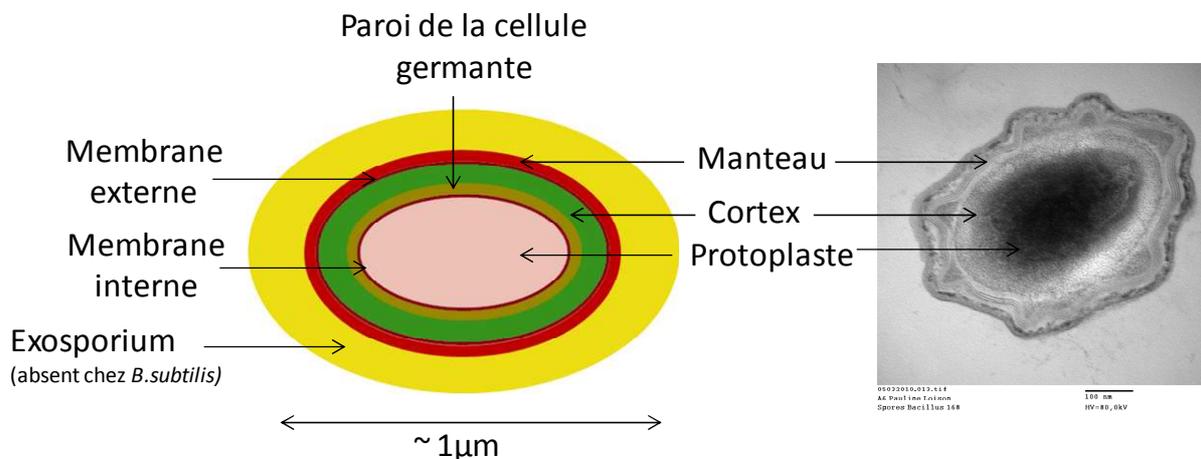


Figure 1 : Schéma général de la structure de la spore bactérienne (l'échelle des différentes structures n'est pas respectée) et photographie en Microscopie Electronique à Transmission d'une spore de *Bacillus subtilis* (MET). Echelle : 100 nm.

Cette forme cellulaire est multicouche, chaque couche possédant des spécificités notamment en termes de composition.

1.1.1. L'exosporium

Cette structure principalement protéique n'est présente que chez certaines espèces de *Bacillus* comme *B. cereus*, *B. anthracis* ou *Bacillus thurengiensis* mais est absente chez *B. subtilis*. Il s'agit de la couche la plus externe de la spore. Cette structure est constituée principalement de lipides, de polysaccharides et de protéines (Matz *et al.*, 1970; Setlow and Johnson, 2007). Ainsi, pour *B. cereus*, la fraction protéique représente 52% de l'exosporium. Sa fonction reste cependant peu claire, mais l'exosporium pourrait conférer aux spores des propriétés d'adhérence aux surfaces du fait de sa nature extrêmement hydrophobe. En outre, l'exosporium est plus hydrophobe que le manteau (Koshikawa *et al.*, 1989).

1.1.2. Le manteau (ou enveloppe)

Le manteau est constitué d'environ 30 à 80 protéines spécifiques différentes et est organisé en deux parties : l'enveloppe interne et l'enveloppe externe (Setlow and Johnson, 2007; Leggett *et al.*, 2012). Dans les spores dormantes, le manteau représente une grande fraction du volume de la spore. En effet, son épaisseur est d'environ 77 nm pour un rayon total de la spore d'environ 577 nm (Westphal *et al.*, 2003). En approximant la spore à une sphère, cela signifie que le volume de l'enveloppe représente environ 35 % du volume total de la spore tandis que la fraction protéique de l'enveloppe représente 50 à 80% des protéines totales de la spore (Leggett *et al.*, 2012). Le manteau contient également des carbohydrates (6%). L'enveloppe interne a une apparence lamellaire et est peu dense en microscopie électronique, au contraire, l'enveloppe externe est plus épaisse et plus dense aux électrons. Bien que la plupart des protéines n'aient pas de rôle connu, le manteau en lui-même assure un rôle de protection du cortex contre les enzymes de dégradation du peptidoglycane. En effet, sans l'enveloppe, ces enzymes, comme le lysozyme, ont accès au cortex et entraînent sa dégradation. Ainsi, le manteau joue un rôle de protection physique face à des bactériovores. Des auteurs ont montré, par exemple, que le manteau était essentiel à la résistance à la prédation par le protozoaire *Tetrahymena thermophila* (Klobutcher *et al.*, 2006) ou par le nématode *Caenorhabditis elegans* (Laaberki and Dworkin, 2008), en empêchant l'accès des enzymes muralytiques de l'hôte au cortex de la spore. Cette structure a également un rôle de protection face à certains agents chimiques (glutaraldehyde, iode, agents oxydants,...). Ainsi, des spores mutantes sans enveloppe sont très sensibles à l'hypochlorite de sodium (eau de Javel) (Ghosh *et al.*, 2008). Le mécanisme par lequel le manteau protège la spore face à ces

agents n'est pas très clair : soit il joue un rôle de barrière de perméabilité (mais beaucoup de composés semblent pouvoir traverser cette structure), soit cette structure sert à détoxifier ces composés chimiques avant qu'ils ne pénètrent dans les régions internes de la spore. A ce jour, à l'exception de CotA laccase qui intervient dans la protection contre le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) (Henriques and Moran, 2007), aucune protéine précise n'a cependant été identifiée dans ce rôle (Setlow, 2006).

1.1.3. Le cortex

Le cortex est constitué d'une forme de peptidoglycane (hétéropolymère de deux dérivés glucidiques, la N-acétyl-glucosamine (NAG) et l'acide N-acétyl-muramique (NAM) et de différents acides aminés) qui est similaire, mais non identique, au peptidoglycane des parois des cellules végétatives. Il s'en distingue par la présence de résidus δ -lactam muramiques (MAL). Cette particularité est à l'origine d'un plus faible nombre de chaînes latérales peptidiques et ainsi d'une réduction de la réticulation des brins glycanes (Popham, 2002). En effet seulement 3% environ des résidus NAM des spores de *Bacillus subtilis* contiennent des chaînes latérales peptidiques réticulées, c'est-à-dire environ 11 fois moins que dans la paroi d'une cellule végétative (Atrih *et al.*, 1996). Le cortex contient également des enzymes sous forme inactive, SleB et CwlJ, qui permettent d'hydrolyser le cortex au cours de la germination. Les résidus δ lactames sont nécessaires pour l'hydrolyse du cortex durant la germination. En effet, ces résidus font partie des substrats reconnus par ces enzymes (Atrih and Foster, 1999). CwlJ est synthétisée dans la cellule mère et localisée spécifiquement entre le cortex et le manteau. SleB est également présente à cet endroit mais aussi au niveau de la membrane interne (Chirakkal *et al.*, 2002) (Figure 2).

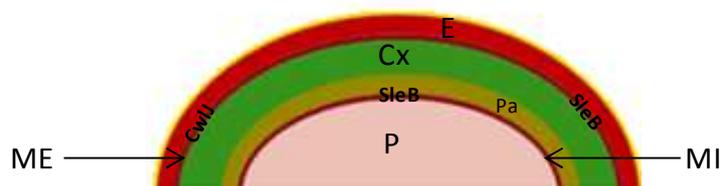


Figure 2 : Schéma présentant la localisation des enzymes de germination dans la spore bactérienne. Cx : cortex, E : enveloppe, MI : membrane interne, ME : membrane externe, P: protoplasme, Pa : paroi de la cellule germante. D'après (Setlow, 2003).

Le cortex semble jouer un rôle déterminant dans la déshydratation et le maintien de l'état déshydraté du protoplasme, paramètre important notamment dans la résistance des spores à la chaleur humide. Cependant les mécanismes de déshydratation sont encore peu compris

(Setlow, 2006). Ainsi, le faible degré de réticulation dans les spores a été identifié comme un mécanisme possible responsable de l'obtention et du maintien d'un état déshydraté du protoplaste. Cependant, certains auteurs ont montré qu'un plus fort degré de réticulation du cortex n'affecte pas l'hydratation du protoplaste mais perturbe par contre la germination des spores (Popham *et al.*, 1996). Le cortex constitue une structure de résistance mécanique face à la forte pression osmotique générée par la concentration importante des solutés dans le protoplaste (Meador-Parton and Popham, 2000; Popham, 2002; Zhang *et al.*, 2012). Le cortex pourrait avoir un rôle dans la création et le maintien de l'état compressé de la membrane interne pendant la sporulation et ce jusqu'à la germination (Cowan *et al.*, 2004).

Entre le cortex et la membrane interne se situe la paroi de la cellule germante. La structure de cette couche de peptidoglycane apparaît identique à celle d'une cellule végétative. Celle-ci deviendra la paroi de la future cellule végétative.

1.1.4. Les membranes interne et externe

1.1.4.1. La membrane externe

Cette membrane, localisée entre le cortex et le manteau, est peu connue et peu décrite dans la littérature. Il s'agit d'une membrane fonctionnelle lors du développement de la préspore mais qui pourrait ne plus l'être dans la spore dormante (Setlow and Johnson, 2007). Ainsi, cette membrane semble ne plus être intègre dans la spore et ne serait pas une barrière de perméabilité importante (Setlow, 2006). Il a été montré chez *Bacillus megaterium* que cette membrane possède une composition lipidique différente de celle de la membrane interne (Swerdlow and Setlow, 1984). Cette membrane ne semble pas avoir de rôle particulier dans la résistance des spores aux radiations, à la chaleur ou à des agents chimiques (Nicholson *et al.*, 2000).

1.1.4.2. La membrane interne

Les propriétés de la membrane interne seront détaillées succinctement dans cette partie, la membrane interne faisant l'objet d'une partie ultérieure (cf 2.3). Cette membrane correspond à la membrane de la future cellule végétative. Sa composition lipidique apparaît très similaire à celle de la cellule végétative (Griffiths and Setlow, 2009) avec cependant une proportion plus élevée de cardiolipides pour les spores. La composition protéique est quant à elle très

différente. En effet, bien que la membrane des cellules végétatives contienne de nombreuses protéines, la membrane interne possède, en plus des protéines membranaires classiques, d'autres protéines très spécifiques. Ces protéines vont être des transporteurs, mais surtout des récepteurs de germination (Paidhungat and Setlow, 2001). Cette membrane possède de plus des propriétés uniques. Il s'agit d'une importante barrière de perméabilité, ralentissant l'entrée de la plupart des molécules, aussi petite que la méthylamine, dans le protoplaste de la spore (Black and Gerhardt, 1962; Cortezzo *et al.*, 2004). Ceci permet une protection face aux agents chimiques pouvant altérer l'ADN. Elle possède de plus une très faible dynamique, des auteurs ayant montré que les lipides de cette membrane sont très peu mobiles (Cowan *et al.*, 2004).

1.1.5. Le protoplaste ou noyau

Il s'agit de la structure centrale de la spore, contenant le matériel génétique, la plupart des enzymes synthétisées ainsi qu'une molécule en quantité très abondante et spécifique à la spore : l'acide pyridine-2,6-dicarboxylique ou acide dipicolinique (DPA).

L'hydratation du protoplaste est considérée comme faible, l'eau ne représente que 27 à 50% du poids humide du protoplaste de spores, la variation étant liée aux espèces et aux conditions de sporulation (Storz and Hengge, 2011). Ainsi les cellules végétatives contiennent environ 4 g d'eau / g de poids sec comparées au cytoplasme des spores qui ne contient que 0,4 à 1 g d'eau / g de poids sec, soit environ 10 fois moins (Setlow and Johnson, 2007). Cette faible teneur en eau est notamment liée à la présence dans le protoplasme du DPA complexé en majorité aux ions calcium à un ratio 1 : 1 (Ca-DPA). Ainsi, des spores mutantes sans DPA présentent une plus faible densité du protoplaste et donc une teneur en eau plus importante (Paidhungat *et al.*, 2000). En effet, Lindsay *et al.*, ont corrélé la mesure de la densité du protoplaste avec sa teneur en eau selon l'Équation 1 (Lindsay *et al.*, 1985).

$$y = -0.00254x + 1.460$$

Équation 1

Avec y, densité du protoplaste et x, teneur en eau du protoplaste.

Le DPA représente environ 5 à 15% du poids sec total des spores. Cette concentration est telle que le DPA est au-dessus de sa limite de solubilité (Huang *et al.*, 2007). Cependant, il semble que la faible teneur en eau du protoplaste n'empêche pas une mobilité importante de l'eau, celle-ci ne serait que 30 fois inférieure à « de l'eau libre » et comparable à un système eau/protéine de 0,6 g eau / g protéine (Sunde *et al.*, 2009). Par contre, la mobilité des

protéines et des ions à l'intérieur du protoplaste est quant à elle quasi nulle (Cowan *et al.*, 2003). Une autre caractéristique du protoplaste est la valeur de son pH, celui-ci diminuant de 1 à 1,5 unités durant la sporulation pour atteindre une valeur proche de 6. Cette valeur est plus faible que celle mesurée dans les cellules végétatives (classiquement autour de 7,5-8) (Setlow and Setlow, 1980; Magill *et al.*, 1994). Ces changements de pH pourraient entraîner des changements dans le métabolisme et la synthèse de macromolécules. Ainsi, la faible hydratation et le pH jouent un rôle essentiel dans la modulation de la mobilité et de l'activité enzymatique du protoplaste.

Une dernière caractéristique du protoplaste est la présence de petites protéines solubles dans l'acide ou « Small Acid Soluble Proteins » (SASP), représentant 5 à 10% des protéines totales des spores de *Bacillus* ou *Clostridium*, les plus répandus étant les SASP α et β . Ces protéines, spécifiques des spores, forment un complexe avec l'ADN et le sature, lui conférant une forme compressée particulière, une structure « ring like » comme le montre la [Figure 3](#) (Ragkousi *et al.*, 2000).

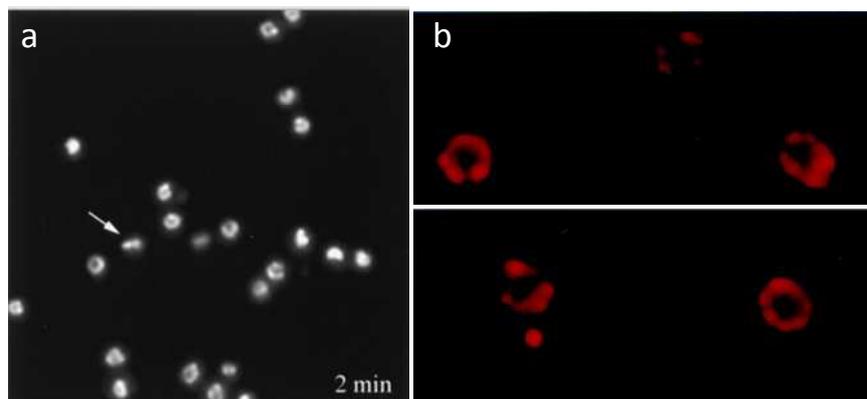


Figure 3: Observation en microscopie de fluorescence de spores de *Bacillus megaterium* marquées après 2 min de germination. a) marquage de l'ADN au DAPI b) immunomarquage des SASPs α/β . D'après (Ragkousi *et al.*, 2000).

Cet assemblage permet de protéger l'ADN contre de nombreuses altérations (Setlow *et al.*, 1991; Setlow, 2007). Ces protéines sont synthétisées tardivement dans la sporulation et rapidement dégradées pendant la phase de germination (Setlow, 2007). Le rôle du DPA et des SASPs sera détaillé dans la partie 2.2.

1.2. La sporulation

La structure compartimentée de la spore résulte d'un cycle de formation unique qui conduit la cellule bactérienne à former une endospore. Ce processus est appelé sporulation. Les caractéristiques et la résistance exceptionnelle de la spore sont fortement liées au bon déroulement des différentes étapes de cette sporulation. Celles-ci seront détaillées dans la partie suivante.

1.2.1. Induction de la sporulation

L'entrée des cellules en sporulation dépend de plusieurs facteurs, le principal stimulus de ce processus étant la limitation en nutriments. En général, une limitation en source de carbone, d'azote ou plus rarement de phosphore peut induire une entrée en sporulation (Nicholson and Setlow, 1990; Sonenshein, 2000b). Dans leur environnement naturel (le sol généralement), ces bactéries sont souvent confrontées à un manque de nutriments et disposent alors de plusieurs stratégies de survie. Lorsque la densité cellulaire augmente, des peptides spécifiques sont sécrétés et s'accumulent dans le milieu extracellulaire. Quand ces peptides atteignent une concentration critique, reflétant une forte concentration cellulaire, ils sont « détectés » par des récepteurs à la surface des cellules et peuvent entraîner une phosphorylation d'une protéine clé de la sporulation : Spo0A (Hoch, 1976; Strauch *et al.*, 1990). Le facteur de transcription Spo0A et notamment son degré de phosphorylation gouverne la décision de l'entrée en sporulation mais également d'autres stratégies de survie. En effet, un faible degré de phosphorylation conduira plutôt à la formation de biofilms ou à du cannibalisme alors qu'un degré élevé entraînera la sporulation (López *et al.*, 2009). Ces phosphorylations sont sous le contrôle de kinases (Errington, 2003; Higgins and Dworkin, 2012). Le cannibalisme a ainsi été observé chez *B. subtilis*. La lyse de cellules qui ne sont pas encore entrées en sporulation, *via* différentes enzymes, permet de libérer des nutriments. Ceci va permettre aux cellules ayant initié la sporulation de continuer à croître plutôt que de terminer la sporogénèse ou de réaliser une sporulation « efficace » au moment opportun. Ainsi, le cannibalisme, permettrait de retarder le recours à la sporulation (Gonzalez-Pastor *et al.*, 2003). La sporulation semble être l'ultime recours, puisqu'il s'agit d'un processus long et coûteux en énergie (Errington, 2003). L'entrée en sporulation nécessite un autre facteur de transcription, le facteur σ^H . Celui-ci, en partenariat avec Spo0A, serait impliqué dans la division cellulaire asymétrique qui conduirait à la sporulation (Hilbert and Piggot, 2004;

Piggot and Hilbert, 2004). Les facteurs sigma sont des sous-unités protéiques qui s'associent transitoirement avec l'ARN polymérase. Une fois associés, ces facteurs sigma déterminent ainsi la spécificité de liaison de l'ARN polymérase avec des régions promotrices de l'ADN, augmentant la transcription de sous-ensembles de gènes impliqués dans des processus spécifiques (Gruber and Gross, 2003; Prescott *et al.*, 2010), ici la sporulation.

Spo0A agit aussi en activant d'autres gènes spécifiques clés de la sporulation, notamment ceux impliqués dans l'activation de facteurs sigma spécifiques à la sporulation (McKenney *et al.*, 2013).

1.2.2. Formation d'une spore mature : la sporulation

Face aux conditions extrêmes de son environnement la cellule va, en dernier recours, initier la sporulation. Il s'agit d'un processus complexe, divisé généralement en 7 étapes, contrôlé par 4 facteurs sigma distincts en plus de σ^H (Piggot and Hilbert, 2004). Ces facteurs sigma sont spécifiques de la sporulation et contrôlent l'expression de gènes de la préspore et de la cellule mère en début de sporulation (σ^F et σ^E , respectivement) et plus tardivement dans la sporulation (σ^G et σ^K respectivement) (Hilbert and Piggot, 2004; De Hoon *et al.*, 2010).

La cellule végétative mère est considérée comme l'étape 0-I. La Figure 4 schématise les étapes conduisant à une spore mature.

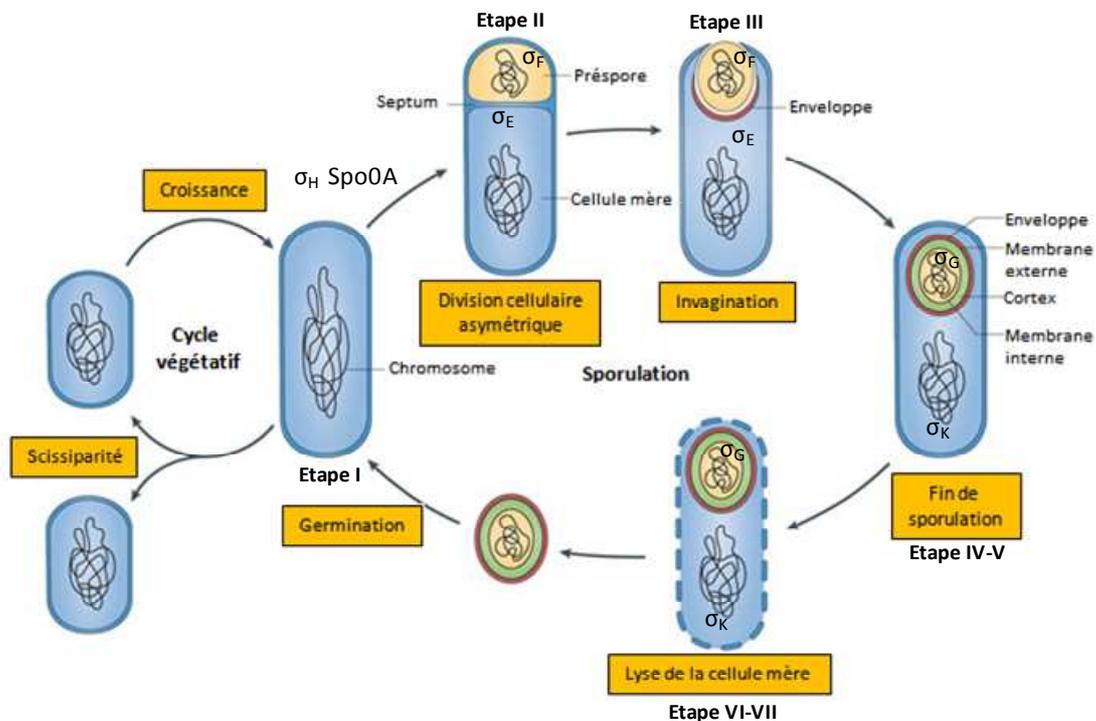


Figure 4 : Schéma simplifié des étapes du cycle de sporulation et de germination chez *Bacillus subtilis*. D'après (McKenney *et al.*, 2013).

Elle débute par une division cellulaire asymétrique près de l'un des pôles de la cellule, cette étape est contrôlée par Spo0A et σ^H . Le septum de division pendant la sporulation est similaire mais non identique à un septum de division cellulaire classique, et contient une fine couche de peptidoglycane séparant les deux compartiments (Higgins and Dworkin, 2012). Ceci correspond à l'étape II de la sporulation. Pendant cette étape, la cellule mère synthétise un certain nombre d'enzymes (principalement extracellulaires), incluant des α -amylases, protéases et nucléases ainsi qu'une variété d'antibiotiques extracellulaires. En conséquence de cette division asymétrique, deux compartiments sont formés : un plus petit, la préspore et un plus grand, la cellule mère.

Chaque compartiment s'engage dans une voie de différenciation *via* différents facteurs sigma, σ^F dans la préspore et σ^E dans la cellule mère (Parker *et al.*, 1996; Piggot and Hilbert, 2004; Leggett *et al.*, 2012). σ^F entraînera l'activation de gènes impliqués dans la synthèse de récepteurs de germination, le développement des constituants du cortex de la future spore, la réparation de l'ADN et la communication avec le compartiment de la cellule mère (Wang *et al.*, 2006). Le septum commence ensuite à s'incurver et finalement, la préspore devient complètement intégrée à l'intérieur de la cellule mère. Il s'agit de l'invagination, considérée comme l'étape III. La préspore est englobée par la cellule mère, dans un processus ressemblant à une phagocytose (Higgins and Dworkin, 2012; McKenney *et al.*, 2013). Après l'achèvement de l'invagination, la préspore est alors libre dans la cellule mère et entièrement entourée par deux membranes, interne et externe. C'est à partir de ce stade que l'on parle de « commitment », c'est-à-dire que l'engagement dans la voie de la sporulation devient irréversible (Parker *et al.*, 1996; Higgins and Dworkin, 2012).

Durant l'étape IV, deux couches de peptidoglycane sont synthétisées entre les deux membranes : une couche épaisse correspondant au cortex et la paroi de la future cellule. Cette synthèse résulte de l'action de gènes exprimés dans la cellule mère notamment sous le contrôle de σ^E , mais aussi de σ^K (Errington, 1993; Vasudevan *et al.*, 2007). Cette étape est suivie par l'étape V qui voit la synthèse de l'enveloppe à l'extérieur de la spore en développement. Il a cependant été décrit que l'assemblage du manteau commence juste après l'invagination et continue tout au long de la sporulation. Celui-ci est composé d'au moins 70 protéines individuelles qui sont produites par la cellule mère et commencent à se localiser à la surface de la spore pendant l'invagination. Les précurseurs du peptidoglycane sont également synthétisés dans la cellule mère et sont acheminés à travers la membrane externe de la préspore (Vasudevan *et al.*, 2007; McKenney and Eichenberger, 2012). En même temps que la formation du cortex, la préspore perd de l'eau et des ions comme le potassium (K^+),

suscitant une forte diminution en volume et une baisse simultanée du pH d'environ une unité. La diminution du contenu en eau de la spore s'accompagne de l'absorption de cations (Ca^{2+} , Mg^{2+} ou Mn^{2+}) et du DPA qui est synthétisé dans la cellule mère pendant les étapes IV et V. La dernière période de développement des spores, la maturation appelée étape VI, se produit avec peu de changements morphologiques manifestes (le matériau de l'enveloppe devient plus dense en apparence) mais au cours de cette période, les propriétés caractéristiques de résistance à la chaleur, de dormance et de germination apparaissent successivement. La cellule mère se lyse ensuite pour libérer la spore mature, il s'agit du dernier stade, l'étape VII (Nicholson and Setlow, 1990; Errington, 1993; Leggett *et al.*, 2012). Cette spore libérée, métaboliquement inactive, est ainsi résistante à de nombreux stress environnementaux extrêmes (hautes températures, radiations, détergents, solvants chimiques,...) et peut rester à l'état de dormance sur une très longue période de temps (Errington, 2003).

Les deux termes « matures » et « métaboliquement inactive » doivent être pris avec précaution lorsqu'on parle de spores qui viennent d'être libérées de la cellule mère. En effet, des auteurs ont montré, que des spores récoltées directement après leur libération, sont moins résistantes à la chaleur que celles récoltées au moins 24 h plus tard. Ceci serait lié à une maturation supplémentaire de l'enveloppe, elle-même reliée à une activité enzymatique (Sanchez-Salas *et al.*, 2011). De plus, il semble que ces « jeunes » spores possèdent une dynamique de transcription (période adaptative), et n'entreraient en réalité en dormance que quelques jours après la fin de la sporulation (Segev *et al.*, 2012).

Dans les cultures de laboratoire, la sporulation commence au début de la phase stationnaire lorsque les nutriments sont épuisés (Nicholson and Setlow, 1990; McKenney and Eichenberger, 2012). La Figure 5 présente ainsi un résumé des étapes de la sporulation en fonction de la densité optique chez *B. subtilis* à 37 °C. Du point de vue d'une spore individuelle, la sporulation dure environ 8 à 10 h (De Hoon *et al.*, 2010).

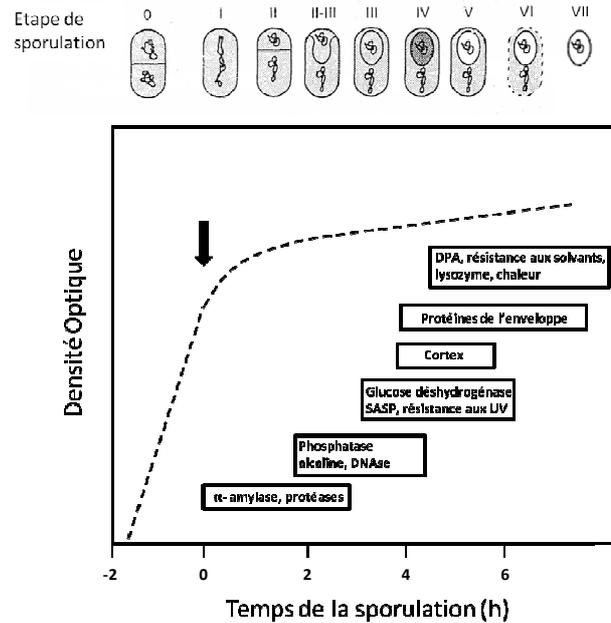


Figure 5: Courbe de temps idéalisée de la sporulation chez *Bacillus subtilis* à 37 °C avec les différentes synthèses caractéristiques et l'apparition de différentes résistances. (D'après Nicholson et Setlow, 1990).

1.3. Le retour à l'état végétatif : la germination et le développement

Les spores sont formées lorsque les conditions environnementales de la bactérie sont défavorables. Inversement, lorsque ces mêmes conditions redeviennent viables pour le microorganisme, la spore va entamer son retour à l'état végétatif *via* la germination. La germination est une série d'événements entraînant la perte de propriétés spécifiques des spores et est déclenchée par des solutés spécifiques (germinants), par la variation de certaines grandeurs physiques ou parfois spontanément (Foster and Johnstone, 1990).

Cette transition de l'état de spore à celui de cellule végétative implique 3 étapes : l'activation, la germination et le développement.

1.3.1. L'activation : une étape facultative

L'activation prépare la spore à lever son état de dormance. Elle permet souvent à une population de spores de germer plus rapidement et efficacement. Ainsi, Yi et Setlow, ont montré une diminution du temps d'entrée en germination et de la libération du DPA après une activation thermique (Yi and Setlow, 2010). Il s'agit cependant d'un phénomène réversible,

c'est-à-dire qu'en absence de déclencheurs (de germinants), la germination n'aura pas lieu et la spore restera en état de dormance (Keynan *et al.*, 1964; Zhang *et al.*, 2009). Les spores activées gardent ainsi la plupart des propriétés des spores dormantes. Un certain nombre d'agents sont responsables de l'activation bien qu'une exposition à un traitement thermique sublétal (70 °C / 30 min par exemple) soit la plus utilisée. Celle-ci peut aussi être déclenchée par un faible pH (< à 4,5) ou bien une exposition chimique (mercaptoethanol) (Keynan *et al.*, 1964). Les mécanismes correspondants à l'activation sont encore peu connus cependant, la modification de la conformation d'une ou de plusieurs protéines semble être impliquée. Ainsi, Keynan *et al.*, suggèrent que la chaleur modifie la structure tertiaire d'une protéine responsable de la maintenance de l'état dormant en réduisant les ponts disulfures qui stabilise cette protéine dans une configuration particulière (Keynan *et al.*, 1964). La dénaturation partielle de cette protéine serait réversible par réoxydation des ponts disulfures réduits. Zhang *et al.*, ont observé par spectroscopie Raman, des modifications dans les ratios d'intensité des bandes caractéristiques du DPA, suggérant une modification de l'environnement de ce composé à l'intérieur du noyau, à des températures correspondant à l'activation (Zhang *et al.*, 2009). Une dénaturation protéique a également été observée (Keynan *et al.*, 1964; Zhang *et al.*, 2009). Yi et Setlow, en comparant l'augmentation du niveau d'expression de récepteurs par spore (utilisation de mutants) à l'activation thermique, suggèrent que cette dernière pourrait également être à l'origine d'une amélioration de l'accessibilité ou de la réponse de ces récepteurs, dans un mécanisme qui reste peu clair (Yi and Setlow, 2010). L'activation thermique pourrait aussi être associée à un événement thermique (relaxation enthalpique et/ou transition vitreuse) observé aux alentours de cette température par plusieurs auteurs, et qui est réversible après plusieurs jours, bien que la structure concernée ne soit pas bien élucidée (Ablett *et al.*, 1999; Leuschner and Lillford, 2003).

1.3.2. La germination : un phénomène complexe et multifactoriel

Contrairement à la sporulation, la germination est un événement irréversible. La période précise correspondant à la germination possède plusieurs définitions suivant les auteurs. On considère en général qu'elle correspond aux événements qui ont lieu après l'induction et qui ne nécessitent pas d'énergie métabolique (pour la différencier du « développement ») (Setlow and Johnson, 2007). La germination peut avoir lieu en réponse à de nombreux stimuli comme certains acides aminés spécifiques, des nucléosides, des sucres mais aussi des germinants non métabolisables comme des surfactants cationiques, des ions, le

DPA, mais aussi des traitements physiques comme les hautes pressions (Gould and Sale, 1970; Setlow, 2003). Ces germinants peuvent alors activer la germination *via* l'activation de récepteurs de germination (localisés dans la membrane interne) ou *via* une action sur des voies avales. La Figure 6 présente ainsi les différents stimuli (en rouge) et voies d'entrée en germination (en mauve).

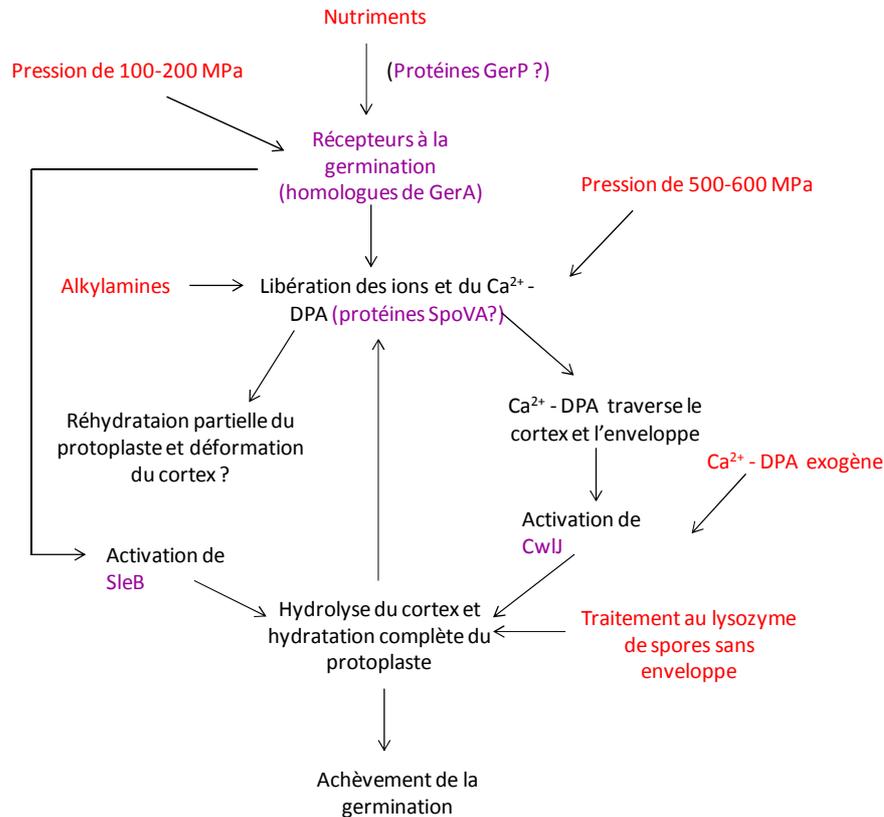


Figure 6: Différents facteurs inducteurs de la germination. D'après (Setlow, 2003).

Le DPA et les alkylamines sont des germinants plutôt universels au contraire des nutriments qui sont souvent spécifiques à une espèce (Setlow and Johnson, 2007). Il a récemment été montré que des petits fragments de peptidoglycane (muropeptides) peuvent être à l'origine d'une germination, ces fragments se lient à une protéine kinase de la membrane interne (Shah *et al.*, 2008). Les muropeptides sont produits lors de la dégradation du peptidoglycane, il s'agit d'une caractéristique normale lors de la croissance. Ainsi un haut niveau de ces composés dans l'environnement peut signifier une croissance abondante de bactéries (Gram positives) et donc un environnement favorable à la vie (Setlow, 2008). La germination est une série d'événements se déroulant, normalement, dans un ordre particulier. Ainsi, initialement, la mise en contact avec un (ou plusieurs) des germinants cités précédemment entraîne une série de réactions déclenchant l'entrée en germination, même si le

germinant est enlevé. Setlow décrit ainsi la germination en 2 étapes constituées de plusieurs stades (Setlow, 2003). Les étapes I et II sont ainsi schématisées sur la Figure 7.

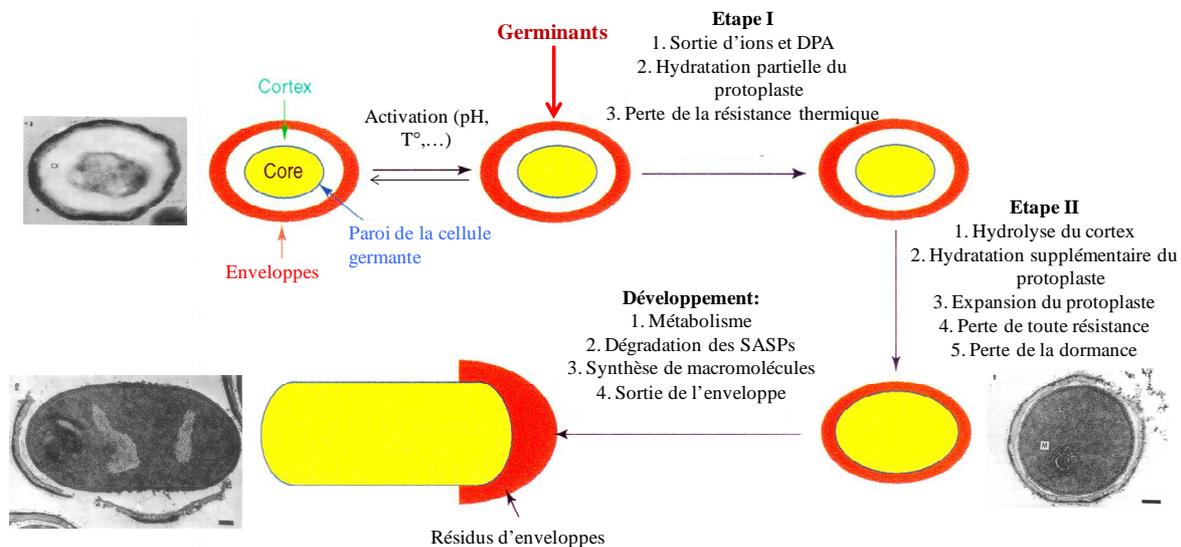


Figure 7 : Déroulement du processus de germination d'une spore bactérienne D'après (Santo and Doi, 1974; Setlow, 2003).

Le premier stade serait une libération de cations monovalents (K^+ , Na^+) issus probablement du protoplaste de la spore. La germination se poursuit par la libération d'une grande quantité de DPA et d'ions Ca^{2+} , initialement présents dans le protoplaste des spores sous forme de complexe Ca-DPA. Cette reprise des flux peut être reliée à une modification de la membrane interne lors de la germination. En effet, la fluidité de la membrane interne augmente et sa perméabilité augmente de plus de cent fois en début de germination (Swerdlow *et al.*, 1981; Cowan *et al.*, 2004; Setlow *et al.*, 2008). Le DPA est ensuite remplacé par de l'eau contribuant à augmenter l'hydratation du protoplaste. Ceci serait à l'origine d'une première perte de résistance de la spore, la résistance à la chaleur humide. Par contre cette étape a peu d'effets sur la résistance à d'autres agents et ne permet pas la reprise d'activité enzymatique ou l'augmentation de la mobilité des protéines (Cowan *et al.*, 2003; Setlow, 2003). Le cortex est ensuite dégradé. En effet, la sortie de DPA active elle-même, pour les spores de *Bacillus*, l'hydrolyse du cortex *via* l'activation d'une des 2 enzymes de dégradation : CwlJ ou SleB. Ces deux enzymes reconnaissent les résidus δ -lactam muramiques (MAL) et sont localisées de manière adjacente à la surface externe et interne du cortex (Paredes-Sabja *et al.*, 2011). CwlJ est probablement activée directement par une forte concentration en DPA mais le mécanisme d'activation de SleB est encore méconnu. Une faible concentration en DPA semble pouvoir activer cette enzyme pour compléter la germination. Il a également été

suggéré que SleB pourrait être activée par la variation de la pression exercée sur le cortex alors que la plupart du DPA est libéré (Magge *et al.*, 2008; Paredes-Sabja *et al.*, 2011).

Par la suite, l'hydrolyse du cortex va permettre à son tour au noyau de s'expanser et de s'hydrater complètement *via* une absorption d'eau supplémentaire. Le volume de la spore va ainsi être multiplié par 2 à 3 (Setlow and Johnson, 2007). Cette hydratation va permettre l'activation d'enzymes et l'initiation du métabolisme dans le noyau de spores (Yi and Setlow, 2010) et correspond au 5^{ème} et dernier stade. Cette étape s'accompagne également d'une perte supplémentaire de la résistance extrême des spores. Tous ces mécanismes et événements se déroulent sans activité métabolique énergétique détectable (Setlow, 2003). De plus, à l'échelle d'une spore individuelle, la germination peut être très rapide, de 30 secondes à 2 minutes. Cependant à l'échelle de la population le temps peut être bien plus long car les spores déclenchent l'entrée en germination après des temps de latence très différents.

Les spores possèdent des propriétés particulières de réfringence, ainsi une spore dormante et mature est dite « phase bright » et apparaît comme une structure brillante en microscopie à contraste de phase. La germination s'accompagne de la perte de la réfringence et les spores deviennent « phase dark ». Kong *et al.*, en combinant microscopie à contraste de phase, fluorescence et spectroscopie Raman, ont observé que une perte de réfringence très rapide (au niveau d'une spore individuelle) et concomitante avec la libération de la majeure partie du DPA, suivi d'une nouvelle baisse plus lente de la réfringence (~ 30%) due à l'hydrolyse du cortex (Kong *et al.*, 2010).

Ainsi, nous avons pu voir qu'il existe deux types de constituants nécessaire à la germination des spores, les récepteurs à la germination ainsi que les enzymes de lyse du cortex. Ces deux constituants peuvent ainsi être les cibles de traitements provoquant l'inactivation des spores en inhibant leur germination (Setlow *et al.*, 2002).

1.3.3. Le développement (ou émergence)

Il s'agit de la dernière étape de la germination. Le développement est défini comme l'ensemble des événements ayant lieu après la germination incluant l'initiation du métabolisme, la synthèse de macromolécules, l'émergence ainsi que la croissance de la nouvelle cellule (cf. Figure 7). A la suite de l'étape II, l'hydratation du protoplaste correspond à celle d'une cellule végétative et la mobilité des protéines est restaurée. En conséquence, il y a reprise d'activité enzymatique dans le noyau des spores (génération d'ATP, dégradation des SASPs, catabolisme de certains acides aminés issus de cette dégradation,...) (Setlow, 2003).

Dès les premières minutes de l'émergence, l'ARN est synthétisé à partir de nucléotides stockés dans la spore ou provenant de la dégradation d'anciens ARN (Nicholson and Setlow, 1990; Setlow and Johnson, 2007). En ce qui concerne les protéines, leur synthèse arrive peu de temps après celle de l'ARN et utilise en grande partie des acides aminés provenant de la dégradation des SASPs dans les 20 à 30 premières minutes de l'émergence. La synthèse d'ADN arrive plus tard dans le processus, après environ 45 minutes (Santo and Doi, 1974). Bien que les spores utilisent des réserves endogènes, l'achèvement du développement, qui peut prendre à peine 90 minutes, nécessite des nutriments exogènes (Setlow and Johnson, 2007). Ce processus voit le volume de la spore germante continuer à augmenter, nécessitant ainsi la synthèse de membrane et de composés pariétaux. Au niveau structural, après environ 50 minutes, il est possible de voir l'émergence d'une cellule qui sera suivie après environ 1 heure par son élongation. Au bout d'environ 90 minutes, deux corps nucléaires sont observés suivis par une division cellulaire. Il est alors possible de visualiser les fragments de l'enveloppe aux pôles opposés de la cellule en division (Santo and Doi, 1974).

En effet, l'enveloppe est également altérée lors de ce processus. Elle se dégrade et se fissure partiellement durant la germination, mais le mécanisme par lequel cette dégradation est initiée n'est pas encore élucidé (Moir, 2006).

Après avoir décrit la structure de la spore, nous nous intéressons dans la partie suivante à l'impact de son cycle de vie sur la santé humaine.

1.4. Les spores bactériennes : impact pour l'alimentation humaine et la santé

1.4.1. Pathogénicité

La germination est une partie du cycle de la spore qui peut, dans le cas d'espèces pathogènes, être à l'origine de maladies et/ou d'intoxications alimentaires. Elles peuvent également provoquer la détérioration des aliments, notamment des aliments en conserve (apparition de saveurs de type rance ou aigre) (Setlow, 2005; Setlow and Johnson, 2007). *B. cereus* est un exemple de bactérie responsable d'infections alimentaires. Ces bactéries sous forme de spores peuvent contaminer des aliments comme le riz, les pommes de terre ou la viande. Elles peuvent alors résister à la cuisson ou au réchauffage. Leur forme végétative peut produire des entérotoxines dans l'aliment ou dans l'intestin de l'homme qui sont responsables

de forts vomissements et diarrhées. Les bactéries du genre *Clostridium* peuvent aussi provoquer des intoxications aiguës. Ainsi, la forme végétative de *Clostridium botulinum* produit une toxine thermolabile responsable du botulisme, *Clostridium perfringens* peut quant à elle provoquer des intoxications *via* la contamination d'aliments. La sporulation dans l'intestin, suite à l'ingestion, provoquera la synthèse d'entérotoxines. (Cossart *et al.*, 2004; Prescott *et al.*, 2010).

En plus des intoxications, les bactéries sporulantes peuvent également provoquer d'autres maladies. Ainsi, *C. perfringens* est également responsable de gangrènes gazeuses post-traumatique, suite à une contamination de tissus blessés par des spores. C'est la germination de *C. perfringens* qui est responsable de la production de la toxine impliquée (toxine α).

Bacillus anthracis (ou anthrax), une bactérie du sol, est l'agent pathogène de la maladie du charbon, qui est une maladie animale hautement infectieuse pouvant être transmise aux humains par contact avec des animaux infectés. La bactérie produit en effet des toxines « charbonneuses ». Les spores sont ingérées par les herbivores, les animaux deviennent infectés à leur tour, et les bactéries prolifèrent dans les vaisseaux lymphatiques exprimant alors les exotoxines, ce qui conduit finalement à la mort de l'animal (Figure 8).

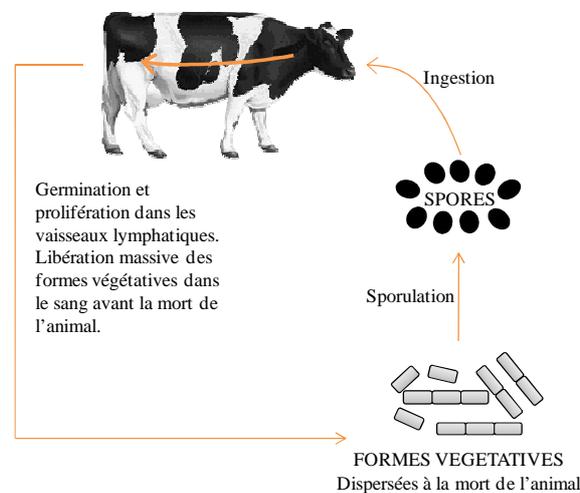


Figure 8 : Illustration du cycle d'infection des animaux par *Bacillus anthracis*. D'après (Jensen *et al.*, 2003).

La contamination chez l'homme se fera principalement de manière directe *via* des coupures ou plus rarement de manière indirecte par inhalation de spores. L'anthrax peut également provoquer des infections intestinales (Jensen *et al.*, 2003; Setlow, 2005; Prescott *et al.*, 2010).

1.4.2. Spores comme agents probiotiques et vecteurs « thérapeutiques »

Lorsqu'elles retournent à l'état végétatif, les spores peuvent être responsables d'un certain nombre de maladies. Pourtant, la formation et la structure de la spore présentent également des intérêts pour l'alimentation ou la santé.

Ainsi, les spores bactériennes sont utilisées comme probiotiques depuis au moins 50 ans, bien que l'utilisation des *Bacillus* comme bactérie sporulante a gagné en intérêt depuis les 15 dernières années (Cutting, 2011). Les probiotiques sont définis comme des microorganismes vivants, qui lorsqu'ils sont administrés en quantité adéquate confère un effet bénéfique à l'hôte (WHO/FAO). La résistance extrême des spores semble leur permettre de passer les stress drastiques que représente le système gastro-intestinal. En effet, plusieurs travaux ont montré la sensibilité *in vitro* de cellules végétatives de *Bacillus* de différentes espèces à un fluide gastrique simulé ou aux sels biliaires. Au contraire, des études menées sur des spores de *B. subtilis* ont montré une très bonne résistance des spores aux fluides gastriques ou aux sels biliaires bien qu'il semble que la germination soit partiellement inhibée par ces sels (Hong et al., 2005). L'intérêt d'utiliser les spores comme probiotique provient également de la possibilité de conserver le produit à température ambiante sous une forme déshydratée, sans aucun effet délétère sur la viabilité (Cutting, 2011). Plusieurs études ont cherché à savoir comment fonctionnait l'effet probiotique obtenu par les spores et/ou les cellules végétatives. Bien que le genre *Bacillus* concerne des bactéries aérobies facultatives, il semble qu'elles puissent, sous conditions appropriées, se développer sous conditions anaérobies comme celles retrouvées dans le système gastro-intestinal (Hong et al., 2005). Il semble ainsi qu'un certain pourcentage d'inoculum de spores de *Bacillus* (> 10%) peut germer dans le petit intestin, se multiplier (de manière peu importante) puis resporuler (Casula and Cutting, 2002; Tam *et al.*, 2006; Leser *et al.*, 2008). La capacité des microorganismes à subir ce cycle semble cependant dépendre des souches, Tam *et al.*, ayant observé une meilleure capacité pour des souches de *B. subtilis* isolées d'un milieu naturel que pour des souches de laboratoire. Ils ont ainsi montré un temps de séjour dans l'intestin de souris plus long pour ces souches (Tam *et al.*, 2006). La Figure 9 représente ce cycle.

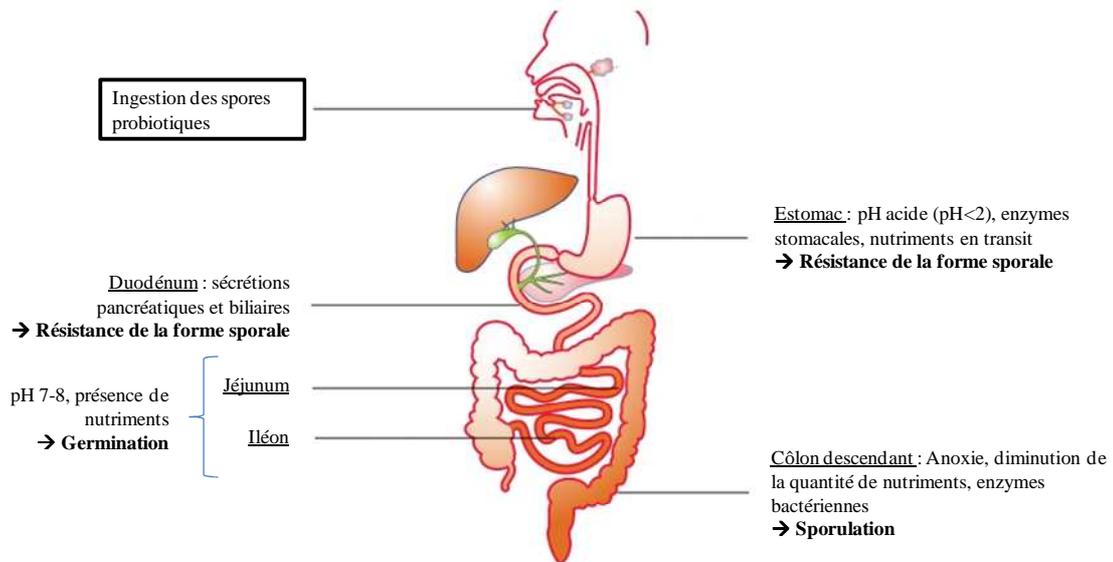


Figure 9 : Schéma du cycle des spores bactériennes dans le système gastro-intestinal.

L'effet probiotique dû aux bactéries sporulantes et notamment aux espèces de *Bacillus*, semble être relié aux spores germantes. Celles-ci susciteraient des réponses immunitaires dans le tractus gastro-intestinal (observées notamment sur des modèles murins) cause d'un effet probiotique (Cutting, 2011). Un autre des mécanismes considérés comme important est la production de molécules antimicrobiennes par ces bactéries (Hong *et al.*, 2005).

Plus récemment, l'utilisation des spores bactériennes, notamment de *B. subtilis*, a été envisagée comme « véhicule » de vaccins. L'idée est d'utiliser le potentiel de l'enveloppe pour l'affichage d'antigènes hétérologues, en utilisant notamment les protéines CotB ou CotC de l'enveloppe comme le montre la Figure 10 (Ricca and Cutting, 2003).

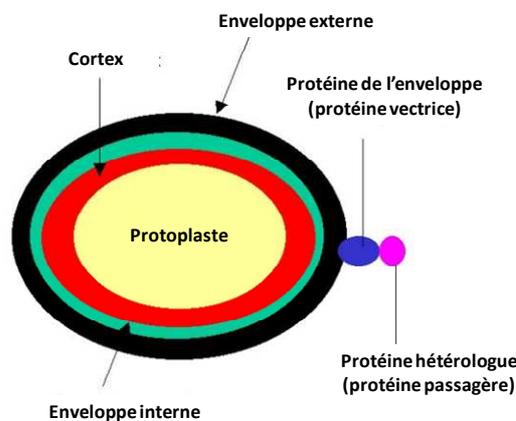


Figure 10 : Illustration de l'affichage de protéines hétérologues à la surface des spores bactériennes. D'après (Ricca and Cutting, 2003).

Ainsi, des spores de *B. subtilis* affichant l'antigène du fragment C de la toxine tétanique (TTFC) ont été utilisées pour la vaccination orale et nasale et ont montré la génération de réponses muqueuses et systémiques chez un modèle murin (Duc *et al.*, 2003). De même, la production de spores exprimant un antigène ciblé contre un parasite a été réalisée. Ce modèle a été utilisé pour une vaccination orale chez le rat et a montré une réponse de la muqueuse chez ces animaux. Il semble que cet antigène exprimé sur les spores de *B. subtilis* provoque bien une réponse immunogène et peut fournir une éventuelle protection contre le parasite (Zhou *et al.*, 2008).

Ainsi, la spore bactérienne est une structure cellulaire multicouche dormante issue d'un processus appelé sporulation qui intervient lorsque certaines bactéries sont placées dans un environnement défavorable. Lorsque des conditions favorables reviennent, ces spores sont réactivables et peuvent revenir à un état végétatif *via* la germination. Ces bactéries pathogènes peuvent sous la forme de spore résister à une grande variété de traitements drastiques naturels (tractus digestif, déshydratation) ou mise en place par l'homme (pasteurisation, séchage, congélation) et ainsi contaminer l'homme en provoquant des intoxications alimentaires et/ou maladies. En effet, les nombreuses spécificités dans leur composition et leur structure unique sont à l'origine d'une extrême résistance des spores à une grande variété de contraintes physiques telles que la chaleur sèche et humide, les radiations UV et γ ou encore les agents oxydants. La composition particulière de la spore, a un rôle important dans sa résistance extrême aux stress environnementaux. Un autre facteur important dans cette résistance est sa faible perméabilité, due notamment à sa membrane interne mais également à d'autres structures plus externe comme l'enveloppe. Ces deux paramètres feront l'objet de la partie suivante.

2. Résistance extrême de la spore aux stress environnementaux

2.1. Comparaison entre cellules végétatives et spores

Les procédés classiques de décontamination, comme la pasteurisation ou la stérilisation utilisent la chaleur humide pour détruire les microorganismes. Les barèmes de pasteurisation sont connus pour ne pas être efficace sur les spores bactériennes, au contraire de la stérilisation dont le barème a été initialement établi pour détruire la totalité des formes sporulées (120 °C / 20 min). Les spores sont en effet généralement résistantes à des températures 40 °C plus élevée que les cellules végétatives en chaleur humide (Setlow, 2006) (Tableau 1).

Tableau 1 : Différences observées entre spores et cellules végétatives de *Bacillus subtilis* : structure et résistance face à différents traitements. D'après (Setlow *et al.*, 2002; Setlow, 2005; Setlow and Johnson, 2007)

	<i>Cellules végétatives</i>	<i>Spores dormantes</i>
	<i>Caractéristiques structurales</i>	
Surface	Gram positive (majorité). Paroi cellulaire	Enveloppes. Epais cortex
Apparence microscopique	Non réfringente	Réfringente
Contenu en Calcium	Faible	Elevé
DPA	Absent	Présent
Contenu en eau	Élevé, 80-90%	Faible, 25-50% (protoplaste)
SASPs	Absente	Présente
Métabolisme	Présent	Très faible ou absent
	<i>Résistance (en % de survivants à moins d'une autre indication)</i>	
Chaleur humide-85°C 30min	< 10 ⁻⁴	79
Valeur de D à 65°C	< 15 sec	105 h
Chaleur sèche-120°C 30min	< 10 ⁻⁵	14
Lyophilisation et réhydratation	2	> 90
Radiation UV à 254 nm – 315 J/m ²	< 10 ⁻⁶	10
0.5 M HCl-24°C 30 min	< 10 ⁻⁶	65
Ethanol 70% 65 °C	< 10 ⁻² (1 min)	59 (1 h)

Les différences observées entre cellules végétatives et spores sont à la fois constitutives, c'est-à-dire au niveau de leur structure et composition, mais aussi dans leur résistance à différents procédés. Ainsi, la spore possède des composés spécifiques comme le DPA ou les protéines SASPs. Cette différence dans leur constitution est notamment responsable de la meilleure résistance des spores à divers traitements. Tous les stress existants ne sont pas répertoriés, il est ainsi également connu que les spores sont plus résistantes que les cellules végétatives aux radiations γ ou aux hautes pressions (Nicholson *et al.*, 2000).

2.2. Propriétés du protoplaste impliquées dans la résistance extrême des spores

2.2.1. Faible hydratation et mobilité réduite des composants du protoplaste

Comme indiqué précédemment, le protoplaste des spores contient une faible teneur en eau, de l'ordre de 25 à 50% du poids humide. Cette caractéristique va intervenir dans la résistance des spores notamment à la chaleur en milieu liquide. En effet, il existe une relation bien établie entre la teneur en eau du protoplaste et la résistance à la chaleur humide : plus le protoplaste est hydraté et plus la résistance diminue (Popham *et al.*, 1995). Ceci a été constaté de différentes façons. Des espèces, voire des souches différentes du genre *Bacillus*, ont une résistance différente à la chaleur, corrélée à la teneur en eau de leur protoplaste. Pour une même espèce, les spores formées à une température plus élevée ont généralement une teneur en eau plus faible et sont alors plus résistantes. Par exemple, les spores de *B. subtilis* produites à 50 °C ont une teneur en eau de 33,5% comparées à 50% pour les spores produites à 37 °C. Leurs valeurs de D_{100} , c'est-à-dire le temps (en minutes) nécessaire pour réduire la population par 10 à une température de 100 °C, sont alors de 45,1 et 8,84 min respectivement (Beaman and Gerhardt, 1986). Ceci a également été observé pour les spores mutantes ne possédant pas de DPA, qui ont un protoplaste plus hydraté et qui sont alors moins résistantes (Paidhungat *et al.*, 2000). De même, la modification de la composition lipidique de la membrane interne des spores conduit à une plus faible survie des spores à ce traitement, les auteurs suggérant un effet indirect de l'altération de la composition lipidique sur le niveau d'hydratation (Griffiths and Setlow, 2009).

Il semble que la faible teneur en eau du protoplaste ait également un rôle dans la résistance aux radiations γ (réduisant probablement la possibilité de ces radiations à créer des radicaux

hydroxyles néfastes) et UV (la faible hydratation du protoplaste pouvant avoir un rôle dans la formation de « spores photoproducts » (SP) qui se sont accumulés dans la spore suite à l'exposition à ces radiations) (Setlow, 2006). Selon plusieurs auteurs, la mobilité des substances contenues dans le protoplaste des spores est très réduite. Ainsi, une faible mobilité des protéines a été mesurée dans le protoplaste (Leuschner and Lillford, 2000; Cowan *et al.*, 2003). La dénaturation des protéines par la chaleur va être minimisée si ces dernières sont faiblement hydratées (Coleman *et al.*, 2007). Cette faible mobilité est également un paramètre important dans le maintien de l'état de dormance (et éventuellement la résistance) des spores.

2.2.2. Composition minérale du protoplaste

Le degré de minéralisation du protoplaste est également un facteur intervenant dans la résistance à la chaleur humide et à la chaleur sèche ; une augmentation de la teneur en minéraux permettant une meilleure survie. Ainsi, des spores de *Bacillus stearothermophilus* présentent une plus faible résistance à la chaleur sèche lorsqu'elles sont déminéralisées (Nicholson *et al.*, 2000). En ce qui concerne la chaleur humide, une augmentation de la teneur en eau suite à la déminéralisation peut expliquer en partie la diminution de la résistance. La composition semble également jouer un rôle puisque, par exemple, les spores possédant une plus grande proportion en Ca^{2+} sont plus à même de résister que les spores possédant une grande quantité de Mg^{2+} ou Mn^{2+} . De même, des spores enrichies en Ca^{2+} ont une résistance similaire aux spores natives, alors que des spores enrichies en cations monovalents H^+ sont elles moins résistantes (Beaman and Gerhardt, 1986; Setlow, 2006).

La quantité et la composition en ions du protoplaste ont également un rôle dans la résistance à la pression hydrostatique. Ainsi, des spores déminéralisées sont plus résistantes alors que si elles sont reminéralisées avec du Ca^{2+} ou du Mg^{2+} la résistance de ces spores est diminuée, ces deux derniers ions pouvant avoir un rôle dans l'activation des enzymes de germination (Igura *et al.*, 2003).

2.2.3. Les protéines SASPs

Ces protéines sont localisées dans le protoplaste des spores et saturent l'ADN. Elles constituent un des paramètres majeurs de protection de l'ADN contre de nombreux traitements comme la chaleur ou l' H_2O_2 . L'utilisation de spores mutantes ne possédant pas de SASPs α et β a permis de corrélérer la présence de ces protéines à la résistance à de nombreux

stress. Les spores sauvages présentent une bien meilleure résistance à la chaleur sèche que les spores mutantes (90% de survie après 60 min à 90 °C contre 2,1% de survie après 5 min à 90 °C pour les spores ne possédant pas de SASPs α et β) (Popham *et al.*, 1995; Setlow and Setlow, 1995). De même les spores déficientes en SASPs sont décrites comme étant beaucoup plus sensibles aux radiations UV (Mason and Setlow, 1986), à l' H_2O_2 (Setlow and Setlow, 1993) ou à d'autres agents chimiques comme le glutaraldehyde (Tennen *et al.*, 2000). Popham *et al.*, ont montré que l'exposition des spores à la chaleur humide n'entraîne pas de dégradation de l'ADN (les spores survivantes ne présentent pas plus de mutations), suggérant qu'il existe un mécanisme de protection, probablement par la saturation de l'ADN par les SASP α et β (Popham *et al.*, 1995).

La diminution de la quantité en protéines α et β entraîne également une diminution de la résistance des spores de *C. perfringens* à la chaleur humide ou aux radiations UV (Setlow, 2007). Il existe d'autres SASPs dans la spore, les SASPs γ et d'autres dites mineures, dont le rôle n'est pas connu.

2.2.4. L'acide dipicolinique (DPA)

Le protoplaste de la spore contient une grande quantité de DPA (5 à 15 % du poids sec de la spore), bien que le contenu puisse varier selon l'espèce ou la souche et les conditions de sporulation (Huang *et al.*, 2007). Cette molécule (Figure 11) n'est synthétisée que dans la cellule mère et diffuse dans la spore dans les dernières étapes de la sporulation sous forme chélatée (1 : 1) avec des cations divalents, notamment le Ca^{2+} (Setlow, 2005). Il semble de plus que cette molécule soit sous sa forme basique à l'intérieur de la spore, l'anion dipicolinate, avec 3 molécules d'eau ($\text{CaDP}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$) (Johnson *et al.*, 2010).

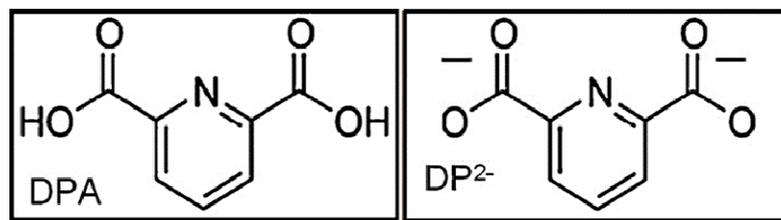


Figure 11 : Structure chimique de l'acide dipicolinique (DPA) et de l'anion dipicolinate (DP^{2-})

L'utilisation de spores déficientes en DPA a permis de clarifier le rôle de cette molécule dans la résistance des spores. Ainsi, ces spores mutantes sont plus sensibles à la chaleur humide, à l' H_2O_2 , ceci étant en grande partie relié à une plus importante quantité d'eau dans

le protoplaste (Paidhungat *et al.*, 2000; Setlow *et al.*, 2006). Le DPA aurait donc un rôle dans le maintien de l'état déshydraté du protoplaste. Coleman *et al.*, ont également montré que lors d'un traitement thermique en milieu liquide, une augmentation en eau du protoplaste apparaît dans les spores dans lesquelles le DPA a été libéré (Coleman *et al.*, 2007). Cette molécule a également un rôle dans le maintien de l'état de dormance. En effet, les spores sans DPA ont tendance à germer de manière spontanée (Paidhungat *et al.*, 2000; Setlow *et al.*, 2006), bien que ce comportement ne soit pas bien compris. Les spores sans DPA sont plus sensibles à la dessiccation (observation de mutations chez les survivantes). Un effet similaire est observé face à des traitements par la chaleur humide ou sèche en absence de SASPs (Setlow *et al.*, 2006). Il semble que ce composé joue également un rôle de protection de l'ADN. Le DPA est aussi connu pour être un photo-sensibilisant des spores, augmentant le nombre de photoproduits (« spore photoproduct » = SP) (Nicholson *et al.*, 2000).

2.2.5. Les systèmes de réparation de l'ADN

La spore possède des mécanismes de réparation de l'ADN lors du retour à l'état végétatif. Cette réparation va se faire pendant la phase de germination et peut avoir lieu bien avant la réplication de l'ADN (Setlow and Johnson, 2007). Ce système de réparation est mis en place à la suite de différents traitements provoquant des dégradations de l'ADN. Ainsi, Setlow et Setlow ont montré que l'expression de gènes impliqués dans la réparation de l'ADN (comme *recA*) est induite de manière importante durant la germination suite à une exposition à la chaleur sèche ou aux UV (Setlow and Setlow, 1996). L'utilisation de mutants inactifs sur ces gènes a également montré l'importance de ce système de réparation. Il faut environ neuf fois moins de temps pour détruire 90% de ces spores comparées aux spores sauvages (2 min contre 18 min à 120 °C), et ces spores sont environ 2 fois plus sensibles aux UV. Les spores ne possédant pas *RecA* et/ou les protéines de réparations sont également beaucoup plus sensibles à certains composés chimiques (Setlow and Setlow, 1996; Salas-Pacheco *et al.*, 2005; Ibarra *et al.*, 2008). Ce gène est impliqué dans des procédés de réparation par recombinaison ou excision qui peuvent aussi nécessiter certaines protéines spécifiques de réparation (Leggett *et al.*, 2012). Il existe un autre système de réparation, qui est la lyase de photoproduits (lyase photoproduct), une enzyme spécifique aux SP générés suite à l'exposition aux UV.

2.3. La membrane interne : structure impliquée dans la faible perméabilité de la spore

2.3.1. Rôle du manteau et du cortex dans la perméabilité

L'ensemble « Enveloppe-Cortex » ne semble pas représenter une barrière de perméabilité importante à l'eau. Ainsi des travaux réalisés sur les spores de *Bacillus thuringiensis* à l'état sec ont montré que ces dernières sont sensibles à un changement en humidité relative du milieu. Ces spores ont tendance à se contracter lorsque l'humidité est diminuée et à regonfler lorsque l'humidité est augmentée. Ceci est corrélé à une diffusion rapide de l'eau à travers l'ensemble « Enveloppe-Cortex » (une première étape dans le regonflement étant rapide, environ 50 secondes) au contraire de la diffusion jusqu'au protoplaste (Westphal *et al.*, 2003). De manière similaire, en utilisant la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN), il a été montré une diffusion rapide de l'eau à travers l'enveloppe, diffusion plus rapide à l'état hydraté qu'à l'état sec (Sunde *et al.*, 2009). L'enveloppe peut être vue comme un « tamis », c'est-à-dire qu'elle constitue une barrière par rapport à certaines molécules, notamment par rapport à leur taille. Ainsi, cette structure constitue une barrière pour des molécules comme le lysozyme, mais laisserait passer des molécules allant de 2 à 8 kDa selon les espèces, ici pour *B. megaterium* et *B. cereus* respectivement (Driks, 1999; Nicholson *et al.*, 2000). Ceci permettrait d'éviter que des enzymes de dégradation du cortex n'arrivent jusqu'à cette structure. La relative porosité de l'enveloppe est cependant nécessaire. En effet, de nombreuses molécules, notamment des germinants, peuvent passer au travers de l'enveloppe et du cortex et atteindre des couches plus profondes telles que la membrane interne qui contient les récepteurs (Driks, 1999). Il semble cependant que cette structure ait un rôle critique dans la résistance à de nombreux composés chimiques (peroxyde d'hydrogène, le peroxydinitrite, l'hypochlorite...) responsables de l'inactivation rapide des spores en absence d'enveloppe (Ghosh *et al.*, 2008; Leggett *et al.*, 2012). En étudiant, l'effet de traitements chimiques sur les spores de *B. cereus*, Cronin et Wilkinson ont également montré par cytométrie en flux que l'enveloppe serait, paradoxalement, la principale barrière à des composés fluorescents comme l'Iodure de Propidium (IP) et le Hoechst 33342 (Cronin and Wilkinson, 2008). Des molécules de faible taille comme l'éthanol, le NaOH ou le HCl, peuvent passer la relative barrière que représente l'enveloppe comme le montre le peu de différence de sensibilité de spores sans enveloppe à ces agents (Setlow *et al.*, 2002).

En ce qui concerne le cortex, son éventuel rôle comme barrière de perméabilité n'est que peu décrit dans la littérature. Plomp *et al.*, en observant la germination des spores de *Bacillus atrophaeus* en microscopie à force atomique ont révélé une structure en nid d'abeille du cortex dont la taille des pores varie de 5 à 100 nm (Figure 12) (Plomp *et al.*, 2007).

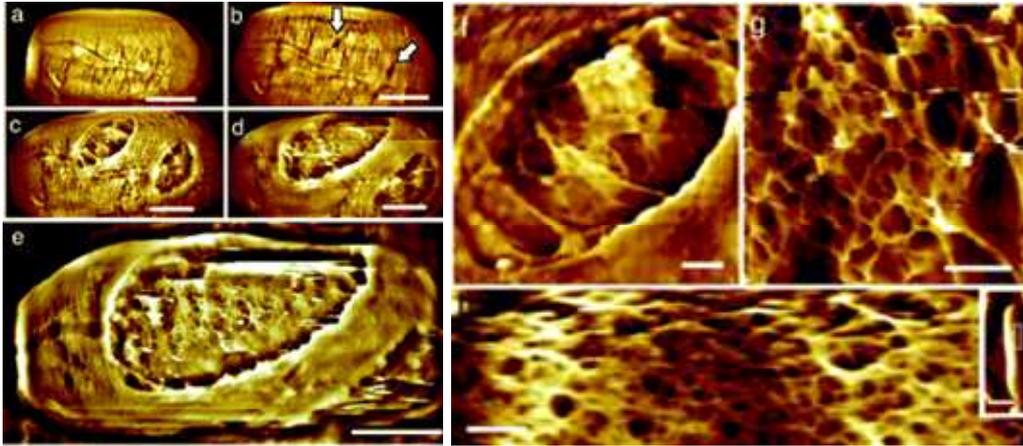


Figure 12 : Germination d'une spore de *Bacillus atrophaeus* observée par microscopie à force atomique. (a) 3h40, (b) 5h45, (c) 7h05, (d) 7h30, (e) 7h45, (f) 7h15, (g) 7h50, (h) surface d'une cellule végétative de *B. atrophaeus*. Echelle : 500 nm (a-e), 100 nm (f-h) et 1 µm (h encadré). D'après (Plomp *et al.*, 2007).

Le cortex ne représente ainsi pas une structure imperméable à l'eau bien qu'un de ses rôles majeurs semble être la mise en place et/ou le maintien d'un état déshydraté du protoplaste ; cette fonction est assurée en association avec la membrane interne. Son rôle mécanistique peut être vu *via* la germination. En effet, sa dégradation est essentielle pour permettre la germination et ainsi le retour à la perméabilité et la « fluidité » d'une cellule végétative (Setlow, 2003; Setlow *et al.*, 2009).

2.3.2. Composition de la membrane interne

2.3.2.1. Composition phospholipidique

Un certain nombre d'études se sont intéressées aux caractéristiques de la membrane interne et notamment à sa composition phospholipidique. Ainsi, le Tableau 2 donne la composition lipidique ou phospholipidique mesurée par différents auteurs dans les cellules végétatives de certaines souches de *B. subtilis* comparées à celle des spores (notamment la membrane interne).

Tableau 2 : Composition lipidique (excepté mention contraire) (en %) des membranes plasmiques de cellules végétatives et de la membrane interne des spores de *Bacillus subtilis*. PG : phosphatidylglycérol, PE : phosphatidyléthanolamine, CL : cardiolipide, l-PG : lysyl-phosphatidylglycérol, dGDG : digalactosyldiacylglycérol

	PE (%)	PG (%)	CL (%)	l-PG (%)	dGDG (%)	Publication
Cellules végétatives phase stationnaire (composition phospholipidique)	30	36	12	22	-	(Op den Kamp <i>et al.</i> , 1969)
Cellules végétatives phase exponentielle	24,4	39,4	1,4	15,6	9,4	(Kawai <i>et al.</i> , 2004)
T2h après le début de sporulation	26,5	47,1	2	16,7	6,3	(Kawai <i>et al.</i> , 2004)
T4h après le début de la sporulation	22,9	47	5,4	2,7	8	(Kawai <i>et al.</i> , 2004)
Cellules végétatives phase exponentielle	33,3	50,2	1,2	2	9,8	(Kawai <i>et al.</i> , 2006)
Spores 168	9,6	45,7	24,3	1,4	1,4	(Kawai <i>et al.</i> , 2006)
Cellules végétatives en phase stationnaire	14	23	46	Nd	17	(Griffiths and Setlow, 2009)
Spores CU1065	12	35	50	Nd	3	(Griffiths and Setlow, 2009)

On constate des compositions légèrement différentes selon les souches utilisées ainsi que le stade de croissance. L'utilisation de milieux de croissance différents peut aussi expliquer ces différences. Dans les cellules végétatives en phase stationnaire, les phospholipides principaux sont le phosphatidylglycérol (PG), la phosphatidyléthanolamine (PE) ainsi que le cardiolipide (CL) (Op den Kamp *et al.*, 1969; Griffiths and Setlow, 2009) ; les PG et CL étant des phospholipides anioniques (Kawai *et al.*, 2004; Nishibori *et al.*, 2005) au contraire du PE qui est un phospholipide neutre.

Selon, le Tableau 2, des cellules en phase exponentielle auraient cependant une plus faible proportion en CL et une plus forte proportion en lysyl-phosphatidylglycérol (l-PG). Il semble qu'au cours de l'entrée en sporulation et dans les premières heures, la proportion en cardiolipides augmente, ce qui est cohérent avec l'augmentation de la transcription de gènes impliqués dans sa synthèse (Kawai *et al.*, 2004). On atteint alors dans les spores, et notamment dans la membrane interne, une plus forte proportion en phospholipides PG et CL et une plus faible proportion en PE que dans les cellules végétatives (Kawai *et al.*, 2006; Griffiths and Setlow, 2009). Les cardiolipides en présence de certains cations divalents ainsi que de PE ont la possibilité de former des structures qui ne sont pas en bicouches (Matsumoto

et al., 2006). Ceci permet, en entraînant des discontinuités dans la membrane, des fonctions de dynamique membranaire comme l'intégration et la stabilisation de protéines dans la membrane (Dowhan, 1997). Kawai *et al.*, ont ainsi montré la présence de domaines riches en CL dans la membrane des cellules de *B. subtilis* (Kawai *et al.*, 2004). Ces domaines auraient un rôle dans la sporulation, jouant à la fois un rôle dans la formation du septum et dans le processus d'invagination. Ils permettraient également une activité optimale de certaines protéines spécifiques à la sporulation qui nécessiteraient une localisation et/ou un maintien dépendant des CL. Griffith et Setlow, affirment cependant que les lipides majeurs retrouvés dans les membranes, excepté le PG, ne sont pas indispensables à la sporulation, bien que l'efficacité de la sporulation soit dépendante d'un « ensemble » de lipides (Griffiths and Setlow, 2009).

La grande quantité de CL retrouvée dans les spores a été reliée à une implication de ces phospholipides dans le fonctionnement de certains récepteurs de germination (L-alanine et AGFK (Asparagine, Glucose, Fructose et KCl)). Ce phospholipide serait nécessaire pour donner la conformation appropriée à ces récepteurs (Kawai *et al.*, 2006). Kawai *et al.*, semblent montrer que, bien que ce phospholipide anionique puisse être remplacé pour des fonctions indispensables pendant la croissance des cellules végétatives, il est par contre indispensable à la germination des spores (Kawai *et al.*, 2006). Ce résultat est à nuancer, d'autres auteurs ayant observé que des mutants déficients en CL germaient assez bien en présence de L-alanine et un peu moins bien avec le mix AGFK, avec tout de même une efficacité moindre que des spores sauvages. Il semble qu'une germination optimale avec nutriments nécessite un environnement lipidique membranaire approprié (Griffiths and Setlow, 2009). Une modification de la composition lipidique de la membrane ne semble pas perturber de manière drastique l'intégrité de la membrane interne des spores (contenu en DPA inchangé) (Griffiths and Setlow, 2009). Cependant, cette modification aurait un impact indirect sur la résistance à la chaleur humide puisque l'hydratation du protoplaste et donc la résistance seraient modifiées (cf. 2.2).

2.3.2.2. Composition protéique

En plus des phospholipides, de nombreuses protéines spécifiques de la spore sont localisées dans la membrane interne. La distribution des protéines à l'intérieur de la membrane interne pourrait être répartie de façon hétérogène comme observée pour les spores de *B. megaterium* (Swerdlow and Setlow, 1984). En effet, selon cette étude, la membrane

serait composée de deux fractions, l'une ayant un ratio phospholipides/protéines de 4,3 mg/mg comparée à 0,47 mg/mg pour l'autre fraction. Les auteurs suggèrent également une différence dans la teneur en protéines particulières. Cette membrane abriterait un certain nombre de protéines impliquées dans la germination et la sporulation. Ainsi, le transport du DPA (accumulation) à travers la membrane interne serait relié à la présence de protéines SpoVA lors de la sporulation (Errington, 1993) mais également lors de la germination (Vepachedu and Setlow, 2005). Vepachedu et Setlow, ont ainsi montré la présence de la protéine transmembranaire SpoVAD dans la membrane interne, suggérant que les protéines SpoVA sont localisées dans cette membrane (~15000 SpoVAD par spores). Cette grande quantité peut faciliter le mouvement du DPA qui doit traverser la membrane interne dans les premières minutes de la germination (Kong *et al.*, 2010). La présence de nombreux récepteurs de germination à l'intérieur de cette membrane, comme la protéine transmembranaire GerBA ou d'autres protéines impliquées comme GerD, a également été montrée (Paidhungat and Setlow, 2001). Toutes ces protéines seraient localisées dans des « domaines » ou clusters, ce qui faciliterait une réponse rapide et coopérative en présence de nutriments. D'autres protéines (récepteurs inconnus, agents de transduction du signal, agents de formation des clusters,...) pourraient également être localisées dans ces domaines (Griffiths *et al.*, 2011).

2.3.3. Propriétés spécifiques de la membrane interne

Plusieurs études ont montré la faible perméabilité de la membrane interne des spores. Ainsi, la spore dormante est très imperméable, même à des petites molécules comme la méthylamine (~31,1 g/mol) ; l'eau ne pénètre elle-même que très lentement dans la spore (Swerdlow *et al.*, 1981; Cortezzo and Setlow, 2005). La perméabilité de cette membrane à l'eau serait en effet au moins 100 fois moins importante que celle d'une membrane modèle (Sunde *et al.*, 2009). Ceci permettrait d'assurer le maintien de l'état déshydraté du protoplaste et a également un rôle dans la résistance des spores aux composés délétères de l'ADN (Setlow, 2007). Cette membrane subit un retour à une perméabilité classique au cours de la germination (Swerdlow *et al.*, 1981). Ainsi, le SYTO-16, une molécule fluorescente reconnue comme perméable vis-à-vis des membranes cellulaires, et ayant des affinités pour l'ADN ou l'ARN, ne marque pas les spores dormantes mais pénètre très rapidement à partir du moment où la spore a libéré tout son DPA (environ 8 min) (Kong *et al.*, 2010). La membrane interne constituerait la barrière majeure de perméabilité de la spore. Cette caractéristique de la membrane interne a conduit à l'hypothèse que la membrane interne des spores était différente

de la membrane d'une cellule végétative. Cependant, comme mentionné dans la partie précédente, la composition lipidique de ces membranes est assez proche, et la différence en protéines présentes ne semble pas être un paramètre expliquant cette faible perméabilité. De plus, la composition en acides gras de la membrane interne des spores est généralement semblable à celle des cellules cultivées à la même température (avec cependant quelques différences) et ne semble pas non plus responsable de cette faible perméabilité (Cortezzo and Setlow, 2005).

Une autre spécificité de cette membrane est sa faible fluidité et la faible mobilité lipidique. Dans les années 80, des études ont été réalisées sur la fluidité de la membrane interne et son évolution lors de la germination par résonance paramagnétique électronique (RPE). Ces auteurs ont ainsi montré que les lipides étaient très peu mobiles et que cette mobilité augmentait lors de la germination. Cependant, il est apparu que ces résultats étaient en réalité en grande partie dus aux protéines du manteau (Stewart *et al.*, 1980; Elmes *et al.*, 1983). De manière similaire, une étude utilisant comme marqueur le 1,6-Diphényl-1,3,5-Hexatriène (DPH) en spectrofluorimétrie de polarisation a montré une plus faible mobilité de la sonde dans les spores de *B. subtilis* que dans les cellules végétatives (Ishihara *et al.*, 1999). Cependant la localisation du DPH n'est pas certaine, c'est-à-dire qu'il ne s'agit pas forcément d'un marquage exclusivement membranaire et notamment de la seule membrane interne.

Cowan *et al.*, ont montré par technique FRAP (Fluorescence recovery after photobleaching), sur des spores marquées avec les sondes di-4-ANEPPS et FM 4-64 au cours de la sporulation, une faible mobilité lipidique de la membrane interne, celle-ci étant environ 2,5 fois plus faible que dans des spores germées (Cowan *et al.*, 2004). Une étude récente portant sur l'utilisation de la sonde Laurdan (6-dodecanoyl-2-diméthylaminonaphthalène) dans les spores de *Clostridium sporogenes* a également montré une plus faible mobilité de cette membrane comparée à celle des cellules végétatives (Hofstetter *et al.*, 2012). L'hypothèse généralement admise est que la membrane interne est dans un état très compacté. Le volume qu'elle englobe (le protoplaste) est divisé par 2 en fin de sporulation et elle doit suivre l'augmentation de ce même volume (environ multiplié par 2) durant la germination, sans synthèse de membrane supplémentaire (Cowan *et al.*, 2004). Cet état compacté pourrait expliquer la faible mobilité ainsi que la faible perméabilité de cette structure.

Peu de données bibliographiques concernent l'état biophysique de la membrane interne ainsi que son évolution durant la germination. Cowan *et al.*, ont soulevé l'hypothèse selon laquelle le feuillet interne de la membrane interne pourrait être dans un état gel (Cowan *et al.*, 2004) ce

qui est cohérent avec la faible perméabilité mesurée dans cette membrane. Sunde *et al.*, suggèrent que cette faible mobilité des lipides serait liée à une compression de la membrane (et peut être à un état gel), plutôt qu'à des interactions des têtes polaires avec un protoplaste à l'état vitreux (correspondant à un liquide figé) (Sunde *et al.*, 2009). Enfin, les travaux réalisés sur les spores de *Clostridium* avec le Laurdan, suggère là encore par rapport aux valeurs de polarisation généralisée (GP), un haut degré d'ordre des lipides de cette membrane et une exclusion de l'eau (Hofstetter *et al.*, 2012).

Dans le cadre de l'étude de la membrane interne, une méthode d'investigation intéressante basée sur l'imagerie en temps de vie de fluorescence (FLIM) est ressortie de la bibliographie. Cette méthode utilise des sondes fluorescentes particulières, les rotors moléculaires dont les caractéristiques de fluorescence, notamment le temps de vie de fluorescence, sont dépendantes de la viscosité (Haidekker *et al.*, 2001; Kuimova *et al.*, 2008). Cette technique a déjà été utilisée pour mesurer les microviscosités dans une variété de systèmes y compris des cellules vivantes, des sols-gels et des mono et bicouches lipidiques (Haidekker *et al.*, 2001; Kuimova *et al.*, 2008; Hungerford *et al.*, 2009; Levitt *et al.*, 2009). Ces sondes n'ont jamais été utilisées sur les spores, elles présentent cependant un potentiel intéressant dans l'idée de cartographier la fluidité des structures spores (et donc de visualiser à quelle structure correspond quelle viscosité). L'utilisation du FLIM permet de plus de s'affranchir de problèmes de concentration en sonde.

2.3.4. Modulation des propriétés membranaires

Les conditions de sporulation lorsqu'elles sont modifiées, peuvent jouer entre autre sur les propriétés membranaires. Ainsi, la culture des spores sur milieu solide ou liquide peut entraîner une modification de leur composition membranaire (Rose *et al.*, 2007). Ce travail a également montré qu'il était plus facile d'extraire les protéines de l'enveloppe de spores produites en milieu liquide, suggérant un degré de réticulation plus faible. Cependant peu d'autres modifications de l'enveloppe sont à noter. Concernant la membrane, ces auteurs ont observé que les spores préparées en milieu solide avaient un ratio d'acides gras anteiso- / iso- plus élevé que les spores préparées en milieu liquide. Ceci indiquerait une fluidité membranaire plus importante. Les phospholipides avec des acides gras à chaînes ramifiées anteiso- ont des points de fusion inférieurs à ceux dont les acides gras ont des ramifications iso- (Mansilla *et al.*, 2004). De manière similaire, lorsque les spores sont produites à une température plus faible (23 °C), la membrane des cellules végétatives ou des spores ont un

ratio anteiso-/iso- plus important ainsi qu'une quantité d'acide gras insaturés plus importante (Cortezzo and Setlow, 2005). Ces spores sont alors plus sensibles à la chaleur humide. Une étude réalisée par Nguyen *et al.*, au laboratoire GPMA, a également mis en évidence une relation entre l'augmentation de la sensibilité des spores à la chaleur humide et la fluidification de la membrane des cellules végétatives mères (Nguyen Thi Minh *et al.*, 2011). On peut alors supposer qu'une augmentation de la fluidité de la membrane des cellules végétatives aura également un impact sur la membrane interne. Ainsi, différentes conditions de sporulation peuvent jouer sur la fluidité (Nguyen Thi Minh *et al.*, 2011) :

- l'activité de l'eau du milieu de sporulation (0,95 avec du NaCl ou glycérol) ;
- la température ;
- le pH (un pH alcalin par exemple).

Ainsi, la composition de la spore bactérienne en fait une structure de résistance extrême. Sa faible perméabilité à des composés autres que l'eau ou des germinants est également impliquée dans sa résistance. Différentes structures interviennent dans cette imperméabilité, la membrane interne étant la plus impliquée. La composition phospholipidique de cette membrane est peu différente de celle de la membrane de cellule végétative, ainsi les raisons de sa faible mobilité et imperméabilité sont encore peu comprises. L'état biophysique de cette membrane est de plus peu décrit. L'utilisation de nouvelles méthodes d'investigation, comme le FLIM et les rotors moléculaires, pourrait permettre d'obtenir des informations supplémentaires.

La modulation de ses propriétés *via* la germination ou d'autres stress environnementaux pourrait permettre de mieux comprendre son état de compaction extrême. Nous allons donc nous intéresser dans la partie suivante aux perturbations permettant de modifier ces structures.

3. Effets de perturbations environnementales sur les structures de la spore

3.1. Traitements physiques

3.1.1. Pression hydrostatique

Il existe deux niveaux de pression qui peuvent jouer sur la modification des structures de la spore bactérienne : entre 50 et 400 MPa (basses pressions) et à des niveaux de pressions plus élevés : de 400 à 700 MPa (hautes pressions) (Vepachedu *et al.*, 2007). En ce qui concerne les basses pressions, la modification de la perméabilité des spores à ce traitement va en fait correspondre à une activation de la germination *via* les récepteurs aux nutriments (Figure 6) (Paidhungat *et al.*, 2002; Nguyen Thi Minh *et al.*, 2010a). Cette activation de la germination pourrait se faire soit par une modification directe des récepteurs entraînant leur activation, soit par une modification des propriétés membranaires (Paidhungat *et al.*, 2002). Pour que ce procédé fonctionne, les spores doivent être à un pH et une température optimale (Gould and Sale, 1970). Ainsi, suite à une pression modérée, on observe les modifications classiques suite à une germination c'est-à-dire une dégradation du cortex suivie des autres étapes. Les basses pressions ne semblent pas avoir d'effet direct sur les barrières de perméabilité. Cependant, il semble que des cycles répétés de compression/décompression (notamment une pression de 400 MPa à 35 / 45 ou 55 °C) entraînent, suite à une activation de la germination, des perturbations et ruptures des structures des spores conduisant à leur inactivation (Furukawa *et al.*, 2003).

Les hautes pressions semblent agir de manière différente sur les structures de la spore bactérienne. Ces hautes pressions peuvent également être à l'origine d'une entrée en germination, mais cette entrée se fait par des mécanismes différents de ceux rencontrés pour les basses pressions. Il semblerait que cette activation se fasse de manière indirecte *via* une libération de DPA (Figure 6) (Paidhungat *et al.*, 2002; Black *et al.*, 2007). Cependant, les mécanismes conduisant à la libération du DPA restent hypothétiques :

- une activation des canaux DPA *via* une action directe sur la membrane interne ou une de ses protéines ;

- une libération reliée à une augmentation de la perméabilité de la membrane interne (pores), du cortex ou bien de l'enveloppe, Black *et al.*, suggérant plutôt une action sur une protéine de la membrane interne (Margosch *et al.*, 2004; Black *et al.*, 2007).

Il semble que la pression ait également une action directe sur les barrières de perméabilité de la spore. Ainsi, Wuytack et Michiels suggèrent que la pression (mais également les hautes températures) affaiblisse les barrières de perméabilité de la spore, favorisant les échanges d'ions et de protons (Wuytack and Michiels, 2001). Mathys *et al.*, en combinant hautes pressions et températures (600 MPa / 77 °C) ont montré par cytométrie en flux une inactivation des spores en plusieurs étapes, commençant par la germination et terminant par une déstructuration de la membrane interne, les spores pouvant être marquées à l'IP (Mathys *et al.*, 2007). Cependant, il n'est pas sûr que cette déstructuration soit liée seulement à l'application de la pression.

Ainsi, les modifications sur les structures créées par les hautes pressions sont surtout reliées à une entrée en germination, bien qu'il puisse y avoir une action directe de ces pressions, notamment sur la membrane interne.

3.1.2. Température

La résistance des spores à la chaleur humide est notamment corrélée au niveau d'hydratation du protoplaste (cf. 2.2). Bien que les mécanismes ne soient pas encore bien compris, il semble qu'une des cibles des traitements à la chaleur humide soit la membrane interne. Ce traitement est également accompagné d'une inactivation des enzymes du protoplaste (Setlow, 2006). Ainsi, en 1976, Flowers et Adams suggéraient déjà que la membrane des spores de *C. perfringens* pouvait être le lieu de perturbations suite à ce traitement (Flowers and Adams, 1976). Cependant, plus récemment, Coleman *et al.*, ont proposé un modèle expliquant la destruction des spores par la chaleur. Selon ces auteurs, la membrane interne serait une cible « tardive » de la destruction des spores. L'inactivation des spores surviendrait suite à la perturbation d'un nombre important de protéines. Par la suite, ces spores toujours exposées au traitement, subiraient une rupture de la membrane interne conduisant à une libération rapide du DPA et d'autres molécules (Coleman *et al.*, 2007).

Concernant les autres barrières de perméabilité, c'est à dire l'enveloppe et le cortex, peu de descriptions existent dans la littérature quant à l'effet de la température sur ces structures. Cependant, quelques études réalisées en AED (Analyse Enthalpique Différentielle) peuvent

apporter des informations. Ainsi, Ablett *et al.*, ont étudié des spores de *B. subtilis* hydratées par AED et ont constaté une transition réversible aux alentours de 60 °C (Ablett *et al.*, 1999). Ces auteurs ont alors suggéré qu'une partie de la spore pouvait être dans un état vitreux, notamment le protoplaste. Cette conclusion a depuis été remise en question (Ablett *et al.*, 1999; Sunde *et al.*, 2009). Cependant, cette transition a également été observée par Lillford et Leuschner sur des spores à l'état sec à une température un peu plus faible (Leuschner and Lillford, 2003). Ces auteurs suggèrent que cette transition obtenue pour des spores entières soit reliée à l'enveloppe. Ils ont en effet observé des transitions à des températures proches pour des systèmes protéiques hydratés. Enfin, plus récemment, des expériences menées au laboratoire, ont montré une transition entre 58 et 70 °C sur des spores à différents degrés d'hydratation (Nguyen Thi Minh *et al.*, 2010b). Au contraire de Leuschner et Lillford, cette transition a également été observée sur des spores sans enveloppe, suggérant ainsi que cette transition serait plutôt relié au cortex qui serait sous sa température de transition vitreuse (T_g) lorsque les spores sont à un état d'hydratation faible. Bien que des doutes subsistent sur la nature du compartiment sporal impliqué et du type de transition, il semble néanmoins que pour des températures comprises entre 50 et 70 °C, le cortex (et/ou l'enveloppe) subissent une modification permettant une augmentation de la mobilité. Le passage de cette transition thermique permet en effet d'augmenter la perméabilité. Comme suggéré par Ablett, la température de transition est proche de celle utilisée pour l'activation thermique de la germination (cf. 1.3.1) (Ablett *et al.*, 1999). Beaman *et al.*, avaient déjà suggéré que des spores de *B. stearothermophilus* totalement activées étaient « perméabilisées », observant une libération de DPA (Beaman *et al.*, 1988). Cependant, cette perméabilisation durant l'activation dépend du traitement appliqué d'une part et de l'espèce de *Bacillus* impliqué d'autre part (Kort *et al.*, 2005).

3.2. Traitements chimiques

Les spores sont résistantes à un grand nombre de composés chimiques létaux pour des cellules végétatives. En combinant des barèmes drastiques, il est cependant possible d'inactiver les spores par un nombre réduit de ces produits. Pour certains agents chimiques, la destruction des spores se fait *via* des dommages à l'ADN (acide nitrique, formaldéhyde,...). Cependant pour un grand nombre de composés chimiques, elle se fait *via* d'autres voies, notamment la perturbation de couches externes de la spore (Setlow, 2006).

3.2.1. Agents oxydants

Les agents oxydants sont connus pour entraîner des perturbations « physiques » sur les structures de la spore, notamment sur la membrane interne. La présence de l'enveloppe de la spore est importante dans la résistance des spores à ces composés comme le montre la plus grande sensibilité des spores sans enveloppe à ces traitements (traitées chimiquement ou spores mutantes) (Young and Setlow, 2003; Ghosh *et al.*, 2008). Des composés comme l'hypochlorite de sodium (eau de Javel), le dioxyde de chlore (ClO_2), l' H_2O_2 et d'autres décontaminants commerciaux, sont responsables de modifications irréversibles au niveau de la membrane interne (Melly *et al.*, 2002; Young and Setlow, 2003; Young and Setlow, 2004a). Contrairement à l'hypochlorite, les spores traitées au ClO_2 peuvent entamer les premières étapes de la germination. Cependant, celle-ci serait incomplète suite aux perturbations subies par la membrane interne. Ces composés semblent donc avoir un effet possible sur l'appareil de germination mais pas seulement puisque ces spores, même germées artificiellement (lysozyme), ne peuvent se développer (Setlow, 2006). Bien que le lysozyme ne permette pas aux spores d'être revivifiées, il entraîne une perte de réfringence des spores et un certain pourcentage de spores germées, indiquant qu'il peut dégrader le cortex (Foegeding and Busta, 1983; Young and Setlow, 2003). Ceci signifie que le manteau est en partie perméabilisé, ou que sa structure a été modifiée et permet le passage du lysozyme. Ainsi, des spores de *B. megaterium* traitées à l' H_2O_2 (combiné à la température) montrent une dégradation importante des couches externes de la spore (manteau et cortex) (Shin *et al.*, 1994). Il ne semble pas que la structure sporale soit cependant totalement perméabilisée puisque les spores traitées avec ces agents ne peuvent pas être marquées au DAPI (Melly *et al.*, 2002; Young and Setlow, 2003; Young and Setlow, 2004a). Cronin et Wilkinson ont cependant observé un marquage modéré pour des spores traitées au H_2O_2 contrairement à Melly *et al.*, (Melly *et al.*, 2002; Cronin and Wilkinson, 2008). La nature précise des modifications de la membrane interne, causées par ces agents, n'est pas connue. Il semble, en tout cas, que ce ne soit pas relié à une oxydation d'acides gras insaturés (Setlow, 2006). L'ozone aqueux est un autre agent qui cause l'inactivation des spores *via* des perturbations similaires aux agents oxydants (Young and Setlow, 2004b).

3.2.2. Autres composés chimiques

Les acides et les bases fortes (HCl et NaOH), ainsi que l'éthanol sont d'autres composés chimiques décrits comme perturbateurs des structures de la spore bactérienne. En ce qui concerne les bases fortes, elles semblent avoir un effet essentiellement sur l'inactivation des enzymes dégradant le cortex. En effet, ces spores ne peuvent être marquées par des sondes se liant à l'ADN et peuvent être complètement germées par le lysozyme (Setlow *et al.*, 2002). Au contraire, l'inactivation des spores par les acides forts est reliée directement à une déstructuration très importante de ces spores. La membrane interne, mais également les structures plus externes comme l'enveloppe ou le cortex, sont touchées de manière importante (Figure 13).

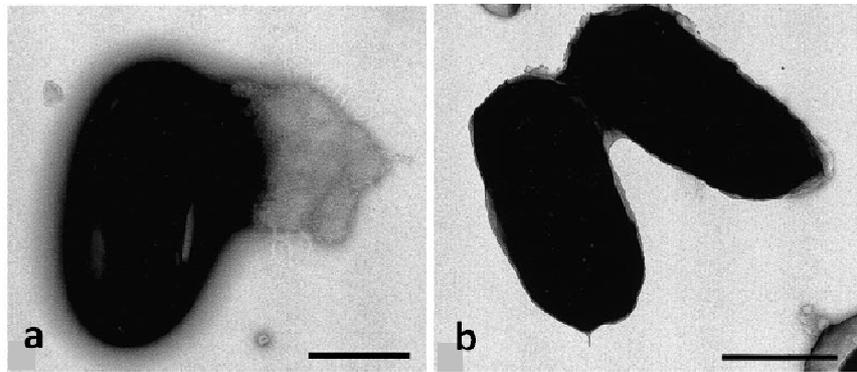


Figure 13 : Image en Microscopie Electronique à Balayage (MEB) de spores de *B. subtilis* traitées dans une solution 1 M de HCl. (a) spores traitées (b) spores non traitées. Echelle= 0,5µm (Setlow *et al.*, 2002).

L'éthanol joue également sur les barrières de perméabilité mais de manière différente. Pour entraîner une inactivation des spores, l'éthanol doit être couplé à la température (Russell, 1990; Setlow *et al.*, 2002; Cronin and Wilkinson, 2008). Ainsi, un traitement de 2 h à 70% sans chauffage d'éthanol n'entraîne pas d'inactivation, alors qu'à 65 °C, environ 2 log (99%) sont détruits. De même, le suivi de la survie des spores à des contacts prolongés avec l'éthanol a révélé une tolérance prolongée (>12 mois) à différents niveaux d'alcool, sauf à 90% où aucune survie n'a été observée au-delà de 2-12 mois (selon les espèces) (Thomas, 2012). Bien que l'éthanol chauffé modifie les barrières de perméabilité, il le fait de manière différente des agents oxydants puisque dans ce cas, les spores peuvent être marquées par un colorant des acides nucléiques (Setlow *et al.*, 2002; Cronin and Wilkinson, 2008). De plus une libération du DPA et une hydratation du protoplaste sont observées (Figure 14).

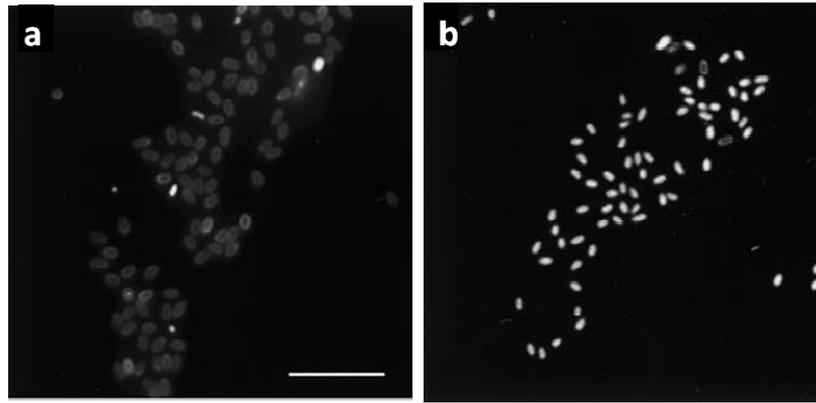


Figure 14 : Images de microscopie de fluorescence montrant le marquage de spores traitées à l'éthanol par le DAPI. (a) spores non traitées (b) spore traitées à l'éthanol 70% 2 h à 65 °C (Setlow *et al.*, 2002).

Ainsi, les spores traitées montrent une accessibilité augmentée au SYTO 9 et à l'IP mais plus faible au Hoechst 33342, indiquant peut être que bien que l'éthanol perturbe une ou plusieurs barrière de perméabilité, les « brèches » sont relativement mineures (Cronin and Wilkinson, 2008). Les spores sans DPA sont très sensibles au traitement éthanol. Setlow *et al.*, suggèrent ainsi que la destruction des spores par l'éthanol serait liée à un premier mécanisme de libération du DPA suivi de la mort des spores par l'effet de la chaleur (cf. 2.2) et/ou de l'éthanol. Bien que les spores traitées à l'éthanol aient des aspects de spores germées, ces spores ne perdent pas leur réfringence, ne sont pas capables de germer même avec le lysozyme et ne montrent pas d'initiation du métabolisme (Setlow *et al.*, 2002; Cronin and Wilkinson, 2008). L'alcool est très rapidement létal pour des bactéries non sporulantes à concentration appropriée. L'éthanol à 70% est recommandé comme étant la meilleure concentration comme désinfectant bactérien puisqu'il tue les cellules bactériennes par des perturbations de la membrane et des dénaturations protéiques (Thomas, 2012). Ce dernier auteur suggère que l'éthanol à 90% serait plus efficace sur les spores.

D'autres agents chimiques comme des aldéhydes (glutaraldéhyde) peuvent détruire les spores, mais par des mécanismes qui restent hypothétiques. Il est par contre connu qu'ils ne provoquent pas d'altération de l'ADN (Setlow, 2006).

Différents paramètres environnementaux, qu'ils soient physiques ou chimiques, permettent de moduler les propriétés structurales des spores bactériennes. Ils peuvent notamment être responsables de modifications des barrières de perméabilité de la spore. L'éthanol couplé à la température est une perturbation intéressante à étudier. En effet, ce stress entraîne une perméabilisation de la structure, suffisante pour laisser entrer des sondes spécifiques de l'ADN, mais la spore semble conserver son intégrité au contraire d'un traitement à l'acide par exemple. Ce stress peut ainsi s'avérer intéressant dans une optique d'utilisation de la structure de la spore bactérienne comme microcapsule biologique. Les propriétés de résistance de la spore sont en effet déjà exploitées dans l'alimentation. Cependant, l'effet de cette perturbation sur les structures, et notamment la ou les couches cibles, est encore mal compris. L'utilisation de différentes méthodes, globales ou plus ciblée, est ainsi envisagé afin d'en étudier l'impact sur les structures de la spore.

CONCLUSION ET PROBLEMATIQUE DE LA THESE

La spore bactérienne est une structure cellulaire multicouche issue d'un processus appelé sporulation. Lorsque des conditions favorables reviennent, ces spores sont réactivables et peuvent sortir de leur état de dormance *via* la germination. Ces deux processus sont très bien décrits dans la littérature, cependant certains points, comme l'activation thermique de la germination, sont encore mal compris. Des hypothèses sont néanmoins avancées puisque de précédents résultats obtenus au laboratoire ont relié une modification du cortex à une relaxation enthalpique aux alentours de la température d'activation de la germination.

Cette étude bibliographique montre également que les nombreuses spécificités dans la composition des spores bactériennes sont à l'origine d'une extrême résistance à de multiples stress environnementaux. Ainsi, la forte minéralisation et la faible hydratation du protoplaste sont particulièrement importantes dans sa résistance. De même, le DPA, un composé spécifique des spores est également impliqué. Ce dernier peut avoir un rôle dans la faible mobilité de certains constituants de la spore.

L'étude bibliographique a également permis de mettre en évidence que les caractéristiques structurales de la spore, notamment sa faible perméabilité à des composés autres que l'eau ou les germinants, sont également impliquées dans sa résistance. La membrane interne a ainsi été identifiée comme un point clé de l'imperméabilité des spores. Cependant, peu de différences existent dans sa composition par rapport à la membrane de cellules végétatives. Il est ainsi difficile d'expliquer la faible mobilité de ses constituants et son état biophysique est encore mal connu.

Enfin, ce travail bibliographique nous a permis de mettre en évidence certains paramètres environnementaux, qu'ils soient physiques ou chimiques, permettant de moduler les propriétés structurales des spores bactériennes. Des températures non létales semblent ainsi être responsables d'une augmentation de la mobilité de certains constituants ou de certaines structures de la spore. Des agents chimiques, comme l'éthanol couplé à la température ou les acides forts, provoquent également des modifications de l'intégrité des structures de la spore en relation avec leur inactivation. L'éthanol permet notamment une perméabilisation différente des spores puisque des sondes fluorescentes peuvent pénétrer

jusque dans le protoplaste. Cette perturbation semble particulièrement intéressante dans une éventuelle utilisation de la spore comme capsule biologique. Cependant, même si l'hypothèse de « rupture » d'une des couches de la spore est soulevée, la ou les structures cibles ne sont pas encore totalement identifiées.

La problématique de ce travail peut s'énoncer ainsi :

« Est-il possible de contrôler la perméabilité de la spore afin d'utiliser cette structure comme une microcapsule biologique ? »

Afin de répondre à cette question, différents axes de recherche ont été menés :

- ❖ Mise en place de techniques d'études permettant de rendre compte de la perméabilité et de l'état des barrières de perméabilité de la spore et notamment de sa membrane interne.
- ❖ Evaluation de l'effet de perturbations connues (germination, température) au moyen des méthodes mises en place.
- ❖ Etude de l'impact de procédés de perméabilisation des spores sans modification drastique des structures, notamment par l'utilisation du couplage éthanol/température.

MATERIEL & METHODES

MATERIEL & METHODES

1. Matériel biologique

1.1. Souches utilisées et techniques de culture

1.1.1. Souches bactériennes

Les souches de *B. subtilis* utilisées dans ce travail sont la souche sauvage 168 (*Bacillus* Genetic Stock Center, Département de biochimie, Ohio State University, Columbus, OH 43010, USA) et la souche sauvage PS533. La souche sans enveloppe PS4150 dans laquelle la plupart des séquences codantes pour les gènes *cotE* et *gerE* sont supprimés a également été utilisée. Ces spores ne possèdent plus la plupart des protéines qui peuvent être extraites de l'enveloppe et la microscopie électronique à transmission montre que cette structure est très faiblement présente (Ghosh *et al.*, 2008). PS533 et PS4150 sont des dérivés de la souche isogénique PS832, un dérivé prototrophe de la souche 168. Ces souches ont généreusement été fournies par Barbara Setlow (Department of Molecular, Microbial and Structural Biology, University of Connecticut Health Center, USA). La souche PS533 porte un plasmide pUB110 codant pour la résistance à la kanamycine (Setlow and Setlow, 1996). La souche PS4150 porte une résistance à la tétracycline (qui remplace la séquence codante *cotE*) et une résistance à la spectinomycine (qui remplace la séquence codante *gerE*). Dans le texte, les souches 168 et PS533 seront appelées « souche sauvage » et la souche PS4150, « souche mutante » ou « *cotE gerE* ».

1.1.2. Production de spores

Les spores de *B. subtilis* ont été produites selon la méthode de Nicholson et Setlow (Nicholson and Setlow, 1990). Pour s'assurer des souches utilisées, les isolements des souches PS533 et PS4150 sont réalisés sur des boîtes de gélose contenant un antibiotique adéquat (kanamycine pour PS533 et spectinomycine pour PS4150).

Une pré-culture est obtenue par l'inoculation d'une colonie fraîche à 50 ml de milieu de sporulation 2x Schaeffer's-glucose (2xSG) à 37 °C contenu dans une fiole bafflée de 250 ml. La composition du milieu de sporulation est donnée dans le Tableau 3.

Tableau 3 : Composition du milieu de sporulation 2x Schaeffer's-glucose (2xSG) pour 1L

Eléments	Quantités	Méthodes de stérilisation
Difco nutrient broth (Becton Dickinson, Detroit, USA)	16,0 g	Autoclavage
KCl	2,0 g	
MgSO ₄ , 7H ₂ O	0,5 g	
Ca(NO ₃) ₂ , 4H ₂ O (1M)	1,0 mL	Filtration
FeSO ₄ , 7H ₂ O (0,1M)	1,0 mL	
MnCl ₂ (1 mM)	1,0 mL	
D-Glucose (50% w/v)	2,0 mL	

Le pH est ajusté à 7 avant autoclavage avec du NaOH 1 M puis les autres composés filtrés sont ajoutés après refroidissement à 50 °C. Sauf précision, les différents constituants proviennent de Sigma Aldrich, France.

La préparation a été mise sous agitation à 37 °C jusqu'à obtention d'une DO_{600 nm} comprise entre 0,4 et 0,6. Puis 90 ml de milieu de sporulation 2xSG à 37 °C contenus dans une fiole bafflée de 500 ml sont inoculés par 10 ml de pré-culture. La préparation est mise à l'étuve pendant 48 à 72 h sous agitation (200 rpm) à 37 °C jusqu'à l'obtention d'une sporulation suffisante (supérieur à 90%). Le niveau de sporulation est vérifié à l'aide d'un microscope droit à contraste de phase (Primostar, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Germany). En effet, les spores matures, appelées spores dormantes, apparaissent très réfringentes et il est donc possible de les distinguer des cellules végétatives ou des spores germées (Figure 15).

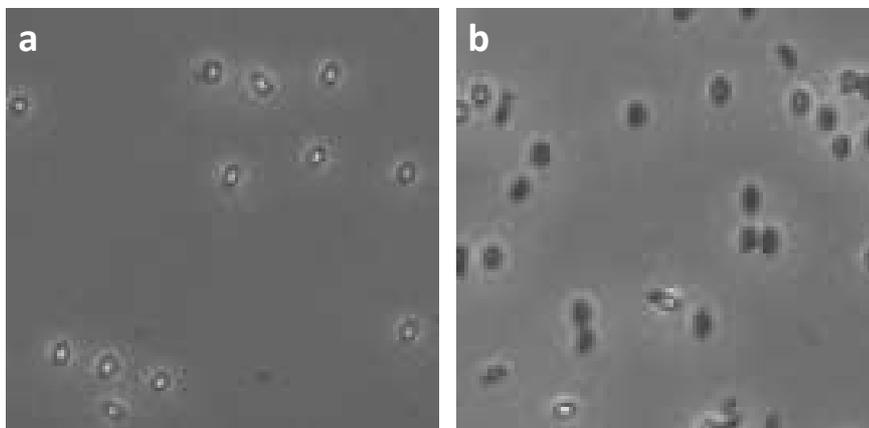


Figure 15 : Observation au microscope à contraste de phase de spores à différents stades. (a) spores dormantes. (b) spores germées pendant 45 min avec de la L-alanine.

Les spores sont ensuite récoltées par centrifugation pendant 15 min à 4500 g à 4 °C, puis lavées trois fois avec de l'eau distillée froide. Elles sont ensuite stockées à 4 °C.

1.1.3. Purification des productions de spores

Les spores sont ensuite lavées à l'eau déminéralisée froide stérile tous les deux jours pendant au moins une semaine afin d'éliminer les débris cellulaires, les cellules restantes et les contaminants éventuels. Le matériel biologique est ensuite conservé dans de l'eau déminéralisée à 4 °C et sa pureté est vérifiée par la détermination du pourcentage de spores réfringentes « phase bright » (au minimum 95% de spores pour un maximum de pureté). Les spores sont ensuite utilisées au moins 7 jours après la récolte. Certaines production de spores, notamment les spores mutantes *cotE gerE*, nécessitent une purification supplémentaire. Pour cela, après centrifugation les culots de spores sont repris dans 100 à 200 µl de Nycodenz (Histodenz® Sigma Aldrich, France) à 20% (m/v) et déposés sur 1 à 2 ml de Nycodenz à 50% (m/v). Les tubes sont ensuite centrifugés pendant 45 min à 14000 g à 25 °C (Ghosh and Setlow, 2010). Les culots de centrifugation obtenus contiennent exclusivement des spores dormantes et sont lavés abondamment (au moins 5 lavages) pour enlever tout les résidus de Nycodenz. Les spores sont ensuite stockées à 4 °C.

1.1.4. Production de cellules végétatives

La production de cellules végétatives débute par une pré-culture réalisée de la même manière que pour la production de spores. 10 mL de pré-culture sont alors ajoutés à 90 mL de milieu 2xSG dans une fiole bafflée. La culture est placée à 37 °C sous agitation (200 rpm) pendant environ 100 min. Les cellules sont alors en milieu de phase exponentielle, ce qui permet d'éviter la présence de spores dans les échantillons. La culture est suivie par la densité optique à 600 nm (DO_{600nm}) (Figure 16).

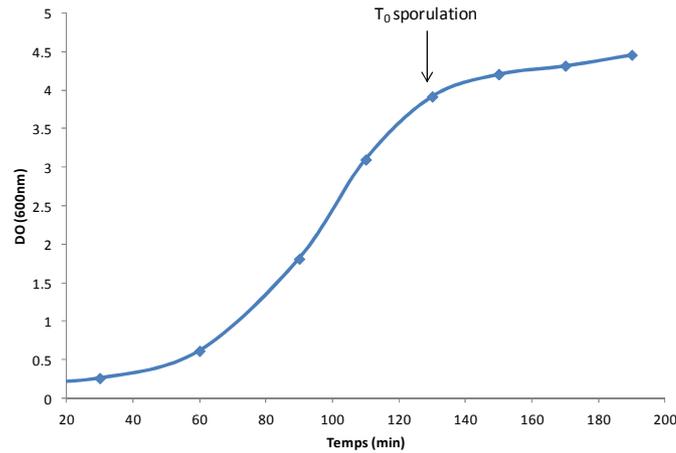


Figure 16 : Evolution de la densité optique à 600 nm (DO_{600nm}) au cours de la culture de cellules de *Bacillus subtilis* en milieu 2xSG

L'arrêt de la croissance est réalisé par centrifugation à 3500 g pendant 15 min à 4 °C. Le culot est ensuite lavé trois fois dans 100 ml d'eau physiologique pour se débarrasser du milieu résiduel.

1.2. Germination des spores

1.2.1. Conditions de germination

Préalablement à la germination, les spores de *B. subtilis* sont activées thermiquement. Pour cela, elles sont suspendues à une concentration cellulaire d'environ $\sim 1,5 \cdot 10^8$ spores/ml (DO_{600 nm} = 1) pendant 30 minutes dans un bain d'eau à 70 °C, puis immédiatement refroidies dans la glace. Ceci permet de synchroniser et d'améliorer la germination (Keynan *et al.*, 1964; Zhang *et al.*, 2009). Pour la germination, les spores sont remises en suspension à une DO_{600 nm} proche de 1 dans un milieu riche Luria Broth (LB, Sigma Aldrich, France) ou dans un tampon Tris-HCl 25 mM contenant 10 mM de L-alanine (Sigma Aldrich, France) à 37 °C. Les spores sont ensuite récoltées par centrifugation 15 min à 4500 g à 4 °C, lavées au moins deux fois avec de l'eau distillée à 4 °C puis sont utilisées.

1.2.2. Suivi de la germination

La germination peut être suivie ou vérifiée par différentes méthodes. La microscopie à contraste de phase permet ainsi de distinguer les spores dormantes et réfringentes (« phase bright ») des spores germées qui deviennent « phase dark » (Figure 15). Le suivi de la densité

optique à 580 nm ($DO_{580\text{ nm}}$) permet également de suivre la germination au cours du temps. En effet, suite à l'ajout d'un germinant, une chute de la $DO_{580\text{ nm}}$ est observée au cours du temps et ce jusqu'à atteindre environ 40 à 50% de la densité optique initiale, comme le montre la Figure 17.

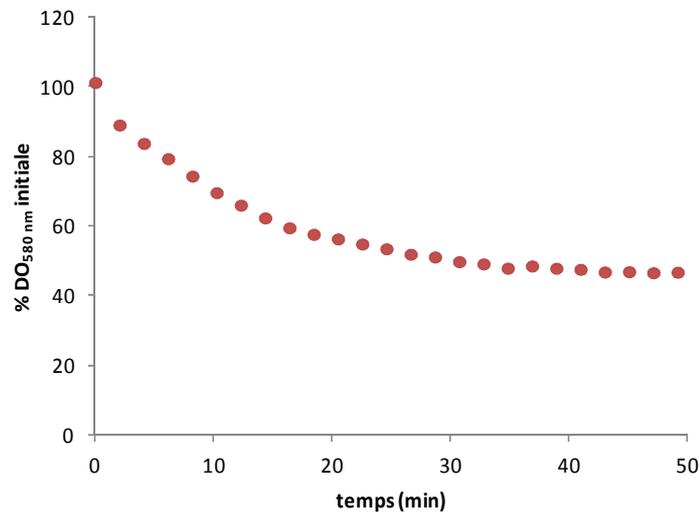


Figure 17 : Suivi de la chute de la $DO_{580\text{ nm}}$ de spores sauvages de *Bacillus subtilis* en présence de L-alanine 10 mM.

1.2.3. Obtention de fragments d'enveloppe après germination

Les fragments d'enveloppes sont obtenus en laissant les spores sauvages germer pendant environ 90 min et sont alors identifiés par microscopie. En effet, des résidus d'enveloppe et/ou de cortex sont souvent observables attachés aux cellules ou dans le milieu de germination (Keijser *et al.*, 2007; Ceragioli *et al.*, 2009).

1.3. Production de spores sans enveloppe (traitement chimique)

Ces spores ont été préparées selon la procédure décrite par Paidhungat et Setlow (Paidhungat and Setlow, 2001). Dans le but d'extraire les protéines de l'enveloppe, les spores sont suspendues à une $DO_{600\text{ nm}}$ d'environ 10-15 pendant 30 minutes à 70 °C dans la solution suivante : 1% de dodécylsulfate de sodium (SDS), 0,1 M de NaOH, 0,1 M de NaCl et 0,1 M de dithiothréitol (DTT). Ces spores sont ensuite lavées abondamment avec de l'eau distillée (environ 8 fois) et conservés à 4 °C dans du tampon phosphate salin (PBS). L'efficacité du traitement a été vérifiée par le suivi de la diminution de la $DO_{580\text{ nm}}$ en présence de 0,5 mg / ml de lysozyme. En effet, les spores sans enveloppe sont sensibles au lysozyme. Cette enzyme

va provoquer la germination de ces spores en dégradant le cortex, ce qui pourra être suivi, comme décrit précédemment, par la chute de DO_{580nm} .

2. Caractérisation des structures de la spore par méthodes physicochimiques

2.1. Etude de la mobilité par la résonance magnétique nucléaire (RMN)

2.1.1. Principe de la RMN

Le noyau d'un atome peut être considéré comme une sphère chargée tournant sur elle-même. Cette rotation induit un petit champ magnétique appelé moment magnétique nucléaire de spin et noté μ . Lorsque l'échantillon est plongé dans un champ magnétique externe intense (B_0), les moments magnétiques nucléaires s'orientent dans la direction de ce champ. Le nombre de noyaux parallèles est légèrement supérieur à celui des noyaux antiparallèles, la somme vectorielle de tous les moments magnétiques nucléaires, l'aimantation M , est alors non-nulle et dirigée dans la direction du champ B_0 (Figure 18a).

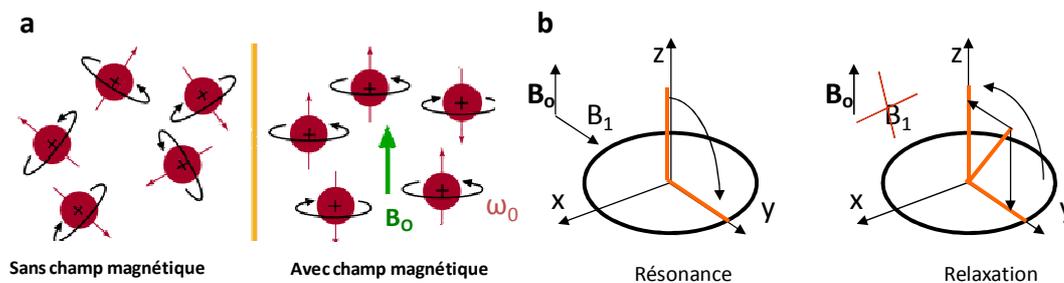


Figure 18 : Principe de la résonance magnétique nucléaire (RMN).

Le moment magnétique est également animé d'un mouvement de précession analogue au mouvement de l'axe d'une toupie. Pour un champ magnétique B_0 donné, on a alors :

$$\omega_0 = \gamma \cdot B_0 \text{ (relation de Larmor)}$$

avec ω_0 : la fréquence de précession (Hz), γ : rapport gyromagnétique du noyau (MHz/T) et B_0 : force du champ magnétique appliqué (T).

Si un second champ magnétique B_1 de radiofréquence $\omega_1 = \omega_0$ est appliqué perpendiculairement à B_0 , il va y avoir absorption d'énergie, les noyaux précessent sous

l'influence de B_1 , c'est la résonance. A l'arrêt de B_1 , l'aimantation va progressivement retourner à sa position d'équilibre, parallèle à B_0 , c'est la relaxation (Figure 18b). La relaxation est alors caractérisée par des temps de relaxation :

T_1 , temps de relaxation spin-réseau, correspond à la relaxation longitudinale. Dans ce cas l'énergie est transférée à l'environnement moléculaire (le réseau) par vibration ou translation. Pour l'atome ^1H par exemple, plus T_1 est court, plus les protons sont mobiles.

T_2 , temps de relaxation spin-spin, correspond à la relaxation transversale. Dans ce cas l'énergie est transférée au noyau voisin. Plus T_2 est long, plus les protons sont mobiles.

2.1.2. Préparation des spores déshydratées

Les suspensions de spores sont atomisées à 135 °C, avec un débit d'air de 473 L/h (Mini spray dryer B-290, Buchi, France), la concentration des spores est alors d'environ 10^{11} spores/g. Environ 100-150 mg de spores sont ensuite placées dans un tube RMN de 8 mm de diamètre. Ces tubes sont par la suite placés dans des boîtes hermétiques contenant différentes solutions de sel saturés pour équilibrer l'activité de l'eau (a_w). Avant chaque mesure, les tubes sont sortis des boîtes et immédiatement fermés à l'aide de parafilm. Les différents a_w utilisées dans ce travail ainsi que les sels utilisés (Sigma Aldrich, France) pour les atteindre sont donnés en Tableau 4.

Tableau 4 : Solutions saturées de sels et a_w correspondantes à 25 °C

a_w	Sels utilisés
0,113	LiCl
0,328	MgCl ₂
0,528	Mg(NO ₃) ₂
0,754	NaCl
0,843	KCl

Chaque tube est laissé au moins 10 jours à équilibrer pour chaque a_w . Les a_w sont vérifiées à l'aide d'un osmomètre Decagon-AQUALAB CX-2 (Pullman, USA).

2.1.3. Acquisition et traitement des signaux

L'étude des temps de relaxation des protons a été réalisée sur un spectromètre RMN basse résolution MARAN Ultra (Resonance Instrument, Oxford, UK) dont la fréquence de résonance est de 23 MHz. Le système RMN est équipé d'un régulateur de température

permettant des acquisitions comprises entre 25 et 100 °C. Les temps de relaxation spin-spin (T_2) ont été déterminés à l'aide des séquences FID (Free Induction Decay) et CPMG (Carr-Purcell-Meiboom-Gill) à 25 °C. Pour la séquence FID, le nombre de points est de 2048 et le nombre d'acquisitions de 128. La séquence par échos CPMG permet de détecter les protons les plus mobiles sans que le signal ne soit influencé par l'inhomogénéité du champ magnétique ; par contre, les protons engagés dans des structures plus organisées, de mobilité très réduite ($T_2 < \tau$) ne seront pas ou mal détectés. La simple séquence de retour à la précession libre (FID) est également utilisée pour détecter le pourcentage correspondant aux protons les moins mobiles. Le Tableau 5 indique les paramètres utilisés pour la séquence CPMG.

Tableau 5 : Paramètres d'acquisition des séquences CPMG.

Séquence CPMG	
Durée des impulsions (P90)	2,7 μ s
Durée des impulsions (P180)	5,4 μ s
Nombres d'échos	2048
Nombre d'acquisition (NS)	512
Temps entre les acquisitions (RD)	4 s
τ	40 μ s

Les courbes de relaxation à partir de la séquence CPMG sont modélisées comme une distribution continue d'exponentielle à l'aide du logiciel Win DXP (Resonance Instrument, Oxford, UK) *via* l'Équation 2.

$$I(t) = \sum_i I_i e^{(-t/T_{2i})} \quad \text{Équation 2}$$

Avec T_{2i} et I_i respectivement, temps de relaxation et intensité des différentes populations.

Les courbes obtenues sont déconvoluées à l'aide du logiciel OriginPro (OriginPro 8, Origin Lab) pour évaluer le T_2 de chaque population (position des pics) et le nombre de protons correspondant (intensités des pics). Ces intensités sont exprimées en pourcentage du FID c'est-à-dire en pourcentage de protons mobiles et ramenées à une masse identique de spores de 100 mg.

2.2. Utilisation de la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR)

2.2.1. Principe de la spectroscopie infrarouge

Le FTIR permet l'étude des propriétés d'un matériel par rapport à son interaction avec les infrarouges. Il s'agit d'une technique de spectroscopie vibrationnelle, les spectres obtenus reflétant à la fois la structure moléculaire et l'environnement moléculaire. Les échantillons sont irradiés par des radiations infrarouges, l'absorption de ces radiations stimulant des mouvements vibrationnels. Cela se traduit par une absorption d'énergie à des fréquences correspondant au mode de vibration moléculaire entraînant des variations de dipôle de la molécule correspondante ou d'un groupe chimique. Ces changements dans les mouvements vibrationnels donneront des bandes sur le spectre, chacune étant caractérisée par sa fréquence et son amplitude (Duygu *et al.*, 2009; Alvarez-Ordóñez *et al.*, 2011). Ainsi lorsqu'un échantillon est étudié par spectroscopie infrarouge, un spectre complexe, caractérisé par des bandes spécifiques, est obtenu. Une « empreinte digitale », qui peut être utilisée pour l'identification, la caractérisation et la quantification d'échantillon, est ainsi obtenue.

En biologie, le FTIR permet ainsi de visualiser de manière globale les constituants de microorganismes mais aussi l'identification et la différenciation d'espèces bactériennes (Naumann *et al.*, 1995; Forrester *et al.*, 2009; Garip *et al.*, 2009). La spectroscopie infrarouge a beaucoup été utilisée par exemple pour les protéines, la région entre 1500 et 1700 cm^{-1} étant caractéristique de leur structure secondaire. D'autres constituants cellulaires, comme les phosphates ou les polysaccharides, possèdent également des bandes (ou régions) caractéristiques. Le Tableau 6 liste ainsi divers bandes caractéristiques obtenues pour les cellules végétatives de *Clostridium* ou *Bacillus* ainsi que pour des spores de *Bacillus spp.*

Tableau 6: Attribution des fréquences de bandes classiques observées en FTIR pour les cellules végétatives et les spores de *Bacillus* et *Clostridium* (ν : stretching, δ : bending, a : antisymétrique, s : symétrique). Sp *Bacillus* : Spores de *Bacillus*. D'après (Schuster *et al.*, 1999; Naumann, 2000; Perkins *et al.*, 2004; Johnson *et al.*, 2005; Forrester *et al.*, 2009; Garip *et al.*, 2009; Johnson *et al.*, 2010).

Région d'absorption des lipides 3000-2800 cm ⁻¹			Région d'absorption phosphates et carbohydrates 1300-900 cm ⁻¹		
Valeur du pic (cm ⁻¹)	Groupement	Composé cellulaire	Valeur du pic (cm ⁻¹)	Groupement	Composé cellulaire
<i>Bacillus</i> : 2956	ν_a CH ₃	Lipides	<i>Bacillus</i> : 1256	-	Composé lipidique/ ester ?
<i>Clostridium</i> : 2959			<i>Bacillus et Sp Bacillus</i> : 1235-1233	ν_a PO ₂ ⁻	Acide nucléique et petites contributions des phospholipides
<i>Bacillus et Sp Bacillus</i> : 2923	ν_a CH ₂	Lipides	<i>Sp Bacillus</i> : 1277 - 1279	ν_a COO	DPA
<i>Clostridium</i> : 2921			<i>Sp Bacillus</i> : 1439-1441 ; 1015	Ring ν C-N Ring ν C-C	CaDP-3H ₂ O
Région d'absorption des protéines 1800-1500 cm ⁻¹			Région « empreinte digitale » :		
Valeur du pic (cm ⁻¹)	Groupement	Composé cellulaire	Valeur du pic (cm ⁻¹)	Groupement	Composé cellulaire
<i>Bacillus</i> : 1656-1657	ν C=O	Structure secondaire protéines (amide I)	<i>Sp Bacillus</i> : 766 ; 725 ; 701 ; 659	-	CaDP-3H ₂ O
<i>Sp Bacillus</i> : 1656 - 1658					
<i>Bacillus</i> : 1540-1542	δ N-H	Structure secondaire protéines (amide II)			
<i>Sp Bacillus</i> : 1540 - 1541	ν C-N	Vibration de l'anneau hétérocyclique du CaDPA			
<i>Bacillus</i> : 1739	$\nu >$ C=O	Groupe ester des lipides			

2.2.2. Préparation des échantillons et acquisition du signal

Les expériences ont été réalisées à l'aide d'un spectromètre infrarouge à transformée de Fourier BRUKER IFS Vector 22 (Bruker, Allemagne). La méthode ATR (réflectance totale atténuée) a été utilisée avec un cristal ZnSe (séléniure de zinc). Une goutte de 10 μl d'échantillon (spores ou cellules végétatives) à une $\text{DO}_{600\text{ nm}}$ d'environ 10 est déposée sur le cristal puis séchée sous un flux d'azote pendant 5 à 10 min pour obtenir un film homogène. Les spectres sont obtenus par l'acquisition de 10 scans à une résolution de 2 cm^{-1} et à une température de $25\text{ }^\circ\text{C}$. Avant chaque mesure, un background est réalisé afin de soustraire le bruit de fond. La température est contrôlée à l'aide d'un bain à circulation HAAKE DC30/DL30 (Thermo Electron, Allemagne). La Figure 19 schématise la procédure utilisée.

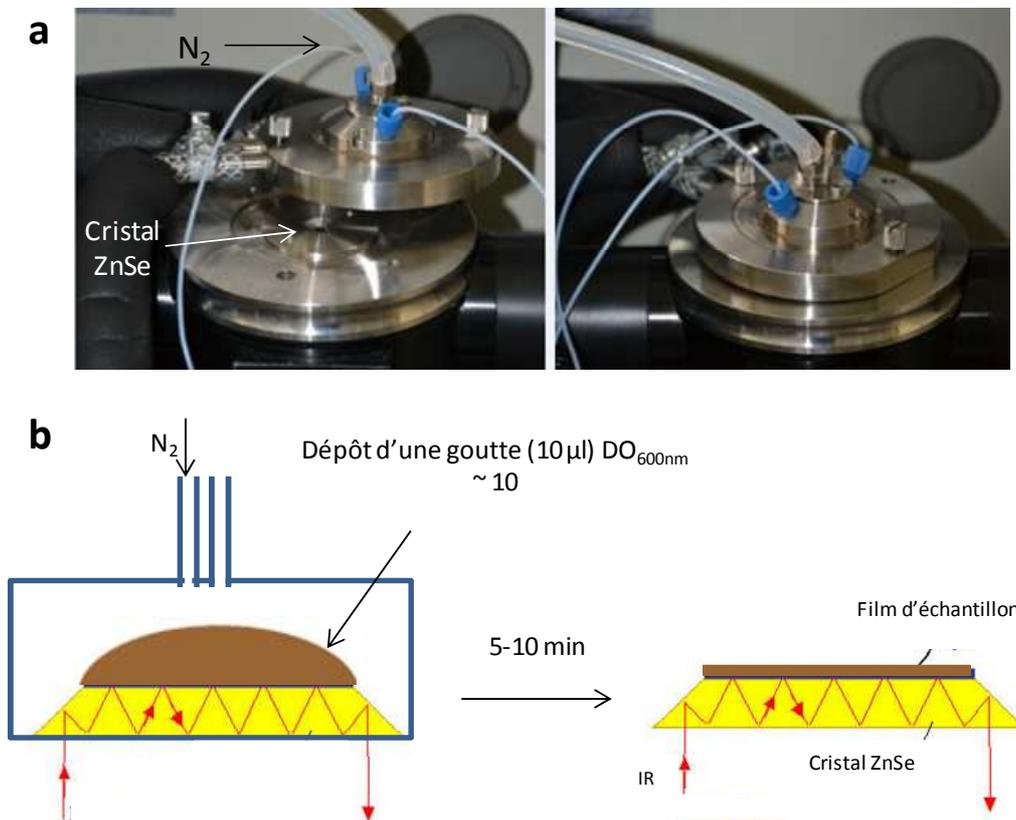


Figure 19 : Principe de l'obtention et de la mesure d'un film d'échantillon sur le cristal ZnSe du spectromètre infrarouge. (a) Photographie du système. (b) Schématisation de l'obtention d'un film. N₂ : azote U.

Le logiciel OPUS (Bruker, Allemagne) est utilisé pour obtenir la dérivée seconde des spectres et obtenir la position des pics. Ce logiciel est également utilisé pour obtenir des spectres moyens des spores ou des cellules végétatives.

2.2.3. Suivi de la germination

Pour l'étude de la germination, une suspension de spores est préalablement activée thermiquement puis re-suspendue dans du milieu LB ($DO_{600\text{ nm}} = 1$). Des échantillons sont prélevés au cours du temps, lavés et concentrés avant de déposer une goutte de 10 μL d'échantillon sur le cristal. Un film est ensuite obtenu avant acquisition de la même manière que décrit précédemment.

3. Utilisation de la fluorescence pour étudier les structures de la spore

3.1. Spectrofluorimétrie

3.1.1. Principe

La mesure d'émission de fluorescence polarisée permet l'observation de mouvements rotationnels de fluorophores durant leur durée de vie à l'état excité. Cette technique repose sur le principe suivant : lorsque des molécules sont exposées à de la lumière polarisée, celles dont le dipôle d'absorption est orienté dans la même direction que la lumière sont préférentiellement excitées, c'est la photosélection. Une fois excitées ces molécules peuvent avoir des mouvements de rotation durant la durée de vie de l'état excité ($\sim 10^{-9}\text{ s}^{-1}$), ceci va dépolariiser l'émission de fluorescence. Ainsi, la mesure des composantes d'émission polarisée, *via* des polariseurs, permet le calcul du type et de l'étendue des mouvements de rotation des molécules. La mesure de l'anisotropie (r) est alors obtenue à partir de l'intensité des composantes verticales, dites parallèles (I_{\parallel}) et horizontales, dites perpendiculaires (I_{\perp}) de l'émission de fluorescence (Figure 20).

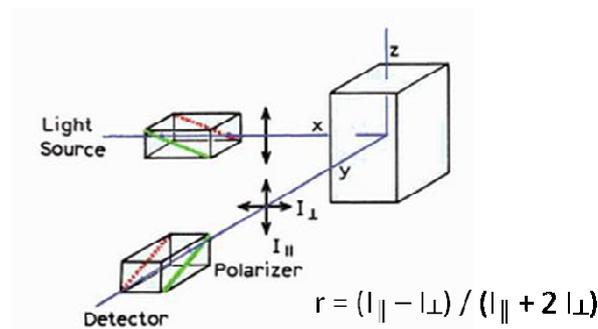


Figure 20 : Principe de la mesure d'anisotropie de fluorescence (Lakowicz, 2006).

La vitesse de rotation des molécules dépend de leur taille, forme et de leur environnement local. Un changement de viscosité du milieu de la sonde entraînera un changement d'anisotropie de fluorescence. Ainsi, cette méthode peut être utilisée pour détecter des changements dans l'environnement de ces molécules (viscosité locale, transition de phase,...) (Fluorolog, 2001; Lakowicz, 2006).

Le DPH a par exemple déjà été utilisé en analyse de l'anisotropie de fluorescence sur les spores de *B. megaterium* ou *B. subtilis*, dans l'idée de mesurer une fluidité membranaire (Skomurski *et al.*, 1983; Ishihara *et al.*, 1999). Le DPH s'insère dans les feuillettes de manière parallèle aux chaînes acyles des phospholipides mais aussi au centre de la bicouche (Van der Heide *et al.*, 1996).

3.1.2. Mesure de l'anisotropie de fluorescence

Les mesures ont été réalisées sur un spectrofluorimètre de type Fluorolog-3 équipé d'un double polariseur en T (Jobin-Yvon, HoribGroup, USA). Une solution de DPH concentrée à 1 mM est préparée dans du tétrahydrofurane (THF) et conservée à -20 °C à l'abri de la lumière. 6 µl de solution de DPH à 1 mM sont ajoutés à 3 ml de suspensions cellulaires de concentration définie (spores : 10⁸ spores / ml ; cellules végétatives : 10⁷ bactéries / ml). Les longueurs d'onde d'émission et d'excitation sont respectivement de 360±2 nm et de 431±5 nm (Simonin *et al.*, 2008). Le mélange est réalisé dans une cuve de spectroscopie en verre poli à 30 °C sous agitation. Quatre signaux sont acquis au cours du temps avec un délai de 8 s : les intensités I_{HH}, I_{HV}, I_{VV} et I_{VH}, qui sont utilisées pour calculer l'anisotropie de fluorescence (r) selon la formule suivante :

$$r = \frac{(I_{VV} - GI_{VH})}{(I_{VV} + 2GI_{VH})} \text{ avec } G = \frac{I_{HV}}{I_{HH}} \quad \text{Équation 3}$$

3.1.3. Détermination du temps d'insertion de la sonde

Il est aussi intéressant de suivre la vitesse d'insertion de la sonde. Pour cela, les variations de fluorescence (I_{VV}) ont été suivies au cours du temps. Les courbes sont normalisées à l'aide du logiciel Origin Pro et le temps d'insertion est ensuite défini comme le temps nécessaire pour atteindre 95 % de l'intensité maximale.

3.1.4. Réalisation d'une rampe de température

Les différents échantillons (spores ou cellules végétatives) ont été soumis à des modifications de température. Ces variations de température ont été effectuées au sein même du spectrofluorimètre, dans l'enceinte contenant la cuve de spectroscopie à l'aide d'un système Peltier. Ainsi, les suspensions de spores et de cellules (3 mL) vont subir les rampes de température suivantes:

- de 30 à 80 °C puis retour à 30 °C avec pour paramètres : +/- 5 °C toutes les 180 s pour les spores ;
- de 40 à 5 °C puis retour à 30 °C avec pour paramètres : +/- 5 °C toutes les 180 s pour les cellules végétatives.

3.2. Microscopie confocale

3.2.1. Mesure de la perméabilité des spores aux sondes fluorescentes

Plusieurs sondes fluorescentes ont été utilisées en microscopie confocale : l'iodure de propidium (IP), l'acridine orange (AO) et le meso-phenyl-4,4'-difluoro-4-bora-3a,4adiaza-s-indacene (Bodipy-C₁₂).

3.2.1.1. L'iodure de propidium (IP)

L'IP est un intercalant de l'ADN d'environ 668 g/mol. Il est capable de se lier à l'ADN (à raison d'une molécule toutes les quatre à cinq paires de bases) ainsi qu'à l'ARN. Cette molécule fluoresce vingt à trente fois plus lorsqu'elle est liée à des acides nucléiques (maximum de fluorescence à 617 nm sous forme liée). Ce fluorophore est par ailleurs un marqueur de viabilité car il est connu pour ne marquer que les cellules dont les membranes ont perdu leur intégrité (Williams *et al.*, 1998). Pour l'ensemble des expérimentations, l'IP a été ajouté aux suspensions cellulaires ($\sim 5 \cdot 10^7$ spores /mL) à raison de 4 µL/mL à partir d'une solution mère aqueuse de 1 mg/mL.

3.2.1.2. L'acridine orange (AO) :

L'Acridine Orange est une sonde fluorescente de 301,8 g/mol qui, lorsqu'elle s'intercale au niveau de l'ADN, émet une fluorescence verte (Emission : 525 nm, Excitation : 500 nm) et rouge lorsqu'elle interagit avec l'ARN (Emission > 630 nm, Excitation : 460 nm). Ce fluorophore est un perméant cellulaire qui pénètre ainsi dans les cellules mortes et vivantes. Etant plus hydrophobe que l'IP, il passe aisément la membrane plasmique et se lie alors aux acides nucléiques. Une solution stock à 0,1 g/L dans l'eau distillée est conservée à 4 °C. Pour les essais de marquage pendant la sporulation la sonde est ajoutée à T₀, c'est-à-dire en début de phase stationnaire, à une concentration finale de 5 µg/mL pour une concentration finale d'environ 5.10⁸ spores/mL.

3.2.1.3. Le Bodipy-C₁₂ :

Cette sonde d'environ 455 g/mol a été synthétisée par l'équipe de Marina Kuimova de l'Imperial College London (Kuimova *et al.*, 2008). Il s'agit d'un rotor moléculaire qui a déjà été utilisé pour mesurer des micro-viscosités dans divers systèmes : cellules vivantes, sol-gels, mono et bicouches lipidiques (Kuimova *et al.*, 2008; Hungerford *et al.*, 2009; Levitt *et al.*, 2009; Hosny *et al.*, 2013). Elle est stockée à -20 °C à une concentration de 1 mg/ml dans du diméthylsulfoxyde (DMSO). Pour les essais d'insertion avant ou après sporulation, elle est utilisée à une concentration de 4,3 µM (pour une concentration de 1 à 5.10⁸ spores/mL). Sa formule chimique est donnée en Figure 21.

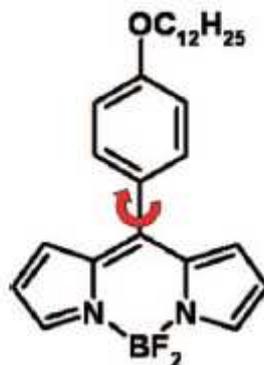


Figure 21 : Formule chimique du Bodipy-C₁₂ (Kuimova *et al.*, 2008)

Compte tenu de la structure hydrophobe du Bodipy-C₁₂, en particulier sa chaîne hydrocarbonée saturée (C₁₂), une localisation de la sonde dans les structure hydrophobes des

microorganismes étudiés est attendue. La localisation de cette sonde dans la bicouche se fait en profondeur dans le feuillet et son temps de vie reflète la viscosité de la chaîne carbonée de la bicouche, bien que dans une phase gel, la localisation pourrait être un peu différente et moins profonde (Wu *et al.*, 2013).

3.2.2. Acquisition d'image

Pour toutes ces sondes fluorescentes, les images en fluorescence et en transmission ont été acquises sur un microscope confocal Nikon C1Si Eclipse TE 2000 U avec le logiciel EZ-C1 3.50 (Nikon, Japon). Un objectif à immersion à huile PlanApo x100 a été utilisé (NA : 1,4) (Nikon, Japon). Un laser argon à 488 nm a été utilisé pour l'excitation avec un miroir dichroïque 408-488nm. Les longueurs d'onde d'émission étaient de 550-700 nm pour l'IP, 500-550 nm pour l'AO et 500-600 nm pour le Bodipy C₁₂.

3.3. Imagerie en temps de vie de fluorescence (FLIM)

3.3.1. Principe

Cette méthode est basée sur l'utilisation du décalage temporel entre excitation et émission de fluorescence. Les molécules fluorescentes ne sont pas seulement caractérisées par leurs spectres d'excitation et d'émission mais également par leur temps de vie (τ), c'est-à-dire le temps pour lequel les molécules restent à l'état excité avant de revenir à l'état fondamental. En d'autres termes, la distribution des temps de vie de fluorescence correspond à la décroissance exponentielle de l'émission après l'excitation (par une impulsion laser courte $<10^{-9}$ s) d'une sonde fluorescente. La Figure 22 montre un exemple de courbe de décroissance obtenue pour la rhodamine B.

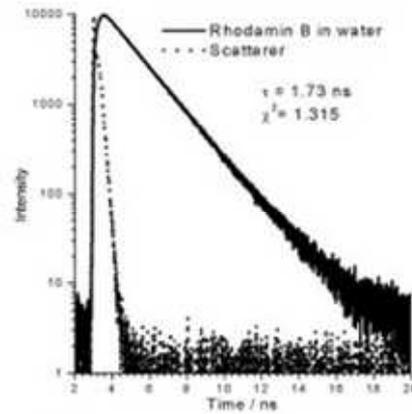


Figure 22 : Exemple de courbe de décroissance de fluorescence mesurée pour la Rhodamine B en solution dans l'eau. L'impulsion correspond à la réponse instrumentale. D'après (Szabelski *et al.*, 2010).

En plus d'être spécifique d'un fluorophore, le temps de vie possède plusieurs avantages comme le fait d'être indépendant de la concentration, et de varier selon l'environnement du fluorophore (pH, viscosité, concentration en ions,...) (Swift and Trinkle-Mulcahy, 2004; Ishikawa-Ankerhold *et al.*, 2012; Suhling *et al.*, 2012). L'imagerie par durée de vie de fluorescence est une mesure de la probabilité d'émission de fluorescence d'une certaine durée de vie. Ainsi le processus doit être répété plusieurs fois pour construire un « temps de vie moyen » pour chaque pixel qui a été imagé (Swift and Trinkle-Mulcahy, 2004), comme le montre la Figure 23.

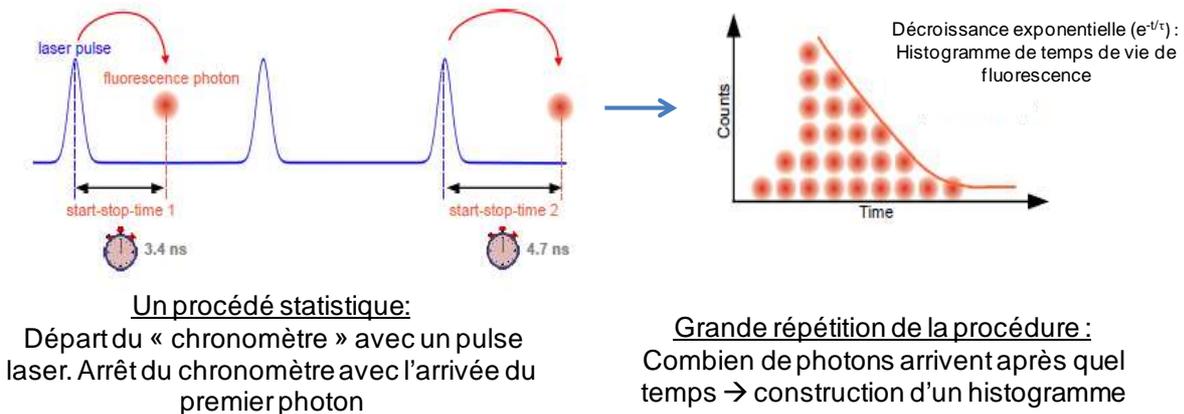


Figure 23 : Schématisation du principe du FLIM (méthode « time domain (TCSPC) »). D'après PicoQuant GmbH

Le FLIM est ainsi utilisée pour discriminer différents fluorophores sur la base de leur temps de vie mais aussi pour distinguer différents environnements dans un système basé sur les changements d'environnement local d'un fluorophore. La Figure 24 montre le type d'image qui peut ainsi être « construite », ici basée sur de l'autofluorescence.

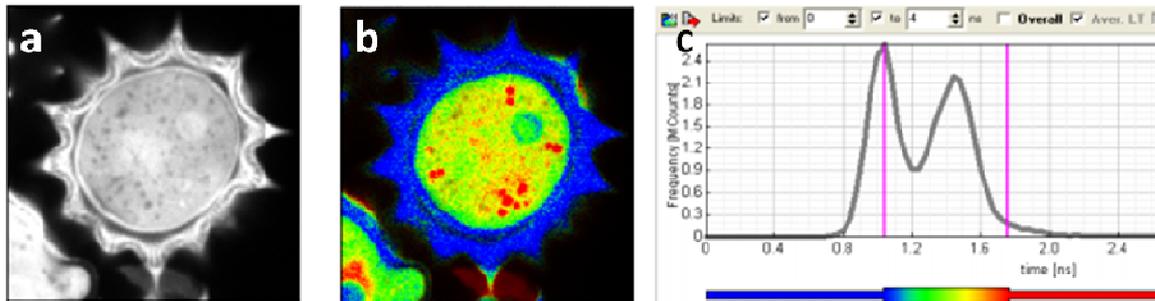


Figure 24 : Image en intensité de pollen de marguerite (a) et sa correspondance en temps de vie (b). Le graphe (c) représente l'histogramme de temps de vie et l'échelle de couleur correspondante utilisée dans l'image b. Il s'agit d'auto-fluorescence. D'après PicoQuant GmbH.

Seule la méthode dans le domaine temporel (time domain) est présentée ici mais le temps de vie peut aussi être mesuré dans le domaine fréquentiel (frequency domain).

3.3.2. Détermination de la viscosité

3.3.2.1. Principe des rotors moléculaires

La viscosité est une propriété clé qui résulte de la friction des molécules entre elles et qui gouverne les processus de diffusion et mobilité dans les fluides. Il s'agit donc d'un paramètre important à mesurer dans les membranes. Les rotors moléculaires sont des sondes fluorescentes qui ont la capacité de subir un mouvement intramoléculaire de rotation à l'état excité (« twisted intra-molecular charge transfer » = TICT). Le 4-(Dicyanovinyl) Julolidine DCVJ (Figure 25a) en est un exemple. Le retour à l'état fondamental peut se faire via deux voies de désexcitation concurrentes : une relaxation non fluorescente à partir de l'état de torsion (TICT) ou une émission de fluorescence à partir de l'état excité « plan » (LE).

La Figure 25b est une extension du diagramme de Jablonski pour les rotors moléculaires et présente ces deux voies.

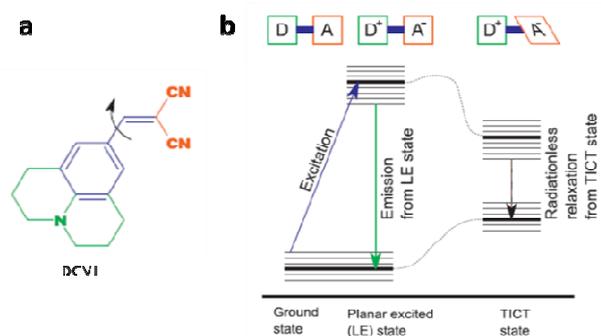


Figure 25 : (a) le DCVI, exemple de rotor moléculaire (b) Extension du diagramme de Jablonski pour les rotors moléculaires (Haidekker and Theodorakis, 2010).

Dans les environnements visqueux, il y a augmentation de la barrière d'énergie entre l'état excité LE et l'état TICT. Il y aura ainsi une dépendance de la formation de l'état TICT par rapport à la microviscosité de l'environnement. Le rendement quantique de fluorescence augmente dans les solvants de plus haute viscosité (Haidekker and Theodorakis, 2010; Kuimova, 2012). Ainsi, en pratique, à la fois l'intensité de fluorescence et le temps de vie sont très dépendent de la viscosité pour ces molécules (Haidekker and Theodorakis, 2007; Kuimova *et al.*, 2008). Cependant, pour les mesures basées sur l'intensité de fluorescence, il existe des incertitudes liées aux variations locales de concentration, de propriétés optiques du milieu, ainsi l'utilisation du temps de vie semble plus adapté (Levitt *et al.*, 2009). Ces sondes ont été utilisés pour mesurer les microviscosités dans une variété de systèmes, y compris des cellules vivantes, des sols-gels et des mono et bicouches lipidiques (Haidekker *et al.*, 2001; Kuimova *et al.*, 2008; Hungerford *et al.*, 2009; Levitt *et al.*, 2009). Ces sondes représentent un outil intéressant dans l'étude de la fluidité membranaire.

3.3.2.2. Mesure de la viscosité par le Bodipy C₁₂

Pour la mesure de la viscosité, la sonde Bodipy-C₁₂ a été utilisée. En effet, il a été mis en évidence que l'intensité et le temps de vie de fluorescence de cette sonde sont fortement dépendants de la viscosité. Le temps de vie de fluorescence a été utilisé dans ce travail. Il semble en effet un meilleur marqueur que l'intensité de fluorescence puisqu'il n'est pas affecté par la concentration (Kuimova *et al.*, 2008; Levitt *et al.*, 2009). Une courbe de calibration entre le temps de vie du rotor et la viscosité d'une solution de méthanol/glycérol variant de 15 et 1500 cP a été réalisée et a permis d'établir l'équation suivante (Kuimova *et al.*, 2008) :

$$\ln\tau_f = 0,5336 \times \ln\eta + 4,5862$$

Équation 4

Avec τ_f , temps de vie de fluorescence en ps et η , viscosité en cP.

Cette expression permet de convertir directement le temps de vie du rotor en une mesure de la micro-viscosité de l'environnement de la sonde.

Il a également été vérifié que la sonde ne forme pas d'agrégats dans les systèmes utilisés. En effet, des concentrations élevées en Bodipy peuvent former des agrégats qui sont caractérisés par un maximum d'émission supérieur à 630 nm (pour le chromophore non modifié), et également probablement par une durée de vie de l'état excité beaucoup plus courte (Bergstrom *et al.*, 2002; Kuimova *et al.*, 2008). La Figure 26 présente ainsi les spectres de fluorescence obtenus dans des spores sauvages en spectrofluorimétrie pour une excitation à 488 nm.

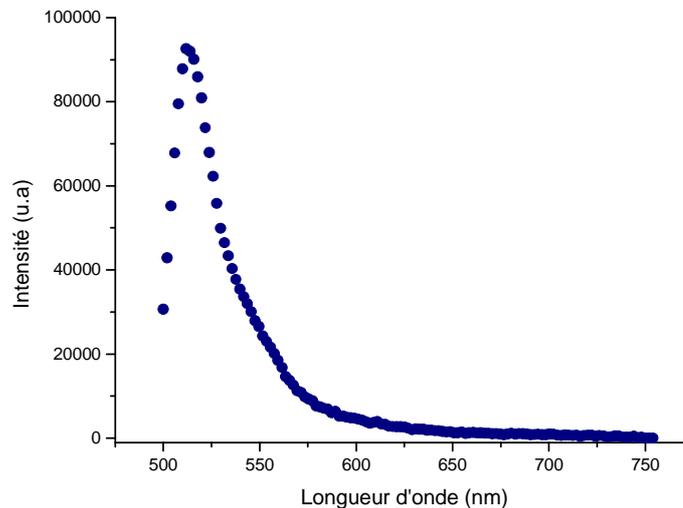


Figure 26 : Spectre de fluorescence de la sonde Bodipy-C₁₂ intégrée dans des spores sauvages au cours de la sporulation (Excitation : 488 nm).

Aucun maximum d'émission n'est observé pour des longueurs d'onde supérieures à 630 nm, ce qui confirme l'absence d'agrégats. Cette vérification a été réalisée pour les différents échantillons testés.

3.3.3. Intégration de la sonde

3.3.3.1. Marquage de spores

Pour les spores, la sonde Bodipy-C₁₂ a été incorporée au cours de la sporulation environ 1 à 2 h après le T₀ de sporulation (cf. Figure16) à une concentration de 4,3 µM afin de marquer les structures les plus profondes. Dans ce cas, les spores sont cultivées dans des fioles bafflées de 125 mL. Le même ratio d'inoculation (1/10) et de volume de la fiole (1/5) est utilisé que pour les autres productions. Il a été vérifié que la sonde n'a pas d'effet sur la sporulation (suivi des courbes de croissance). La sonde a également été utilisée pour marquer des spores déjà formées. Dans ce cas, les spores sont mises en contact avec la sonde pendant environ 12 h.

3.3.3.2. Marquage de cellules végétatives

Les cellules végétatives ont été cultivées et marquées suivant la procédure adaptée de (Cowan *et al.*, 2004). Après une pré-culture d'une nuit, les cellules végétatives sont mises en culture dans du milieu LB jusqu'à atteindre une DO_{600 nm} d'environ 0,2. A ce moment là, la sonde est ajoutée à une concentration de 4,3 µM et laissée en contact pendant encore 2 à 3 heures. Les cellules sont ensuite récoltées par centrifugation (3500 g, 4 °C, 10 min), lavées et remises en suspension dans du PBS pour les observations.

3.3.3.3. Acquisition des images FLIM

Pour ces expériences, une goutte de spores ou de cellules végétatives (~10 µL) est placée sur une lamelle et recouverte par un petit bloc d'agarose à 10% afin de maintenir les microorganismes en place et de préserver l'humidité. Les lamelles sont changées après 30 min maximum d'observation. Le système FLIM utilisé est une extension LSM kit de Picoquant ajouté au microscope confocal Nikon C1Si et consiste en une diode laser pulsée (485 nm, FWHM (Full Fidth Half Maximum, largeur à mi-hauteur) = 83 ps, 40MHz) et en deux détecteur SPAD (Single-photon avalanche diode). Des images à une dimension de 256*256 pixels ont été enregistrées pendant environ 210 s avec un temps d'exposition par pixel de 9,60 µs. L'enregistrement TCSPC (Time-Related Single Photon Counting) du temps de vie a été réalisé sur 200 canaux temporels (résolution finale de 128 ps/canal). Les images FLIM sont

ensuite analysées à l'aide du logiciel TRI2 version 2.4.4.1 (Gray Institute, Oxford, (Barber *et al.*, 2009)). Afin d'obtenir entre 1000 et 10000 coups au pic maximum par pixel, un binning circulaire de 4 a été utilisé, sauf mention contraire. Un seuillage de 10-20% à 100% sur les pixels a également été utilisé afin d'enlever des signaux relatifs au bruit de fond ou provenant de structures très peu marquées. La réponse de l'instrument (IRF) a été obtenue en mesurant la très courte durée de vie de fluorescence de la fluorescéine (0,2 mM) diluée dans une solution saturée en iodure de potassium. Cette dilution dans le KI permet en effet le quenching de la fluorescéine et la courbe de décroissance obtenue, dans les mêmes conditions que les échantillons, peut alors être utilisée comme IRF (Szabelski *et al.*, 2009).

3.3.3.4. Analyse et traitement des données

Les différents échantillons de spores sauvages ou issus de spores sauvages ont été analysés à l'aide d'un ajustement bi-exponentiel pour chaque pixel ou groupe de pixels (binning) de la courbe de décroissance (modèle Marquardt, Équation 5). Les spores mutantes *cotE gerE* ont été analysées par un ajustement mono-exponentiel (Équation 6) puisque le bi-exponentiel n'a pas produit une amélioration du χ_r^2 (mono-exponentiel χ_r^2 1.1-1.2, bi-exponentiel χ_r^2 1.0-1.1). Plus le χ_r^2 est faible, meilleur est l'ajustement. Dans notre cas, il doit s'approcher de 1. Les cellules végétatives ont été analysées à l'aide d'un fit mono-exponentiel avec l'algorithme Bayesian (Équation 7) qui permet d'analyser les courbes de décroissance avec un nombre inférieur de pixels. Cette procédure permet d'éviter un binning excessif et une diminution de la résolution spatiale. Pour les cellules végétatives, un binning circulaire de 2 a été appliqué. Pour les analyses en algorithme bi-exponentiel, l'amplitude de chaque composante est représentée sous forme d'intensité fractionnelle (F_i) qui varie entre 0 et 1 (équivalent à 0-100 %) (Équation 8).

Les différents modèles utilisés sont les suivants (avec A, l'amplitude et τ , le temps de vie) :

$$f(t) = Z + A_1 \exp^{-t/\tau_1} + A_2 \exp^{-t/\tau_2} \quad \text{Équation 5}$$

$$f(t) = Z + A \exp^{-t/\tau} \quad \text{Équation 6}$$

$$f(t) = Z + A(Z) \exp^{-t/\tau} \quad \text{Équation 7}$$

$$F_i = \frac{A_i}{\sum_i A_i} \quad \text{Équation 8}$$

Où A_i correspond à l'amplitude de la composante i .

Les histogrammes de temps de vie et d'intensités fractionnelles obtenus ont été exportés et analysés à l'aide du logiciel OriginPro. Les outils « Fit peak » ou « Fit multiple peak » ont été

utilisés pour déterminer le maximum et les FWHM de chaque pic. Les maximum ont été utilisés pour déterminer les valeurs moyennes et les FWHM pour déterminer les barres d'erreurs de chaque temps de vie ou intensité fractionnelle.

3.4. Cellules de visualisation

3.4.1. Fixation des spores

Pour certaines expérimentations réalisées en FLIM, des cellules de visualisation ont été utilisées. Les spores sont alors fixées de la manière suivante, adaptée du protocole utilisé par (Kong *et al.*, 2010) : une goutte d'une suspension de spores (10 μ l, $\sim 1.10^8$ spores / mL dans l'eau) est déposée sur la surface d'une lamelle. Ces lamelles sont ensuite disposées à 4 °C pendant 30 min afin de permettre aux spores d'adhérer à celle-ci. Le surplus de liquide est ensuite éliminé en laissant une fine pellicule de spores sur la surface de la lamelle. Celle-ci est ensuite placée dans un dessiccateur pendant au moins 15 min afin de sécher le film mince, les spores sont ainsi fermement adhérentes à la surface.

3.4.2. Germination

Pour la germination la lamelle est ensuite disposée dans une chambre thermostatée FCS2 (Bioptechs, USA). Environ 100 μ l de solution de germination à 37 °C sont injectés dans la chambre thermostatée à une température de 37 °C. Le moment de l'addition du germinant est considéré comme le T_0 de la germination.

3.4.3. Modification de la température

Pour visualiser l'effet de la température sur la viscosité des spores, un système thermostaté pour lamelle carrée a été utilisé (Bioscience tools, USA). Un joint en silicone est utilisé pour délimiter un volume ($\sim 50\mu$ l) entre deux lamelles, les spores sont fixées sur l'une d'entre elle. Avant le début des expérimentations, de l'eau distillée est ajoutée à l'aide d'une aiguille afin de maintenir les spores dans un état hydraté. La Figure 27 est une représentation de la chambre carrée réalisée.

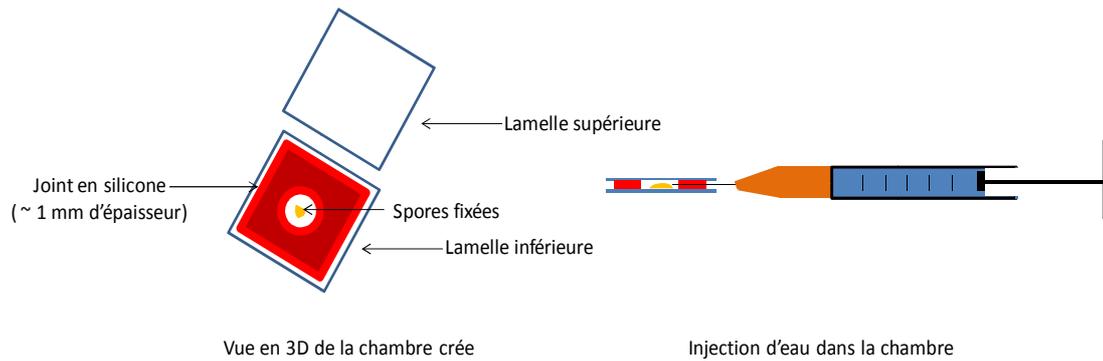


Figure 27 : Schéma de la chambre réalisée à l'aide de lamelles carrées et d'un joint en silicone

Cette chambre est ensuite placée dans un élément chauffant (TC-E35) adapté pour la chambre et relié à un contrôleur de température (TC-1-100, Bioscience tools, USA). Des températures allant de 20 à 75 °C ont été appliquées. Une photographie du système chauffant est donnée en Figure 28.



Figure 28 : Photographie de la chambre utilisée pour modifier la température des spores bactériennes.
<http://www.biosciencetools.com/catalog/images/CSC-IC.gif>

4. Evaluation de l'effet d'un traitement éthanol sur les spores bactériennes

4.1. Barèmes des traitements utilisés

Les spores ont été traitées pendant 2 h à 65 °C avec une solution d'éthanol à 70% préparée à partir d'éthanol absolu (Sigma Aldrich, France) et d'eau distillée. Les spores sont traitées à une $DO_{600\text{ nm}}$ de 1 dans 2 mL d'éthanol contenus dans des tubes Falcon de 15 mL. Ce

traitement est connu pour inactiver les spores et modifier leurs barrières de perméabilité (Setlow *et al.*, 2002). D'autres barèmes de traitements ont été étudiés : 1 h à 70 °C avec des solutions d'éthanol à 30, 50 et 70%. Immédiatement après le traitement, l'éthanol contenant les spores est dilué 5 fois par ajout d'eau distillée froide. Les tubes sont ensuite placés dans de la glace pendant 5 min avant les étapes suivantes. Chaque traitement a été réalisé au minimum 3 fois sur au moins 2 productions de spores différentes.

4.2. Estimation de la viabilité

Deux méthodes sont utilisées pour estimer la viabilité. En effet, des expérimentations ultérieures avec des sondes fluorescentes étant réalisées, il était nécessaire d'éliminer alors la présence d'éthanol. Cependant les lavages et centrifugations ne permettent pas de récupérer toutes les spores traitées. Afin de s'assurer que la méthode d'estimation de la viabilité n'est pas biaisée par la perte due aux lavages des spores totales, la viabilité a également été estimée sans lavage préalable.

4.2.1. Pourcentage d'inactivation sur spores lavées

Après le refroidissement des tubes dans la glace, les spores sont centrifugées à 4 °C pendant 15 min à 4000 g. Les spores sont ensuite lavées au moins 3 fois avec de l'eau distillée froide. Après lavage, les spores sont resuspendues dans environ 1 mL d'eau et la $DO_{600\text{ nm}}$ est alors mesurée. Cette densité optique nous permet d'obtenir le nombre total de spores après lavages, un certain nombre de spores ne pouvant être récupérées. Par la suite, un dénombrement sur gélose de spores traitées et non traitées est réalisé. Après plusieurs dilutions décimales, 100 µl de suspensions de spores sont étalées sur milieu BCP (Biokar diagnostics) et incubées une nuit à 37 °C. Le dénombrement est réalisé sur les boîtes de Petri, les boîtes comptées sont celles ayant un nombre d'unité formant colonie (UFC) compris entre 30 et 300. L'étalement des spores non traitées nous permet d'obtenir la corrélation exacte entre la $DO_{600\text{ nm}}$ et le nombre de spores (~ 1 à $1,5 \cdot 10^8$ spores / mL). La viabilité des spores traitées est alors estimée comme suit :

$$\% \text{ de spores inactivées} = 100 - \left(\frac{\text{Nombre de spores viables comptées sur boîtes après traitement et lavage}}{\text{Nombre total de spores après traitement et lavages (} DO_{600\text{nm}} \text{ mesurée)}} \times 100 \right)$$

4.2.2. Pourcentage d'inactivation sur spores non lavées

Les tubes de spores refroidies, et dont l'éthanol est dilué par 5, sont dilués directement de manière décimale. Le nombre de spores totales avant et après traitement n'a donc pas été modifié. 100 μ L de dilutions adéquates sont étalés sur milieu BCP et incubés comme précédemment. Le dénombrement est également réalisé après une nuit à 37 °C pour les spores traitées et non traitées. La viabilité des spores traitées est alors estimée comme suit :

$$\% \text{ de spores inactivées} = 100 - \left(\frac{\text{Nombre de spores viables comptées sur boîtes après traitement}}{\text{Nombre de spores totales (correspondant à une } DO_{600\text{nm}} \text{ de 1)}} \times 100 \right)$$

La Figure 29 schématise ainsi les deux méthodes d'estimation de la viabilité.

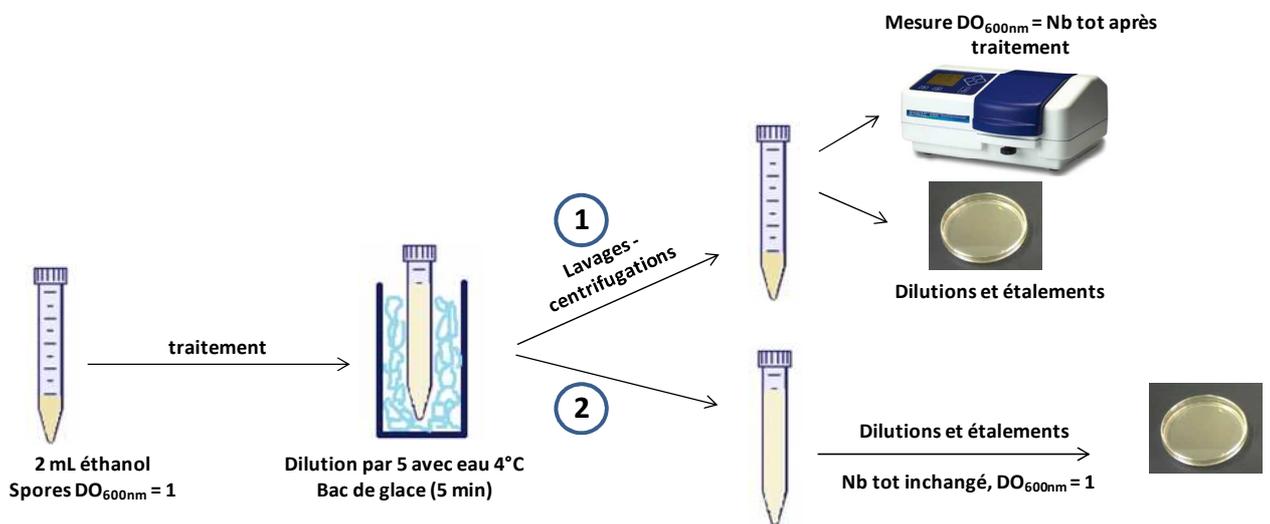


Figure 29 : Méthodes d'estimation de la viabilité après les différents traitements à l'éthanol

4.3. Estimation de la perméabilisation des spores

Afin d'estimer le nombre de spores perméabilisées par le traitement, un marquage à l'IP pendant 15 min est réalisé sur les spores lavées. Pour chaque traitement ou témoin, un nombre minimum de 100 spores est ensuite observé en microscopie confocale. Les spores considérées comme marquées sont celles dont le protoplaste présente une fluorescence rouge intense, comme le montre la Figure 30.

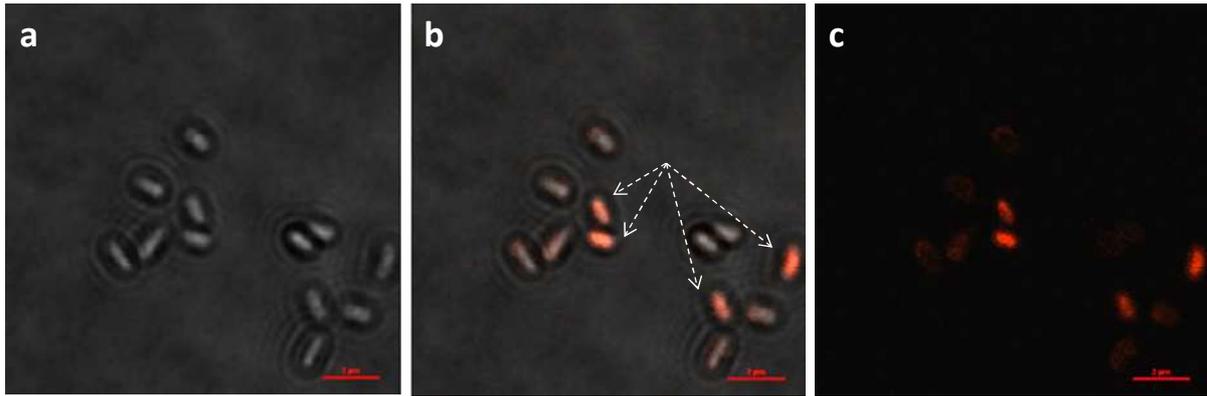


Figure 30 : Images en microscopie confocale de spores sauvages traitées pendant 1 h à 70 °C avec 30% d'éthanol et marquées à l'IP. (a) Image en transmission (b) Image superposée en transmission et en fluorescence. (c) Image en fluorescence. (Excitation : 488nm ; Emission : 550-700 nm). Echelle= 2 µm. Les flèches indiquent les spores au protoplaste marqué.

4.4. Evaluation de la viscosité des spores traitées

Une estimation de la viscosité des spores traitées est également réalisée sur ces spores. Pour cela, le rotor est ajouté à une concentration de 0,43 µM la concentration en spores étant beaucoup plus faible (~ 3 à $5 \cdot 10^7$ spores/mL). Les spores sont alors mises en contact avec la sonde pendant environ 1 à 2 h pour les spores mutantes traitées et 4 h pour les spores sauvages. Un temps plus long est utilisé pour les spores sauvages pour s'assurer de marquer toutes les structures, celle-ci possédant encore leur enveloppe.

5. Traitement statistique des données

Les différentes analyses statistiques des résultats ont été effectuées à l'aide du logiciel Sigmaplot version 11.0 (Systat software). Pour comparer deux échantillons, un test de Student est réalisé. Lorsque plus de deux échantillons sont comparés, un test ANOVA est utilisé, le test de Student-Newman-Keuls (SNK) permet alors de comparer les moyennes par paires. En cas de non homogénéité des variances, le test ANOVA est réalisé sur les rangs (test de Kruskal-Wallis), la comparaison par paire est alors réalisée par un test de Dunn. Les différences ont été considérées comme significatives pour un risque $\alpha \leq 0,05$, sauf mention contraire.

RESULTATS

RESULTATS

1. Caractérisation des structures de la spore impliquées dans sa faible perméabilité

Objectif de l'étude :

Cette étude a pour but d'identifier et de caractériser les structures de la spore bactérienne impliquées dans la faible perméabilité et la rigidité. Pour cela, différentes approches sont utilisées.

Dans un premier temps, une étude structurale globale et dynamique utilisant des méthodes non intrusives a été initiée. Deux techniques ont été choisies : la résonance magnétique nucléaire pulsée à bas champs (RMN) et la spectroscopie infrarouge. Ces méthodes permettent d'obtenir des signaux donnant des informations sur l'état, la composition et parfois la mobilité des différents constituants de la spore bactérienne. Par la suite, des méthodes plus ciblées ont été envisagées. Ces techniques utilisent des sondes fluorescence pour marquer sélectivement les compartiments cellulaires. L'analyse de cette fluorescence par spectrofluorimétrie donne une vision globale du compartiment ciblé pour autant que la sonde soit suffisamment sélective. Par l'utilisation de la polarisation de fluorescence, il est possible, à partir de sondes adéquates, d'obtenir des informations sur la fluidité membranaire. Pour obtenir des informations à l'échelle d'un individu et non plus uniquement d'une population, la microscopie de fluorescence, et plus particulièrement la microscopie confocale, a été envisagée. L'utilisation de sondes spécifiques (rotors moléculaires) a permis d'utiliser le temps de vie de fluorescence (FLIM) afin d'obtenir des informations sur la microviscosité du compartiment ciblé. Le Bodipy-C₁₂ a en effet été mis en évidence comme une sonde hydrophobe particulièrement sensible à la viscosité de son environnement.

1.1. Approche non intrusive des structures et de la dynamique de la spore

Afin de caractériser les spécificités des structures de la spore bactérienne, des méthodes non intrusives ont été utilisées en premier lieu. Ces méthodes permettent d'obtenir des signaux globaux sur l'ensemble des couches de la spore.

1.1.1. RMN pulsée à bas champ

La RMN pulsée à bas champs du proton a été utilisée sur des spores déshydratées équilibrées à différentes a_w . On s'intéresse ici à la distribution des temps de relaxation spin-spin (T_2) obtenue à partir de mesure par la séquence CPMG ($\tau = 40 \mu s$). La séquence par échos CPMG permet de détecter les protons les plus mobiles sans que le signal ne soit influencé par l'inhomogénéité du champ magnétique ; par contre, les protons engagés dans des structures plus organisées, de mobilité très réduite ($T_2 < \tau$) ne seront pas ou mal détectés. La simple séquence de retour à la précession libre (FID) est également utilisée pour détecter le pourcentage correspondant aux protons les moins mobiles. Plus le temps T_2 est important plus la mobilité des protons est importante, et le signal est proportionnel à la quantité de protons. La Figure 31 présente ainsi le spectre obtenu par CPMG pour la souche de *B. subtilis* sauvage équilibrée à une a_w de 0,5, correspondant aux protons mobiles.

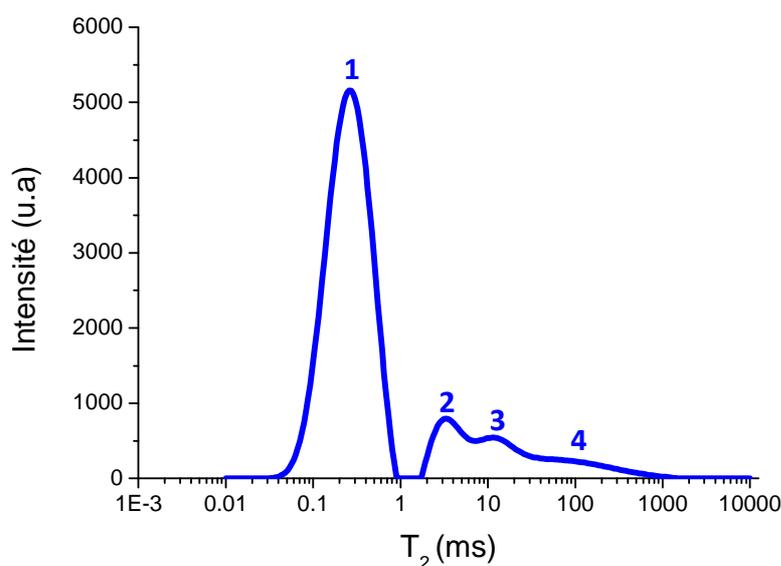


Figure 31 : Distribution des temps de relaxation T_2 de spores de *Bacillus subtilis* équilibrées à une a_w de 0,5 obtenu en RMN basse résolution du proton.

Tous les protons mobiles sont visibles, ils peuvent provenir de plusieurs constituants :

- tous les solutés et biopolymères de la spore pour peu qu'ils soient mobiles ;
- les phospholipides et lipides des membranes ;
- l'eau présente dans les différentes structures de la spore ;

Ces protons ne se distinguent que par leur mobilité. Afin d'essayer d'attribuer une population de protons à des constituants de la spore, différents paramètres (équilibre des poudres à différentes a_w , modification de la température) ont été appliqués afin de mieux comprendre les distributions de mobilités de protons obtenus. Une population de protons importante est obtenue à un temps de relaxation moyen de $0,23 \pm 0,02$ ms (pic 1) et selon l' a_w trois autres populations (ou deux pour des a_w 0,1, 0,7 et 0,8) sont également visibles.

La Figure 32 présente l'évolution de l'intensité (cercle rouge, échelle de droite) et du temps de relaxation T_2 (carré bleu échelle de gauche) du pic 1 en fonction (a) de l' a_w mesuré à température ambiante et (b) de la température à une a_w de 0,5.

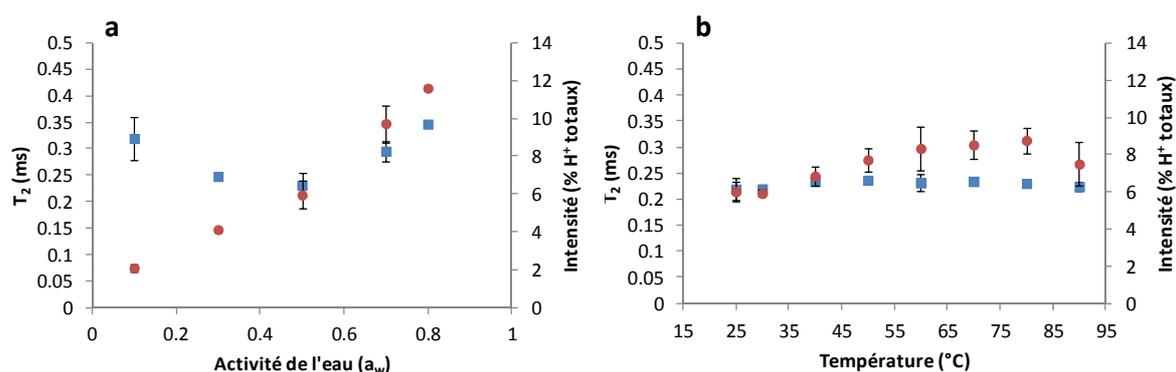


Figure 32 : Evolution du temps de relaxation T_2 exprimé en ms (en bleu) et de l'intensité (en rouge) exprimé en % de protons totaux du pic 1 en fonction (a) de l' a_w à température ambiante et (b) de la température pour des spores à a_w 0,5 (b).

L'intensité de la population 1 dépend de façon quasi linéaire de l'activité de l'eau à laquelle la poudre de spores a préalablement été équilibrée. Ceci signifie que cette population de protons peut être attribuée en grande partie à l'eau présente dans les structures de la spore. Cette eau pourrait correspondre à l'eau présente dans les couches externes de la spore, notamment l'enveloppe et le cortex, qui sont des structures qui gonflent sous l'effet d'une hydratation plus importante. La relaxation spin-spin (T_2) diminue quant à elle légèrement jusqu'à l' a_w 0,5 pour augmenter de nouveau par la suite. Cette première population mobile correspond aux protons de l'eau mais aussi aux protons mobiles des solutés ou des polymères (la mobilité des protons des lipides étant attendue à plus fortes valeurs de T_2 et surtout ces protons sont

insensibles en intensité à des variations d' a_w). Lors de l'hydratation, l'ajout de molécules d'eau provoque un effet anti plastifiant provoquant d'abord une diminution de mobilité. Les interactions avec l'eau dans les gammes d'hydratation faible redonnent à la matrice suffisamment de mobilité à l'échelle locale (échelle du proton) pour provoquer une densification des constituants, d'où une diminution de la mobilité globale du système. Ce comportement d'antiplastification de l'eau, est souvent observé pour des matrices biopolymériques conservées à l'état vitreuse, pour lesquelles une densification lors de l'hydratation est mesurée (Seow *et al.*, 1999).

En ce qui concerne les autres populations de protons (pic 2, 3 et 4 en Figure 31), l'intensité ne semble pas être modifiée par l' a_w et la variation du nombre de populations rend difficile l'interprétation de ces données. Il peut donc s'agir de populations de protons correspondant à des zones hydrophobes de la spore ou à des zones hydrophiles où les molécules d'eau ne parviennent pas à diffuser. Il est difficile d'attribuer les protons de différentes mobilités aux membranes ou au protoplaste mais l'observation d'un nombre variable de populations en fonction de l'hydratation pourrait être reliée à la mobilité relative des protons des membranes interne et externe. La membrane externe peut voir sa fluidité modifiée par le gonflement (modification) plus ou moins importante du (cortex + manteau) lors de sa réhydratation.

La température a peu d'effet sur la mobilité des protons de la première population puisque la valeur de T_2 évolue très peu. Elle semble par contre avoir une légère influence sur l'intensité des pics avec une augmentation de la proportion entre 40 et 70 °C puis une stagnation voire une diminution. Au cours du chauffage cette population s'enrichit de composants de la spore qui au départ avait une faible mobilité et qui sous l'effet de la température gagne en mobilité. Les T_2 moyens de cette population restent quasi inchangés car l'effet de la température attendu sur la mobilité est compensé par la mise en mouvement de solutés qui arrivent à ce niveau de mobilité. L'effet de la température, alors que le niveau d'hydratation est constant, est double : permettre une augmentation de mobilité de solutés immobiles et permettre une répartition de l'eau dans cette zone mobile.

Ainsi, cette méthode a permis d'analyser la mobilité des protons de spores à l'état sec. Cependant, cette méthode n'a pas permis d'étudier les protons provenant des membranes, aucun pic n'ayant pu être clairement attribué à ceux-ci. Ceci est peut être dû à la faible proportion en phospholipides comparée à celle de l'enveloppe et du cortex dans une spore (leur signal pourrait faire partie des populations mineures identifiées) mais aussi au fait que leur mobilité est trop faible pour être détectée ou différenciée des protons de l'eau (leur signal est dans le FID ou dans le 1er pic).

1.1.2. Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR)

La spectroscopie infrarouge permet d'obtenir des spectres qui apportent des informations sur plusieurs structures de la spore de manière simultanée. En effet, les spectres obtenus correspondent aux nombres d'onde pour lesquelles les liaisons entrent en vibrations et qui sont caractéristiques de molécules ou de constituants cellulaires. Ainsi, cette méthode a été utilisée initialement sur des spores sauvages et des cellules végétatives afin d'identifier les constituants spécifiques de la spore et leurs caractéristiques. La Figure 33 présente les spectres entiers et coupés dans différentes régions spectrales de spores et cellules végétatives.

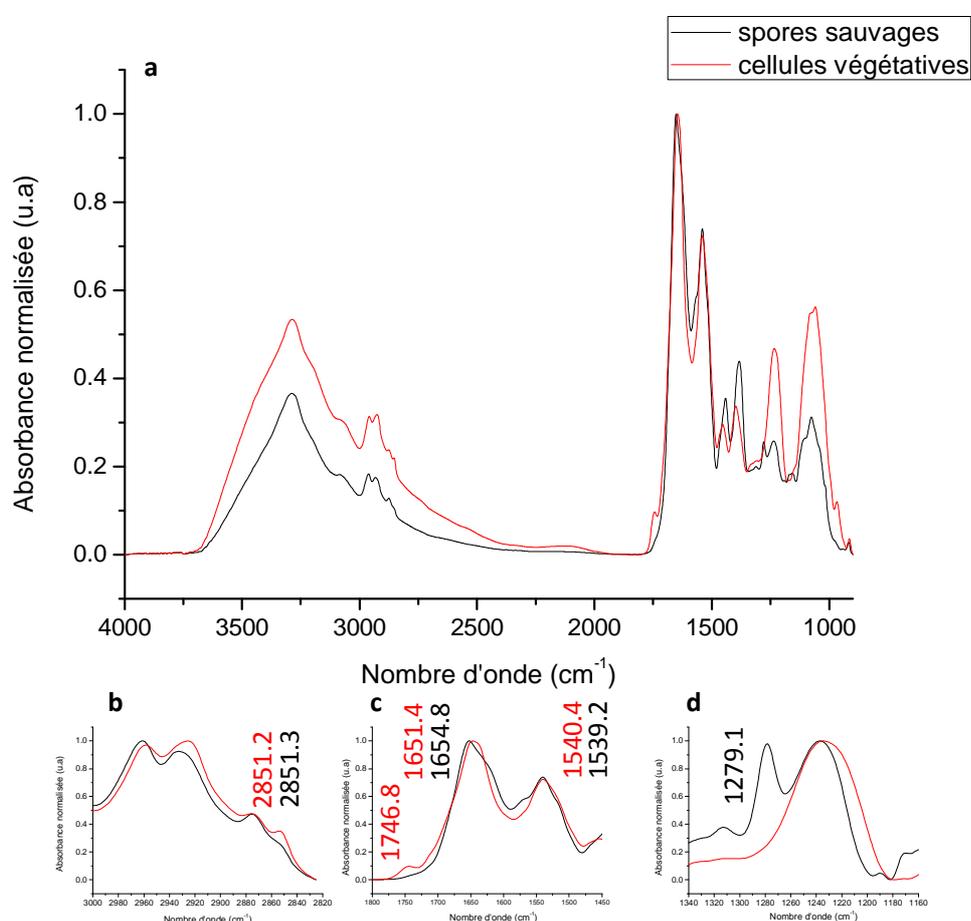


Figure 33 : Comparaison des spectres IR moyennés ($n \geq 3$) de spores et cellules végétatives de *Bacillus subtilis* obtenus à 30 °C. (a) spectres entiers, (b) région des lipides, (c) région des protéines, (d) DPA. Les valeurs correspondent aux fréquences de vibrations mesurées sur les dérivées secondes des spectres.

Il faut préciser que ces spectres sont obtenus par dépôt de gouttes concentrées en microorganismes sur la fenêtre d'analyse (cristal ATR) et séchage sous un flux d'azote afin d'obtenir le meilleur signal possible. En ce qui concerne la position des pics, on constate sur la Figure 33c que la bande Amide I n'a pas tout fait à la même longueur d'onde selon l'état du

microorganisme : 1651 cm^{-1} et 1655 cm^{-1} pour les cellules végétatives et les spores respectivement. Cette fréquence permet généralement d'obtenir des informations sur les protéines et leur structure secondaire. La position des pics est obtenue par l'analyse de la dérivée seconde de chaque courbe, que ce soit pour les spores ou les cellules végétatives, cette longueur d'onde est caractéristique de vibrations de structures protéiques en hélice α (Johnson *et al.*, 2005; Garip *et al.*, 2009).

Un pic à la fréquence de 2851 cm^{-1} est également observé sur les deux spectres (Figure 33b), celui-ci est caractéristique de la vibration d'élongation symétrique de la liaison C-H des groupements $>\text{CH}_2$ dans les acides gras. Cette vibration semble « masquée » dans les spores ce qui rend difficile l'analyse des membranes par cette méthode. Ce faible signal obtenu pour les spores est peut être relié à sa structure multicouche dans laquelle une des membranes est localisée en profondeur. Ainsi, à température ambiante, il n'y a pas ou peu de différence pour cette vibration selon la forme du microorganisme. De plus, dans le cas de spores entières les spectres ne permettent pas de différencier les deux membranes.

Chaque forme bactérienne possède des spécificités, on peut observer un épaulement à 1747 cm^{-1} pour les cellules végétatives. Ce pic a déjà été observé dans la littérature et peut être attribué à un composé de réserve polyester, le PHB (ou acide poly- β -hydroxybutyrique) (Helm and Naumann, 1995). D'autres auteurs l'ont associé à un composé liposoluble, probablement un phospholipide comme le phosphoglycérol (PG) ou phosphatidyléthanolamine (PE) (Johnson *et al.*, 2009). Ce composé n'est pas retrouvé sur le spectre des spores, le PHB étant en majorité dégradé pendant la sporulation, apportant l'énergie nécessaire à ce processus. Ce pic permet d'observer la pureté d'un échantillon de spores puisqu'il est absent sur un échantillon de spores suffisamment purifié. En ce qui concerne les spores, plusieurs pics proviennent de la vibration de liaisons du DPA, notamment à 1279 cm^{-1} (Figure 33d) et un épaulement à 1570 cm^{-1} et ne se retrouvent donc pas pour les cellules végétatives.

Enfin, en ce qui concerne la région $3000\text{-}2800\text{ cm}^{-1}$, en observant la dérivée seconde des spectres on peut constater une légère différence au niveau du pic à $2920\text{-}2930\text{ cm}^{-1}$ comme le montre la Figure 34.

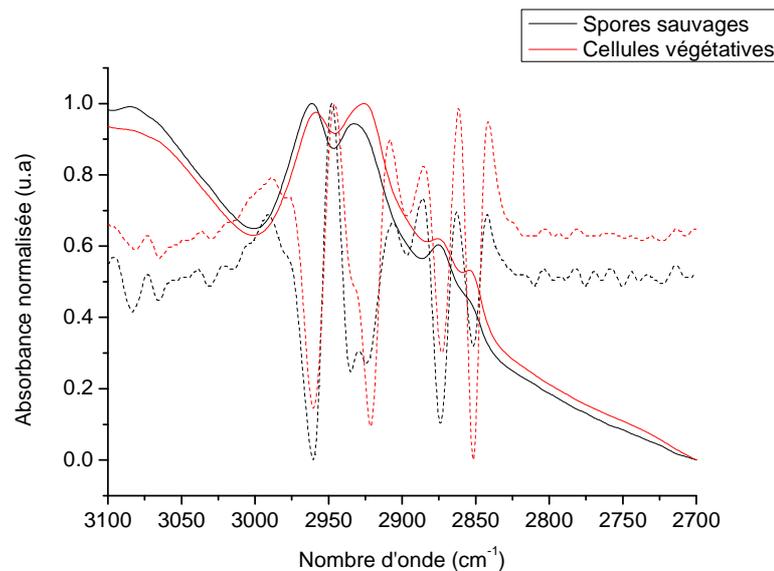


Figure 34 : Spectre d'absorbance IR (en trait plein) et dérivée seconde (en trait pointillé) des spectres de spores (en noir) et cellules végétatives (en rouge) de *Bacillus subtilis* sur la plage de fréquence 2700-3100cm⁻¹.

Sur le spectre dérivé seconde, les pics apparaissent ainsi comme des « creux ». En effet pour les cellules végétatives, un seul pic est dominant aux alentours de 2921 cm⁻¹ et peut être attribué à la vibration d'élongation asymétrique de la liaison C-H des groupements >CH₂ dans les acides gras. Un épaulement est aussi observé aux alentours de 2933 cm⁻¹. Pour les spores, le pic est plutôt visible aux alentours de 2924 cm⁻¹ et un autre pic d'intensité similaire est observable à 2934 cm⁻¹. Ce dernier pic est également attribué à des vibrations d'élongation asymétrique de la liaison C-H des groupements >CH₂, mais pas forcément dans les acides gras. Ce pic peut être induit par une différence dans la structure et/ou composition membranaire des spores ou bien par un autre constituant sporal. Il n'existe que peu d'étude des vibrations associées aux spores bactériennes dans cette région. L'étude de Johnson *et al.*, en discute brièvement mais les dérivées secondes ne sont pas présentées (Johnson *et al.*, 2009).

1.2. Approche de la structure de la spore par la fluorescence

Les méthodes précédentes ont permis d'observer des spécificités dynamiques et structurales propres aux spores bactériennes *via* des signaux globaux. Ces signaux ne permettent pas de cibler directement la contribution de chaque structure au signal obtenu. Pour cibler un organite, il est possible d'introduire une sonde dont les propriétés permettent de marquer spécifiquement un compartiment de la spore. Les méthodes suivantes utilisent les

propriétés de la fluorescence dans le visible qu'ont certaines molécules. Elles vont consister à intégrer ces molécules fluorescentes spécifiques permettant l'étude d'un paramètre (comme la fluidité membranaire) ou d'une structure (liaison à l'ADN).

1.2.1. Incorporation de sondes fluorescentes dans les spores

La spore est une structure multicouche de petite taille et peu perméable. L'étude de la sporulation ou des spores dormantes emploie généralement la GFP (Green Fluorescent Protein) ou un fluorochrome analogue pour étudier la localisation des protéines et l'expression des gènes au cours de la sporulation. Incorporer des sondes dans cette structure peut s'avérer difficile (il ne faut pas que la sonde affecte la sporulation) et peu de travaux ont été menés sur le marquage spécifique de structure de la spore dormante comme la membrane interne (Pogliano *et al.*, 1999; Cowan *et al.*, 2004; Hofstetter *et al.*, 2012).

Afin d'insérer des sondes fluorescentes dans les structures les plus profondes, différentes stratégies ont été utilisées. La sonde est soit insérée après la sporulation, soit pendant la sporulation. Deux sondes, aux spécificités différentes, ont été utilisées : un intercalant de l'ADN, l'acridine orange et une sonde hydrophobe, le Bodipy-C₁₂ dont l'utilisation est envisagée afin de caractériser les membranes de la spore. Des résultats de marquage avant ou après la sporulation avec ces différentes sondes sont présentés en Figure 35.

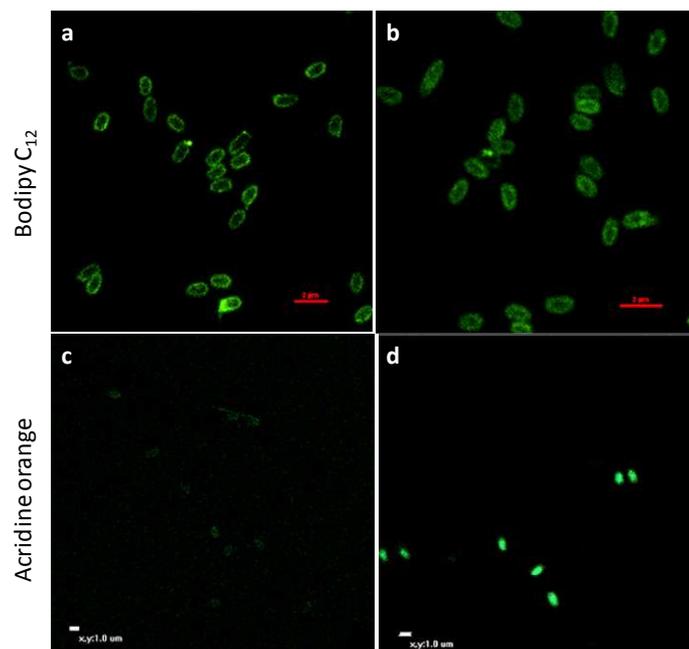


Figure 35 : Images en fluorescence obtenues en microscopie confocale pour des spores marquées après (a,c) et pendant (b,d) la sporulation avec du Bodipy-C₁₂ ou de l'acridine orange (AO). Echelle = 2 μm pour les images a et b et 1 μm pour c et d.

Les images obtenues en microscopie confocale permettent d'observer que lorsque le Bodipy-C₁₂ est inséré après la sporulation, seul un anneau périphérique est marqué pour les spores entières, même après 24 h de contact (Figure 35a). Les structures les plus internes, notamment la membrane interne, ne semblent ainsi pas être atteintes bien que la membrane externe soit probablement marquée. La sonde a également été insérée en cours de sporulation selon un protocole similaire à celui de Cowan *et al.* (Cowan *et al.*, 2004). Ainsi, 2 à 3 h après la mise en culture, ce qui correspond au T₀ de la sporulation, la sonde est introduite dans le milieu de sporulation. Les images acquises en microscopie confocale dans ce cas sont obtenues 7 jours au moins après la récolte des spores.

La Figure 35b montre que la sonde atteint alors des structures plus profondes et possède une fluorescence verte intense typique du Bodipy. Pour autant, la sonde ne semble pas marquer le protoplaste, l'intensité de fluorescence dans cette partie ne représente qu'environ 10% de la fluorescence des autres structures. La fluorescence apparaît uniforme le long des couches de la spore et il n'est ainsi pas possible de distinguer les différentes structures basées seulement sur l'intensité de fluorescence (à la limite de résolution optique). L'AO est un intercalant de l'ADN pénétrant dans toutes les cellules. En ce qui concerne les spores, cette sonde ne peut pas pénétrer dans le protoplaste si celles-ci sont marquées après la sporulation, même après 20 h de mise en contact (Figure 35c). Par contre, l'insertion de la sonde au préalable de la sporulation permet d'atteindre plus profondément la spore, notamment jusqu'à l'ADN localisé dans le noyau. En effet, on obtient alors une fluorescence intense localisée dans le protoplaste (Figure 35d).

Ainsi, ces résultats de marquage montrent que l'insertion en cours de sporulation permet d'atteindre les structures les plus internes contrairement à un marquage sur des spores déjà formées. Un marqueur de l'ADN pourra atteindre le noyau des spores s'il est inséré avant la sporulation. De même, un marqueur hydrophobe ou membranaire, s'intégrera dans des couches plus profondes ce qui permettra de marquer probablement la membrane interne. Le marquage ainsi obtenu n'est cependant pas possible avec n'importe quel marqueur fluorescent. En effet, le marqueur peut être expulsé lors de la sporulation ou métabolisé par la cellule durant cette même phase ou encore (photo) oxydé durant le stockage. La sonde utilisée doit donc être particulièrement stable et pouvoir s'accrocher à un organite ou une structure maintenue lors du passage de la cellule à la spore (ADN, membrane, ...).

1.2.2. Mesure de la mobilité des membranes et des structures hydrophobes d'une population de spores par le DPH

Le DPH s'incorpore naturellement à l'intérieur des membranes. Il est possible d'utiliser la technique de polarisation de fluorescence pour mesurer la mobilité de cette sonde (grâce aux paramètres de polarisation et d'anisotropie) et ainsi d'approcher la viscosité de la membrane. La mesure de l'anisotropie du DPH insérée dans les spores et les cellules végétatives a été comparé afin d'approcher une mesure de la rigidité globale des structures cellulaires ciblées et principalement des membranes. Dans ce cas, un marquage après sporulation a été réalisé. En effet, le DPH a un poids moléculaire plus faible que le Bodipy-C₁₂ (232,2 contre 454,0 g/mol) et a déjà été utilisé sur des spores bactériennes après formation (Ishihara *et al.*, 1999). De plus, des travaux précédents réalisés au laboratoire ont montré que la sonde était métabolisée si elle est insérée au cours de la sporulation. Le DPH est de nature hydrophobe et se localise préférentiellement dans les solvants et les structures apolaires où il fluoresce fortement. Ainsi dans un milieu cellulaire, le DPH va migrer vers les membranes cellulaires et certaines zones hydrophobes. Dans une membrane, le DPH se localise principalement au centre de la bicouche phospholipidique (Kaiser and London, 1999), une fraction reste cependant dans les feuilletts phospholipidiques (Van der Heide *et al.*, 1996). L'un des avantages du DPH provient du fait que son positionnement dans les membranes s'accompagne par une forte augmentation de fluorescence alors que celle-ci est quasiment négligeable dans l'eau (Laroche *et al.*, 2001). La Figure 36a présente l'évolution de l'intensité moyenne et normalisée obtenue dans des cellules végétatives et des spores après insertion du DPH à 30 °C.

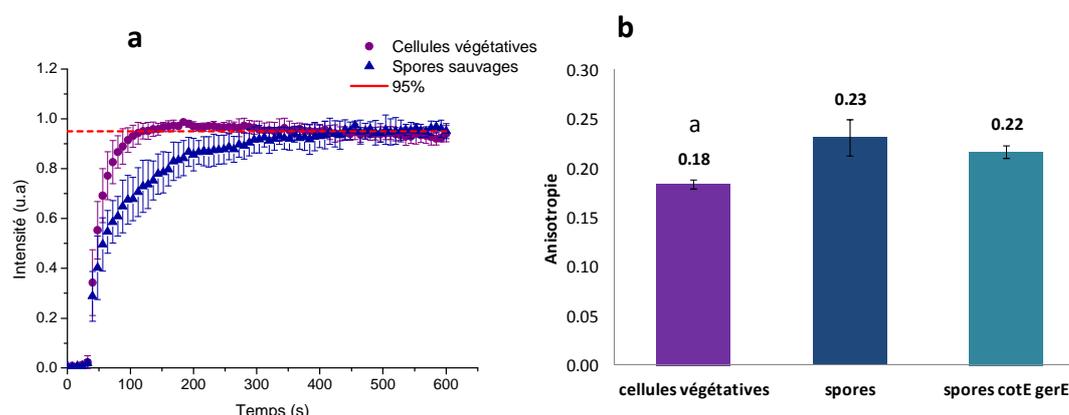


Figure 36 : Comparaison du pourcentage de l'intensité maximum du DPH pour des spores et des cellules végétatives de *Bacillus subtilis*. (a) Evolution de l'intensité de fluorescence (polarisation parallèle) normalisée du DPH inséré dans des spores ou des cellules végétatives de *Bacillus subtilis* à 30 °C (b) Anisotropie moyenne du DPH mesuré dans des spores avec ou sans enveloppe et des cellules végétatives à 30 °C. ^{a,b} : les colonnes portant des lettres différentes sont significativement différentes (Test SNK avec un risque α de 5%).

Afin d'étudier l'intégration de la sonde dans les différents microorganismes, l'évolution de l'intensité après insertion a été étudiée. Ainsi, pour obtenir 95% de l'intensité maximale, il faut en moyenne 416 secondes pour les spores sauvages contre 120 secondes pour les cellules végétatives, soit environ 3,5 fois plus de temps. Ce résultat montre que pour les spores, la sonde met plus de temps pour arriver à des structures qu'elle peut marquer, comme les membranes, par comparaison aux cellules végétatives. Ceci est en accord avec les couches supplémentaire que cette sonde doit traverser, notamment l'enveloppe et/ou le cortex

En ce qui concerne les spores mutantes *cotE gerE*, l'allure de la courbe se rapproche de celle des spores sauvages mais avec un temps pour atteindre 95% de l'intensité maximum d'environ 350 secondes, soit environ 2,9 fois plus long que les cellules végétatives. Dans ces spores, une grande partie de l'enveloppe est absente mais également la membrane externe (Ghosh *et al.*, 2008). On peut alors supposer que l'enveloppe joue un rôle dans l'accessibilité des membranes à la sonde mais qu'il ne s'agit pas de la seule structure impliquée.

La mesure de l'anisotropie du DPH inséré dans les cellules végétatives apparaît plus faible que celle des spores (Figure 36b). Les spores entières ont en moyenne une anisotropie de 0,23 ($\pm 0,018$) comparée à une anisotropie d'environ 0,18 ($\pm 0,004$) pour les cellules végétatives, la différence entre les deux étant significative. Les spores *cotE gerE* ont elles aussi une anisotropie plus élevée que les cellules végétatives : 0,22 ($\pm 0,006$). Les valeurs d'anisotropie plus élevée mesurée pour les spores concordent avec la présence de différentes structures hydrophobes dont la membrane interne qui possède une faible mobilité de ces lipides (Cowan *et al.*, 2004). La plus faible valeur d'anisotropie (non significative) obtenue pour les spores mutantes comparée aux spores sauvages, suggère que les parties externe (membrane externe et/ou enveloppe) sont peut être également responsable d'une valeur d'anisotropie plus élevée. Le DPH ne semble pas avoir dans la spore une localisation suffisamment précise pour pouvoir interpréter ces variations d'anisotropie.

1.2.3. Mesure de la viscosité des membranes et des structures hydrophobes de spores individuelles par le Bodipy-C₁₂

Les méthodes précédentes ont permis d'obtenir des informations globales sur la perméabilité et la fluidité de la spore. Ainsi, l'anisotropie du DPH permet d'obtenir une vision globale de la rigidité de la spore, cependant la ou les membranes ne sont pas forcément les seules structures marquées. Afin de pouvoir distinguer la contribution de chacune des couches, nous avons tenté de les séparer spatialement grâce à la microscopie de fluorescence.

La polarisation de fluorescence ainsi que l'utilisation d'excitation UV étant difficilement applicable en microscopie, une autre sonde sensible à la viscosité a été développée : le Bodipy-C₁₂. Il s'agit d'un rotor moléculaire qui permet par l'analyse de la décroissance de fluorescence de mesurer la viscosité de l'environnement de la molécule. Cette sonde est hydrophobe et semble donc adaptée pour l'étude de la viscosité de la ou les membranes de la spore.

1.2.3.1. Contrôles du système FLIM et de l'utilisation du Bodipy-C₁₂

La mesure en temps de vie de fluorescence par un système TCSPC sur un microscope confocal est un système qui demande à être précisément étalonné. Ce système n'ayant jamais été utilisé au niveau du plateau d'imagerie PIMS, différentes procédures ont été mises en place. Dans un premier temps, afin de vérifier le bon fonctionnement du système FLIM et des paramètres utilisés, le temps de vie (τ) de deux sondes fluorescentes connues a été mesuré : la Rhodamine B (Rh B) et la Rhodamine 6G (Rh 6G). Ces sondes ont en solution, des temps de vie qui leur sont spécifiques. En effet, celui-ci est une caractéristique intrinsèque de chaque molécule fluorescente. La Figure 37 présente les courbes de décroissance ou déclin de fluorescence de ces deux sondes ainsi que les valeurs de τ qui en sont extraites.

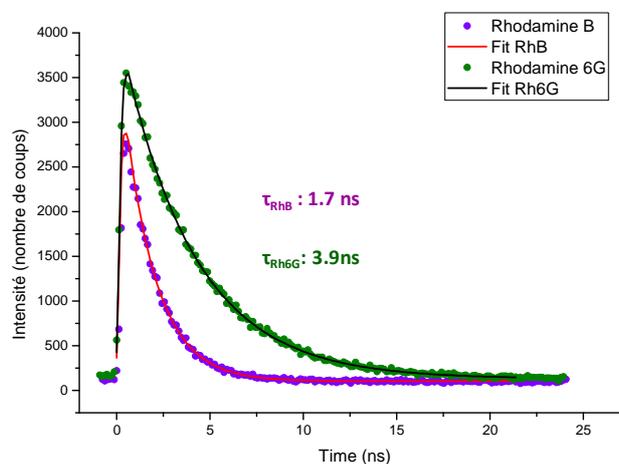


Figure 37 : Courbe de déclin de la fluorescence de la Rhodamine B et de la Rhodamine 6G dans de l'eau mesuré par le système de détection FLIM couplé au microscope confocal.

Le logiciel TRI2 a été utilisé pour modéliser les courbes. Comme on peut l'observer, il est possible de modéliser ces deux courbes comme des courbes de décroissance monoexponentielle. Les valeurs de τ obtenus (1,7 ns et 3,9 ns) sont proches des valeurs mesurées dans la bibliographie pour la Rhodamine B (1,73-1,68 ns) et la Rhodamine 6G

(4,04-4,08 ns) respectivement (Magde *et al.*, 2002; Waharte *et al.*, 2006; Szabelski *et al.*, 2010).

Dans les échantillons homogènes comme les solvants organiques, les bicouches lipidiques modèles ou même les membranes cellulaires, le déclin du rotor Bodipy-C₁₂ est monoexponentiel (Kuimova *et al.*, 2008; Hungerford *et al.*, 2009; Levitt *et al.*, 2009). Nous avons mesuré le temps de vie de fluorescence du rotor dans de l'éthylène glycol, la courbe de déclin de fluorescence obtenue est également monoexponentielle et donne un τ de 0,84 ns cohérent avec les valeurs obtenues par l'équipe anglaise ayant mis au point la sonde (0,9 ns).

1.2.3.2. Application à la spore bactérienne

Les images obtenues en microscopie confocale ont permis de valider une stratégie de marquage en cours de sporulation afin d'atteindre les structures les plus internes (Figure 35). Le rotor utilisé est une sonde hydrophobe qui devrait marquer les couches hydrophobes de la spore, les membranes mais aussi potentiellement l'enveloppe. L'utilisation de cette sonde doit permettre de différencier plusieurs structures en se basant sur leur viscosité bien que leur éloignement soit sous la limite de la résolution de la microscopie optique.

Relation entre viscosité et temps de vie

Il a été précédemment montré que pour ce fluorophore, la voie de désexcitation non radiative est activée pour des faibles viscosités. Ainsi, à la fois l'intensité de fluorescence et le temps de vie sont très dépendants de la viscosité.

Conformément à l'équation modifiée de Förster-Hoffmann (Kuimova, 2012), le temps de vie (τ_f) des rotors moléculaires montre la dépendance suivante à la viscosité (η) :

$$\log \tau_f = \log \left(\frac{z}{k_r} \right) + \alpha \log \eta \quad \text{Équation 9}$$

où k_r est la constante de vitesse de désexcitation radiative et z et α sont des constantes nécessaires pour ajuster les données de l'équation.

Une calibration entre le temps de vie du Bodipy-C₁₂ rotor en fonction de la viscosité a été réalisée sur une large gamme de viscosité. En utilisant des mélanges méthanol/glycérol correspondant à des viscosités allant de 15 à 1500 cP, il a été montré que pour le Bodipy-C₁₂ l'Equation 9 devient :

$$\ln \tau_f = 0,5336 \times \ln \eta + 4,5862$$

Équation 10

où τ_f est le temps de vie du Bodipy-C₁₂ en ps et η est la viscosité en cP.

Cette expression fournit un moyen direct de convertir le temps de vie du rotor Bodipy-C₁₂ en une mesure de la microviscosité de l'environnement de la sonde.

Etude de la viscosité dans des spores dormantes

Afin de différencier des structures sporales sur la base de leur viscosité, le temps de vie du Bodipy-C₁₂ a ainsi été utilisé. Dans les échantillons homogènes, le déclin de fluorescence de la sonde est monoexponentiel. La courbe de décroissance obtenue dans les spores ainsi que les histogrammes de répartition de temps de vie qui en sont extraits sont présentés en Figure 38 a et b.

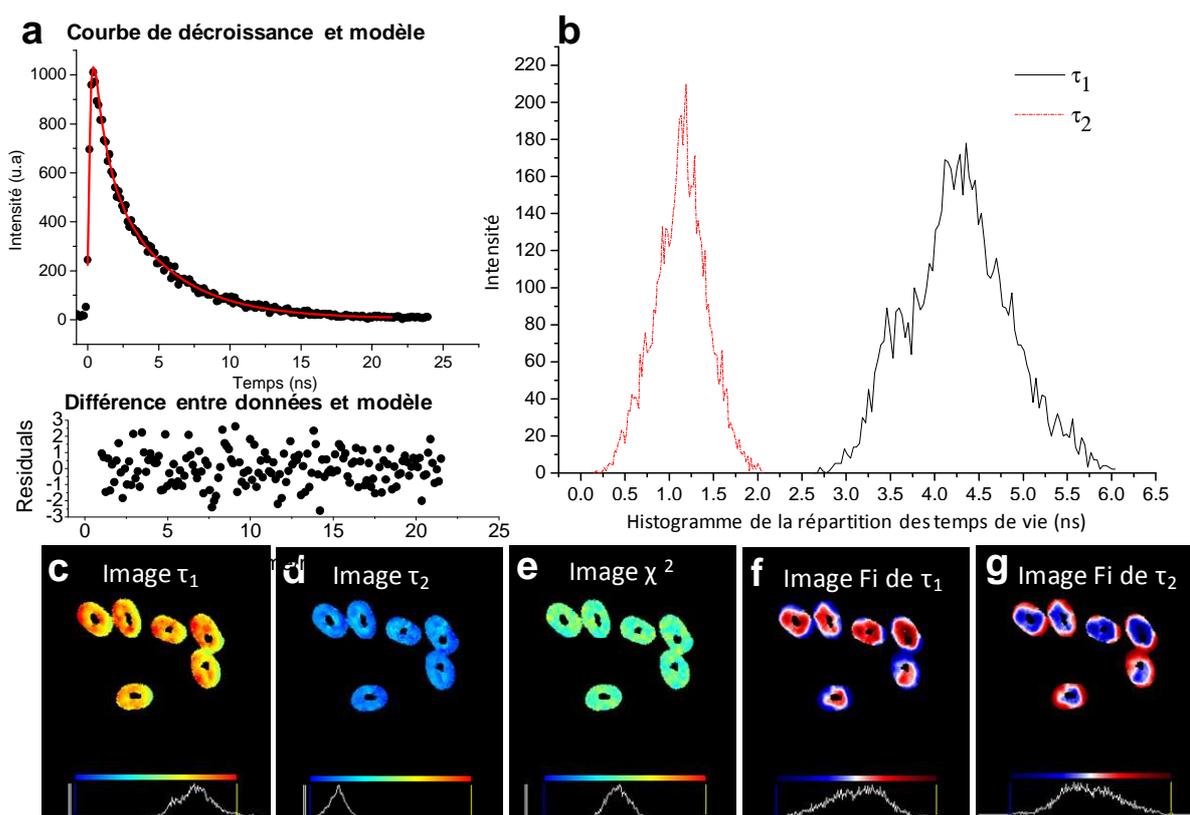


Figure 38 : Set de données « classiques » obtenues en temps de vie de fluorescence pour des spores dormantes marquées avec 4,3 μ M de Bodipy-C₁₂. (a) Courbe classique de décroissance du temps de vie de fluorescence montrant un déclin biexponentiel (b) Histogramme de la répartition des temps de vie et les images correspondantes de τ_1 (c), τ_2 (d), χ^2 (e) ainsi que les intensités fractionnelles (F_i) de τ_1 (f) et τ_2 (g). L'échelle en fausse couleurs des images en temps de vie est de 0,2 à 5,6 ns, de 0,2 à 2 pour l'image χ^2 et de 0,2 à 0,8 pour les intensités fractionnelles F_i .

La courbe de décroissance du rotor dans les spores nécessite une modélisation au moins biexponentielle (χ^2 de 1,03 contre 1,5 en monoexponentiel). Ainsi, si la sonde a gardé sa caractéristique monoexponentielle, il semble que le rotor marque au moins deux environnements dont les viscosités sont différentes dans chaque pixel de l'image. Cette modélisation biexponentielle conduit à l'obtention de plusieurs valeurs de τ pour les spores : un temps de vie court (τ_2) de $1,1 \pm 0,3$ ns et un temps de vie plus long (τ_1) qui s'étend de 3 à 5,5 ns (Figure 38). Pour la plupart des échantillons, cet histogramme montre clairement une forme asymétrique. Cette courbe a alors été modélisée par le logiciel Origin Pro, ce qui permet d'extraire deux Gaussiennes centrées sur des valeurs moyennes de τ différentes : $3,4 \pm 0,2$ ns et $4,2 \pm 0,5$ ns.

Afin de localiser τ_1 et τ_2 , une analyse globale des images en temps de vie a été réalisée. En effet, plusieurs valeurs de τ (plusieurs environnements) sont « mélangés » par pixel. L'analyse globale permet, en « fixant » les valeurs de τ_1 et τ_2 , de décomposer le signal de chaque pixel selon ces deux valeurs en affectant un poids (intensité fractionnelle) à chaque temps. Cette analyse peut permettre de localiser ces 2 durées de vie à l'intérieur de la structure de chaque spore. En utilisant cet algorithme, les intensités fractionnelles (F_i) de chaque temps de vie peuvent être déterminées plus précisément. Ces intensités fractionnelles correspondent à l'amplitude de chaque temps de vie τ_1 et τ_2 réparti par pixel. Les images obtenues sont présentées en Figure 38 f et g. L'échelle en fausse couleur correspond aux intensités fractionnelles entre 20 et 80%. On peut observer à partir de ces images que le temps de vie court, τ_2 a l'intensité la plus importante (environ 65%, couleur rouge) au niveau d'une couche en périphérie des spores, et est faible à l'intérieur des spores (35%, couleur bleue). Inversement, le temps de vie plus long τ_1 a l'intensité la plus importante (65% couleur rouge) dans la partie interne des spores. Ces images permettent donc de montrer une séparation spatiale des deux temps de vie dans les spores dormantes et permet la séparation des contributions de différentes structures de la spore. On observe ainsi que contrairement aux images obtenues en intensité, la répartition des temps de vie du Bodipy-C₁₂ n'est pas homogène dans les spores. Bien que l'on ait déjà pu obtenir des informations intéressantes sur la répartition des temps de vie dans la spore, des analyses supplémentaires sont nécessaires pour attribuer des valeurs de temps de vie à des structures en particulier.

Séparation des contributions par analyses d'images

Comme on a pu le constater sur les images obtenues en intensités fractionnelles (Figure 38f et Figure 38g), il est possible de séparer les spores en deux parties : une partie interne et une plus externe. Afin d'améliorer les informations obtenues, l'outil « masque » (définition de zones dont les pixels ne sont pas pris en compte) et un seuillage des pixels plus important ont été utilisés pour diviser chaque spore en deux parties. La ligne de séparation utilisée pour chaque spore, se localise à peu près au niveau du cortex, et on peut supposer qu'elle sépare l'enveloppe et la membrane externe de la membrane interne. Les deux parties possèdent sûrement une contribution liée au cortex qui ne doit cependant contribuer que faiblement au signal du Bodipy-C₁₂ puisqu'il est plutôt de nature hydrophile (Engleberg. NC, 2007). La Figure 39a et b montre ainsi une cartographie des intensités fractionnelles dans les parties interne et externe des spores. τ_1 contribue pour 56% de l'intensité totale dans la partie interne (couleur rouge) et à 42% pour la partie externe (couleur bleue) alors que τ_2 contribue pour 58% du total dans la partie externe et 44 % pour la partie interne (Figure 39c).

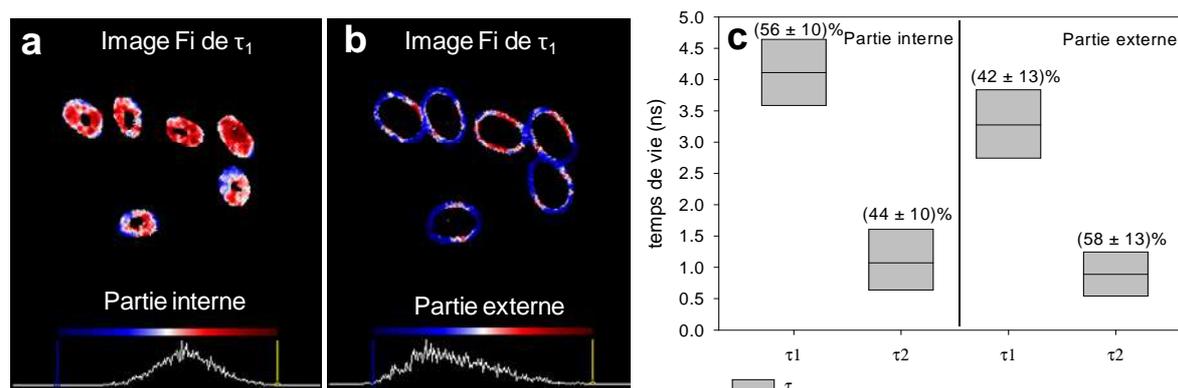


Figure 39 : Analyses d'images FLIM de spores sauvages par masquage spatial de pixels de la région interne ou externe. Image en intensité fractionnelle F_i dans la partie interne (a) et externe (b) de spores. L'échelle en fausse couleur va de 0,2 à 0,8. (c) valeur moyenne de τ_1 et τ_2 (axe des ordonnées, les boîtes représentent l'étendue) et les intensités fractionnelles correspondantes (% entre parenthèses).

Si maintenant on s'intéresse plus particulièrement aux valeurs de τ (Figure 39c), on constate que τ_2 varie très peu entre la partie interne ($1,1 \pm 0,4$ ns) et externe ($0,9 \pm 0,4$ ns). Ces valeurs correspondent à peu près à une viscosité d'environ 80 cP (cf Équation 10). Au contraire des différences sont observées pour les valeurs de τ_1 avec un temps de vie de $4,1 \pm 0,5$ ns (1090 cP) pour la partie interne et de $3,3 \pm 0,5$ ns (725 cP) pour la partie externe. Cette dernière valeur est très proche de la valeur extraite de l'épaule observé sur l'histogramme des spores entières (Figure 38b). On peut ainsi supposer qu'une contribution du déclin lent (τ_1) dans la partie externe soit responsable de cet épaule.

Spores sans enveloppe et résidus de germination

Afin d'aider l'attribution d'une viscosité à un domaine particulier dans les spores sauvages, des images FLIM de différents types cellulaires (spores sans enveloppes, résidus d'enveloppe) ont été acquises. La Figure 40a donne ainsi les valeurs moyennes de τ_1 et τ_2 obtenues.

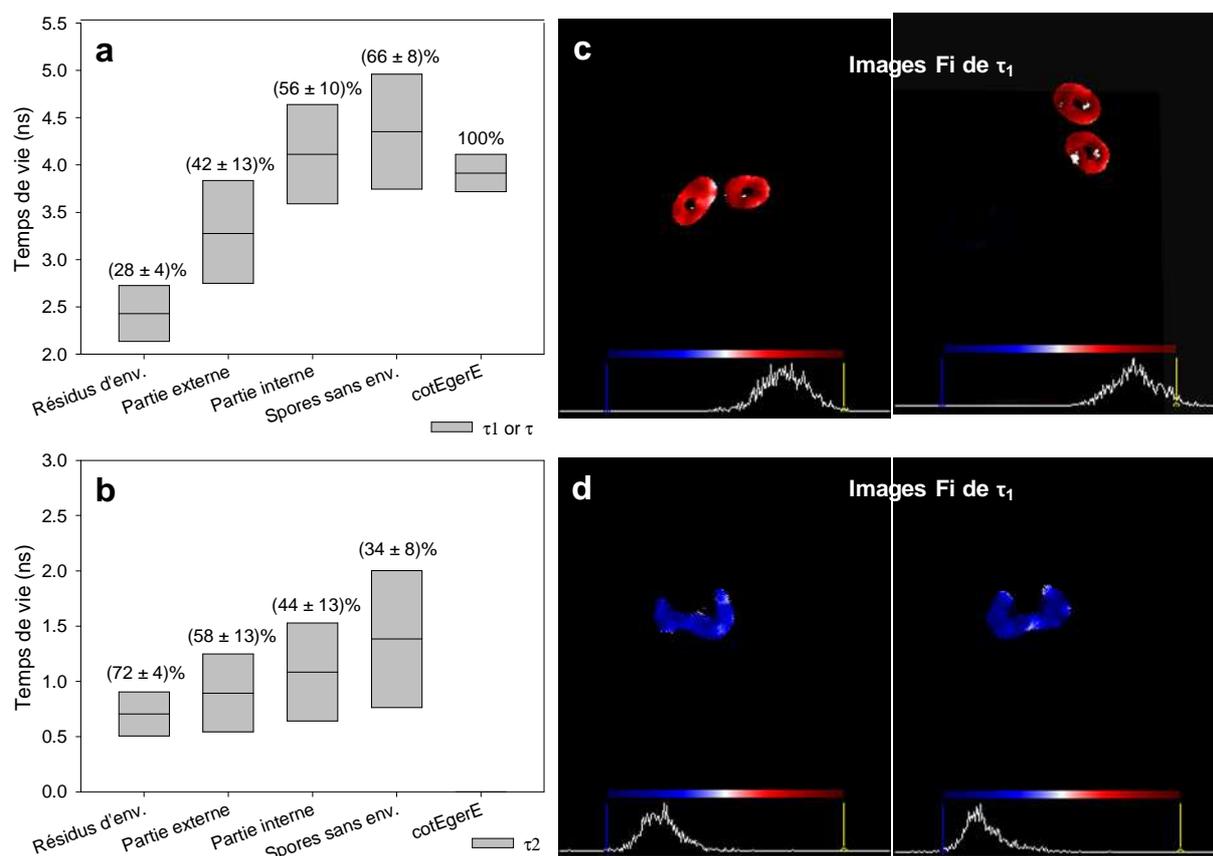


Figure 40 : Comparaison des temps de vie mesurés dans différents échantillons. Temps de vie moyen τ_1 ou τ_2 (a) and τ_2 (b) , les % représentent les intensités fractionnelles correspondantes. Image en intensité fractionnelle Fi de spores sans enveloppe (c) et de résidus d'enveloppe (d). L'échelle en fausse couleur va de 0,2 à 0,8

Si on s'intéresse tout d'abord aux spores dont l'enveloppe a été retirée par traitement chimique (« spores sans env. » sur la figure), on observe que la courbe de déclin de fluorescence nécessite là encore une modélisation biexponentielle. L'intensité fractionnelle moyenne mesurée, 66%, nous indique que la contribution la plus importante dans ces spores provient de τ_1 ($4,4 \pm 0,6$ ns) (Figure 40). Au contraire, dans les résidus d'enveloppe obtenus par germination, le temps de vie dominant est τ_2 qui représente 72% du déclin total avec une valeur moyenne de $0,7 \pm 0,2$ ns, proche de ce qui est mesuré dans la partie externe des spores. Les spores *cotE gerE*, ont également été utilisés. Pour ces spores, il semble que le déclin de

fluorescence suit un modèle monoexponentiel, avec une valeur de temps de vie de $3,9 \pm 0,2$ ns proche de la valeur de τ_1 mesurée dans la partie interne des spores entières. Ainsi, pour ces spores, il n'y a pas de temps de vie court aux alentours de 1 ns.

En considérant toutes ces données, la valeur de temps de vie court, τ_2 , a une contribution très faible (34%), voire nulle (*cotE gerE*), dans les spores sans enveloppe et au contraire très importante dans les résidus d'enveloppe (72%). Ceci suggère que ce temps de vie est associé aux protéines de l'enveloppe et qu'ainsi la viscosité de 80 cP y est associée. Cette valeur ne peut pas être imputée au cortex puisque ce τ n'est pas présent pour les spores *cotEgerE* qui possèdent un cortex intact. Ces données peuvent être liées au fait que le procédé d'analyse d'image par masque ne soit pas suffisamment précis. De plus, le fait que le traitement chimique pour enlever l'enveloppe ne soit pas efficace à 100%, peut expliquer pourquoi même les parties intérieures ont montré une certaine contribution de τ_2 .

En ce qui concerne la valeur de τ_1 proche de 4 ns (3,9 à 4,4 selon l'échantillon), elle semble pouvoir être attribuée à la membrane interne puisqu'il s'agit de la principale structure hydrophobe qui reste dans les spores sans enveloppe. Ces valeurs correspondent à des viscosités allant de 990 à 1220 cP. Enfin, la valeur de τ_1 proche de 3 ns (3,3 -3,4 ns) peut être associée à la membrane externe, ce temps de vie étant absent des spores sans enveloppe et présent dans les zones périphériques des spores sauvages. Dans ce cas, cette membrane possède une viscosité plus faible que la membrane interne d'environ 725 cP.

1.2.3.3. Viscosité de cellules végétatives et comparaison avec les spores entières

Le rotor moléculaire a également été utilisé dans les cellules végétatives afin de mesurer une viscosité de la membrane plasmique et de la comparer à celle mesurée dans les spores. Les cellules végétatives de *B. subtilis* ne possèdent qu'une seule membrane puisqu'il s'agit d'une bactérie Gram-positif recouverte par une couche de peptidoglycane, c'est-à-dire la paroi cellulaire. Au contraire des spores entières, la courbe de décroissance de la fluorescence du Bodipy-C12 dans les cellules végétatives peut être modélisée par une courbe monoexponentielle. La Figure 41 présente ainsi les images de τ obtenues pour les cellules végétatives (a) en comparaison avec l'image τ_1 obtenue pour des spores entières (b).

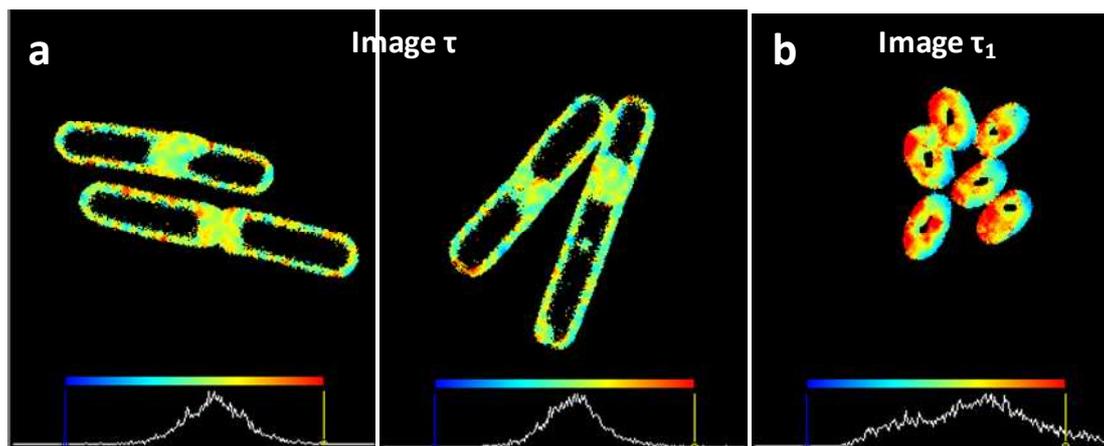


Figure 41 : Image FLIM de cellules végétatives et de spores sauvages. (a) Image du temps de vie du rotor dans les cellules végétatives. Echelle en fausse couleur : 2,2 à 3,2 ns. (b) Image du temps de vie long (τ_1) du rotor dans des spores sauvages. Echelle de couleur : 2,5 à 5 ns.

L'échelle en fausse couleur est différente selon les échantillons allant de 2,2 à 3,2 ns pour les cellules végétatives et de 2,2 à 5,1 ns pour les spores. Ceci montre déjà que les valeurs de τ pour les cellules végétatives sont moins étendues et plus faibles que pour les spores. En effet, le Bodipy- C_{12} possède en moyenne un temps de vie de $2,7 \pm 0,2$ ns dans les cellules végétatives, ce qui correspond à une viscosité d'environ 500 cP.

Ainsi de manière similaire à ce qui a été mesuré avec l'anisotropie du DPH, les cellules végétatives présentent une viscosité membranaire plus faible que les spores et notamment que la membrane interne. De plus, il semble même que la membrane externe des spores soit plus visqueuse que celle des cellules végétatives (725 cP contre 500 cP).

Cette première partie nous a permis de mettre en évidence des particularités spécifiques aux spores bactériennes. Ainsi, ces spores possèdent des constituants internes qui leur sont propres (comme le DPA) et qui permet de les différencier de cellules végétatives. Nous avons pu mettre en évidence une forte rigidité et une faible mobilité des structures de la spore à l'aide de méthodes d'investigation globales comme la RMN ou la spectrofluorimétrie. Ainsi des spores sauvages présentent une mesure de fluidité membranaire environ 1,3 fois plus élevée que des cellules végétatives. L'utilisation de spores sans enveloppe montre cependant que le signal obtenu peut également provenir de structures externes. L'utilisation de sondes fluorescentes afin de marquer les spores après production a validé la faible perméabilité des structures sporales, celles-ci pénétrant moins profondément que si elles sont additionnées en cours de sporulation. Ces méthodes n'ont cependant pas permis de distinguer quelles étaient les structures qui intervenaient dans ces caractéristiques de faible perméabilité et fluidité. L'ajout d'un rotor moléculaire en cours de sporulation, nous a permis de mettre en évidence une forte viscosité des structures de la spore. L'utilisation de spores modifiées nous a permis d'identifier la membrane interne comme étant la structure majoritaire qui intervient dans la rigidité des spores. Celle-ci possède ainsi une viscosité d'environ 2,3 fois plus élevée que celle d'une cellule végétative classique. La Figure 42 reprend ainsi les valeurs de viscosité mesurées dans les différentes structures de la spore et les cellules végétatives.

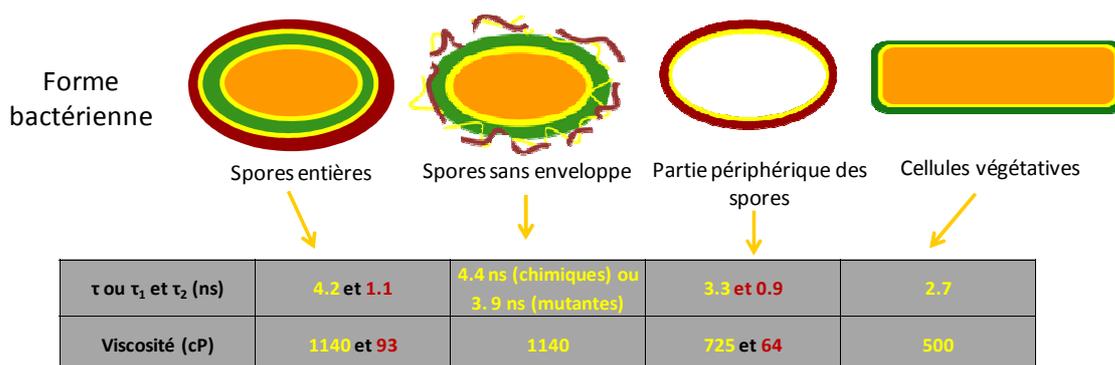


Figure 42 : Résumé des valeurs de τ et de viscosités obtenues dans les différents types cellulaires (rouge : enveloppe et jaune : membrane).

Dans l'idée de relier les spécificités de la spore à sa résistance, différents paramètres environnementaux (nutriments, température,...) vont être modifiés. Ces perturbations permettront de visualiser comment évoluent les structures de la spore.

2. Modification de la perméabilité de la spore et de la fluidité de ses membranes

Objectif de l'étude

L'étude précédente a permis la mise en place de méthodes d'analyses et d'identifier plus ou moins les structures impliquées dans l'état de compaction extrême de la spore bactérienne : notamment le cortex et la membrane interne. Il s'agit dans ce travail de voir si ces méthodes permettent de suivre et d'identifier la nature des modifications que peuvent subir ces structures. Pour cela, différents paramètres seront étudiés. Dans un premier temps, la germination sera utilisée comme modification dite « naturelle ». Par la suite, l'effet de la température sera étudié ainsi qu'un procédé d'inactivation des spores identifié par l'étude bibliographique pour modifier les barrières de perméabilité : l'éthanol (couplé à la température).

2.1. Modification « naturelle » des structures : la germination

La spectroscopie infrarouge est utilisée dans un premier temps pour visualiser quelles structures sont modifiées au cours de ce processus et de quelle manière.

2.1.1. Libération de l'acide dipicolinique

Le DPA est un constituant de la spore présent en grande quantité dans le protoplaste. L'utilisation du FTIR permet de visualiser l'évolution des vibrations caractéristiques de ce composé lors d'une germination. Pour réaliser ces spectres, les spores sont germées dans une étuve à 37 °C, lavées, puis une goutte de spores germées est déposée sur le cristal du FTIR et séchée. La Figure 43 montre un exemple des spectres obtenus au cours des 55 premières minutes de la germination.

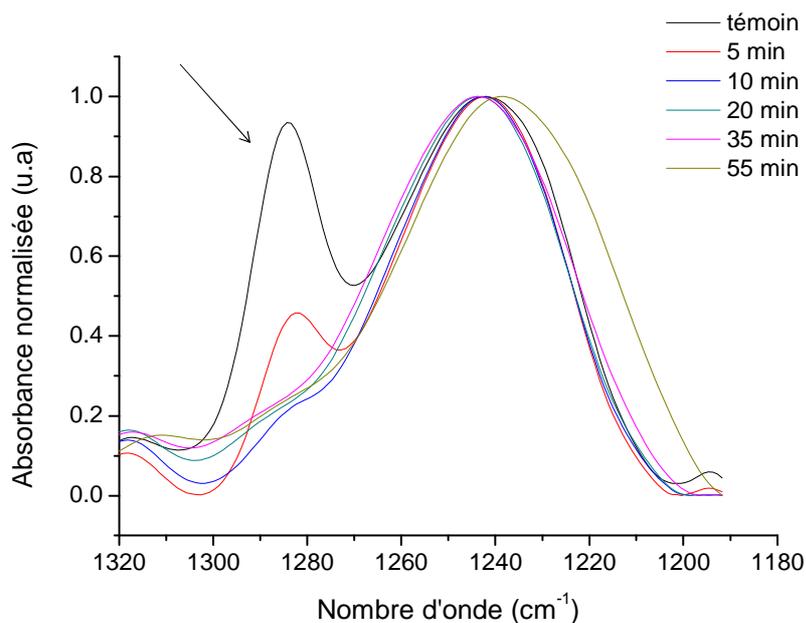


Figure 43 : Suivi en spectroscopie IR de la libération du DPA au cours de la germination de spores de *Bacillus subtilis* en milieu nutritif. La flèche indique le pic d'absorbance caractéristique du DPA.

D'un point de vue qualitatif, les fréquences de vibrations caractéristiques du DPA ($\sim 1279 \text{ cm}^{-1}$, épaulement à $\sim 1570 \text{ cm}^{-1}$ non présenté sur cette figure) disparaissent rapidement au cours de la germination, notamment au cours des cinq premières minutes. Cette sortie du DPA signifie que suite à l'activation des récepteurs de germination, une modification des structures a lieu, permettant entre autre une libération d'un constituant présent dans le noyau des spores. Il est connu que le DPA est libéré au cours de la germination *via* l'ouverture de canaux spécifiques localisés dans la membrane interne, et que cela se produit très tôt au cours de la germination (Vepachedu and Setlow, 2005; Yi and Setlow, 2010)

2.1.2. Modification de la membrane interne et de l'enveloppe

2.1.2.1. Spectres infrarouges

La Figure 34 permet d'observer les différences dans la région lipidique des spectres infrarouge de spores et de cellules végétatives. Ces dernières présentent un pic aux alentours de 2920 cm^{-1} , faiblement présent chez les spores. L'évolution de ces vibrations au cours de la germination a été suivie par spectroscopie infrarouge, un exemple en est donnée Figure 44.

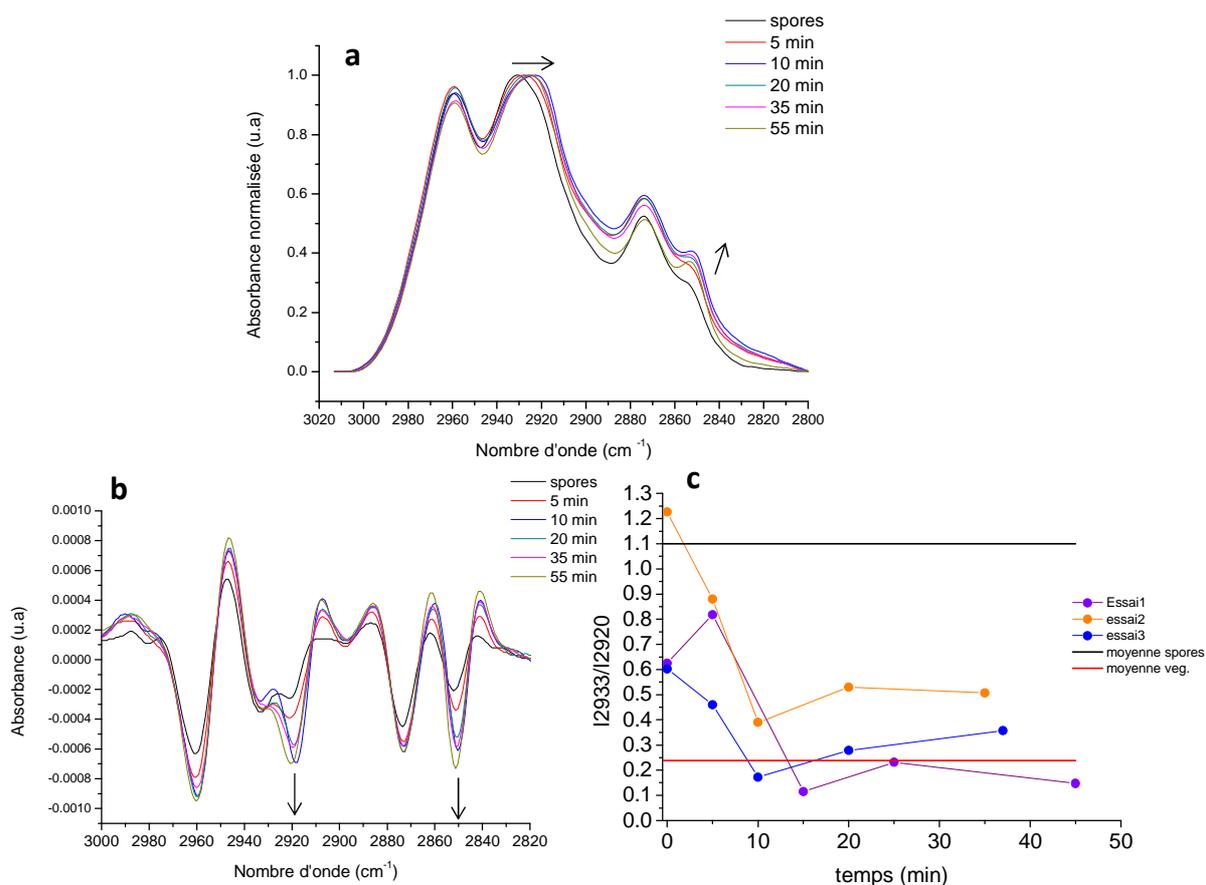


Figure 44 : Evolution des spectres infrarouges dans la région 3000-2700cm⁻¹ de spores de *Bacillus subtilis* au cours de la germination. (a) Evolution du spectre au cours du temps de germination. Pour une meilleure visualisation, la ligne de base est corrigée. Les flèches indiquent les variations observées. (b) Evolution du spectre dérivé seconde au cours de la germination. (c) Evolution du rapport d'intensité (2933 / 2920 cm⁻¹) en fonction du temps de germination pour plusieurs essais réalisés. Les courbes rouges et noires représentent les rapports moyens obtenus pour les cellules végétatives et les spores respectivement.

Une modification de la fluidité membranaire entraîne un déplacement des positions de vibrations d'élongation des CH₂ asymétrique (~2920 cm⁻¹) ou symétrique (2850 cm⁻¹) (Wolkers and Hoekstra, 1995; Laroche *et al.*, 2005; Fang *et al.*, 2007).

Sur le spectre des lipides (Figure 44a), un déplacement est visible (indiqué par une flèche) seulement pour la vibration proche de 2930 cm⁻¹, qui pourrait correspondre à une modification de la fluidité membranaire au cours de la germination. Cependant, cette variation n'est pas visible pour la fréquence de 2850 cm⁻¹. Par contre, l'intensité de cette dernière semble augmenter avec la germination. Le spectre dérivé seconde a donc ensuite été analysé (Figure 44b).

Cette figure nous permet de constater que la position du pic aux alentours de 2920 cm⁻¹, qui n'est que peu présent chez les spores, n'est pas réellement modifié. Cependant, l'intensité de

ce pic (mais également celui à 2850 cm^{-1}), augmente au cours de la germination (Figure 44b). Le décalage observé sur le spectre premier semble ainsi être lié à l'augmentation de l'intensité du pic à 2920 cm^{-1} . Pour faire un suivi plus précis, la modification du rapport de l'intensité du pic à 2933 cm^{-1} sur le pic à 2920 cm^{-1} a été évaluée (Figure 44c). Ceci permet de traduire l'augmentation de la vibration du pic à 2920 cm^{-1} au cours de la germination (diminution du rapport). Ainsi, on constate que dès les 10 – 15 premières minutes le rapport n'évolue quasiment plus. On peut supposer que la germination conduit à une modification des membranes soit en termes de « démasquage » des vibrations (augmentation de l'intensité), soit en termes de modification structurale. Cependant, ce rapport n'a pas de réelle signification et ne permet pas d'identifier réellement les modifications subies par ces structures.

Les vibrations caractéristiques des membranes ne sont pas les seules à évoluer au cours de la germination. La Figure 45 présente ainsi l'évolution du pic Amide I au cours de la germination.

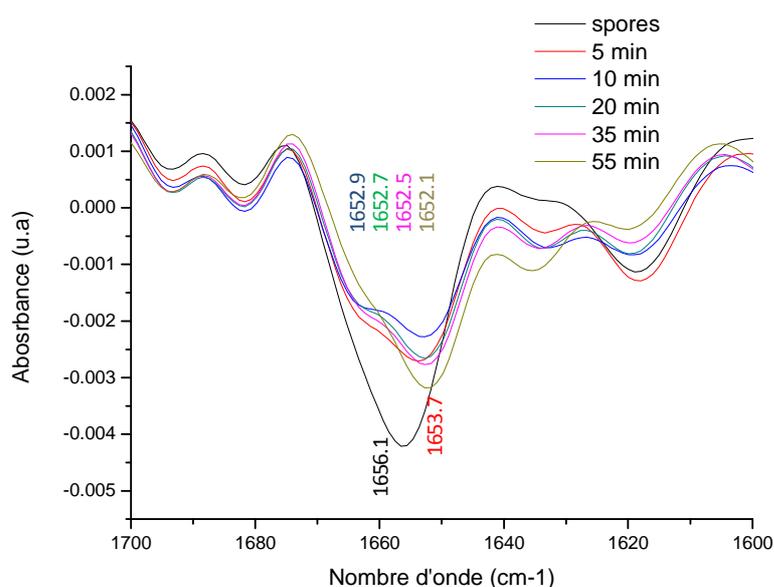


Figure 45 : Evolution de la dérivée seconde du spectre Amide I obtenue en spectroscopie IR de spores de *Bacillus subtilis* en fonction du temps de germination. Les valeurs indiquent les fréquences de vibrations de la liaison Amide I.

On peut constater qu'en fonction du temps, la position du pic varie de 1655 cm^{-1} pour atteindre une valeur d'environ $1652,0\text{ cm}^{-1}$, proche de la valeur obtenue en moyenne dans les cellules végétatives ($1651,4\text{ cm}^{-1}$). Ce shift apparaît très tôt dans la germination ($\sim 5\text{min}$), et signifie que les caractéristiques des protéines de la spore germée sont rapidement modifiées et se rapprochent de celles de cellules végétatives. Une étude réalisée en infrarouge a également

montré des modifications des protéines immédiatement après l'initiation de la germination ; les auteurs ont ainsi quantifié une hydrolyse de 26 % des protéines (diminution de l'intensité sur le spectre non dérivé) dans les premières 15 minutes de la germination (Cheung *et al.*, 1999). Ceci concorde avec la dégradation de protéines spécifiques de la spore (notamment des SASP) dans les premières minutes de la germination (Johnson and Tipper, 1981; Mason and Setlow, 1986).

2.1.2.2. Modification de la viscosité des structures

Observation de spores germées

Le FLIM a permis d'attribuer une valeur de viscosité aux structures sporales et notamment à la membrane interne des spores. L'effet de la germination sur ces structures a donc été étudié par cette méthode afin de visualiser et quantifier les modifications de viscosités au cours de ce processus. Les résultats sont ainsi présentés Figure 46. La germination a été réalisée à 37 °C avec de la L-alanine dans une étuve. Les spores ont ensuite été lavées et observées en microscopie FLIM à température ambiante. L'évolution de la viscosité a été réalisée à la fois sur des spores mutantes *cotE gerE*, après 1 h, mais également sur des spores sauvages après 45 min. Dans les deux cas, les spores sont à l'étape II de la germination (cf Figure 7), ce qui signifie que le cortex a été dégradé et que l'enveloppe commence à s'ouvrir (Setlow, 2003). Pour les spores sauvages, deux temps de vie sont encore présents après germination : $\tau_1 = 3,0 \pm 0,4$ ns (41%) and $\tau_2 = 0,9 \pm 0,2$ ns (59%). On observe ainsi qu'en moyenne la valeur de temps de vie associée à l'enveloppe (τ_2) n'est pas modifiée par la germination. Au contraire, τ_1 qui était associé aux membranes (~ 4,2 ns) atteint une valeur plus faible (~ 3 ns) (Figure 46) correspondant à une valeur de viscosité de 610 cP.

Pour les spores mutantes, on peut également constater une diminution du temps de vie après la germination, qui passe de $3,9 \pm 0,2$ ns à $2,9 \pm 0,1$ ns, ce qui correspond à une diminution de la viscosité de 990 à 570 cP. Ces deux valeurs de temps de vie obtenues après la germination pour les spores sauvages et les spores mutantes sont proches de ce qui est mesuré dans la membrane des cellules végétatives (Figure 41).

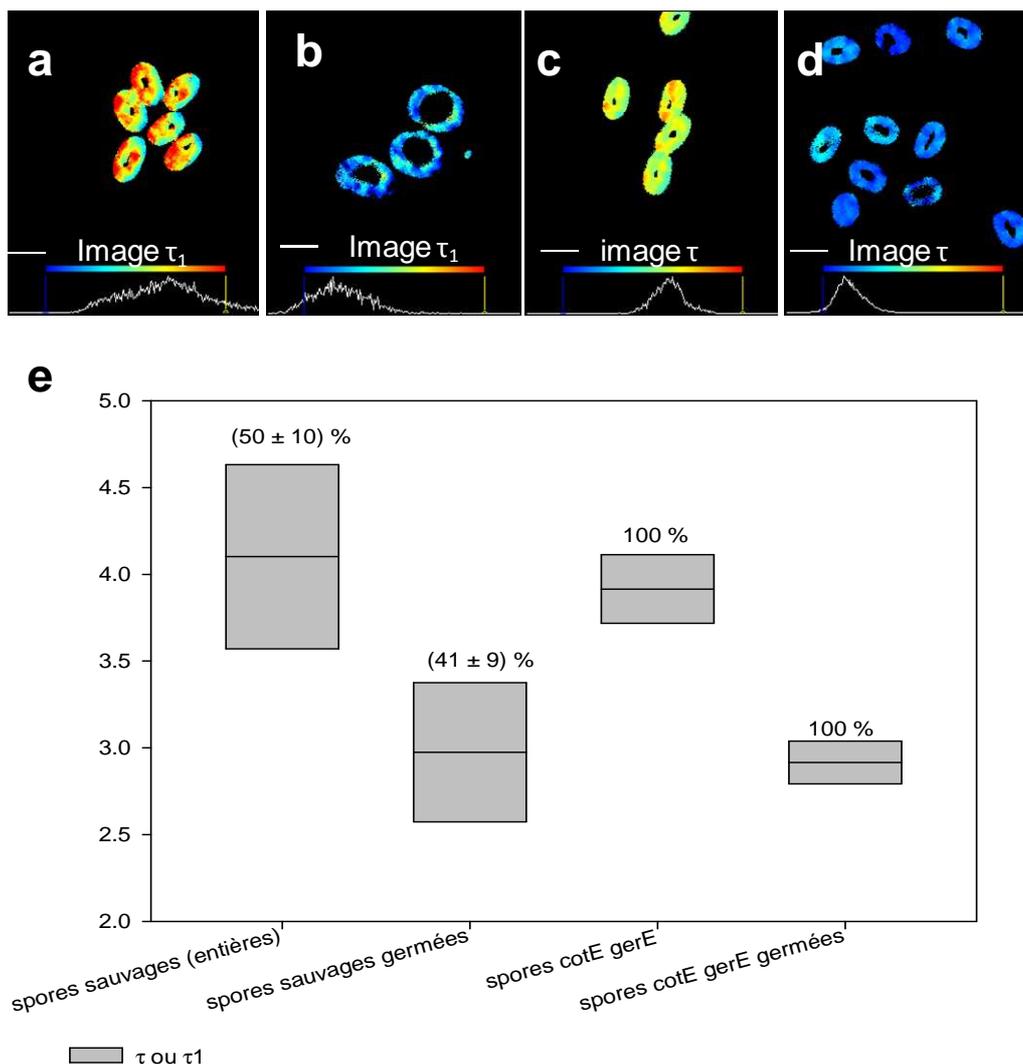


Figure 46 : Modification des temps de vie après germination pour des spores de *Bacillus subtilis* sauvages et sans enveloppe. Images en temps de vie de spores sauvage avant (a) et après 45 min de germination (b) et de spores *cotE gerE* avant (c) et après 1h de germination (c). Echelle en fausse couleur : 2,5 à 5 ns. La barre d'échelle correspond à 1 μ m. (e) Valeurs de temps de vie mesurées avant et après germination pour des spores sauvages (τ_1) et *cotE gerE* (τ). Les % représentent les intensités fractionnelles correspondantes.

Suivi de la germination en cellules de visualisation

Grâce à une cellule de visualisation, des essais de suivi de germination ont également été réalisés pour des spores sauvages sous microscope à 37 °C. L'évolution des temps de vie au cours de la germination de spores sauvages est ainsi présenté Figure 47.

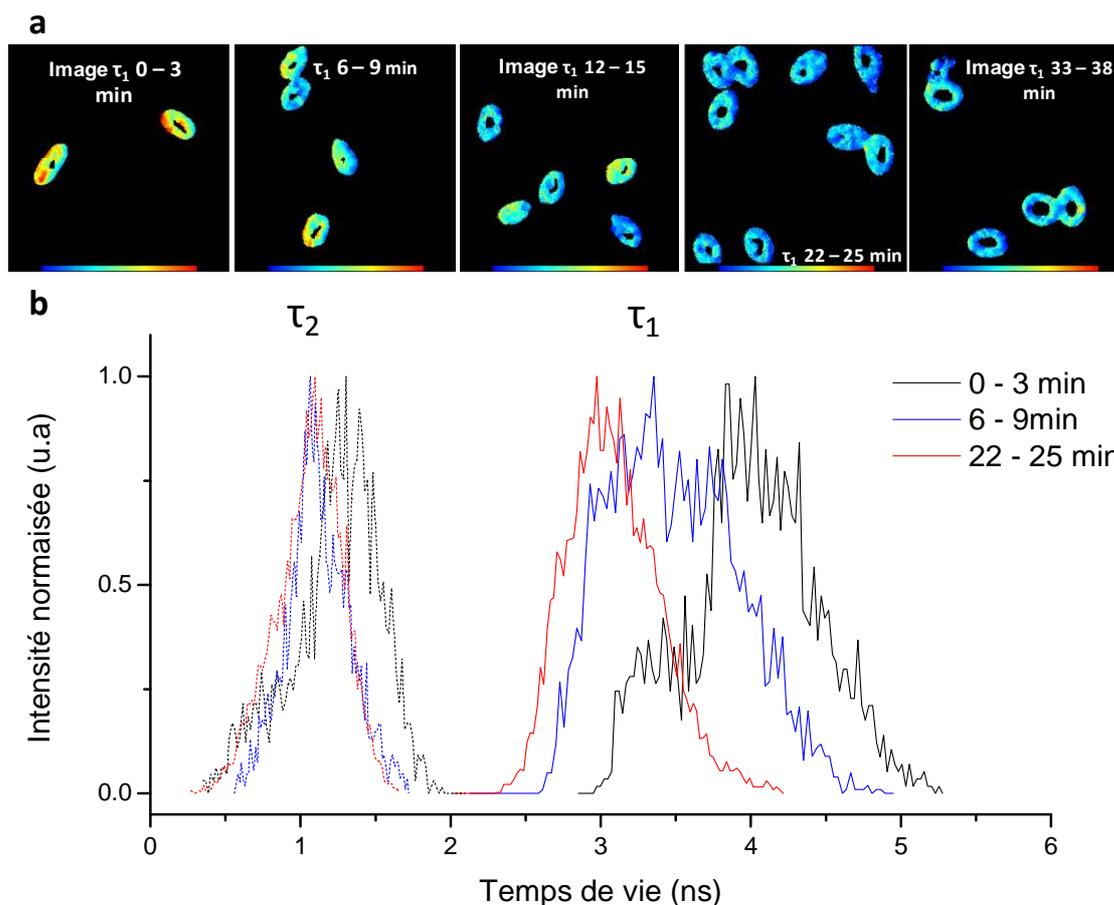


Figure 47 : Evolution des temps de vie au cours de la germination de spores sauvages. (a) Images en temps de vie (τ_1). Echelle en fausse couleur: 2,5 à 5 ns. (b) Histogramme de la répartition des temps de vie τ_1 et τ_2 .

L'évolution de la viscosité des membranes (τ_1) n'apparaît pas identique d'une spore à une autre. Chaque spore ne germe pas forcément de manière identique, il existe même des spores qui ont été identifiées comme « superdormantes » (Ghosh and Setlow, 2010). Ainsi on observe que certaines spores restent à un temps de vie plus élevé (couleur jaune – orange Figure 47) plus longtemps. De plus, si on s'intéresse aux histogrammes de temps de vie (Figure 47b), il est visible que τ_2 , qui correspond à l'enveloppe, n'est que peu affecté par la germination (une légère diminution de la valeur est cependant observée). Le suivi au cours du temps, nous permet de constater que dès 4 - 6 min, le temps de vie de la sonde insérée dans la membrane interne (τ_1) diminue pour atteindre une valeur stable dès 9 à 12 min, proche de 3 ns. Ce temps est proche de ce qui est observé par spectroscopie infrarouge. Ainsi, au cours de la germination, la membrane interne acquiert la même fluidité que la membrane d'une cellule végétative et ceci semble se dérouler assez rapidement au cours de la germination.

2.2. Effet de la température sur les structures de la spore

2.2.1. Modification de la fluidité membranaire et autres structures hydrophobes d'une population de spores

La sonde DPH a été insérée dans des spores de *B. subtilis* afin d'obtenir, *via* son anisotropie de fluorescence, des informations sur les membranes de la spore et notamment sa membrane interne. Pour étudier une éventuelle modification des membranes des spores sous différentes contraintes, les spores marquées par le DPH ont été soumises à des rampes de température. Des spores sauvages et des spores mutantes sans enveloppe (*cotE gerE*) ont été utilisées. La Figure 48a présente l'évolution de l'anisotropie du DPH à l'intérieur de spores soumises à une rampe de température allant de 30 à 80 °C.

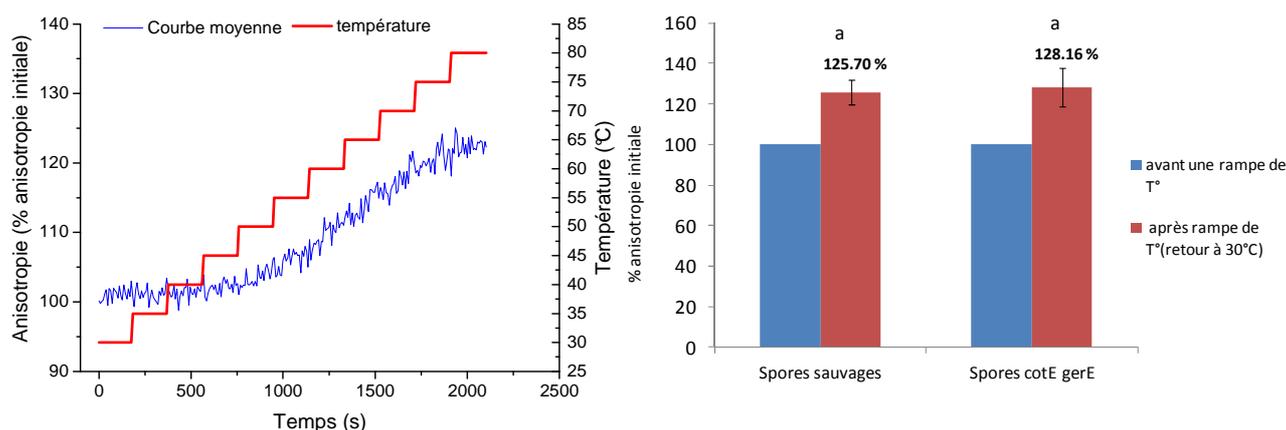


Figure 48 : Evolution de l'anisotropie du DPH inséré dans des spores de *Bacillus subtilis* soumises à une rampe de température (a) Courbe moyennée de l'évolution de l'anisotropie du DPH (en % anisotropie initiale) inséré dans des spores sauvages en fonction du temps et de la température (n = 6). (b) Anisotropies moyennes du DPH (exprimées en % d'anisotropie initiale) mesurées avant et après une rampe de température pour des spores sauvages et *cotE gerE*. a : différences non significatives au seuil α de 5 %.

Initialement, on peut observer une variabilité importante des valeurs d'anisotropie mesurées dans les spores bactériennes. Cela peut être relié à des différences dans les lots de spores produites ou aux différentes structures des spores qui sont réellement marquées. Les résultats d'anisotropie mesurée après la rampe sont ainsi exprimés en pourcentage de l'anisotropie initiale. De manière étonnante, la valeur d'anisotropie du DPH mesurée dans les spores augmente avec la température. Quelle que soit la valeur d'anisotropie initiale, cette valeur augmente à partir d'une température proche de 55 °C jusqu'à atteindre un plateau vers 75 °C

(Figure 48a). Cette augmentation de la valeur d'anisotropie semble indiquer une augmentation de la rigidité des structures marquées par le DPH, pouvant résulter d'une densification du milieu. Le retour à 30 °C *via* une rampe de température ne modifie pas la valeur d'anisotropie obtenue qui reste proche de celle mesurée à 75 °C. Ce comportement du DPH mesuré dans des spores sauvages est également observé pour des spores mutantes sans enveloppes (*cotE gerE*). La Figure 48b présente ainsi le pourcentage moyen d'augmentation de l'anisotropie mesurée avant une rampe de température et après retour à 30 °C. Ainsi, quelle que soit la souche, la rampe de température entraîne une augmentation d'environ 26 % à 28% de la valeur de l'anisotropie initiale. On passe d'une valeur moyenne d'anisotropie de $0,22 \pm 0,028$ à $0,28 \pm 0,026$ et de $0,23 \pm 0,016$ à $0,29 \pm 0,012$ pour les spores sauvages et mutantes respectivement. De plus, l'effet d'un choc (70 °C / 30 minutes par exemple) sur des spores marquées au DPH entraîne un comportement similaire, c'est-à-dire une augmentation de la valeur d'anisotropie. Dans des membranes « modèles », une augmentation de la température s'accompagne d'une augmentation de la fluidité et donc d'une diminution de l'anisotropie du DPH localisé dans ces membranes (Laroche *et al.*, 2001; Laroche *et al.*, 2005; Najjar *et al.*, 2007). Cette augmentation de l'anisotropie dans notre cas peut s'expliquer par une délocalisation de la sonde dans une partie moins fluide (comme la membrane interne) plutôt que par une augmentation irréversible de rigidité des structures marquées. La délocalisation de la sonde dans des structures plus rigides peut être liée à la fois à une augmentation de la vitesse d'insertion par la température mais aussi par une perméabilisation des structures externes suite à modification d'état de ces structures (enveloppe et/ ou cortex). Ce résultat montre une similitude avec ce qui a été observé en RMN lors de l'identification des pics (Figure 32). L'utilisation de spores mutantes sans enveloppe montre que l'enveloppe ne semble pas être la structure touchée, il s'agirait donc plutôt du cortex. On peut ainsi suggérer que la valeur d'anisotropie obtenue après une rampe de température intègre beaucoup plus à une mesure de la fluidité de la membrane interne. Il est important de noter qu'une fois relocalisée ce signal bouge peu avec la température.

2.2.2. Modélisation de l'état de rigidité de la membrane interne

L'étude bibliographique a montré que la membrane interne des spores diffère peu en composition d'une membrane de cellule végétative. Si on considère la valeur d'anisotropie obtenue après la rampe comme celle du DPH inséré dans la membrane interne des spores (0,28), cette valeur est bien plus importante que celle mesurée dans la membrane de cellules

végétatives (0,18, Figure 36). Afin d'étudier le comportement du DPH inséré dans des cellules végétatives en fonction de la température, celles-ci ont également été soumises à une rampe de température (Figure 49).

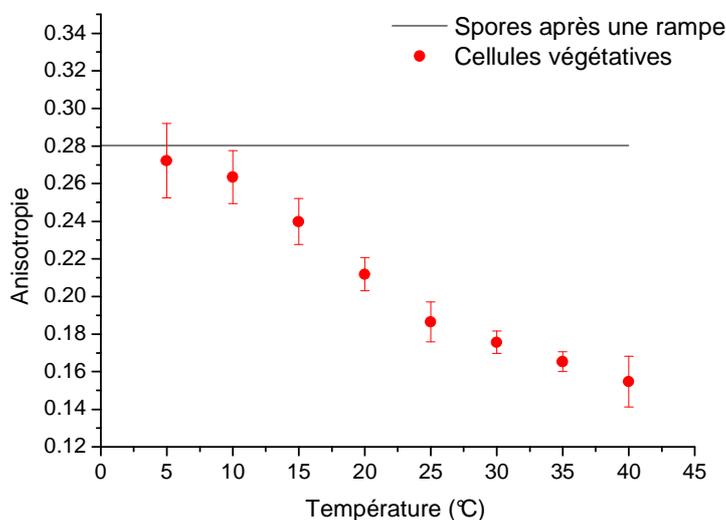


Figure 49 : Evolution de l'anisotropie du DPH inséré dans des cellules végétatives de *Bacillus subtilis* en fonction de la température (n= 5).

On observe ainsi logiquement que l'anisotropie du DPH, dans ce cas, diminue avec l'augmentation de température. La valeur moyenne d'anisotropie mesurée dans des spores après une rampe de température est représentée par une ligne noire. On constate que pour s'approcher de cette valeur, les cellules végétatives doivent être amenées à une température inférieure à 5 °C. Ainsi, elles atteignent à 5 °C une valeur moyenne d'anisotropie de $0,27 \pm 0,02$. Cette valeur de température traduit le haut degré de rigidité de la membrane interne des spores.

2.2.3. Mesures individuelles de l'évolution de la viscosité de la membrane interne des spores en fonction de la température

Des expériences préliminaires ont été réalisées afin de mesurer l'évolution de la viscosité de la membrane interne des spores à l'aide de la sonde Bodipy-C₁₂ et de l'analyse FLIM en fonction de la température. Ces résultats ont été suivis à l'aide d'une chambre de visualisation permettant une régulation de la température. La Figure 50 présente ainsi les valeurs obtenues pour les spores sauvages.

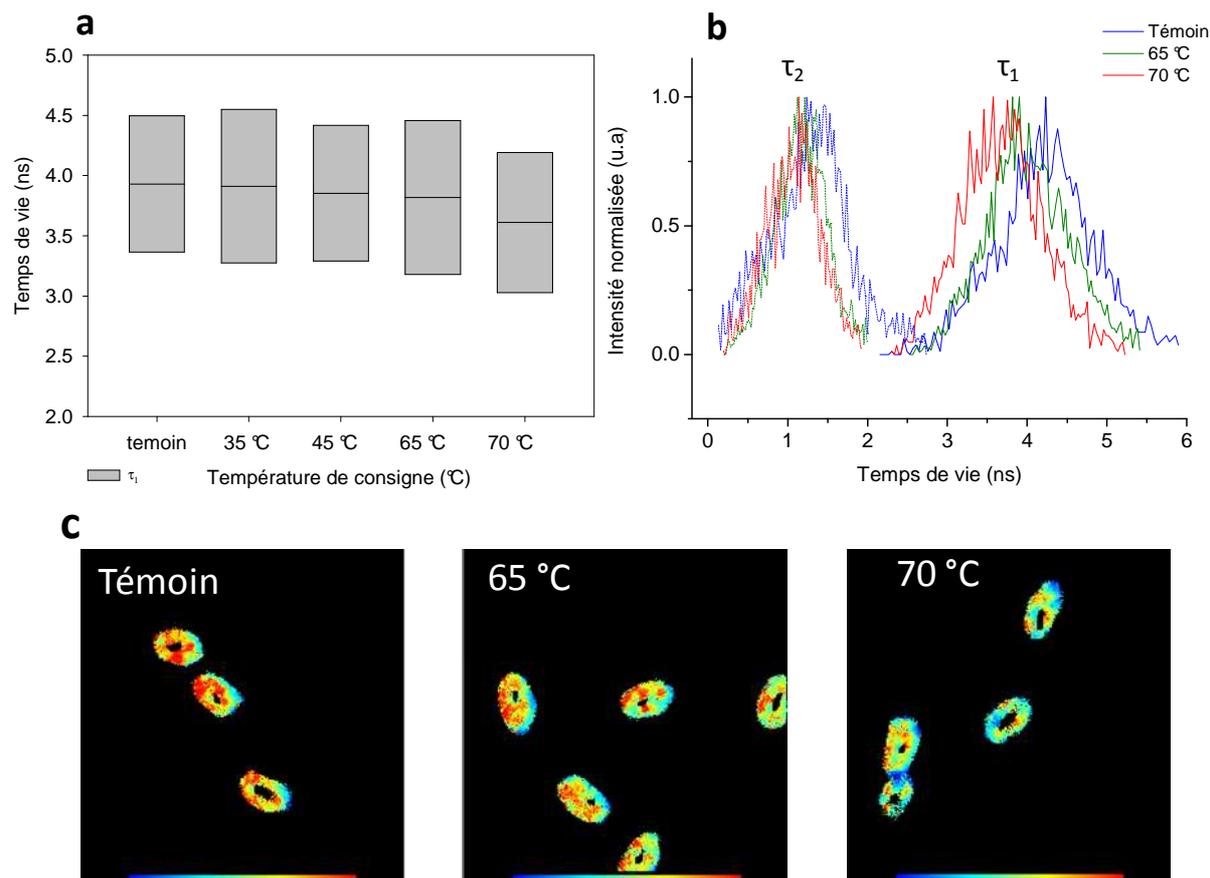


Figure 50 : Evolution des temps de vie de spores sauvages en fonction de la température. (a) Valeurs moyennes de τ_1 mesurée dans la partie interne de spores sauvages. (b) Histogramme de la répartition des temps de vie. (c) Images en temps de vie (τ_1) de fluorescence. Echelle en fausse couleur : 2,5 à 5 ns.

Ces résultats montrent qu'une température de consigne de 70 °C permet de modifier la valeur moyenne de viscosité de la membrane interne, celle-ci passant d'une valeur d'environ 1000 cP à température ambiante à 850 cP. Le retour à température ambiante s'accompagne d'une réaugmentation de la viscosité (900 cP), cependant plus faible que la valeur initiale. Cette température de 70 °C est très élevée et se rapproche là encore de la température d'activation de la germination. Pour des températures plus faibles, aucune différence significative n'est observée avec le témoin. A cette température critique, on peut supposer qu'une des structures évolue, probablement le cortex, puisque peu de variations sont observées au niveau de l'enveloppe (Figure 50b). Ceci permet peut être une modification de la fluidité de la membrane interne.

2.3. Effet couplé de l'éthanol et de la température

2.3.1. Impact de l'éthanol sur l'inactivation des spores

2.3.1.1. Traitement à l'éthanol 70% pendant 2 h à 65 °C

L'étude bibliographique nous a permis d'identifier l'éthanol couplé à la température comme un traitement possible permettant la modification des barrières de perméabilité des spores bactériennes avec une modification apparente minime de la structure. Dans un premier temps, les spores ont ainsi été soumises à un traitement éthanol à 70% pendant 2 h à 65 °C. Lorsque les spores sauvages sont traitées à l'éthanol, leur densité est modifiée ce qui les rend plus difficile à centrifuger et donc à récupérer. Au contraire, les spores sans enveloppe semblent être moins touchées par ce phénomène, ceci étant peut être relié à une différence dans leur hydrophobicité de surface et/ou à la modification de la densité de leur protoplaste. La Figure 51 présente ainsi les résultats de viabilité (UFC) et de marquage à l'IP obtenus pour des spores sauvages et sans enveloppe (*cotE gerE*).

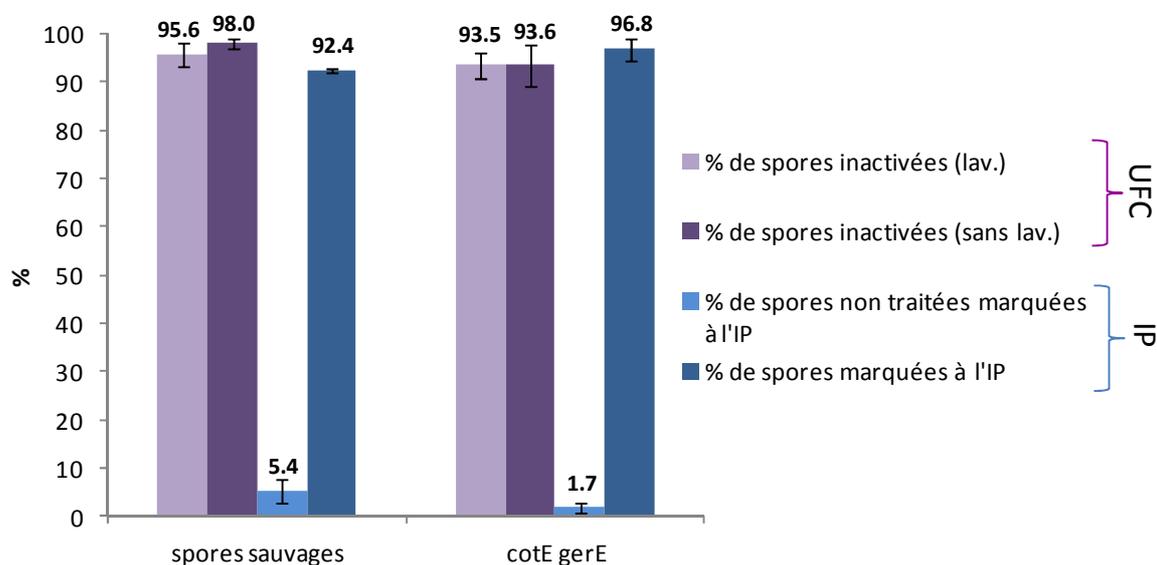


Figure 51 : Impact d'un traitement éthanol 70% à 65 °C pendant 2h sur l'inactivation (en %) et le marquage à l'IP (en %) de spores sauvages et de spores sans enveloppe (*cotE gerE*) de *Bacillus subtilis*. lav. : lavages, sans lav. : sans lavage.

Le traitement éthanol s'accompagne en moyenne de 1,7 log de destruction pour les spores sauvages (~ 98% d'inactivation) et de 1,2 (~ 96.3 % d'inactivation) pour les spores sans enveloppe. Ceci est cohérent avec les 1,7 log de destruction déjà observé dans la bibliographie

(Setlow *et al.*, 2002). Aucune différence significative n'est observée entre l'inactivation (en %) mesurée avec ou sans lavage et entre les deux souches de *B. subtilis*, bien que la souche *cotE gerE* montre une tendance à être plus résistante. La présence ou non de l'enveloppe ne semble pas protéger les spores de ce traitement puisqu'aucune différence significative n'a été observée. Ceci a déjà été observé pour des spores dont l'enveloppe a été retiré chimiquement (Setlow *et al.*, 2002).

L'IP est un marqueur d'ADN connu pour ne marquer que les cellules dont les membranes lipidiques ont perdu leur intégrité. Le traitement à l'éthanol entraîne bien une modification de l'intégrité de la structure sporale puisque l'IP pénètre au cœur des spores et marque l'ADN de ces dernières. Ainsi, l'inactivation semble corrélée à une perméabilisation, celle-ci étant observée à la fois pour les spores mutantes et pour les spores sauvages.

2.3.1.2. Autres barèmes de traitement

D'autres barèmes de traitement ont été étudiés dans le but d'identifier les structures modifiées par l'éthanol : 30, 50 ou 70% d'éthanol pendant 1 h à 70 °C. La Figure 52 présente ainsi les résultats de marquage et de viabilité obtenus.

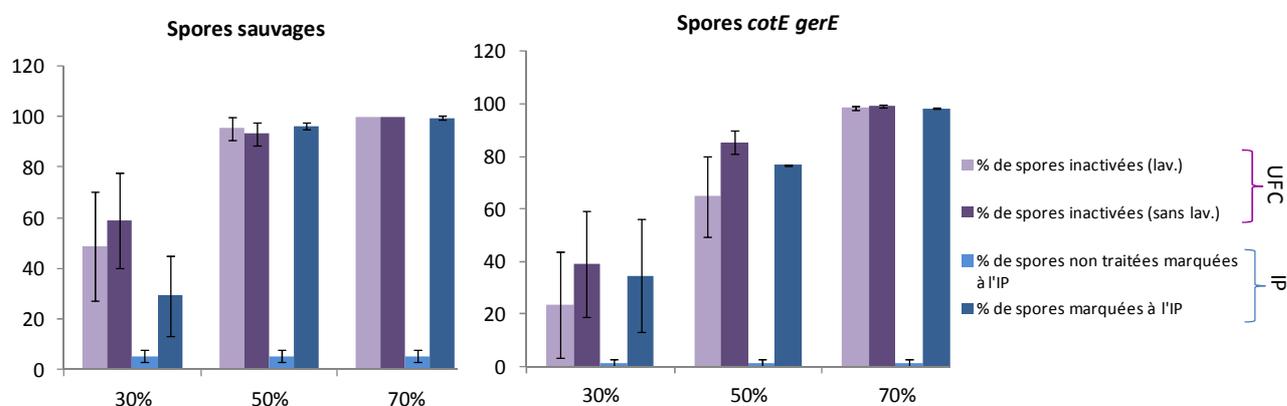


Figure 52 : Effet de traitements ethanol 30, 50 ou 70 % à 70°C pendant 1 h sur l'inactivation (en %) et le marquage à l'IP (en %) de spores de *Bacillus subtilis* sauvages ou mutantes (*cotE gerE*). (a) Traitement à 30 % (b) Traitement à 50 % (c) Traitement à 70%. lav. : lavages, sans lav. : sans lavage.

On observe une tendance pour laquelle les spores *cotE gerE* sont plus résistantes que les spores sauvages, quel que soit le barème utilisé. Pour le barème à 50 %, il semble que le lavage entraîne une sous estimation du nombre de spores inactivées pour les spores *cotE gerE*. Le barème à 30% correspond à environ 0,4 log de destruction (~59% d'inactivation) pour les spores sauvages comparé à 0,2 log (~39% d'inactivation) pour les spores mutantes. Les traitements 50 et 70% s'accompagnent de 1,2 (~ 93,3 %) contre 0,8 (~ 85 %) et 2,8 (~ 99.9 %)

contre 2,1 (99.3 %) log de destruction pour les spores sauvages et mutantes respectivement. Pour ces traitements, on observe également une bonne corrélation entre le marquage à l'IP et l'inactivation des spores, notamment pour les spores mutantes. Ainsi les spores inactivées correspondent aux spores perméabilisées. Cette corrélation est moins nette pour les spores sauvages traitées à l'éthanol 30%. Il est possible qu'une partie des spores mortes n'ait pas été perméabilisées. La variabilité observée dans les valeurs d'inactivation peut également expliquer ces différences. Il est à noter que le pourcentage de spores marquées à l'IP n'évolue pas si celles-ci sont marquées le lendemain ou surlendemain après le traitement. La perméabilisation créée par l'éthanol n'est ainsi pas réversible.

2.3.1.3. Etude de la perméabilisation

La Figure 53 illustre la perméabilisation de spores sauvages et mutantes après un traitement à l'éthanol 50% ou 70% pendant 1 h à 70 °C.

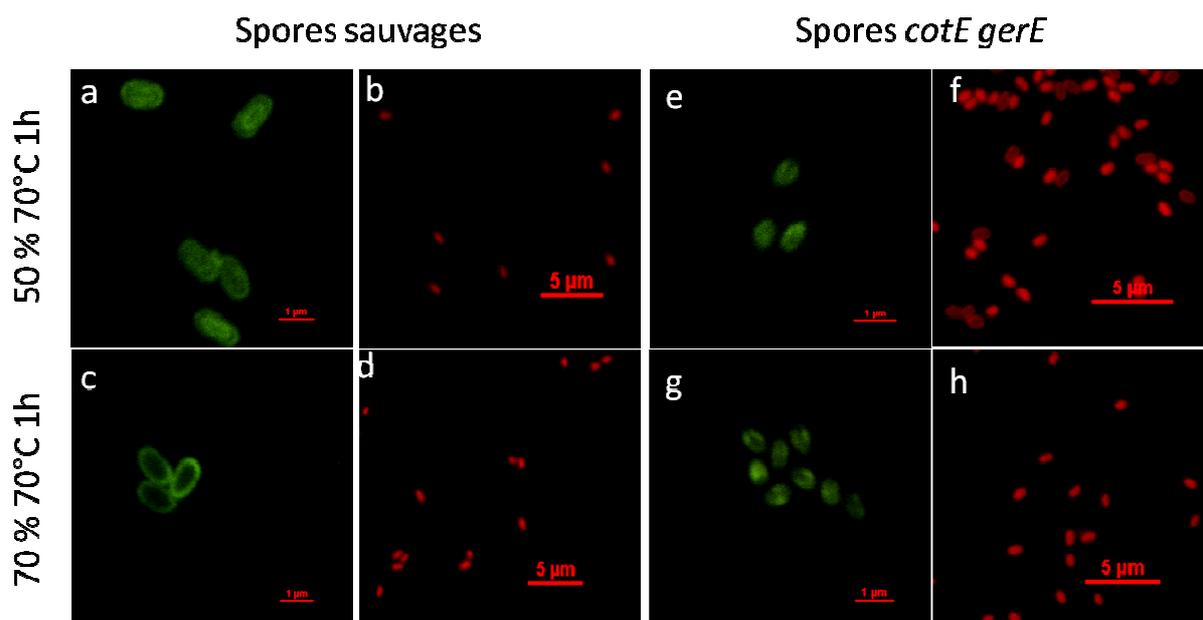


Figure 53 : Observation en microscopie confocale de spores de *Bacillus subtilis* après traitement à l'éthanol 50% (a, b, e, f) ou 70% (c, d, g, h) pendant 1 h à 70 °C. (a,c,e,f) Images en fluorescence obtenues en microscopie confocale de spores sauvages (a,c) et *cotE gerE* (e,g) marquées au Bodipy-C₁₂. Images en fluorescence obtenues en microscopie confocale de spores sauvages (b,d) et *cotE gerE* (f,g) marquées à l'IP.

Les spores traitées à l'éthanol sont effectivement altérées puisque l'IP peut pénétrer jusque dans le protoplaste (Figure 53b, d, f et h). La sonde hydrophobe Bodipy-C₁₂ qui ne pouvait pas pénétrer profondément dans des spores marquées après sporulation, semble pénétrer après traitement dans des structures plus profondes. Cependant, des différences sont observées selon

les traitements et selon la souche. En ce qui concerne la souche sauvage, le traitement à 50 % 70 °C 1h permet de marquer une structure interne, la plupart des spores étant marquées (Figure 53a). Le traitement à 30% donne des résultats similaires, bien que moins de spores soient marquées. Le traitement 70% donne des résultats assez différents. En effet, les spores observées sont la plupart du temps marquées seulement en périphérie (Figure 53c), de manière similaire à des spores non traitées. On peut supposer que la membrane interne est trop altérée pour que la sonde puisse s'y fixer, les spores étant pourtant perméabilisées comme le montre la Figure 53d. Des résultats similaires sont obtenus lorsque les spores sauvages sont traitées à 70 % 65 °C pendant 2h.

Pour les spores mutantes, les résultats sont assez différents. En effet, de la même manière pour le traitement à 50% (Figure 53e), les spores présentent une fluorescence, ce qui n'était pas le cas pour des spores non traitées. Ce type de marquage est également observé pour les spores traitées à 70% (Figure 53g) ou 70% à 65 °C pendant 2 h. Ce résultat peut signifier que pour ces traitements la membrane interne des spores mutantes est moins altérée ce qui concorderait avec leur résistance plus élevée par rapport aux spores sauvages.

2.3.2. Modification des structures

L'utilisation de sondes fluorescentes a permis de mettre en évidence la perméabilisation des structures de la spore. Cependant, les mécanismes conduisant à cette perméabilisation restent hypothétiques, d'autres méthodes ont alors été utilisées.

2.3.2.1. Analyse FTIR des spores traitées à l'éthanol

Modification des protéines

Des spores sauvages et sans enveloppe traitées à l'éthanol 70% à 65 °C pendant 2 h ont été passées en spectroscopie infrarouge pour évaluer les modifications des différentes structures. La Figure 54 présente l'impact du traitement sur le spectre Amide I et Amide II.

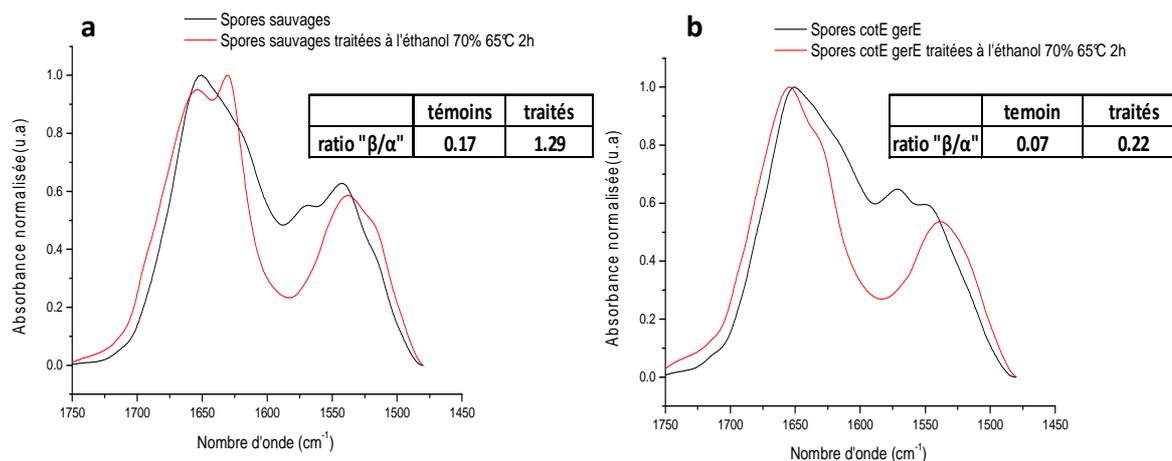


Figure 54 : Impact d'un traitement éthanol 70% 65 °C 2 h sur la structure secondaire des protéines de spores de *Bacillus subtilis*. (a) Spectres infrarouge obtenus pour les spores sauvages. (b) Spectres infrarouges obtenues pour des spores *cotE gerE* (sans enveloppe). Le ratio β/α correspond à l'intensité normalisée mesurée à environ 1615-1618/1655-1656 cm⁻¹ pour les spores non traitées et à 1628/1657-1658 cm⁻¹ pour les spores traitées.

Pour les spores sauvages, on peut constater que le traitement à l'éthanol s'accompagne d'une modification importante de la région Amide I des protéines. Un déplacement de la position du pic correspondant à la structure en hélice α (1655 à 1658 cm⁻¹) est visible, et l'apparition importante d'un pic à 1628 cm⁻¹ correspondant à une structure en feuillet β . Le rapport β/α indique bien une augmentation de la proportion de cette structure. Ces modifications observées dans le spectre infrarouge sont les résultats d'un changement dans la structure secondaire des protéines due notamment à leur dénaturation, de manière similaire à ce qui est observé pour des spores qui ont subi un traitement à l'autoclave (Perkins *et al.*, 2004). Au contraire, pour les spores mutantes sans enveloppe, on observe un très léger shift dans la position du pic correspondant à la structure en hélice α (1655 à 1655-1656 cm⁻¹). De plus, le pic correspondant à la structure en feuillet β ne semble pas apparaître, ce que traduit le rapport β/α qui reste faible comparé aux spores sauvages. Ces résultats semblent montrer que les protéines principalement modifiées par le traitement éthanol sont les protéines de l'enveloppe. Les autres protéines présentes dans la spore ne seraient pas ou peu modifiées, ou sont présentes en trop faible quantité pour être détectées en infrarouge.

La modification de la structure des protéines a également été suivie par infrarouge pour les spores sauvages traitées à 30, 50 ou 70% (1 h à 70 °C), comme le montre la Figure 55.

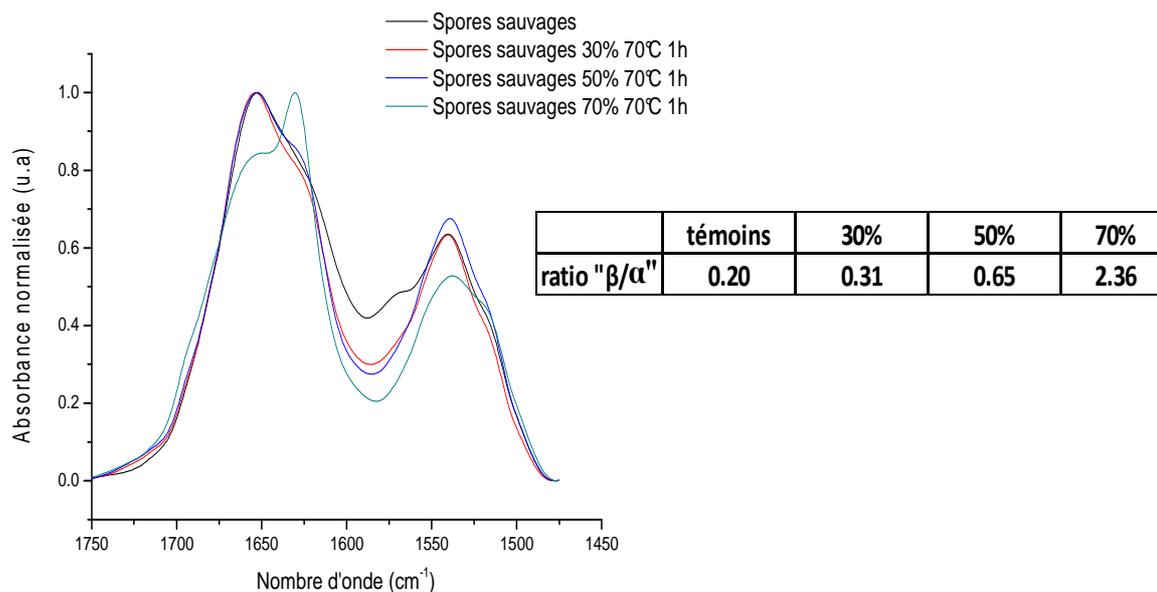


Figure 55 : Impact de traitements à différents pourcentage d'éthanol (30, 50, 70%) pendant 1 h à 70 °C sur la structure secondaire des protéines de spores de *Bacillus subtilis*. Le ratio β/α correspond à l'intensité normalisée mesurée à environ 1615-1618/1655-1656 cm^{-1} pour les spores non traitées et à 1628/1657-1658 cm^{-1} pour les spores traitées.

La structure secondaire protéique en feuillet β augmente avec le pourcentage d'éthanol et devient très importante avec le traitement à 70% 70 °C 1h (supérieure au traitement à 65 °C 2 h). L'augmentation de température de 5 °C semble entraîner une dégradation plus importante des protéines malgré un temps de traitement moins long (1 h contre 2 h). Ainsi, l'augmentation du pourcentage en éthanol s'accompagne d'une augmentation de la dégradation des protéines de l'enveloppe, bien que cette structure n'ait pas de rôle dans la résistance à l'éthanol.

Cependant, la spectroscopie infrarouge ne permet pas d'observer s'il s'agit d'une réponse tout ou rien, c'est-à-dire si quelques spores sont particulièrement touchées ou si chaque spore est plus ou moins endommagée.

Acide dipicolinique (DPA) et hydratation

La Figure 56 présente des exemples de résultats obtenus dans la région correspondant au pic principal du DPA, c'est-à-dire aux alentours de 1279 cm^{-1} .

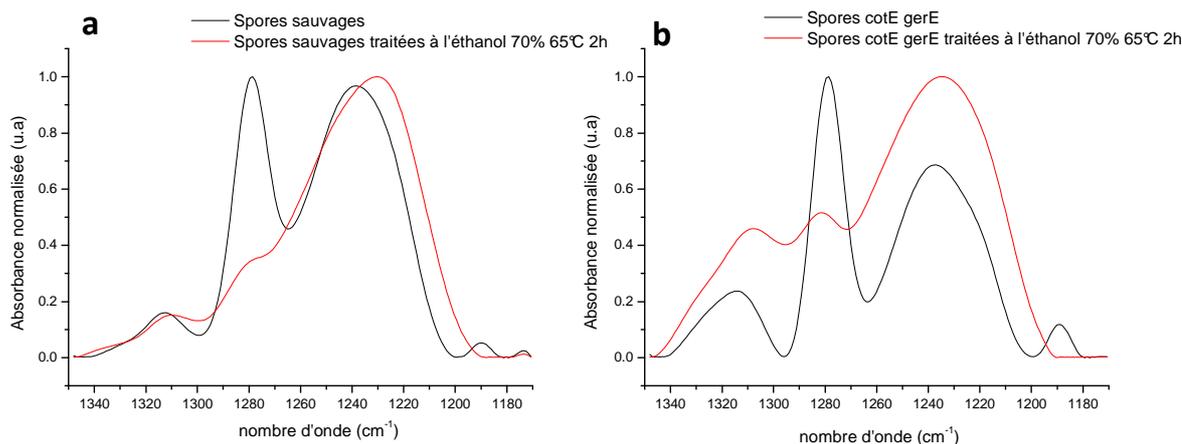


Figure 56 : Impact d'un traitement éthanol 70% à 65 °C 2 h sur la présence de DPA dans les spores de *Bacillus subtilis*. (a) Spectres infrarouge obtenus pour les spores sauvages (b) Spectres infrarouge obtenus pour les spores *cotE gerE*

De manière similaire à ce qui a été observé lors de la germination (cf 2.1.1), les spores sauvages montrent une diminution importante du pic correspondant au DPA suite au traitement éthanol. Pour les spores mutantes, on observe également une diminution de la quantité de DPA, bien qu'il semble qu'une petite quantité soit encore présente. Cette diminution de la quantité de DPA s'observe également par la disparition de l'épaulement à 1570 cm^{-1} , comme observée en Figure 54. Ce résultat est en concordance avec ce qui a déjà été observé (Setlow *et al.*, 2002). La Figure 57 présente les résultats obtenus pour les autres barèmes de traitement ainsi que des images correspondantes obtenues en microscopie à contraste de phase.

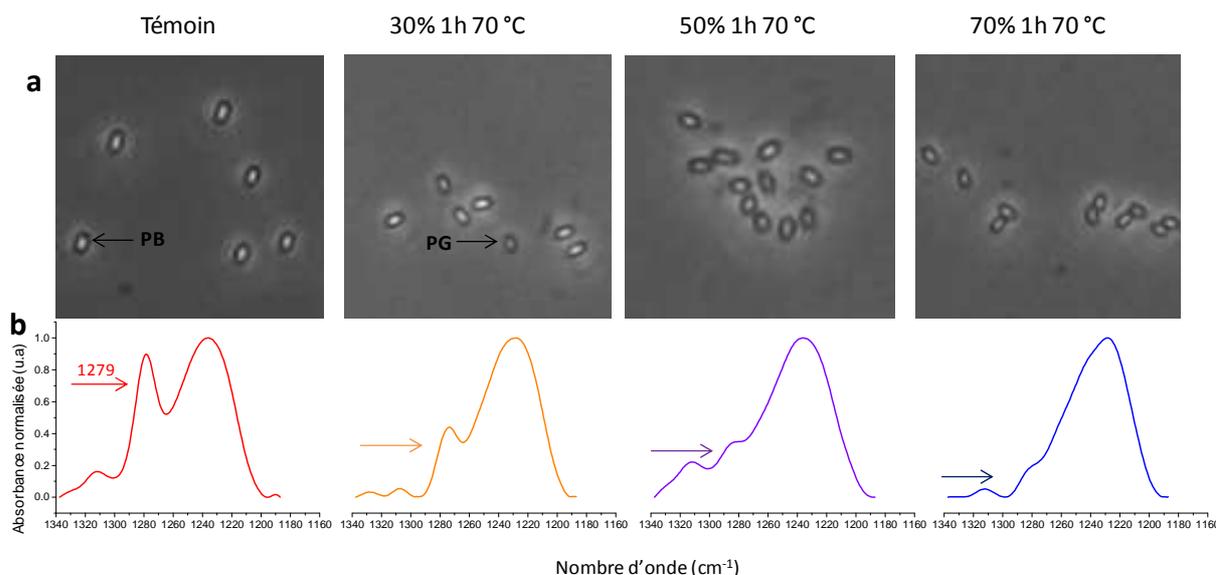


Figure 57 : Impact de traitements à différents pourcentage d'éthanol (30, 50, 70%) pendant 1 h à 70 °C sur la réfringence (a) et la présence de DPA (b) de spores sauvages de *Bacillus subtilis*. PB : phase bright. PG : phase grey.

On observe que le traitement à 70% est celui qui entraîne la plus grande perte en DPA suivi par le traitement à 50%. Cependant, comme pour la structure secondaire des protéines, on peut se demander si chaque spore libère plus ou moins de DPA ou s'il s'agit d'un nombre limité de spores ayant libéré tout le DPA. Les images en contraste de phase nous donnent quelques informations supplémentaires. On peut observer que bien que les spores ne deviennent pas « phase dark », celles-ci perdent une partie de leur réfringence et ainsi le nombre de spores « phase grey » augmente avec la sévérité du traitement. Cette perte de réfringence est associée pour des spores en germination à la libération du DPA et à l'hydratation du protoplaste (Kong *et al.*, 2010; Kong *et al.*, 2011).

Dans tous les cas, ces résultats suggèrent un changement important dans une des barrières de perméabilité, probablement la membrane interne. La quantité de DPA restante dans les spores semble corrélée à la viabilité. En effet, on constate que plus le traitement entraîne d'inactivation plus la quantité de DPA perdue est importante. Ces résultats sont concordants avec la littérature qui suggère que la perte de DPA avec l'hydratation associée du protoplaste serait responsable de l'inactivation des spores par ces traitements (Setlow *et al.*, 2002).

2.3.2.2. Evolution de la viscosité

L'utilisation du FLIM sur des spores traitées à l'éthanol a été envisagée afin de visualiser l'effet de l'éthanol sur la viscosité de la membrane interne des spores. Pour cela, les spores ont été marquées après le traitement (et les lavages) pour que la sonde ne soit pas altérée par celui-ci.

Spores sauvages

Les traitements à 70% d'éthanol ne sont pas présentés puisque seule l'enveloppe semble être marquée. Comme observé en Figure 53, les spores sont marquées différemment selon les traitements. La Figure 58 présente les résultats obtenus sur les spores sauvages entières.

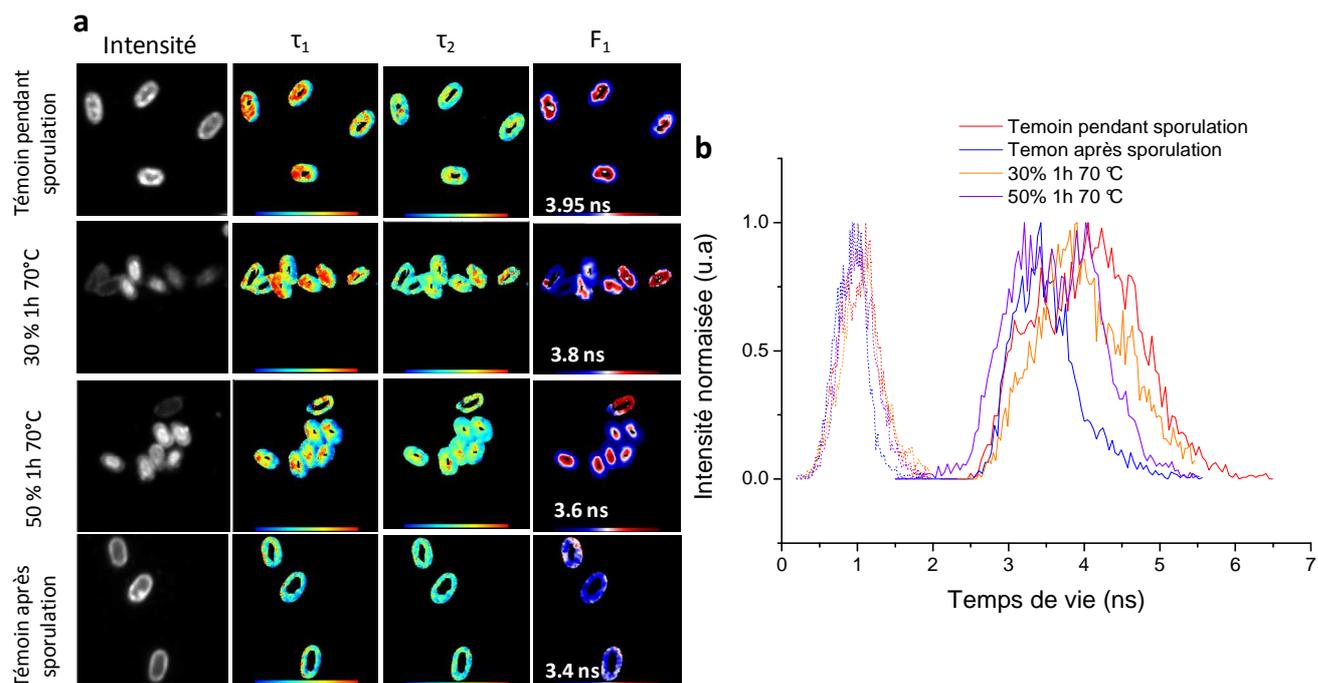


Figure 58 : Impact de traitements éthanol 30 et 50% 1 h à 70 °C sur les spores sauvages de *Bacillus subtilis*. (a) Images en intensité, temps de vie τ_1 (échelle 2,5 à 5 ns) et τ_2 (échelle 0,2 à 2 ns) et intensité fractionnelle de τ_1 (15 à 80%). La valeur en blanc correspond à la valeur utilisé pour le fit global. (b) Histogramme de la répartition des temps de vie τ_1 et τ_2 selon le traitement utilisé.

La valeur de τ_1 évolue avec le traitement. En effet la couleur rouge, représentant les valeurs les plus élevées, diminue avec le traitement (Figure 58a). Les spores traitées à 50% d'éthanol présentent les modifications les plus importantes. La Figure 58b montre également la tendance pour laquelle la valeur de τ_1 diminue avec le pourcentage d'éthanol. La proportion du pré-pic observé sur des spores marquées au cours de la sporulation (~ 3,3 ns) augmente en termes d'aire dans les spores traitées. Le Tableau 7 présente ainsi la proportion moyenne obtenue en déconvoluant l'histogramme de τ_1 en deux Gaussiennes.

Tableau 7 : Proportion et valeurs moyennes de τ_1 pour des spores de *Bacillus subtilis* traitées à l'éthanol.

τ_1		Témoin pendant sporulation		Témoin après sporulation	30% 1 h 70 °C		50% 1 h 70°C	
pic 1 (ns)	pic 2 (ns)	3,3	4,3	3,2	3,3	4,0	3,1	3,8
Proportion (%)	Proportion (%)	16,8	83,2	100,0	24,6	75,4	40,2	50,8

Pour ces résultats, seules les spores marquées sont prises en compte. La valeur moyenne de 3,3 ns obtenue pour les spores non traitées a été attribuée précédemment à la membrane externe. Pour des spores marquées après la sporulation, pour lesquelles la sonde ne peut pas

pénétrer très profondément, la valeur obtenue est très proche puisque seule cette membrane semble pouvoir être marquée. Les spores traitées à l'éthanol montrent des différences. La proportion du pic 1 (membrane externe) augmente en même temps que la sévérité du traitement : 17% pour le témoin, 25 et 40% pour les traitements à 30 et 50% d'éthanol respectivement. Sa valeur n'est pas différente du témoin en ce qui concerne le traitement à 30% mais est significativement différente pour le traitement à 50%, bien que les valeurs restent proches.

Le pic 2 a quant à lui été attribué à la membrane interne. Sa proportion évolue de manière inverse par rapport au pic 1. On note une diminution avec le traitement, passant de 83 % pour le témoin à 51% pour les spores traitées à 50% d'éthanol. Sa valeur est également modifiée puisque la valeur passe de 4,3 ns à 4 et 3,8 ns pour les traitements à 30 et 50% respectivement, les différences étant significatives. Ces résultats indiquent que la membrane interne est modifiée par le traitement éthanol avec une diminution globale de sa viscosité (augmentation de la proportion de valeurs proche de 3 ns et diminution de la valeur proche de 4 ns). Ainsi, la modification de la membrane interne semble progressive, son altération évolue avec la sévérité du traitement. La membrane va jusqu'à perdre son intégrité de manière drastique pour les traitements à 70% d'éthanol puisque les spores sauvages ne montrent pas de marquage avec le Bodipy-C₁₂ (Figure 53).

Spores sans enveloppe

En ce qui concerne les spores sans enveloppe, les résultats obtenus sont un peu différents. L'éthanol semble également provoquer une diminution de la fluidité membranaire, de la même manière que précédemment, comme le montre la Figure 59.

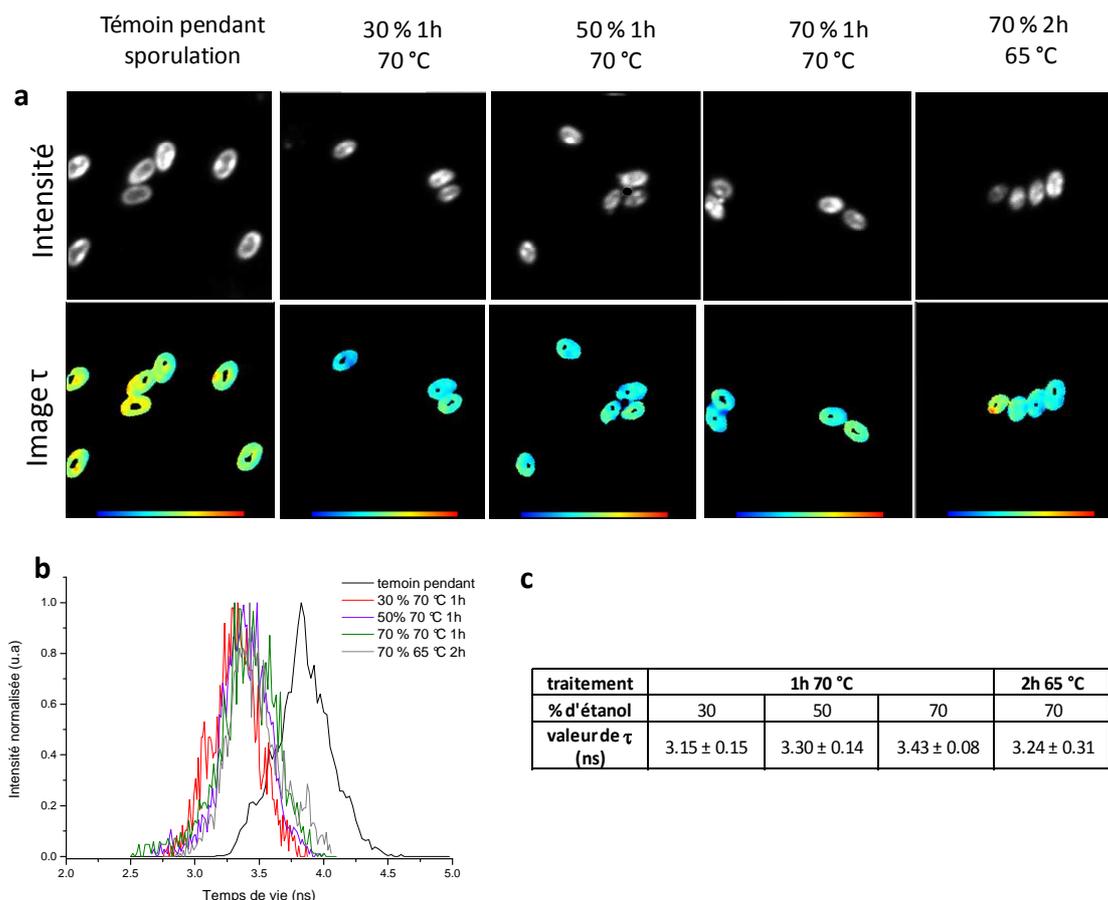


Figure 59 : Impact de stress éthanol 30, 50 et 70% 1 h à 70 °C et 70 % 2h à 65 °C sur les spores mutantes de *Bacillus subtilis*. (a) Images en intensité et en temps de vie τ_1 (échelle 2,5 à 5 ns). (b) Histogramme de la répartition des temps de vie selon le traitement utilisé. (c) Valeurs moyennes de τ et des (FWHM/2) correspondants selon le traitement utilisé.

En général, les spores présentant une plus faible intensité du signal sont les spores présentant une plus forte rigidité. On peut ainsi supposer que ce sont des spores qui sont moins touchées. Contrairement, aux spores sauvages, la fluidification des membranes ne semblent pas se faire de manière progressive, lorsque les spores sont touchées par l'éthanol, on mesure une valeur de τ proche de 3,2-3,3 ns (Figure 59c). Cette valeur est proche du pic 1 qui augmente pour les spores sauvages. De manière étonnante, il semble même que pour le traitement 1 h à 70 °C, plus le pourcentage d'éthanol augmente plus la valeur de τ est élevée. Ceci correspond à une rigidification de la membrane par l'éthanol qui peut, peut-être, être reliée aux dénaturations protéiques membranaires.

Etonnamment, la présence de l'enveloppe (et de la membrane externe) semble atténuer la fluidification de la membrane interne mais ne protège pas de l'inactivation et de la perméabilisation.

La mise en place préalable d'outils de caractérisation des structures de la spore nous a permis d'analyser l'évolution des couches de la spore sous différentes conditions environnementales. Ainsi, la germination des spores permet de diminuer la viscosité de la membrane interne (division par $\sim 1,9$) et de retourner à la fluidité d'une membrane classique. De même, les propriétés vibrationnelles des structures par rapport aux infrarouges (FTIR) s'approchent des propriétés d'une cellule végétative. Les modifications provoquées par la température ont également été étudiées. Une température (entre 60 et 70 °C), proche de la température d'activation de la germination, modifie également la mobilité des structures. Celle-ci provoque une « ouverture » d'au moins une des couches de la spore, probablement le cortex, améliorant l'accessibilité de composés fluorescents comme le DPH. Cette plage de température permet également d'observer une légère reprise de mobilité de la membrane interne, confirmant son état rigide et très ordonné. Cet état peut par contre être modifié de manière beaucoup plus importante par un traitement combinant à la fois température et éthanol à un pourcentage élevé. Une diminution de la viscosité de la membrane interne est ainsi observée accompagnée d'une augmentation de la perméabilité (entrée de sondes fluorescentes et libération du DPA). L'éthanol a également un effet important sur les protéines de l'enveloppe, une dénaturation progressive de celles-ci apparaît graduellement avec le pourcentage d'éthanol. Cependant, cette couche ne semble pas avoir de rôle dans l'inactivation qui accompagne les modifications structurales de la spore.

DISCUSSION GENERALE

DISCUSSION GENERALE

Les spores bactériennes sont des formes de résistance extrême pouvant être responsables d'intoxications alimentaires ou de dégradation de la qualité des aliments. Les particularités de la spore, et notamment sa composition et sa compartimentation, sont à l'origine de son extrême résistance. Néanmoins, il subsiste encore des questions quant au rôle et à l'organisation des différentes structures. Nous avons mis en place différentes méthodes d'analyses afin d'étudier les propriétés de la spore, notamment l'utilisation d'un rotor moléculaire couplée à l'imagerie en temps de vie. L'importante valeur de viscosité mesurée pour la membrane interne soulève ainsi la question de l'état de cette membrane. En effet, ses propriétés particulières sont encore peu comprises au regard de sa composition. La présence de l'épais cortex et de sa résistance mécanique soulève également des questions quant à l'interaction de ces deux structures notamment lorsque la température vient perturber cet équilibre. L'utilisation d'éthanol est, semble-il, nécessaire pour perméabiliser les structures sporales sans les détruire complètement. La question sous-jacente est de comprendre son mode d'action.

Étude des propriétés de la membrane interne des spores bactériennes

Viscosité de la membrane de cellules végétatives

La viscosité des membranes a été estimée par l'utilisation de sondes fluorescentes comme le DPH (dont l'anisotropie reflète leur mouvement de rotation dans la membrane), par l'utilisation de rotors moléculaires ou encore par d'autres méthodes comme la résonance paramagnétique électronique (RPE) (Shechter, 1990; Demchenko *et al.*, 2009). Cette viscosité correspond à la liberté relative de mouvement pour ses composants, en particulier les phospholipides, et correspond à la combinaison de différents types de mobilité (Figure 60). Les valeurs rapportées par les différentes méthodes dépendent de la sonde mais aussi de sa localisation dans la membrane. Il n'est pas exclu que la sonde suivant sa concentration puisse affecter même marginalement le comportement et l'organisation de la membrane.

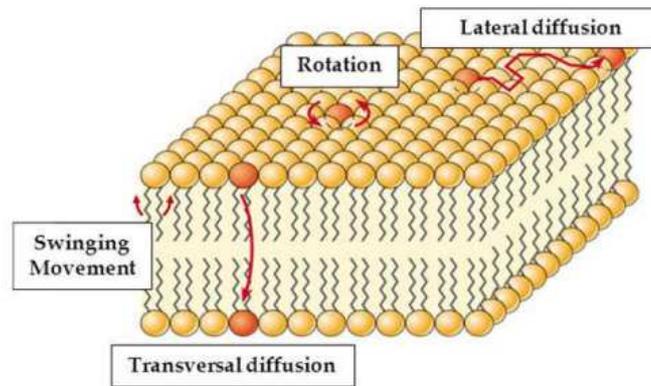


Figure 60 : Schéma des différentes mobilités des phospholipides à l'intérieur de bicouches lipidiques

Peu de valeurs de viscosités sont reportées pour les membranes de cellules bactériennes. Haidekker *et al.*, ont ainsi rapporté des valeurs de viscosités variant de 70 à 120 cP selon la température dans des bicouches phospholipidiques artificielles (Haidekker *et al.*, 2001). La viscosité membranaire de vésicules issues d'*E. coli* a également été mesurée par RPE. Ainsi, une mesure de viscosité de 250 cP pour des vésicules issues de cellules cultivées à 23 °C a été mesurée (Sinensky, 1974). Une microviscosité apparente ($\tilde{\eta}$) peut aussi être estimée à partir de l'anisotropie de fluorescence en utilisant l'équation de Perrin, comme décrite par Shinitzky and Barenholz (Shinitzky and Barenholz, 1978).

$$\tilde{\eta} = \frac{2,4r_s}{r_0 - r_s} \quad \text{Équation 11}$$

avec $\tilde{\eta}$, microviscosité en poise ; r_s , anisotropie de fluorescence du DPH et r_0 , anisotropie limite de fluorescence du DPH égale à 0,362.

Cette équation permet de mesurer une valeur de microviscosité avec une approximation de $\pm 15\%$. Ainsi, cette équation a déjà été utilisée, par exemple, pour mesurer des viscosités de membrane plasmique isolée à partir de foie de rats (258 cP) ou de liposomes composés de différentes proportions en cholestérol et lécithine d'œuf (100 à 500 cP) (Salgia *et al.*, 1993; Pandey and Mishra, 1999). Les expérimentations réalisées en spectrofluorimétrie avec le DPH, nous ont permis de mesurer une valeur d'anisotropie de 0,186 en moyenne à 25°C et de 0,211 à 20°C pour les cellules végétatives de *B. subtilis*. Ces valeurs sont proches de celles déjà mesurées sur des cellules entières de *B. subtilis* (Ishihara *et al.*, 1999; Cao-Hoang *et al.*,

2008). En utilisant l'Équation 11, les valeurs d'anisotropie obtenues sur *B. subtilis* correspondent à des valeurs de microviscosité apparente de 265 cP et 330 cP respectivement. Les valeurs de viscosités calculées, sont environ 1,5 fois plus faible que celles obtenues grâce aux rotors moléculaires. Cette divergence a également été observée entre des valeurs de viscosités mesurées dans des cellules humaines avec le FLIM (140 cP) ou avec l'anisotropie résolue dans le temps (80 cP) (Kuimova *et al.*, 2008). Les différences entre les valeurs obtenues par le DPH et par FLIM peuvent provenir de plusieurs points. D'une part, la diffusion rotationnelle gouverne la tendance naturelle d'un rotor moléculaire à former un état « twisté » et donc relie la diffusivité au rendement quantique de fluorescence et au temps de vie de fluorescence. Ainsi, les rotors moléculaires informent sur la diffusivité de façon similaire à des sondes mesurant l'anisotropie, comme le DPH. Cependant, le facteur dominant dans leur émission de fluorescence est la rotation d'un segment par rapport à un autre. Ce segment est généralement petit et bénéficie d'une plus grande liberté de rotation qu'une sonde comme le DPH (Haidekker and Theodorakis, 2010). De plus, bien que ces deux sondes se localisent parallèlement à la chaîne acylé des phospholipides, certaines expériences ont montré que le DPH peut également s'introduire dans le centre de la bicouche lipidique, parallèlement à la surface (Van der Heide *et al.*, 1996). Cependant, les deux méthodes indépendantes s'accordent sur le même ordre de grandeur de viscosité.

Cas particulier de la membrane interne

A l'état physiologique, les phospholipides d'une membrane biologique, et en particulier ceux d'une bactérie, sont majoritairement dans un état liquide-cristallin (L_α). Cet état est essentiel pour les fonctions membranaires : transport passif de solutés, activité d'enzymes membranaires, transport actif, ... En effet, dans cette phase, les lipides adoptent une conformation et une orientation désordonnée (Herbert, 1981). Dans des membranes modèles, une modification des conditions environnementales (déshydratation, diminution de la température, pression) peut induire une transition de phase de l'état liquide cristallin (L_α) vers l'état gel (L_β) pour lequel les lipides adoptent une conformation plus ordonnée (Shechter, 1990; Beney and Gervais, 2001). L'état L_α , plus mobile, implique une viscosité plus faible de la bicouche par rapport à un état gel. La Figure 61 présente une schématisation des ces deux états membranaires.

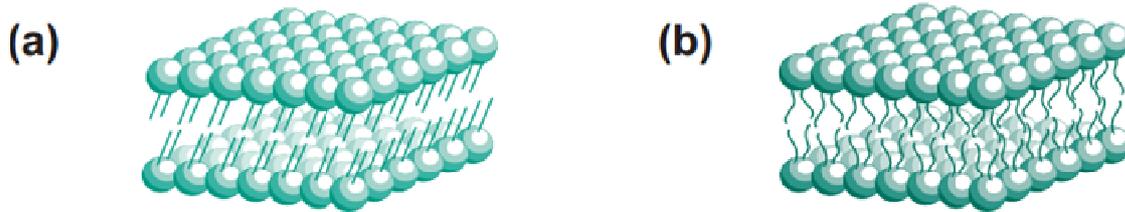


Figure 61 : Schéma présentant les arrangements possibles des phospholipides dans une bicouche modèle. (a) phase gel notée L_{β} . (b) phase liquide cristalline notée L_{α} (Vigh *et al.*, 1998).

La valeur d'anisotropie que nous avons mesurée pour des spores après une rampe de température est de $0,28 \pm 0,025$ (~830 cP, Équation 11) et a été attribuée majoritairement à la membrane interne. Cette valeur est environ 1,6 fois plus élevée que celle mesurée dans les cellules végétatives et est signe d'une importante viscosité. De même, la viscosité mesurée dans la membrane interne par le rotor moléculaire Bodipy-C₁₂ est très élevée (~1100 cP). L'équipe anglaise du Dr Marina Kuimova a réalisé des mesures de la décroissance de fluorescence du Bodipy-C₁₂ sur des bicouches de 1,2-dipalmitylphosphatidylcholine (DPPE). Ils ont ainsi observé que le déclin de fluorescence du rotor est monoexponentiel quand la bicouche est à un état fluide désordonné (au dessus de la température de transition) mais que le déclin devient biexponentiel lorsque la bicouche est dans un état gel. Les valeurs de temps de vie mesurées ($1,5 \pm 0,1$ ns et $4,5 \pm 0,3$ ns) sont alors très proches de celles mesurées dans les spores sauvages (Wu *et al.*, 2013). Ainsi, bien que le déclin ne semble pas biexponentiel dans les spores mutantes, ces données appuient l'hypothèse d'un état gel de la membrane interne des spores. L'importante valeur de viscosité mesurée concorde avec une faible dynamique membranaire et probablement à un état gel d'une partie ou de la totalité de la membrane. En effet, une transition de phase de phospholipides (par une diminution de température par exemple) s'accompagne d'une importante augmentation de la viscosité. Par exemple, des extraits phospholipidiques de cellules d'*E. coli* produites à 43 °C présente une viscosité de 200 cP (obtenue en RPE) à cette même température et de 1500 cP à 15 °C, la transition de phase étant mesurée à 27 °C (Sinensky, 1974). Ces conclusions sont cohérentes avec la littérature. En effet, des mesures réalisées en FRAP avec le di-4-ANEPPS sur des spores dormantes ont montré que la mobilité des lipides est très faible dans la membrane interne. La fraction mobile de la sonde mesurée dans la membrane des spores n'est que de 0,31 comparée à celle de 0,75 mesurée dans des spores germées ou des cellules végétatives. Les auteurs suggèrent ainsi que le feuillet interne de cette membrane pourrait être en partie dans une phase gel (Cowan *et al.*, 2004). L'utilisation du Laurdan sur les spores de *C.*

sporogenes suggère également un état compressé (« lipid packing ») et un degré d'ordre important des lipides de cette membrane (Hofstetter *et al.*, 2012).

Comment la membrane interne peut maintenir sa bicouche phospholipidique à l'état gel à température ambiante ?

D'après la littérature, la composition phospholipidique de la membrane interne des spores est peu différente de celles d'une cellule végétative, bien que l'on note une proportion plus importante en CL (Cardiolipides) (Kawai *et al.*, 2006; Griffiths and Setlow, 2009). A l'état végétatif, les lipides de *B. subtilis* sont à état L_{α} . La composition lipidique n'est donc pas responsable de cet état gel. Deux facteurs essentiels peuvent permettre de comprendre l'état particulier de cette membrane interne : la compaction membranaire (pression latérale) et la faible hydratation interne.

Au cours de la sporulation, le cortex se met en place entre les deux membranes. La déshydratation du protoplaste (a_w interne entre 0,4 et 0,6) implique qu'une contrainte et/ou un support mécanique soit apporté par le cortex à la membrane interne (Popham, 2002) afin qu'elle puisse créer puis maintenir un fort gradient osmotique de part et d'autre de cette membrane. Cette contrainte mécanique peut être assimilée à une pression hydrostatique qui s'appliquerait sur cette membrane et serait responsable de son état compacté (Cowan *et al.*, 2004; Hofstetter *et al.*, 2012). De manière générale, l'application d'une pression élevée sur une biomembrane (à une température donnée) va entraîner une diminution de sa fluidité qui peut être accompagnée par une transition de phase réversible des lipides (Kato and Hayashi, 1999; Denich *et al.*, 2003; Winter and Dzwolak, 2005). Le cortex pourrait ainsi être en partie responsable de l'état gel de la membrane interne et de son maintien (ceci sera plus détaillé dans une partie suivante).

La sporulation est également accompagnée par une sortie d'eau de la spore, et le protoplaste contient une faible teneur en eau (~ 27 à 50 %) (Nicholson and Setlow, 1990; Storz and Hengge, 2011). L'eau possède un rôle structurant pour les membranes des microorganismes. La déshydratation a tendance à rapprocher les têtes polaires et peut également induire une transition de phase des phospholipides (Beney and Gervais, 2001; Ragoonanan *et al.*, 2008). Par exemple, la variation de la pression osmotique est responsable d'une transition de phase des phospholipides extraits d'*E. coli* entre 10 et 40 MPa. L'utilisation du DPH a également montré une augmentation de la viscosité de la membrane de cellules entières d'*E. coli* entre 1,38 et 40 MPa et qui demeure presque constante au-delà de 40 MPa (Beney *et al.*, 2004).

Cette faible hydratation n'est présente que du côté interne de la membrane ce qui pourrait induire une différence de structure entre les feuillettes internes et externes de la membrane interne.

Ainsi, la forte déshydratation du protoplaste et la contrainte mécanique créée par le cortex pourraient, de manière couplées ou non, être responsables de la viscosité importante mesurée dans la membrane interne des spores.

Approche de l'état de la membrane interne

Les mesures effectuées en spectrofluorimétrie ont permis de constater que l'on peut s'approcher de la valeur d'anisotropie associée principalement à la membrane interne ($0,28 \pm 0,025$) en diminuant la température de l'environnement des cellules végétatives. Ainsi, l'anisotropie du DPH atteint une valeur de $0,27 \pm 0,02$ lorsque les cellules atteignent une température de 5 °C. La composition des cellules végétatives et des spores étant proches, on pourrait penser qu'à même viscosité, la membrane de la spore est dans un état proche de la membrane d'une cellule végétative à 5 °C (état gel de la majorité des phospholipides).

Cependant, certaines propriétés peuvent nous faire penser que l'état gel de la membrane interne est différent de celui obtenu à basse température sur des cellules végétatives :

- les propriétés de perméabilité

Nous avons pu observer dans cette étude que des sondes fluorescentes polaires comme l'acridine orange ou apolaires comme le Bodipy-C₁₂ ne peuvent pas pénétrer profondément dans la spore si elles sont ajoutées après sporulation. L'acridine orange, à laquelle les membranes de cellules végétatives sont généralement perméables (Han and Burgess, 2010), montre un marquage périphérique précédemment attribué au cortex dans les spores bactériennes (Setlow *et al.*, 2002; Magge *et al.*, 2009).

Pour le rotor moléculaire utilisé, son statut hydrophobe suggère, comme montré précédemment pour des sondes lipophiles (di-4-ANEPPS ou le 10-N-nonyl acridine orange) (Magge *et al.*, 2009), que le marquage des spores sauvages est associé aux protéines de l'enveloppe (et éventuellement la membrane externe). Nos expérimentations réalisées sur les spores mutantes *cotE gerE* appuient cette hypothèse. Il est suggéré que l'état compacté de la membrane interne ne permet à aucune de ces sondes apolaires fluorescentes de s'y insérer (Cowan *et al.*, 2004; Magge *et al.*, 2009) exceptés le Laurdan (Hofstetter *et al.*, 2012) et le DPH (ce travail et (Ishihara *et al.*, 1999)) semble pouvoir y pénétrer. Sur des membranes modèles, certains travaux ont relié la fluidité membranaire à la perméabilité à des solutés qui

traversent la membrane par des mécanismes de diffusion. La diminution de la fluidité, même d'un seul feuillet, semble suffisante pour réduire la perméabilité (Lande *et al.*, 1995; Hill *et al.*, 1999). Cependant, si sur des membranes modèles la compaction de la bicouche lipidique (par les hautes pressions ou par la diminution de la température) conduit à une diminution de la perméabilité passive, la présence de coexistences entre phase fluides et phase gel, où l'interface semble être un lieu privilégié de passage des solutés, peut au contraire l'augmenter (Macdonald, 1984; Crowe *et al.*, 1989; Clerc and Thompson, 1995). Ainsi, une cellule dont la membrane s'approche d'un état gel (par différentes perturbations dont la pression hydrostatique, le refroidissement et la déshydratation) a plutôt tendance à voir sa perméabilité membranaire augmenter.

Il est possible d'amener une membrane cellulaire au même niveau de fluidité que la membrane des spores. Par contre, il semble difficile d'obtenir les mêmes propriétés de perméabilités par modification physique de l'environnement (pression, température).

- La compression théorique de la membrane interne de la spore

D'après la littérature, la membrane interne est soumise à une augmentation de sa surface d'un facteur 1,6 pendant la germination (soit une augmentation de 60%) sans synthèse ni incorporations de nouveaux matériaux (Swerdlow and Setlow, 1984; Cowan *et al.*, 2004) ce qui suppose un très forte compaction initiale. Le passage d'une phase gel à une phase liquide cristalline d'une membrane modèle s'accompagne d'une augmentation de la surface de la bicouche (en termes d'aire par lipide). Par exemple une bicouche de DPPC voit sa surface par lipide augmenter de 36% au cours d'une transition de phase (L_{α} à L_{β}) par la température bien que cette valeur ait peut-être été surestimée par la méthode utilisée (Lis *et al.*, 1982). D'autres études plus récentes parlent d'environ 25% (Nagle, 1993; Ebel *et al.*, 2001). La compression surfacique apportée par une déshydratation ou une pression hydrostatique même très élevée ne permet pas non plus d'atteindre des variations de surface aussi importantes. Ainsi par exemple, la surface par lipide de bicouche de phosphatidylcholine est diminuée par environ 15% entre une humidité relative de 23% et un excès d'eau (White and King, 1985). La présence de protéines et la diversité des phospholipides dans une membrane cellulaire ont tendance à réduire ces variations.

Ainsi, le passage d'un état gel à un état liquide-cristallin lors de la germination ne semble pas suffisant à lui seul pour expliquer la variation de surface observée.

- La variation de la viscosité avec la température

Une augmentation de la température conduit à une diminution de la viscosité de la membrane des cellules végétatives (observée ici par une diminution de l'anisotropie du DPH). Des extraits phospholipidiques d'*E. coli* à l'état gel affichent une diminution de la viscosité avec la température (Sinensky, 1974). La membrane interne des spores semble réagir différemment. En effet, après une première rampe de température qui permet l'insertion du DPH dans la membrane interne, une modification de la température ne semble pas modifier fortement l'anisotropie (résultats non montrés). Les expérimentations réalisées avec le Bodipy-C₁₂ indiquent un comportement similaire, la viscosité n'étant que peu affectée par une modification de la température (pour un niveau inférieur à 65 °C). Il semble ainsi que la membrane soit dans un état particulier réagissant peu à la température ou qu'une structure, probablement le cortex empêche sa mobilité.

Pour expliquer ces particularités de la membrane interne, on peut envisager plusieurs hypothèses. La présence d'un état gel de l'ensemble des phospholipides au moins sur un feuillet pourrait expliquer la faible perméabilité. De plus, une deshydratation de membranes peut s'accompagner d'une endo-vésiculation (Beney *et al.*, 2004; Simonin *et al.*, 2007). Bien que ceci n'ait jamais été observé ou mis en évidence pour la membrane interne des spores, ceci pourrait expliquer l'augmentation de surface (Swerdlow and Setlow, 1984). Enfin, des modifications de structures des protéines liées à la déshydratation (Cowan *et al.*, 2004) et à la compression par le cortex et/ou une relocalisation de certaines protéines membranaires par la compression (Kato *et al.*, 2002) pourrait également expliquer la diminution de surface.

En conclusion, le Bodipy C₁₂ nous a permis de mesurer la viscosité de la membrane interne séparément de la membrane externe (ce que beaucoup d'autres sondes ne permettent pas car limitées par la résolution optique) mais ne permet pas d'approcher la structure directement. Les propriétés de viscosité et de perméabilité obtenues au niveau de la membrane interne des spores impliquent une structure particulièrement dense et probablement asymétrique de la membrane. L'hypothèse d'un état gel a ainsi été avancée, bien que celui-ci ne puisse à lui seul expliquer les comportements observés. Cet état ne peut s'expliquer par la composition de la membrane elle-même, il résulte plutôt des propriétés des compartiments qui l'entourent. L'évolution des propriétés des structures lors d'une variation de la température peut nous aider à améliorer la compréhension de cet état membranaire particulier.

Effet de la température sur les structures de la spore

Effet de la température sur la membrane interne

Nous avons émis dans ce travail l'hypothèse que la membrane interne soit en partie proche d'un état gel dans une spore dormante. Un suivi de la viscosité dans la spore en fonction de la température a été réalisé par la méthode FLIM. Celle-ci n'est que très peu modifiée par la température et il faut atteindre des températures de 70 °C pour commencer à observer une diminution de la viscosité de cette membrane. Dans une étude récente réalisée sur des spores de *Clostridium spp.*, les auteurs ont montré qu'un traitement à 90 °C modifie le degré d'ordre des lipides de la membrane interne des spores (Hofstetter *et al.*, 2013). Ces auteurs avaient également suggéré dans une étude précédente un état gel de cette membrane en utilisant la sonde Laurdan (Hofstetter *et al.*, 2012). Ces spores de *Clostridium* ont été soumises à des rampes de températures et une chute du GP du Laurdan pour une température de 70-75 °C a été observée, traduisant une diminution de l'ordre des lipides (Hofstetter, 2012). L'étude a également permis d'observer à l'aide de la méthode FT-IR des modifications de la vibration à 2850 cm^{-1} . Ces auteurs ont alors suggéré qu'un passage de l'état gel à l'état liquide est observé lors d'un chauffage jusqu'à 90 °C, les modifications commencent à être très importantes pour une température proche de 60 °C (Figure 62).

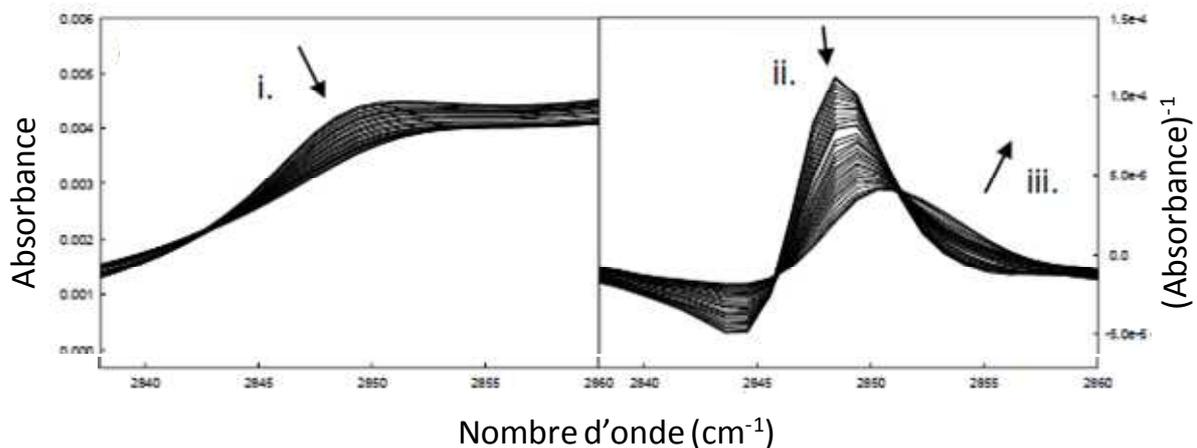


Figure 62 : Spectre infrarouge (A) et dérivée seconde (B) de spores de *Clostridium sporogenes* chauffées jusqu'à 90 °C. Les mesures sont prises toutes les 10 min à une vitesse de 5 °C/10 min. (i) vibration d'étirement des CH₂ asymétriques (ii) membrane à "l'état gel" ; (iii) membrane à "l'état liquide". D'après (Hofstetter, 2012).

Nous n'avons observé qu'une faible modification de la viscosité par la température, celle-ci passant d'une valeur d'environ 1000 cP (témoin) à 850 cP (70 °C) dans la membrane interne.

En traçant une courbe $\ln \eta$ selon la loi d'Arrhenius, il est possible de voir une rupture de pente à partir de la température de 65 °C. Ces données confirment qu'il est nécessaire d'augmenter la température de façon importante pour modifier les propriétés de la membrane interne.

Effet de la température sur les couches externes de la spore

Les résultats obtenus en RMN et par l'utilisation de la spectrofluorimétrie nous ont permis d'observer que la température est responsable d'une modification dans les structures les plus externes de la spore. En effet, une rampe de température (ou bien un choc thermique) de 50 °C à 70 °C entraîne des modifications structurales. L'accessibilité du DPH jusqu'à une structure plus visqueuse (probablement la membrane interne) est en effet améliorée suite à ces variations thermiques. Ces phénomènes sont observés à la fois sur des spores sauvages mais également sur des spores ne possédant pas ou très peu de protéines de l'enveloppe (spore modifiées chimiquement ou *cotE gerE*). Le matériel qui subit ces modifications correspond probablement au cortex. Leuschner et Lillford, ont observé un phénomène thermique par AED aux alentours de 50 °C et l'ont attribué à l'enveloppe de la spore (Leuschner and Lillford, 2003). D'autres travaux réalisés au laboratoire, ont plutôt attribué cette relaxation (observée vers 70 °C) au cortex de la spore (Nguyen Thi Minh *et al.*, 2010b). Nos données obtenues par des méthodes différentes semblent abonder dans ce sens et sont observées à la fois sur des spores hydratées (spectrofluorimétrie) et à l'état sec (RMN). Les travaux réalisés par Ablett *et al.*, ont également montré une transition thermique pour des spores en milieu hydraté, celle-ci a été attribuée à un état vitreux du protoplaste (Ablett *et al.*, 1999). Nous avons réalisé des mesures en AED sur des culots cellulaires de spores sauvages, qui sont donc à l'état hydraté et sur des spores équilibrées à une a_w de 0,5 (Figure 63).

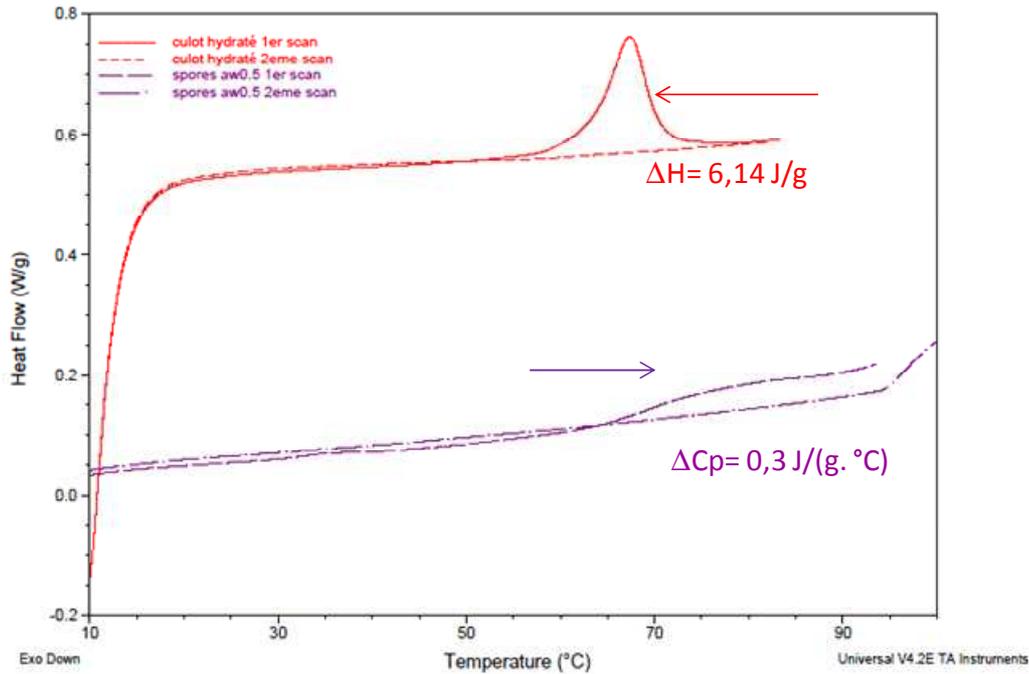


Figure 63 : Thermogramme de spores hydratées (en violet) ou équilibrées préalablement à une a_w de 0,5 (en rouge) chauffées à une vitesse de 10 °C/min. Trait plein : premier chauffage Trait pointillé = deuxième chauffage. Les flèches indiquent les « pics » endothermiques.

Pour ces différentes hydratations, un pic endothermique est observé (indiqué par la flèche) au premier chauffage mais pas sur le deuxième scan. Ce pic endothermique pourrait être relié à une relaxation enthalpique associée à une transition vitreuse. Cette relaxation est observée dans de nombreux polymères synthétiques mais a aussi été étudiée plus récemment sur des biopolymères comme le gluten ou la gélatine (Badii *et al.*, 2005). Cette relaxation structurale, aussi appelée vieillissement physique, a lieu en général à une température inférieure à la température de transition vitreuse (T_g) mais lorsque le matériel est stocké à une température éloignée de sa T_g . Les variations d'énergie mesurées (ΔC_p et ΔH , Figure 63) sont faibles et confirment qu'il ne s'agit pas d'un autre phénomène thermique comme une fusion par exemple. L'observation de ce phénomène suggère qu'un composant de la spore pourrait être dans un état vitreux et que la température de la transition vitreuse associée pourrait être plus élevée que celle de la relaxation (65-70 °C). Des auteurs ont réalisé une étude en AED sur des peptidoglycanes extraits de spores bactériennes et ont observé une transition réversible suggérant un rôle du cortex dans la présence d'un état vitreux (Stecchini *et al.*, 2006). Les températures de transitions vitreuses associées au cortex mesurées par ces auteurs sont aux alentours de 90-115 °C. Nous n'avons pas observé de transition vitreuse associée à cet événement à des températures plus élevées probablement parce que cette transition vitreuse pourrait se propager sur une large plage de température et se confondre alors avec la ligne de

base (Nguyen Thi Minh *et al.*, 2010b). L'état vitreux du cortex n'empêcherait cependant pas la diffusion de molécules jusqu'à la membrane interne. En effet, les nutriments peuvent diffuser jusqu'aux récepteurs de la germination (Paidhungat and Setlow, 2001). Nous pouvons cependant supposer qu'une augmentation de la température au-delà de 50 °C et notamment proche de 65 °C permet d'augmenter la mobilité du cortex ou en tout cas de passer d'un état dense à un état plus perméable ("rajeunissement" lié à la relaxation enthalpique) et pourrait expliquer l'amélioration de l'accessibilité observée sur le DPH. En effet, d'une manière générale, la relaxation d'enthalpie de matériaux amorphes s'accompagne d'une modification des propriétés macroscopiques, telles que la densité et les propriétés de transport (Jin Kim *et al.*, 2003). Ces températures correspondent aux températures connues pour activer la germination des spores bactériennes (Keynan *et al.*, 1964; Yi and Setlow, 2010). On peut supposer que l'activation thermique de la germination, correspondrait à cette transition réversible qui améliorerait l'accessibilité des nutriments aux récepteurs de la germination localisés au niveau de la membrane interne. Il faut rappeler que l'activation de la spore bactérienne seule ne permet pas la germination, elle nécessite toujours la présence de germinants. Cette activation thermique est de plus décrite comme réversible (Keynan *et al.*, 1964).

Relation entre état vitreux du cortex et état de la membrane interne

Selon Atrih et Foster, le cortex de la spore est composé de peptidoglycanes similaires à ceux de la paroi de la cellule végétative (Atrih and Foster, 1999). Cependant le cortex est beaucoup plus épais (140 à 200 nm d'épaisseur) (Driks, 1999). Le cortex agit vraisemblablement comme une structure rigide de forte résistance mécanique pour supporter la pression de turgescence générée par la forte concentration des solutés dans le protoplaste (Popham, 2002). D'après Cowan *et al.*, le cortex pourrait jouer un rôle dans la stabilisation de la membrane interne dans un état compressé durant la sporulation (Cowan *et al.*, 2004).

Nous avons supposé précédemment que lors d'une rampe de température (ou d'un choc suffisamment long), le cortex subit une transition thermique associé à une modification structurale. La résistance mécanique du cortex serait alors modifiée permettant un relâchement de la pression exercée sur la membrane et ainsi une diminution de sa viscosité. La diminution de la viscosité de la membrane interne lors de la germination que nous avons pu observer permet d'appuyer cette hypothèse. En effet, l'hydratation et l'hydrolyse du cortex dans les premières minutes de la germination permet de diminuer rapidement et de manière importante la contrainte mécanique exercé par celui-ci. Cette hydrolyse conduit rapidement à

une expansion de la surface et à une diminution de la viscosité de la membrane interne comme discuté précédemment.

Ainsi, la température pourrait à la fois être responsable d'une meilleure diffusion de solutés au travers du cortex mais aussi d'un léger relâchement de la pression exercée sur la membrane interne, modifiant ses propriétés. L'activation thermique connue pour synchroniser et améliorer la germination, correspondrait à ce phénomène réversible. La température permettrait de faciliter l'accès aux récepteurs de la germination et/ou à une modification de leur structure par la modification des propriétés membranaires. La [Figure 64](#) schématise ce phénomène.

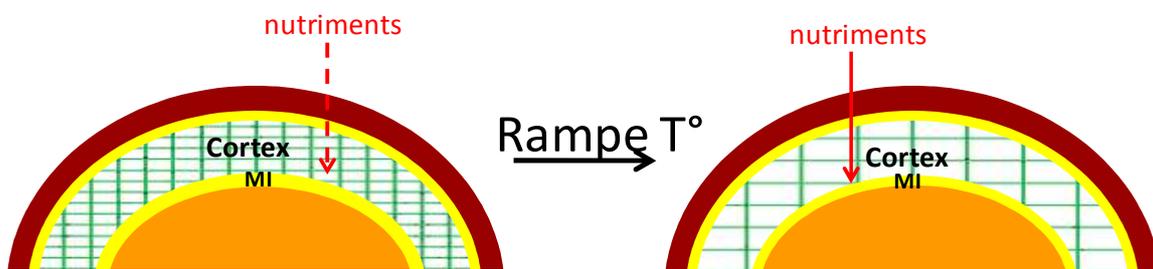


Figure 64 : Schématisation de l'évolution des structures au cours d'une rampe de température. La température permet une relaxation enthalpique et/ou transition vitreuse du cortex et un léger relâchement de la membrane interne de son état comprimé. Les flèches indiquent la facilité de diffusion des nutriments jusqu'à la membrane interne. MI : Membrane interne.

La température est donc un paramètre environnemental pouvant modifier les structures de la spore. La perméabilisation aux solutés par la température reste limitée aux couches externes, le passage de la membrane interne reste un obstacle pour la plupart des molécules. Pour perméabiliser durablement la spore et accéder au protoplasme, il faut utiliser un agent chimique qui va affecter la structure de la spore. L'éthanol est une des molécules pour laquelle cette perméabilisation est efficace tout en préservant la structure multicouche de la spore. Nous avons pu voir dans ce travail que l'éthanol couplé à ces températures peut également modifier les propriétés particulières (faible perméabilité aux solutés et importante viscosité) de la spore bactérienne. Ce traitement entraîne une perméabilisation puisqu'il améliore l'accessibilité de certaines sondes fluorescentes au protoplasme. L'effet de ce traitement sur les structures de la spore et son mécanisme d'inactivation est encore peu connu. Ainsi, il s'agit d'un stress intéressant dans l'étude des modifications des structures qui sera discuté dans la partie suivante.

Impact de l'éthanol sur les structures de la spore

Nécessité de coupler l'éthanol à la température

Les alcools sont des agents de largment et efficacement utilisés pour la désinfection, notamment l'éthanol à un pourcentage proche de 70% (Prescott *et al.*, 2010). Les alcools présentent une activité antimicrobienne à large spectre contre les bactéries végétatives (y compris les mycobactéries), les virus et les champignons mais ne sont cependant pas sporicides (McDonnell and Russell, 1999). L'éthanol (même à faible pourcentage) peut cependant avoir un impact sur la germination, l'inhibant de manière réversible (Trujillo and Laible, 1970). En ce qui concerne les spores bactériennes, le traitement à l'éthanol doit s'accompagner d'une augmentation de la température pour permettre leur inactivation (Setlow *et al.*, 2002). La température est connue pour améliorer l'effet sporicide de certains agents chimiques (Russell, 2004). Il a été montré sur des membranes plasmiques issues de cellules de souris un effet augmenté du désordre provoqué par l'éthanol avec l'augmentation de la température (Chin and Goldstein, 1981). Cependant il s'agit de faible pourcentage en éthanol (<10 %) et les températures utilisées sont faibles (10 à 30 °C au maximum) comparées à celles utilisées dans cette étude. L'éthanol seul n'agit pas sur la membrane interne des spores, ou sur un temps très long (2 mois minimum à 90% d'éthanol) (Thomas, 2012)). Pourtant l'éthanol par ses caractéristiques est susceptible de diffuser presque aussi librement que l'eau dans les structures de la spore. On peut ainsi supposer que cette absence d'effet est liée à l'impossibilité de l'éthanol à s'intégrer et/ou à diffuser dans la membrane interne. La température semble ainsi être nécessaire pour que l'éthanol puisse agir sur la membrane interne. Nous avons vu précédemment que la température provoque une modification de la perméabilité et de la mobilité à l'intérieur du cortex. Ceci ne semble pas pourtant être l'effet principal puisque le cortex est naturellement perméable aux nutriments qui peuvent accéder aux récepteurs localisés au niveau de la membrane interne (Paidhungat and Setlow, 2001). L'éthanol possède en effet une masse molaire faible comparée à un nutriment comme le glucose (46 g/mol et 180g/mol respectivement) et diffuse généralement bien dans les milieux biologiques. Cependant, on peut supposer que la transition subie par le cortex suite à une augmentation de la température permet un relâchement de la pression mécanique qu'il exerce sur la membrane, facilitant alors l'accès de l'éthanol à la membrane. De plus, le traitement est peut être responsable d'une dénaturation importante et irréversible du cortex. Ainsi la température couplée à l'éthanol aurait un double effet :

- effet synergique de l'action des deux paramètres sur la membrane interne.
- amélioration de l'accessibilité de l'éthanol jusqu'à la membrane interne (dénaturation du cortex).

L'utilisation de l'AED sur des spores traitées puis stockées pourrait être envisagée afin d'observer si le traitement provoque la disparition de la relaxation enthalpique et/ou de la transition vitreuse.

Modifications des protéines de la spore

L'utilisation de la spectroscopie infrarouge a permis d'observer l'impact de l'éthanol sur la structure secondaire des protéines. Le traitement éthanol/température conduit ainsi à l'apparition de structure en feuillet β , notamment à 70%. L'apparition de ce type de structures a déjà été observée lors d'un traitement de spores sauvages à l'autoclave (Perkins *et al.*, 2004). L'effet de l'éthanol sur des protéines modèles à haute concentration en éthanol (~ 80% sur du lysozyme) ou sur des protéines de la muqueuse gastrique humaine a également montré l'apparition de structures en feuillet β (Lin *et al.*, 1995; Goda *et al.*, 2000). L'augmentation de la proportion de cette structure secondaire a été attribuée à une agrégation des protéines (Haris, 1999; Wang, 2005). En effet, il est connu que l'activité bactéricide des alcools est notamment due à leur capacité à dénaturer les protéines (Larson and Morton, 1991). L'éthanol déstabilise les protéines et peut entraîner leur dénaturation à des températures élevées (où la température elle-même n'a pas d'effet de dénaturation) ou à des concentrations plus élevées d'éthanol (Yoshikawa *et al.*, 2012). L'augmentation de la concentration en éthanol a tendance à augmenter la dénaturation des protéines (Booth, 1930; Liu *et al.*, 2010). En ce qui concerne les spores bactériennes, ceci explique pourquoi une augmentation de la proportion en éthanol augmente la proportion de structures en feuillet β . Cependant, cette modification des protéines ne semble pas être la cause de la destruction des spores par l'éthanol. Nous avons constaté dans ce travail que bien que les spores mutantes soient également inactivées par l'éthanol, celles-ci ne présentent que très peu de modification au niveau de la structure secondaire des protéines. Ces protéines dénaturées correspondent ainsi vraisemblablement aux protéines de l'enveloppe des spores sauvages. L'enveloppe a déjà été montrée comme une structure n'intervenant pas dans la résistance des spores à l'éthanol (Setlow *et al.*, 2002). La faible proportion de structures en feuillet β observée dans les spores sans enveloppe pourrait être attribuée à la dénaturation d'autres protéines de la spore comme celles de la germination. Cependant, il ne semble pas que ce soit le mécanisme d'inactivation des spores par l'éthanol (l'ajout de lysozyme ne permet pas de refaire germer ces spores).

Modification de la membrane interne

L'éthanol provoque des perturbations membranaires sur les microorganismes quand il est utilisé comme désinfectant (Møretrø *et al.*, 2012). Dans le cas des spores bactériennes, seul l'effet physique de l'éthanol sur les membranes semble pertinent à étudier, les spores ne possédant pas de métabolisme. L'étude de l'effet de l'éthanol sur des membranes modèles a montré qu'il provoquait en général une diminution de l'ordre lipidique (Goldstein, 1984; Ingram, 1989; Gurtovenko and Anwar, 2009) et pouvait affecter la perméabilité aux solutés, ions, colorants fluorescents ainsi que la diffusion au sein des bicouches lipidiques (Mansure *et al.*, 1994; Mizoguchi and Hara, 1996; Patra *et al.*, 2006). Comme mentionné précédemment, l'eau a un rôle important dans la structuration des membranes. L'éthanol peut cependant avoir un effet dépresseur de l' a_w (Hallsworth, 1998). Slater *et al.*, ont montré que l'éthanol perturbe le rôle de l'eau intramembranaire (Slater *et al.*, 1993). L'éthanol affecte négativement les interactions entre les têtes et/ou déplace les molécules d'eau dans ce réseau eau-hydrogène et abaisse ainsi la température de transition. L'éthanol aurait tendance à se placer au niveau des têtes polaires des lipides plutôt que dans la région acyle comme le montre la [Figure 65](#).

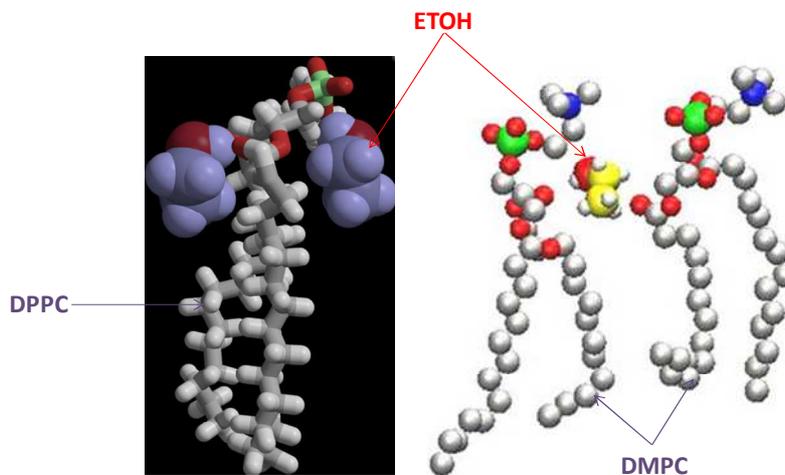


Figure 65 : Schéma montrant l'insertion de l'éthanol au niveau des phospholipides. DPPC : Dipalmitoylphosphatidylcholine DMPC : dimyrystoylphosphatidylcholine (Chanda and Bandyopadhyay, 2004; Patra *et al.*, 2006).

Des études réalisées sur l'effet de l'éthanol sur des bicouches modèles (phosphocholines) ont montré que l'effet d'une désorganisation provoquée par l'éthanol, est visible à la fois sur les membranes à l'état liquide mais aussi à l'état gel (Pillman and Blanchard, 2010).

Les traitements utilisés dans ce travail entraînent une modification de la membrane interne puisqu'ils sont responsables d'une diminution de sa viscosité et d'une augmentation de sa

perméabilité (entrée de sondes fluorescentes, sortie du DPA). Nous avons également observé une sortie du DPA au cours de ces traitements. L'IP est une sonde fluorescente connue pour ne pénétrer que dans des cellules dont la membrane est altérée (Williams *et al.*, 1998). La membrane interne est supposée être dans un état proche de l'état gel. On peut émettre l'hypothèse que la désorganisation de la membrane interne (observée par une diminution de la viscosité) provoquée par l'éthanol conduit à l'apparition d'une coexistence de phases responsable d'une augmentation importante de la perméabilité. L'apparition de coexistence de phases est observée sur des membranes modèles (Pillman and Blanchard, 2010). De plus, ceci pourrait être assimilé à ce qui est observé lors de la déshydratation de bactéries (Beney *et al.*, 2004). Nous avons observé que les traitements utilisés sont à l'origine d'une inactivation des spores bactériennes, cette inactivation augmentant avec le pourcentage d'éthanol. D'après la littérature (Setlow *et al.*, 2002), la dénaturation des enzymes de germination ne serait pas la cause principale de la mort des spores. En effet, l'utilisation de lysozyme pour dégrader le cortex (ce qui permet normalement une germination sans intervention des récepteurs à la germination) ne permet pas un retour à l'état végétatif. Ces auteurs suggèrent plutôt que la libération du DPA qui est observée serait à l'origine d'une sensibilisation des spores à la chaleur et/ou à l'éthanol (Setlow *et al.*, 2002). On peut ainsi imaginer que les perturbations membranaires peuvent être responsables de cette libération et donc de manière indirecte de l'inactivation.

Cas du traitement à 70%

Pour le traitement à 70%, nous avons observé une différence dans l'insertion du Bodipy-C₁₂ pour les spores sauvages et les spores mutantes sans enveloppe. En effet, l'éthanol entraîne une dénaturation des protéines. Liu *et al.*, ont ainsi montré qu'une augmentation de la concentration en éthanol provoque une augmentation de l'agrégation de l'albumine de sérum bovin (Liu *et al.*, 2010). Le pourcentage d'éthanol utilisé pour désinfecter les surfaces et les mains est de 70%. Il est suggéré que l'éthanol à une trop forte concentration provoquerait une agrégation des protéines en surface trop rapidement pour permettre la pénétration de celui-ci plus profondément et diminuerait alors son efficacité (Stoker, 2011). On peut supposer que dans notre cas l'effet couplé d'un traitement éthanol à 70% 2 h 65 °C ou 70% 1 h 70 °C provoque une agrégation importante des protéines en surface. Ceci formerait une barrière empêchant le rotor de pénétrer profondément dans les spores bien que celles-ci soient tout de même inactivées. L'IP pourrait quant à lui rentrer par un mécanisme différent.

En conclusion, ces résultats confirment la particularité des structures de la spore bactérienne. L'effet de l'éthanol seul, ne permet pas d'inactiver les spores bactériennes. Il semble ainsi que les éléments cibles (protéines et lipides) soient protégés. La membrane interne est maintenue dans un état particulier ou protégé de telle sorte que l'effet de l'éthanol seul ne soit pas suffisant pour la désorganiser. L'éthanol couplé à une augmentation de température serait responsable d'une modification du cortex (irréversible ?) et donc de l'accessibilité et/ou des propriétés de la membrane. En conséquence, une désorganisation de la membrane interne provoquerait probablement une perméabilisation responsable directement ou non de la libération du DPA. Ces résultats confirment ainsi l'hypothèse pour laquelle une barrière de perméabilité est modifiée par l'effet du traitement à l'éthanol couplé à la température, probablement la membrane interne. Ces traitements, notamment ceux permettant une perméabilisation sans altération majeure de la membrane et de l'enveloppe, pourraient ainsi être utilisés pour encapsuler des substances d'intérêts dans le protoplaste des spores. Cependant, il est nécessaire d'améliorer les barèmes à utiliser car ceux présentés dans ce travail entraîne une perméabilisation irréversible.

CONCLUSION – PERSPECTIVES

CONCLUSIONS – PERSPECTIVES

En conclusion, malgré la faible taille de la spore (1 μm) et son importante compartimentation, ce travail de thèse a permis de développer une méthode permettant de visualiser la viscosité des structures de la spore. La perméabilité des spores matures étant très faible aux solutés, l'insertion du rotor moléculaire Bodipy-C₁₂ au cours de la sporulation a ainsi permis d'atteindre les structures de la spore les plus internes. Par la suite, l'utilisation de l'imagerie en temps de vie de fluorescence a permis de réaliser une cartographie de la viscosité des structures de la spore. Le Bodipy-C₁₂ représente donc un marqueur intéressant pour la spore qui pourra être utilisé pour évaluer l'effet d'autres perturbations sur la membrane interne comme les hautes pressions ou l'H₂O₂. De plus, l'utilisation couplée de cette technique avec de la super résolution pourrait permettre de mieux cibler le signal. Cette méthode de visualisation pourrait également être envisagée sur d'autres microorganismes. Une première étude a ainsi déjà été initiée sur la levure *Saccharomyces cerevisiae* afin de caractériser une structure membranaire hétérogène. L'utilisation d'un rotor moléculaire hydrophile pour la mesure de la viscosité du protoplaste des spores est également à l'étude.

A l'aide de cette méthode, nous avons démontré que la viscosité de la membrane interne de la spore bactérienne est environ 2 fois plus importante que celle d'une cellule végétative. Cette importante viscosité a été reliée à un état membranaire probablement dans un état gel. Le cortex, en raison de sa contrainte mécanique, est en partie responsable de cet état, puisque lors de la germination et de son hydrolyse, la viscosité de la membrane interne est diminuée par 1,7. La viscosité d'une membrane de cellule végétative à basse température (~ 5 °C) est proche de celle attribuée à la membrane interne. Cependant, l'état gel de la membrane interne semble particulier car cette membrane possède des propriétés de perméabilité et de compression différentes d'une membrane de cellules à faible température. Des travaux complémentaires menés avec des sondes fluorescentes mesurant des paramètres différents (hydratation, ordre) pourraient permettre de mieux définir l'état membranaire. Il est également envisagé d'utiliser les pressions hydrostatiques et/ou osmotiques sur la membrane de cellule végétative pour en visualiser l'effet sur la viscosité et sur la perméabilité. Ceci permettrait peut être de s'approcher au plus près des propriétés de cette membrane.

Des mesures en anisotropie de fluorescence du DPH, et également en AED, ont permis d'observer une modification d'une structure de la spore, probablement le cortex, au cours d'une élévation de température (proche de 60-70 °C). Cette structure subit au cours d'un chauffage une transition thermique (relaxation enthalpique et/ou transition vitreuse). Cette transition permet une augmentation de la perméabilité et/ou de la mobilité du matériau. La contrainte mécanique alors exercée sur la membrane interne diminue (mesure d'une légère diminution de sa viscosité) et permet semble-t-il, d'améliorer l'accessibilité de sondes fluorescentes jusqu'à cette dernière. L'activation thermique de la germination semble pouvoir être reliée à ces modifications. Cependant, certaines expérimentations supplémentaires sont nécessaires (par exemple en fonction du temps) afin de mieux comprendre la relation entre cette transition réversible (et notamment l'augmentation de perméabilité) et l'activation thermique de la germination.

Enfin, nous avons mis en évidence les modifications structurales engendrées par une perturbation éthanol/température. Une augmentation du pourcentage en éthanol conduit à une augmentation de l'inactivation des spores couplée à une augmentation de la perméabilisation. Sur des spores sauvages, ce traitement dénature de manière importante les protéines de l'enveloppe (notamment à 70%). L'utilisation de spores sans enveloppe a cependant permis de confirmer que cette structure ne joue pas de rôle dans l'inactivation des spores par ce traitement. Au contraire, les perturbations subies par la membrane interne (diminution de sa viscosité et augmentation de sa perméabilité) conduisent à la libération du DPA et participe ainsi de manière indirecte à l'inactivation. La température élevée nécessaire pour inactiver les spores en présence de l'éthanol semble, en plus d'un effet synergique, confirmer le rôle du cortex dans le maintien de l'intégrité de la structure de la spore. Un suivi précis de la température à laquelle l'éthanol (à une concentration donnée) a un effet sur l'inactivation des spores, pourrait permettre de confirmer ce point. Un passage de spores traitées en AED pourrait également confirmer si l'éthanol modifie de manière irréversible le cortex.

Comme perspective de travail, nous avons identifié le traitement éthanol/température comme une perturbation intéressante à utiliser pour encapsuler des molécules d'intérêts. Le stress à 50% semble être particulièrement intéressant car il permet une perméabilisation importante tout en minimisant l'effet sur les structures. Des expérimentations préliminaires ont été réalisées avec la rhodamine B (qui ne pénètre pas dans les spores entières). Le « suivi » de sa libération en cellule de visualisation à 37 °C montre que le lysozyme pourrait être utilisé pour

libérer la molécule encapsulée (Figure 66a et b), bien que des expérimentations supplémentaires soient nécessaires.

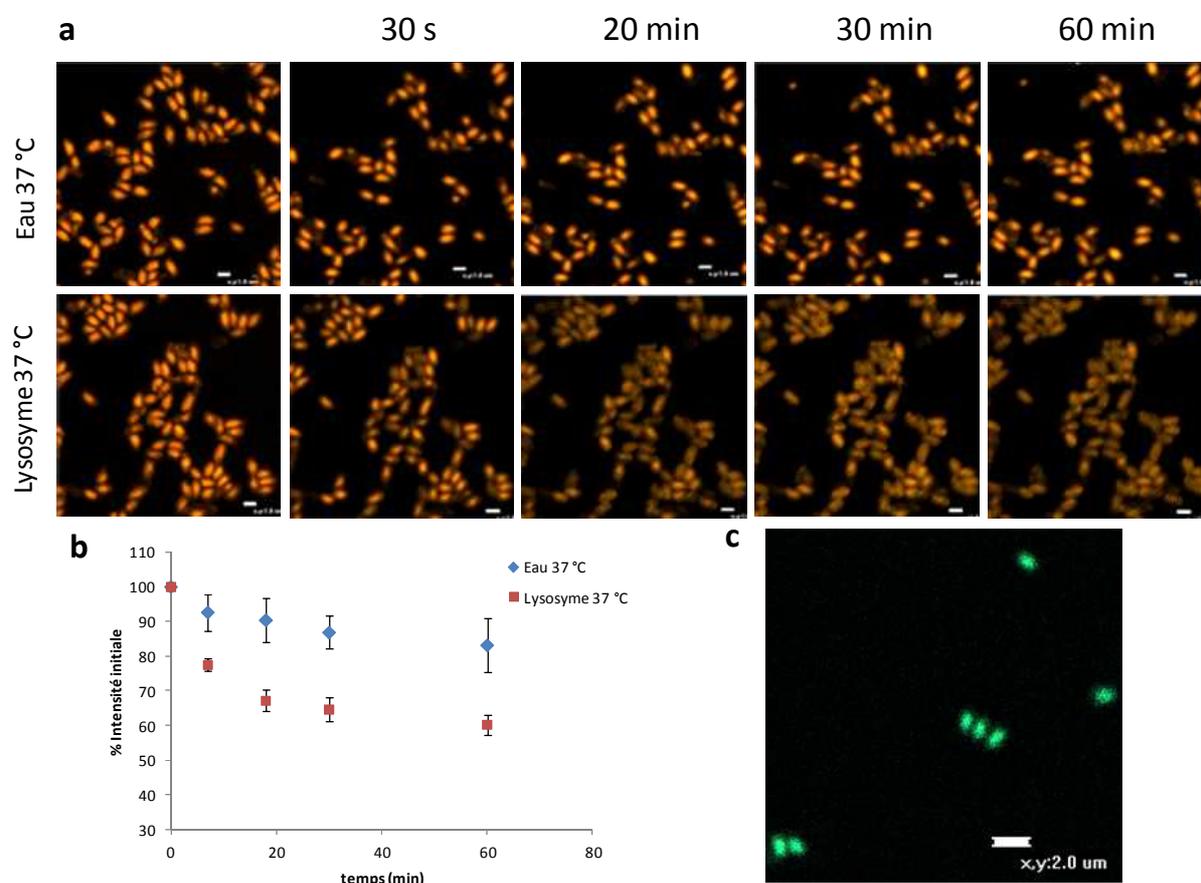


Figure 66 : Exemples d'expériences d'encapsulation réalisées sur des spores sauvages traitées à l'éthanol 50% pendant 1 h à 70 °C. (a) Suivi de la libération dans de l'eau ou du lysozyme (0,05 g/mL) à 37 °C de la rhodamine B « encapsulée » dans des spores traitées 50% pendant 1 h à 70 °C. Les images sont réalisées en cellules de visualisation en microscopie confocale (Excitation : 514 nm, Emission : 540-625 nm) Echelle : 1µm. (b) Suivi de l'intensité de fluorescence au cours du temps en % de l'intensité initiale. (c) Encapsulation de curcumine dans des spores sauvages traitées à 50% pendant 1 h à 70 °C. Echelle = 1 µm.

La curcumine a aussi été envisagée comme molécule d'intérêt. Cette molécule sensible semble pouvoir être encapsulée dans des spores traitée à l'éthanol 50% comme le montre la Figure 66c. Pour envisager cette méthode d'encapsulation, il sera nécessaire d'améliorer les données sur l'efficacité d'encapsulation mais surtout de « mesurer » la protection apportée par la spore à cette molécule face à différentes conditions de stockage (température, humidité,...) et de stress environnementaux (comme ceux du tractus gastro-intestinal). Cependant, l'éthanol n'est peut être pas la meilleur solution, car la perméabilisation créée est irréversible. Ainsi, l'utilisation d'autres perméabilisant à haute température peut être envisagée. Avec la progression des connaissances sur les propriétés et les fonctions de la structure des spores, il

est envisageable de mettre en place une capsule artificielle se rapprochant des propriétés de la spore. Cette encapsulation pourrait permettre à terme de protéger une molécule sensible quel que soit l'environnement extérieur (température, agression chimique,...) et dont la libération serait maîtrisée.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

- Ablett, S., A. H. Darke, et al.** (1999). "Glass formation and dormancy in bacterial spores." *International Journal of Food Science & Technology* **34**(1): 59-69.
- Alvarez-Ordóñez, A., D. Mouwen, et al.** (2011). "Fourier transform infrared spectroscopy as a tool to characterize molecular composition and stress response in foodborne pathogenic bacteria." *Journal of Microbiological Methods* **84**(3): 369-378.
- Atrih, A. and S. F. Foster** (1999). "The role of peptidoglycan structure and structural dynamics during endospore dormancy and germination." *Antonie van Leeuwenhoek* **75**(4): 299-307.
- Atrih, A. and S. J. Foster** (2002). "Bacterial endospores the ultimate survivors." *International Dairy Journal* **12**(2-3): 217-223.
- Atrih, A., P. Zöllner, et al.** (1996). "Structural analysis of *Bacillus subtilis* 168 endospore peptidoglycan and its role during differentiation." *Journal of Bacteriology* **178**(21): 6173-83.
- Badii, F., W. MacNaughtan, et al.** (2005). "Enthalpy relaxation of gelatin in the glassy state." *International Journal of Biological Macromolecules* **36**(4): 263-269.
- Barber, P. R., S. M. Ameer-Beg, et al.** (2009). "Multiphoton time-domain fluorescence lifetime imaging microscopy: practical application to protein-protein interactions using global analysis." *Journal of The Royal Society Interface* **6**(Suppl 1): S93-S105.
- Beaman, T. C. and P. Gerhardt** (1986). "Heat resistance of bacterial spores correlated with protoplast dehydration, mineralization, and thermal adaptation." *Applied and Environmental Microbiology* **52**(6): 1242-1246.
- Beaman, T. C., H. S. Pankratz, et al.** (1988). "Heat shock affects permeability and resistance of *Bacillus stearothermophilus* spores." *Applied and Environmental Microbiology* **54**(10): 2515-2520.
- Beney, L. and P. Gervais** (2001). "Influence of the fluidity of the membrane on the response of microorganisms to environmental stresses." *Applied Microbiology and Biotechnology* **57**(1-2): 34-42.
- Beney, L., Y. Mille, et al.** (2004). "Death of *Escherichia coli* during rapid and severe dehydration is related to lipid phase transition." *Applied Microbiology and Biotechnology* **65**(4): 457-464.
- Bergstrom, F., I. Mikhalyov, et al.** (2002). "Dimers of dipyrrometheneboron difluoride (BODIPY) with light spectroscopic applications in chemistry and biology." *Journal of the American Chemical Society* **124**(2): 196-204.
- Black, E. P., J. Wei, et al.** (2007). "Analysis of factors influencing the rate of germination of spores of *Bacillus subtilis* by very high pressure." *Journal of Applied Microbiology* **102**(1): 65-76.
- Black, S. H. and P. Gerhardt** (1962). "Permeability of bacterial spores III : Permeation relative to germination." *Journal of Bacteriology* **83**(2): 301-308.
- Booth, N.** (1930). "The denaturation of proteins: Denaturation in the presence of alcohol." *Biochemical Journal* **24**(6): 1699.
- Cao-Hoang, L., F. Dumont, et al.** (2008). "Rates of chilling to 0°C: implications for the survival of microorganisms and relationship with membrane fluidity modifications." *Applied Microbiology and Biotechnology* **77**(6): 1379-1387.
- Carlin, F.** (2011). "Origin of bacterial spores contaminating foods." *Food Microbiology* **28**(2): 177-182.
- Casula, G. and S. M. Cutting** (2002). "*Bacillus* Probiotics: Spore germination in the gastrointestinal tract." *Applied and Environmental Microbiology* **68**(5): 2344-2352.

- Ceragioli, M., G. Cangiano, et al.** (2009). "Phagocytosis, germination and killing of *Bacillus subtilis* spores presenting heterologous antigens in human macrophages." *Microbiology* **155**(2): 338-346.
- Chanda, J. and S. Bandyopadhyay** (2004). "Distribution of ethanol in a model membrane: a computer simulation study." *Chemical Physics Letters* **392**(1-3): 249-254.
- Cheung, H.-Y., J. Cui, et al.** (1999). "Real-time monitoring of *Bacillus subtilis* endospore components by attenuated total reflection Fourier-transform infrared spectroscopy during germination." *Microbiology* **145**(5): 1043-1048.
- Chin, J. H. and D. B. Goldstein** (1981). "Membrane-disordering action of ethanol: variation with membrane cholesterol content and depth of the spin label probe." *Molecular Pharmacology* **19**(3): 425-431.
- Chirakkal, H., M. O'Rourke, et al.** (2002). "Analysis of spore cortex lytic enzymes and related proteins in *Bacillus subtilis* endospore germination." *Microbiology* **148**(8): 2383-2392.
- Clerc, S. G. and T. E. Thompson** (1995). "Permeability of dimyristoyl phosphatidylcholine/dipalmitoyl phosphatidylcholine bilayer membranes with coexisting gel and liquid-crystalline phases." *Biophysical Journal* **68**(6): 2333-2341.
- Coleman, W. H., D. Chen, et al.** (2007). "How moist heat kills spores of *Bacillus subtilis*." *Journal of Bacteriology* **189**(23): 8458-8466.
- Cortezzo, D. E., K. Koziol-Dube, et al.** (2004). "Treatment with oxidizing agents damages the inner membrane of spores of *Bacillus subtilis* and sensitizes spores to subsequent stress." *Journal of Applied Microbiology* **97**(4): 838-52.
- Cortezzo, D. E. and P. Setlow** (2005). "Analysis of factors that influence the sensitivity of spores of *Bacillus subtilis* to DNA damaging chemicals." *Journal of Applied Microbiology* **98**(3): 606-17.
- Cossart, P., J. Pizarro-Cerdà, et al.** (2004). Microbial pathogens: an overview. In Cellular microbiology. P. Cossart, P. Boquet, S. Normark and R. Rappuoli. Washington, D.C., ASM Press: 1-33.
- Cowan, A. E., D. E. Koppel, et al.** (2003). "A soluble protein is immobile in dormant spores of *Bacillus subtilis* but is mobile in germinated spores: Implications for spore dormancy." *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100**(7): 4209-4214.
- Cowan, A. E., E. M. Olivastro, et al.** (2004). "Lipids in the inner membrane of dormant spores of *Bacillus* species are largely immobile." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**(20): 7733-7738.
- Cronin, U. P. and M. G. Wilkinson** (2008). "Monitoring changes in germination and permeability of *Bacillus cereus* endospores following chemical, heat and enzymatic treatments using flow cytometry." *Journal of Rapid Methods & Automation in Microbiology* **16**(2): 164-184.
- Crowe, J., L. Crowe, et al.** (1989). "Phase transitions and permeability changes in dry membranes during rehydration." *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* **21**(1): 77-91.
- Cutting, S. M.** (2011). "*Bacillus* probiotics." *Food Microbiology* **28**(2): 214-220.
- De Hoon, M. J. L., P. Eichenberger, et al.** (2010). "Hierarchical evolution of the bacterial sporulation network." *Current Biology* **20**(17): R735-R745.
- Demchenko, A. P., Y. Mély, et al.** (2009). "Monitoring biophysical properties of lipid membranes by environment-sensitive fluorescent probes." *Biophysical Journal* **96**(9): 3461-3470.
- Denich, T., L. Beaudette, et al.** (2003). "Effect of selected environmental and physico-chemical factors on bacterial cytoplasmic membranes." *Journal of Microbiological Methods* **52**(2): 149-182.

- Dowhan, W.** (1997). "Molecular basis for membrane phospholipid diversity: Why are there so many lipids?" *Annual Review of Biochemistry* **66**(1): 199-232.
- Driks, A.** (1999). "*Bacillus subtilis* spore coat." *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **63**(1): 1-20.
- Driks, A.** (2002). "Overview: Development in bacteria: Spore formation in *Bacillus subtilis*." *Cellular and Molecular Life Sciences* **59**(3): 389-391.
- Duc, L. H., H. A. Hong, et al.** (2003). "Bacterial spores as vaccine vehicles." *Infection and Immunity* **71**(5): 2810-2818.
- Duygu, D. Y., T. Baykal, et al.** (2009). "Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy for biological studies (review)." *Gazi University Journal of Science* **22**: 117-121.
- Ebel, H., P. Grabitz, et al.** (2001). "Enthalpy and volume changes in lipid membranes. I. The proportionality of heat and volume changes in the lipid melting transition and its implication for the elastic constants." *The Journal of Physical Chemistry B* **105**(30): 7353-7360.
- Eichenberger, P.** (2007). Genomics and cellular biology of endospore formation. In *Bacillus: Cellular and molecular biology*. P. Graumann. Wymondham, UK, Caister Academic Press: 319-350.
- Elmes, M. L., P. O. Wilkins, et al.** (1983). "An electron spin resonance investigation of *Bacillus megaterium* KM spore inner and cell membranes." *Canadian Journal of Microbiology* **29**(7): 815-818.
- Engleberg, NC, D. T., DiRita V.** (2007). Schaechter's mechanisms of microbial Disease. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins.
- Errington, J.** (1993). "*Bacillus subtilis* sporulation: regulation of gene expression and control of morphogenesis." *Microbiological Reviews* **57**(1): 1-33.
- Errington, J.** (2003). "Regulation of endospore formation in *Bacillus subtilis*." *Nature Reviews Microbiology* **1**(2): 117-26.
- Fang, J., D. Y. Lyon, et al.** (2007). "Effect of a fullerene water suspension on bacterial phospholipids and membrane phase behavior." *Environmental science & technology* **41**(7): 2636-2642.
- Flowers, R. S. and D. M. Adams** (1976). "Spore membrane(s) as the site of damage within heated *Clostridium perfringens* spores." *Journal of Bacteriology* **125**(2): 429-34.
- Fluorolog** (2001). 2. Measurement of fluorescence polarization. In *Polarizers*: 3-7.
- Foegeding, P. M. and F. F. Busta** (1983). "Proposed mechanism for sensitization by hypochlorite treatment of *Clostridium botulinum* spores." *Applied and Environmental Microbiology* **45**(4): 1374-1379.
- Forrester, J. B., N. B. Valentine, et al.** (2009). "Chemometric analysis of multiple species of *Bacillus* bacterial endospores using infrared spectroscopy: Discrimination to the strain level." *Analytica Chimica Acta* **651**(1): 24-30.
- Foster, S. J. and K. Johnstone** (1990). "Pulling the trigger: The mechanism of bacterial spore germination." *Molecular Microbiology* **4**(1): 137-41.
- Furukawa, S., M. Shimoda, et al.** (2003). "Mechanism of the inactivation of bacterial spores by reciprocal pressurization treatment." *Journal of Applied Microbiology* **94**(5): 836-841.
- Garip, S., A. C. Gozen, et al.** (2009). "Use of Fourier transform infrared spectroscopy for rapid comparative analysis of *Bacillus* and *Micrococcus* isolates." *Food Chemistry* **113**(4): 1301-1307.
- Ghosh, S., B. Setlow, et al.** (2008). "Characterization of spores of *Bacillus subtilis* that lack most coat layers." *Journal of Bacteriology* **190**(20): 6741-6748.

- Ghosh, S. and P. Setlow** (2010). "The preparation, germination properties and stability of superdormant spores of *Bacillus cereus*." *Journal of Applied Microbiology* **108**(2): 582-590.
- Goda, S., K. Takano, et al.** (2000). "Amyloid protofilament formation of hen egg lysozyme in highly concentrated ethanol solution." *Protein Science* **9**(2): 369-375.
- Goldstein, D. B.** (1984). "The effects of drugs on membrane fluidity." *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **24**(1): 43-64.
- Gonzalez-Pastor, J. E., E. C. Hobbs, et al.** (2003). "Cannibalism by sporulating bacteria." *Science* **301**(5632): 510-3.
- Gould, G. W. and A. J. H. Sale** (1970). "Initiation of germination of bacterial spores by hydrostatic pressure." *Journal of General Microbiology* **60**(3): 335-346.
- Griffiths, K. and P. Setlow** (2009). "Effects of modification of membrane lipid composition on *Bacillus subtilis* sporulation and spore properties." *Journal of Applied Microbiology* **106**(6): 2064-2078.
- Griffiths, K. K., J. Zhang, et al.** (2011). "Germination proteins in the inner membrane of dormant *Bacillus subtilis* spores colocalize in a discrete cluster." *Molecular Microbiology* **81**(4): 1061-77.
- Gruber, T. M. and C. A. Gross** (2003). "Multiple sigma subunits and the partitioning of bacterial transcription space." *Annual Review of Microbiology* **57**: 441-66.
- Gurtovenko, A. A. and J. Anwar** (2009). "Interaction of ethanol with biological membranes: The formation of non-bilayer structures within the membrane interior and their significance." *The Journal of Physical Chemistry B* **113**(7): 1983-1992.
- Haidekker, M. and E. Theodorakis** (2007). "Molecular rotors - fluorescent biosensors for viscosity and flow." *Organic & Biomolecular Chemistry* **5**(11): 1669 - 1678.
- Haidekker, M. and E. Theodorakis** (2010). "Environment-sensitive behavior of fluorescent molecular rotors." *Journal of Biological Engineering* **4**(1): 11.
- Haidekker, M. A., T. Ling, et al.** (2001). "New fluorescent probes for the measurement of cell membrane viscosity." *Chemistry and Biology* **8**(2): 123-131.
- Hallsworth, J. E.** (1998). "Ethanol-induced water stress in yeast." *Journal of Fermentation and Bioengineering* **85**(2): 125-137.
- Han, J. and K. Burgess** (2010). "Fluorescent indicators for intracellular pH." *Chemical Reviews* **110**(5): 2709-28.
- Haris, P. I.** (1999). "Characterization of protein structure and stability using Fourier transform infrared spectroscopy." *Pharmacy and Pharmacology Communications* **5**(1): 15-25.
- Helm, D. and D. Naumann** (1995). "Identification of some bacterial cell components by FT-IR spectroscopy." *FEMS Microbiology Letters* **126**(1): 75-79.
- Henriques, A. O. and J. C. P. Moran** (2007). "Structure, assembly, and function of the spore surface layers." *Annual Review of Microbiology* **61**(1): 555-588.
- Herbert, R.** (1981). "Low temperature adaptation in bacteria." *Effects of Low Temperature on Biological Membranes, GJ Morris and A. Clarke, eds., Academic Press, London*: 41-53.
- Higgins, D. and J. Dworkin** (2012). "Recent progress in *Bacillus subtilis* sporulation." *FEMS Microbiology Reviews* **36**(1): 131-148.
- Hilbert, D. W. and P. J. Piggot** (2004). "Compartmentalization of gene expression during *Bacillus subtilis* spore formation." *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **68**(2): 234-262.
- Hill, W. G., R. L. Rivers, et al.** (1999). "Role of eaflet asymmetry in the permeability of model biological membranes to protons, solutes, and gases." *The Journal of General Physiology* **114**(3): 405-414.

- Hoch, J. A.** (1976). "Genetics of bacterial sporulation." *Advances in Genetics* **18**: 69-98.
- Hofstetter, S.** (2012). "Resistance and membrane fluidity of endospores of *Clostridium* spp. during pressure-assisted thermal processing in the presence of antimicrobials ".Food science and Technology. Edmonton, University of Alberta: 132.
- Hofstetter, S., C. Denter, et al.** (2012). "Use of the fluorescent probe LAURDAN to label and measure inner membrane fluidity of endospores of *Clostridium* spp." *Journal of Microbiological Methods* **91**(1): 93-100.
- Hofstetter, S., R. Winter, et al.** (2013). "In situ determination of *Clostridium* endospore membrane fluidity during pressure-assisted thermal processing in combination with nisin or reutericyclin." *Applied and Environmental Microbiology* **79**(6): 2103-6.
- Hong, H. A., H. Duc le, et al.** (2005). "The use of bacterial spore formers as probiotics." *FEMS Microbiology Reviews* **29**(4): 813-35.
- Hosny, N. A., G. Mohamedi, et al.** (2013). "Mapping microbubble viscosity using fluorescence lifetime imaging of molecular rotors." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**(23): 9225-9230.
- Huang, S.-s., D. Chen, et al.** (2007). "Levels of Ca²⁺-dipicolinic acid in individual *Bacillus* spores determined using microfluidic Raman tweezers." *Journal of Bacteriology* **189**(13): 4681-4687.
- Hungerford, G., A. Allison, et al.** (2009). "Monitoring sol-to-gel transitions via fluorescence lifetime determination using viscosity sensitive fluorescent probes." *The Journal of Physical Chemistry B* **113**(35): 12067-12074.
- Ibarra, J. R., A. D. Orozco, et al.** (2008). "Role of the Nfo and ExoA apurinic/apyrimidinic endonucleases in repair of DNA damage during outgrowth of *Bacillus subtilis* spores." *Journal of Bacteriology* **190**(6): 2031-2038.
- Igura, N., Y. Kamimura, et al.** (2003). "Effects of minerals on resistance of *Bacillus subtilis* spores to heat and hydrostatic pressure." *Applied and Environmental Microbiology* **69**(10): 6307-6310.
- Ingram, L. O.** (1989). "Ethanol tolerance in bacteria." *Critical Reviews in Biotechnology* **9**(4): 305-319.
- Ishihara, Y., H. Saito, et al.** (1999). "Differences in the surface membranes and water content between the vegetative cells and spores of *Bacillus subtilis*." *Cell Biochemistry and Function* **17**(1): 9-13.
- Ishikawa-Ankerhold, H. C., R. Ankerhold, et al.** (2012). "Advanced fluorescence microscopy techniques-FRAP, FLIP, FLAP, FRET and FLIM." *Molecules* **17**(4): 4047-4132.
- Jensen, G. B., B. M. Hansen, et al.** (2003). "The hidden lifestyles of *Bacillus cereus* and relatives." *Environmental Microbiology* **5**(8): 631-640.
- Jin Kim, Y., T. Hagiwara, et al.** (2003). "Kinetic process of enthalpy relaxation of glassy starch and effect of physical aging upon its water vapor permeability property." *Carbohydrate Polymers* **53**(3): 289-296.
- Johnson, T. J., Y.-F. Su, et al.** (2009). "The infrared spectra of *Bacillus* bacteria part I: Vegetative *Bacillus* versus sporulated cells and the contributions of phospholipids to vegetative infrared spectra." *Applied Spectroscopy* **63**(8): 899-907.
- Johnson, T. J., N. B. Valentine, et al.** (2005). "Mid-infrared versus far-infrared (THz) relative intensities of room-temperature *Bacillus* spores." *Chemical Physics Letters* **403**(1-3): 152-157.
- Johnson, T. J., S. D. Williams, et al.** (2010). "The hydration number n of calcium dipicolinate trihydrate, CaDP·nH₂O, and its effect on the IR spectra of sporulated *Bacillus* bacteria." *Vibrational Spectroscopy* **53**(1): 28-33.

- Johnson, W. C. and D. Tipper** (1981). "Acid-soluble spore proteins of *Bacillus subtilis*." *Journal of Bacteriology* **146**(3): 972-982.
- Kaiser, R. D. and E. London** (1999). "Location of diphenylhexatriene (DPH) and its derivatives within membranes: comparison of different fluorescence quenching analyses of membrane depth." *Biochemistry* **38**(8): 2610-2610.
- Kato, M. and R. Hayashi** (1999). "Effects of high pressure on lipids and biomembranes for understanding high-pressure-induced biological phenomena." *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **63**(8): 1321-8.
- Kato, M., R. Hayashi, et al.** (2002). "High pressure-induced changes of biological membrane." *European Journal of Biochemistry* **269**(1): 110-118.
- Kawai, F., H. Hara, et al.** (2006). "Cardiolipin enrichment in spore membranes and its involvement in germination of *Bacillus subtilis* Marburg." *Genes and Genetic Systems* **81**(2): 69-76.
- Kawai, F., M. Shoda, et al.** (2004). "Cardiolipin domains in *Bacillus subtilis* Marburg membranes." *Journal of Bacteriology* **186**(5): 1475-1483.
- Keijser, B. J. F., A. Ter Beek, et al.** (2007). "Analysis of temporal gene expression during *Bacillus subtilis* spore germination and outgrowth." *Journal of Bacteriology* **189**(9): 3624-3634.
- Keynan, A., Z. Evanchik, et al.** (1964). "Activation of bacterial endospores." *Journal of Bacteriology* **88**: 313-8.
- Klobutcher, L. A., K. Ragkousi, et al.** (2006). "The *Bacillus subtilis* spore coat provides "eat resistance" during phagocytic predation by the protozoan *Tetrahymena thermophila*." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**(1): 165-170.
- Kong, L., P. Zhang, et al.** (2011). "Characterization of bacterial spore germination using phase-contrast and fluorescence microscopy, Raman spectroscopy and optical tweezers." *Nature Protocols* **6**(5): 625-639.
- Kong, L., P. Zhang, et al.** (2010). "Monitoring the kinetics of uptake of a nucleic acid dye during the germination of single spores of *Bacillus* species." *Analytical Chemistry* **82**(20): 8717-8724.
- Kort, R., A. C. O'Brien, et al.** (2005). "Assessment of heat resistance of bacterial spores from food product isolates by fluorescence monitoring of dipicolinic acid release." *Applied and Environmental Microbiology* **71**(7): 3556-3564.
- Koshikawa, T., M. Yamazaki, et al.** (1989). "Surface hydrophobicity of spores of *Bacillus* spp." *Journal of General Microbiology* **135**(10): 2717-2722.
- Kuimova, M. K.** (2012). "Mapping viscosity in cells using molecular rotors." *Physical Chemistry Chemical Physics* **14**(37): 12671-12686.
- Kuimova, M. K., G. Yahioglu, et al.** (2008). "Molecular rotor measures viscosity of live cells via fluorescence lifetime imaging." *Journal of the American Chemical Society* **130**(21): 6672 - 6673.
- Kunst, F., N. Ogasawara, et al.** (1997). "The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*." *Nature* **390**(6657): 249-56.
- Laaberki, M.-H. and J. Dworkin** (2008). "Role of spore coat proteins in the resistance of *Bacillus subtilis* spores to *Caenorhabditis elegans* predation." *Journal of Bacteriology* **190**(18): 6197-6203.
- Lakowicz, J. R.** (2006). Fluorescence anisotropy. In Principle of fluorescence spectroscopy. New York, Springer: 353-382.
- Lande, M. B., J. M. Donovan, et al.** (1995). "The relationship between membrane fluidity and permeabilities to water, solutes, ammonia, and protons." *The Journal of General Physiology* **106**(1): 67-84.

- Laroche, C., L. Beney, et al.** (2001). "The effect of osmotic pressure on the membrane fluidity of *Saccharomyces cerevisiae* at different physiological temperatures." *Applied Microbiology and Biotechnology* **56**(1-2): 249-254.
- Laroche, C., H. Simonin, et al.** (2005). "Phase transitions as a function of osmotic pressure in *Saccharomyces cerevisiae* whole cells, membrane extracts and phospholipid mixtures." *Biochimica et Biophysica Acta* **15**(1): 8-16.
- Larson, E. L. and H. E. Morton** (1991). Alcohols. In Disinfection, sterilization and preservation. S. S. Block. Philadelphia, Lea & Febiger: 191-203.
- Leggett, M. J., G. McDonnell, et al.** (2012). "Bacterial spore structures and their protective role in biocide resistance." *Journal of Applied Microbiology* **113**(3): 485-98.
- Leser, T. D., A. Knarreborg, et al.** (2008). "Germination and outgrowth of *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* spores in the gastrointestinal tract of pigs." *Journal of Applied Microbiology* **104**(4): 1025-1033.
- Leuschner, R. G. and P. J. Lillford** (2000). "Effects of hydration on molecular mobility in phase-bright *Bacillus subtilis* spores." *Microbiology* **146**(Pt 1): 49-55.
- Leuschner, R. G. K. and P. J. Lillford** (2003). "Thermal properties of bacterial spores and biopolymers." *International Journal of Food Microbiology* **80**(2): 131-143.
- Levitt, J. A., M. K. Kuimova, et al.** (2009). "Membrane-bound molecular rotors measure viscosity in live cells via fluorescence lifetime imaging." *The Journal of Physical Chemistry C* **113**(27): 11634-11642.
- Lin, S.-Y., C.-W. Wu, et al.** (1995). "Effect of ethanol on the protein secondary structure of the human gastric mucosa, in vitro." *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* **33**(5): 255-262.
- Lindsay, J. A., T. C. Beaman, et al.** (1985). "Protoplast water content of bacterial spores determined by buoyant density sedimentation." *Journal of Bacteriology* **163**(2): 735-737.
- Lis, L., M. McAlister, et al.** (1982). "Measurement of the lateral compressibility of several phospholipid bilayers." *Biophysical Journal* **37**(3): 667.
- Liu, R., P. Qin, et al.** (2010). "Toxic effects of ethanol on bovine serum albumin." *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology* **24**(1): 66-71.
- López, D., H. Vlamakis, et al.** (2009). "Cannibalism enhances biofilm development in *Bacillus subtilis*." *Molecular Microbiology* **74**(3): 609-618.
- Macdonald, A. G.** (1984). "The effects of pressure on the molecular structure and physiological functions of cell membranes." *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* **304**(1118): 47-68.
- Magde, D., R. Wong, et al.** (2002). "Fluorescence quantum yields and their relation to lifetimes of rhodamine 6G and fluorescein in nine solvents: improved absolute standards for quantum yields." *Photochemistry and Photobiology* **75**(4): 327-334.
- Magge, A., A. C. Granger, et al.** (2008). "Role of dipicolinic acid in the germination, stability, and viability of spores of *Bacillus subtilis*." *Journal of Bacteriology* **190**(14): 4798-4807.
- Magge, A., B. Setlow, et al.** (2009). "Analysis of dye binding by and membrane potential in spores of *Bacillus* species." *Journal of Applied Microbiology* **106**(3): 814-824.
- Magill, N. G., A. E. Cowan, et al.** (1994). "The internal pH of the forespore compartment of *Bacillus megaterium* decreases by about 1 pH unit during sporulation." *Journal of Bacteriology* **176**(8): 2252-2258.
- Mansilla, M. C., L. E. Cybulski, et al.** (2004). "Control of membrane lipid fluidity by molecular thermosensors." *Journal of Bacteriology* **186**(20): 6681-6688.

- Mansure, J. J., A. D. Panek, et al.** (1994). "Trehalose inhibits ethanol effects on intact yeast cells and liposomes." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* **1191**(2): 309-316.
- Margosch, D., M. G. Gänzle, et al.** (2004). "Pressure inactivation of *Bacillus* endospores." *Applied and Environmental Microbiology* **70**(12): 7321-7328.
- Mason, J. M. and P. Setlow** (1986). "Essential role of small, acid-soluble spore proteins in resistance of *Bacillus subtilis* spores to UV light." *Journal of Bacteriology* **167**(1): 174-178.
- Mathys, A., B. Chapman, et al.** (2007). "Flow cytometric assessment of *Bacillus* spore response to high pressure and heat." *Innovative Food Science & Emerging Technologies* **8**(4): 519-527.
- Matsumoto, K., J. Kusaka, et al.** (2006). "Lipid domains in bacterial membranes." *Molecular Microbiology* **61**(5): 1110-1117.
- Matz, L. L., T. C. Beaman, et al.** (1970). "Chemical composition of exosporium from spores of *Bacillus cereus*." *Journal of Bacteriology* **101**(1): 196-201.
- McDonnell, G. and A. D. Russell** (1999). "Antiseptics and disinfectants: Activity, action, and resistance." *Clinical Microbiology Reviews* **12**(1): 147-179.
- McKenney, P. T., A. Driks, et al.** (2013). "The *Bacillus subtilis* endospore: assembly and functions of the multilayered coat." *Nature Reviews. Microbiology* **11**(1): 33-44.
- McKenney, P. T. and P. Eichenberger** (2012). "Dynamics of spore coat morphogenesis in *Bacillus subtilis*." *Molecular Microbiology* **83**(2): 245-60.
- Meador-Parton, J. and D. L. Popham** (2000). "Structural analysis of *Bacillus subtilis* spore peptidoglycan during sporulation." *Journal of Bacteriology* **182**(16): 4491-4499.
- Melly, E., A. E. Cowan, et al.** (2002). "Studies on the mechanism of killing of *Bacillus subtilis* spores by hydrogen peroxide." *Journal of Applied Microbiology* **93**(2): 316-325.
- Mizoguchi, H. and S. Hara** (1996). "Effect of fatty acid saturation in membrane lipid bilayers on simple diffusion in the presence of ethanol at high concentrations." *Journal of Fermentation and Bioengineering* **81**(5): 406-411.
- Moir, A.** (2006). "How do spores germinate?" *Journal of Applied Microbiology* **101**(3): 526-30.
- Møretrø, T., E. Heir, et al.** (2012). "Control of *Salmonella* in food related environments by chemical disinfection." *Food Research International* **45**(2): 532-544.
- Nagle, J.** (1993). "Area/lipid of bilayers from NMR." *Biophysical Journal* **64**(5): 1476-1481.
- Najjar, M. B., M. Chikindas, et al.** (2007). "Changes in *Listeria monocytogenes* membrane fluidity in response to temperature stress." *Applied and Environmental Microbiology* **73**(20): 6429-6435.
- Naumann, D.** (2000). "Infrared spectroscopy in microbiology." *Encyclopedia of analytical chemistry*.
- Naumann, D., S. Keller, et al.** (1995). "FT-IR spectroscopy and FT-Raman spectroscopy are powerful analytical tools for the non-invasive characterization of intact microbial cells." *Journal of Molecular Structure* **347**: 399-405.
- Nguyen Thi Minh, H., P. Dantigny, et al.** (2010a). "Germination and inactivation of *Bacillus subtilis* spores induced by moderate hydrostatic pressure." *Biotechnology and Bioengineering* **107**(5): 876-83.
- Nguyen Thi Minh, H., A. Durand, et al.** (2011). "Effect of sporulation conditions on the resistance of *Bacillus subtilis* spores to heat and high pressure." *Applied Microbiology and Biotechnology* **90**(4): 1409-1417.

- Nguyen Thi Minh, H., J.-M. Perrier-Cornet, *et al.* (2010b). "New insight into the thermal properties and the biological behaviour of the bacterial spores." *Food Biophysics* **5**(3): 238-246.
- Nicholson, W., P. Fajardo-Cavazos, *et al.* (2002). "Bacterial endospores and their significance in stress resistance." *Antonie van Leeuwenhoek* **81**(1): 27-32.
- Nicholson, W. L., N. Munakata, *et al.* (2000). "Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments." *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **64**(3): 548-572.
- Nicholson, W. L. and P. Setlow (1990). Sporulation, germination and outgrowth. In *Molecular biological methods for Bacillus*. C. Hardwood and S. Cutting. Chichester, UK, John Wiley & Sons Ltd: 391-450.
- Op den Kamp, J. A. F., I. Redai, *et al.* (1969). "Phospholipid composition of *Bacillus subtilis*." *Journal of Bacteriology* **99**(1): 298-303.
- Paidhungat, M., B. Setlow, *et al.* (2002). "Mechanisms of induction of germination of *Bacillus subtilis* spores by high pressure." *Applied and Environmental Microbiology* **68**(6): 3172-3175.
- Paidhungat, M., B. Setlow, *et al.* (2000). "Characterization of spores of *Bacillus subtilis* which lack dipicolinic acid." *Journal of Bacteriology* **182**(19): 5505-5512.
- Paidhungat, M. and P. Setlow (2001). "Localization of a germinant receptor protein (GerBA) to the inner membrane of *Bacillus subtilis* spores." *Journal of Bacteriology* **183**(13): 3982-3990.
- Pandey, B. N. and K. P. Mishra (1999). "Radiation induced oxidative damage modification by cholesterol in liposomal membrane." *Radiation Physics and Chemistry* **54**(5): 481-489.
- Paredes-Sabja, D., P. Setlow, *et al.* (2011). "Germination of spores of *Bacillales* and *Clostridiales* species: mechanisms and proteins involved." *Trends in Microbiology* **19**(2): 85-94.
- Parker, G. F., R. A. Daniel, *et al.* (1996). "Timing and genetic regulation of commitment to sporulation in *Bacillus subtilis*." *Microbiology* **142**(12): 3445-3452.
- Patra, M., E. Salonen, *et al.* (2006). "Under the influence of alcohol: The effect of ethanol and methanol on lipid bilayers." *Biophysical Journal* **90**(4): 1121-1135.
- Perkins, D., C. Lovell, *et al.* (2004). "Effects of autoclaving on bacterial endospores studied by Fourier transform infrared microspectroscopy." *Applied Spectroscopy* **58**(6): 749-753.
- Piggot, P. J. and D. W. Hilbert (2004). "Sporulation of *Bacillus subtilis*." *Current Opinion in Microbiology* **7**(6): 579-586.
- Pillman, H. A. and G. J. Blanchard (2010). "Effects of ethanol on the organization of phosphocholine lipid bilayers." *The Journal of Physical Chemistry B* **114**(11): 3840-3846.
- Plomp, M., T. J. Leighton, *et al.* (2007). "In vitro high-resolution structural dynamics of single germinating bacterial spores." *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**(23): 9644-9649.
- Pogliano, J., N. Osborne, *et al.* (1999). "A vital stain for studying membrane dynamics in bacteria: a novel mechanism controlling septation during *Bacillus subtilis* sporulation." *Molecular Microbiology* **31**(4): 1149-1159.
- Popham, D. L. (2002). "Specialized peptidoglycan of the bacterial endospore: the inner wall of the lockbox." *Cellular and Molecular Life Sciences* **59**(3): 426-33.
- Popham, D. L., J. Helin, *et al.* (1996). "Muramic lactam in peptidoglycan of *Bacillus subtilis* spores is required for spore outgrowth but not for spore dehydration or heat

- resistance." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**(26): 15405-15410.
- Popham, D. L., S. Sengupta, et al.** (1995). "Heat, hydrogen peroxide, and UV resistance of *Bacillus subtilis* spores with increased core water content and with or without major DNA-binding proteins." *Applied and Environmental Microbiology* **61**(10): 3633-8.
- Prescott, L. M., J. P. Harley, et al.** (2010). Microbiologie 3^e édition. Bruxelles, De Boeck.
- Ragkousi, K., A. E. Cowan, et al.** (2000). "Analysis of nucleoid morphology during germination and outgrowth of spores of *Bacillus* species." *Journal of Bacteriology* **182**(19): 5556-5562.
- Ragoonanan, V., J. Malsam, et al.** (2008). "Roles of membrane structure and phase transition on the hyperosmotic stress survival of *Geobacter sulfurreducens*." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1778**(10): 2283-2290.
- Ricca, E. and S. Cutting** (2003). "Emerging applications of bacterial spores in nanobiotechnology." *Journal of Nanobiotechnology* **1**(1): 6.
- Rose, R., B. Setlow, et al.** (2007). "Comparison of the properties of *Bacillus subtilis* spores made in liquid or on agar plates." *Journal of Applied Microbiology* **103**(3): 691-9.
- Russell, A. D.** (1990). "Bacterial spores and chemical sporicidal agents." *Clinical Microbiology Reviews* **3**(2): 99-119.
- Russell, A. D.** (2004). "Factors influencing the efficacy of antimicrobial agents." *Russell, Hugo and Ayliffe's principles and practice of disinfection, preservation and sterilization*: 98-127.
- Salas-Pacheco, J. M., B. Setlow, et al.** (2005). "Role of the Nfo (YqfS) and ExoA apurinic/aprimidinic endonucleases in Protecting *Bacillus subtilis* spores from DNA damage." *Journal of Bacteriology* **187**(21): 7374-7381.
- Salgia, R., J. Becker, et al.** (1993). "Altered membrane fluidity in rat hepatocytes during endotoxic shock." *Molecular and Cellular Biochemistry* **121**(2): 143-148.
- Sanchez-Salas, J.-L., B. Setlow, et al.** (2011). "Maturation of released spores is necessary for acquisition of full spore heat resistance during *Bacillus subtilis* sporulation." *Applied and Environmental Microbiology* **77**(19): 6746-6754.
- Santo, L. Y. and R. H. Doi** (1974). "Ultrastructural analysis during germination and outgrowth of *Bacillus subtilis* spores." *J Bacteriol* **120**(1): 475-81.
- Schuster, K., F. Mertens, et al.** (1999). "FTIR spectroscopy applied to bacterial cells as a novel method for monitoring complex biotechnological processes." *Vibrational Spectroscopy* **19**(2): 467-477.
- Segev, E., Y. Smith, et al.** (2012). "RNA dynamics in aging bacterial spores." *Cell* **148**(1): 139-149.
- Seow, C. C., P. B. Cheah, et al.** (1999). "Antiplasticization by water in reduced-moisture food systems." *Journal of food science* **64**(4): 576-581.
- Setlow, B., S. Atluri, et al.** (2006). "Role of dipicolinic acid in resistance and stability of spores of *Bacillus subtilis* with or without DNA-Protective $\alpha\beta$ -type small acid-soluble proteins." *Journal of Bacteriology* **188**(11): 3740-3747.
- Setlow, B., A. R. Hand, et al.** (1991). "Synthesis of a *Bacillus subtilis* small, acid-soluble spore protein in *Escherichia coli* causes cell DNA to assume some characteristics of spore DNA." *Journal of Bacteriology* **173**(5): 1642-53.
- Setlow, B., C. A. Loshon, et al.** (2002). "Mechanisms of killing spores of *Bacillus subtilis* by acid, alkali and ethanol." *Journal of Applied Microbiology* **92**(2): 362-375.
- Setlow, B., L. Peng, et al.** (2009). "Characterization of the germination of *Bacillus megaterium* spores lacking enzymes that degrade the spore cortex." *Journal of Applied Microbiology* **107**(1): 318-328.

- Setlow, B. and P. Setlow** (1980). "Measurements of the pH within dormant and germinated bacterial spores." *Proceedings of the National Academy of Sciences* **77**(5): 2474-2476.
- Setlow, B. and P. Setlow** (1993). "Binding of small, acid-soluble spore proteins to DNA plays a significant role in the resistance of *Bacillus subtilis* spores to hydrogen peroxide." *Applied and Environmental Microbiology* **59**(10): 3418-3423.
- Setlow, B. and P. Setlow** (1995). "Small, acid-soluble proteins bound to DNA protect *Bacillus subtilis* spores from killing by dry heat." *Applied and Environmental Microbiology* **61**(7): 2787-90.
- Setlow, B. and P. Setlow** (1996). "Role of DNA repair in *Bacillus subtilis* spore resistance." *Journal of Bacteriology* **178**(12): 3486-3495.
- Setlow, B., P. G. Wahome, et al.** (2008). "Release of small molecules during germination of spores of *Bacillus* species." *Journal of Bacteriology* **190**(13): 4759-4763.
- Setlow, P.** (2003). "Spore germination." *Current Opinion in Microbiology* **6**(6): 550-556.
- Setlow, P.** (2005). "The bacterial spore: nature's survival package." *Culture* **26**(2): 1-4.
- Setlow, P.** (2006). "Spores of *Bacillus subtilis*: their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals." *Journal of Applied Microbiology* **101**(3): 514-525.
- Setlow, P.** (2007). "I will survive: DNA protection in bacterial spores." *Trends in Microbiology* **15**(4): 172-80.
- Setlow, P.** (2008). "Dormant spores receive an unexpected wake-up call." *Cell* **135**(3): 410-412.
- Setlow, P. and E. A. Johnson** (2007). Spores and their significance. In *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*. M. P. Doyle and L. R. Beuchat. Washington, ASM Press.
- Shah, I. M., M. H. Laaberki, et al.** (2008). "A eukaryotic-like Ser/Thr kinase signals bacteria to exit dormancy in response to peptidoglycan fragments." *Cell* **135**(3): 486-96.
- Shechter, E.** (1990). "Fluidité membranaire." *Biochimie et Biophysique des Membranes. Aspects Structuraux et Fonctionnels*, Masson, Paris: 97-121.
- Shin, S.-Y., E. G. Calvisi, et al.** (1994). "Microscopic and thermal characterization of hydrogen peroxide killing and lysis of spores and protection by transition metal ions, chelators, and antioxidants." *Applied and Environmental Microbiology* **60**(9): 3192-3197.
- Shinitzky, M. and Y. Barenholz** (1978). "Fluidity parameters of lipid regions determined by fluorescence polarization." *Biochimica et Biophysica Acta* **515**(4): 367-94.
- Simonin, H., L. Beney, et al.** (2007). "Sequence of occurring damages in yeast plasma membrane during dehydration and rehydration: mechanisms of cell death." *Biochimica et Biophysica Acta* **6**(10): 28.
- Simonin, H., L. Beney, et al.** (2008). "Controlling the membrane fluidity of yeasts during coupled thermal and osmotic treatments." *Biotechnology and Bioengineering* **100**(2): 325-333.
- Sinensky, M.** (1974). "Homeoviscous adaptation-A homeostatic process that regulates the viscosity of membrane lipids in *Escherichia coli*." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **71**(2): 522-525.
- Skomurski, J. F., F. M. Racine, et al.** (1983). "Steady-state fluorescence anisotropy changes of 1,6-diphenyl-1,3,5,-hexatriene in membranes from *Bacillus megaterium* spores." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **731**(3): 428-436.
- Slater, S. J., C. Ho, et al.** (1993). "Contribution of hydrogen bonding to lipid-lipid interactions in membranes and the role of lipid order: Effects of cholesterol, increased phospholipid unsaturation, and ethanol." *Biochemistry* **32**(14): 3714-3721.

- Sonenshein, A. L.** (2000a). Bacterial sporulation: a response to environmental signals. In Bacterial stress responses. G. Storz and R. Hengge-Aronis. Washington, D.C., ASM Press: 199-215.
- Sonenshein, A. L.** (2000b). "Control of sporulation initiation in *Bacillus subtilis*." *Current Opinion in Microbiology* **3**(6): 561-566.
- Stecchini, M. L., M. Del Torre, et al.** (2006). "Glassy state in *Bacillus subtilis* spores analyzed by differential scanning calorimetry." *International Journal of Food Microbiology* **106**(3): 286-290.
- Stewart, G. S. A. B., M. W. Eaton, et al.** (1980). "An investigation of membrane fluidity changes during sporulation and germination of *Bacillus megaterium* K.M. measured by electron spin and nuclear magnetic resonance spectroscopy." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **600**(2): 270-290.
- Stoker, H. S.** (2011). General, organic, and biological chemistry. Boston, Cengage Learning.
- Storz, G. and R. Hengge** (2011). Bacterial stress responses (2nd Edition), American Society for Microbiology (ASM).
- Strauch, M., V. Webb, et al.** (1990). "The SpoOA protein of *Bacillus subtilis* is a repressor of the *abrB* gene." *Proceedings of the National Academy of Sciences* **87**(5): 1801-1805.
- Suhling, K., J. A. Levitt, et al.** (2012). "Fluorescence lifetime imaging of molecular rotors in living cells." *J Vis Exp* **9**(60): 2925.
- Sunde, E. P., P. Setlow, et al.** (2009). "The physical state of water in bacterial spores." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**(46): 19334-19339.
- Swerdlow, B. M., B. Setlow, et al.** (1981). "Levels of H⁺ and other monovalent cations in dormant and germinating spores of *Bacillus megaterium*." *Journal of Bacteriology* **148**(1): 20-29.
- Swerdlow, R. D. and P. Setlow** (1984). "Isolation and characterization of two distinct fractions from the inner membrane of dormant *Bacillus megaterium* spores." *Journal of Bacteriology* **158**(1): 9-15.
- Swift, S. R. and L. Trinkle-Mulcahy** (2004). "Basic principles of FRAP, FLIM and FRET." *Proceedings - Royal Microscopical Society* **39**: 3-10.
- Szabelski, M., Z. Gryczynski, et al.** (2010). "Photophysical properties of novel fluorescein derivative and its applications for time-resolved fluorescence spectroscopy." *Chemical Physics Letters* **493**(4): 399-403.
- Szabelski, M., R. Luchowski, et al.** (2009). "Evaluation of instrument response functions for lifetime imaging detectors using quenched Rose Bengal solutions." *Chemical Physics Letters* **471**(1-3): 153-159.
- Tam, N. K. M., N. Q. Uyen, et al.** (2006). "The intestinal life cycle of *Bacillus subtilis* and close relatives." *Journal of Bacteriology* **188**(7): 2692-2700.
- Tennen, R., B. Setlow, et al.** (2000). "Mechanisms of killing of spores of *Bacillus subtilis* by iodine, glutaraldehyde and nitrous acid." *Journal of Applied Microbiology* **89**(2): 330-8.
- Thomas, P.** (2012). "Long-term survival of *Bacillus* spores in alcohol and identification of 90% ethanol as relatively more spori/bactericidal." *Current Microbiology* **64**(2): 130-9.
- Trujillo, R. and N. Laible** (1970). "Reversible inhibition of spore germination by alcohols." *Applied Microbiology* **20**(4): 620-623.
- Van der Heide, U. A., G. Van Ginkel, et al.** (1996). "DPH is localised in two distinct populations in lipid vesicles." *Chemical Physics Letters* **253**(1-2): 118-122.

- Vasudevan, P., A. Weaver, *et al.* (2007). "Spore cortex formation in *Bacillus subtilis* is regulated by accumulation of peptidoglycan precursors under the control of sigma K." *Molecular Microbiology* **65**(6): 1582-1594.
- Vepachedu, V. R., K. Hirneisen, *et al.* (2007). "Studies of the release of small molecules during pressure germination of spores of *Bacillus subtilis*." *Letters in Applied Microbiology* **45**(3): 342-348.
- Vepachedu, V. R. and P. Setlow (2005). "Localization of SpoVAD to the inner membrane of spores of *Bacillus subtilis*." *Journal of Bacteriology* **187**(16): 5677-5682.
- Vigh, L., B. Maresca, *et al.* (1998). "Does the membrane's physical state control the expression of heat shock and other genes?" *Trends in Biochemical Sciences* **23**(10): 369-374.
- Waharte, F., C. Spriet, *et al.* (2006). "Setup and characterization of a multiphoton FLIM instrument for protein-protein interaction measurements in living cells." *Cytometry Part A* **69A**(4): 299-306.
- Wang, S. T., B. Setlow, *et al.* (2006). "The forespore line of gene expression in *Bacillus subtilis*." *Journal of Molecular Biology* **358**(1): 16-37.
- Wang, W. (2005). "Protein aggregation and its inhibition in biopharmaceutics." *International Journal of Pharmaceutics* **289**(1-2): 1-30.
- Westphal, A. J., P. B. Price, *et al.* (2003). "Kinetics of size changes of individual *Bacillus thuringiensis* spores in response to changes in relative humidity." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**(6): 3461-3466.
- White, S. H. and G. I. King (1985). "Molecular packing and area compressibility of lipid bilayers." *Proceedings of the National Academy of Sciences* **82**(19): 6532-6536.
- Williams, S. C., Y. Hong, *et al.* (1998). "Distinguishing between living and nonliving bacteria: Evaluation of the vital stain propidium iodide and its combined use with molecular probes in aquatic samples." *Journal of Microbiological Methods* **32**(3): 225-236.
- Winter, R. and W. Dzwolak (2005). "Exploring the temperature-pressure configurational landscape of biomolecules: from lipid membranes to proteins." *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences* **363**(1827): 537-563.
- Wolkers, W. F. and F. A. Hoekstra (1995). "Aging of dry desiccation-tolerant pollen does not affect protein secondary structure." *Plant Physiology* **109**(3): 907-915.
- Wu, Y., M. Stefl, *et al.* (2013). "Molecular rheometry: direct determination of viscosity in Lo and Ld lipid phases via fluorescence lifetime imaging." *Physical Chemistry Chemical Physics*: 10.1039/c3cp51953h.
- Wuytack, E. Y. and C. W. Michiels (2001). "A study on the effects of high pressure and heat on *Bacillus subtilis* spores at low pH." *International Journal of Food Microbiology* **64**(3): 333-41.
- Yi, X. and P. Setlow (2010). "Studies of the commitment step in the germination of spores of bacillus species." *Journal of Bacteriology* **192**(13): 3424-33.
- Yoshikawa, H., A. Hirano, *et al.* (2012). "Effects of alcohol on the solubility and structure of native and disulfide-modified bovine serum albumin." *International Journal of Biological Macromolecules* **50**(5): 1286-1291.
- Young, S. B. and P. Setlow (2003). "Mechanisms of killing of *Bacillus subtilis* spores by hypochlorite and chlorine dioxide." *Journal of Applied Microbiology* **95**(1): 54-67.
- Young, S. B. and P. Setlow (2004a). "Mechanisms of killing of *Bacillus subtilis* spores by Decon and Oxone, two general decontaminants for biological agents." *Journal of Applied Microbiology* **96**(2): 289-301.

- Young, S. B. and P. Setlow** (2004b). "Mechanisms of *Bacillus subtilis* spore resistance to and killing by aqueous ozone." *Journal of Applied Microbiology* **96**(5): 1133-42.
- Zhang, P., P. Setlow, et al.** (2009). "Characterization of single heat-activated *Bacillus* spores using laser tweezers Raman spectroscopy." *Opt Express* **17**(19): 16480-91.
- Zhang, P., S. Thomas, et al.** (2012). "Effects of cortex peptidoglycan structure and cortex hydrolysis on the kinetics of Ca²⁺-dipicolinic acid release during *Bacillus subtilis* spore germination." *Journal of Bacteriology* **194**(3): 646-52.
- Zhou, Z., H. Xia, et al.** (2008). "Oral administration of a *Bacillus subtilis* spore-based vaccine expressing *Clonorchis sinensis* tegumental protein 22.3 kDa confers protection against *Clonorchis sinensis*." *Vaccine* **26**(15): 1817-1825.

ANNEXES



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Biochimica et Biophysica Acta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bbamem

Direct investigation of viscosity of an atypical inner membrane of *Bacillus* spores: A molecular rotor/FLIM study

Pauline Loison^a, Neveen A. Hosny^b, Patrick Gervais^a, Dominique Champion^c,
Marina K. Kuimova^{b,*}, Jean-Marie Perrier-Cornet^{a,*}

^a UMR PAM/Equipe PMB Université de Bourgogne/Agrosup Dijon Nord, 1 Esplanade Erasme 21000 Dijon, France

^b Department of Chemistry, Imperial College London, Exhibition Road, SW7 2AZ, UK

^c UMR PAM/Equipe PAPC Université de Bourgogne/Agrosup Dijon Nord, 1 Esplanade Erasme 21000 Dijon, France

ARTICLE INFO

Article history:
Received 10 April 2013
Received in revised form 5 June 2013
Accepted 25 June 2013
Available online xxx

Keywords:

Bacillus subtilis spores
Lipid membranes
Microviscosity
Molecular rotors
Fluorescence Lifetime Imaging (FLIM)

ABSTRACT

We utilize the fluorescent molecular rotor Bodipy-C12 to investigate the viscoelastic properties of hydrophobic layers of bacterial spores *Bacillus subtilis*. The molecular rotor shows a marked increase in fluorescence lifetime, from 0.3 to 4 ns, upon viscosity increase from 1 to 1500 cP and can be incorporated into the hydrophobic layers within the spores from dormant state through to germination. We use fluorescence lifetime imaging microscopy to visualize the viscosity inside different compartments of the bacterial spore in order to investigate the inner membrane and relate its compaction to the extreme resistance observed during exposure of spores to toxic chemicals. We demonstrate that the bacterial spores possess an inner membrane that is characterized by a very high viscosity, exceeding 1000 cP, where the lipid bilayer is likely in a gel state. We also show that this membrane evolves during germination to reach a viscosity value close to that of a vegetative cell membrane, ca. 600 cP. The present study demonstrates quantitative imaging of the microscopic viscosity in hydrophobic layers of bacterial spores *Bacillus subtilis* and shows the potential for further investigation of spore membranes under environmental stress.

© 2013 Published by Elsevier B.V.

1. Introduction

Some bacterial species such as *Clostridium*, *Bacillus*, or *Sporosarcina*, have the capacity to sporulate when placed in an unfavorable environment. These spores are a major concern in the food industry because they are responsible for spoilage and food borne disease due to their high resistance to food preservation processes. Spores resist numerous stress factors efficiently, including extreme heat, starvation, treatment with chemicals and radiation and are able to germinate even after long periods of dormancy [1–4]. This high resistance to environmental stress is due to their particular and partitioned structure [5]. Bacterial spores possess numerous layers, each protecting the inside of the spore from stress: a proteinaceous coat, a cortex made of peptidoglycan, two phospholipid-based membranes and, finally, a protoplast with a low water content where the DNA is located. The two membranes have different location and function: the outer membrane is localized between the coat and the cortex and the inner membrane surrounds the protoplast. The inner membrane is particularly interesting as it is generally defined as the main permeability barrier; however, its viscoelastic properties and its structure are largely unknown. Indeed, its

composition is thought to be similar to that of a vegetative cell membrane, with only a slight variation in proportion of different phospholipids present [6]. However, the inner membrane has a set of very particular properties: a low mobility of lipids [7] and a weak permeability to small molecules [8,9]. This membrane is thought to be key in the spore's resistance to toxic chemicals, in particular DNA-damaging agents [10] and it is also thought to play a major role in germination, stemming from the fact that it contains numerous germination receptors [11–13]. However, very little is known about the biophysical state of this membrane and the details of its evolution during germination. Study of the inner membrane is particularly difficult as it is buried deep within the spore and surrounded by multiple layers. It is therefore challenging to study the inner membranes mechanical and biophysical properties by standard biophysical techniques, while excluding the influence of the neighboring layers. In this work we set out to use a new viscosity-sensitive spectroscopic technique that visualizes the viscoelastic properties of different hydrophobic structures within the bacterial spore *Bacillus subtilis*, in particular focusing on the inner membrane.

Viscosity is a key property that influences diffusion and mobility in fluids. In microscopically heterogeneous biological systems, such as biopolymer gels, lipid bilayers or even individual live cells, traditional mechanical methods for probing viscosity are not suitable; they are destructive and require large volumes of material for analysis. Alternatively, several spectroscopic and microscopic approaches have

* Corresponding author. Tel.: +44 207 594 8558.

** Corresponding author. Tel.: +33 3 80 77 40 04.

E-mail addresses: m.kuimova@imperial.ac.uk (M.K. Kuimova),
jm.perrier@agrosupdjijon.fr (J.-M. Perrier-Cornet).

0005-2736/\$ – see front matter © 2013 Published by Elsevier B.V.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2013.06.028>

Please cite this article as: P. Loison, et al., Direct investigation of viscosity of an atypical inner membrane of *Bacillus* spores: A molecular rotor/FLIM study, *Biochim. Biophys. Acta* (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2013.06.028>

98 been developed, such as fluorescence recovery after photobleaching
99 (FRAP) [14], fluorescence correlation spectroscopy (FCS) [15–17] or single
100 particle tracking [18], however, these methods are typically limited
101 to a single point measurement. Here we use fluorescence lifetime imag-
102 ing microscopy (FLIM) in conjunction with a viscosity-dependent
103 fluorophore termed “molecular rotor” [19–21] to directly visualize the
104 viscosity of hydrophobic domains of spores.

105 The molecular rotor meso-phenyl-4,4'-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-
106 s-indacene (Bodipy-C₁₂) has been used as a probe for microscopic
107 viscosity in a variety of systems, including live cells, sol-gels and lipid
108 mono- and bilayers [19–22]. It was established that for this fluorophore
109 the non-radiative deactivation pathways are activated at low viscosity.
110 In practice this means that both the fluorescence intensity and the
111 lifetime are strongly viscosity dependent. We have previously demon-
112 strated that the fluorescence lifetime is a superior marker for
113 micro-viscosity in heterogeneous systems, since it is not affected by
114 changes in probe concentration or by its distribution [20,21]. Consistent
115 with the modified Förster-Hoffmann equation [23], the fluorescence
116 lifetime (τ_f) of molecular rotors displays the following dependence on
117 viscosity (η):

$$\log \tau_f = \log \left(\frac{z}{k_r} \right) + \alpha \log \eta \quad (1)$$

119 where k_r is the radiative decay rate constant, and z and α are constants
120 required to fit the data to the equation.

121 We have calibrated a lifetime of the Bodipy-C₁₂ rotor vs. viscosity in
122 a wide range of viscosities. Fitting the experimental data obtained be-
123 tween 15 and 1500 cP [20] we have demonstrated that for Bodipy-C₁₂
124 in methanol/glycerol mixtures Eq. (1) becomes:

$$\ln \tau_f = 0.5336 \times \ln \eta + 4.5862 \quad (2)$$

126 where τ_f is the lifetime of Bodipy-C₁₂ in ps and η is viscosity in cP.

127 This expression provides a direct means of converting the lifetime
128 of the Bodipy-C₁₂ into the micro-viscosity of the probe environment.

129 For the applications of Bodipy-C₁₂ as a bioviscosity sensor it is
130 essential that its fluorescence lifetime is not affected by other envi-
131 ronmental factors such as pH, ionic strength, polarity of the solvent
132 and the presence of the excited state quenchers. It is well known
133 that the spectral characteristics of unmodified Bodipy chromophores,
134 including lifetimes, are largely independent on the solution pH and
135 polarity of the solvent [24,25]. The quenching of Bodipy with protein
136 components has also been shown to be inefficient [24]. Thus we
137 concluded that the major factor affecting the non radiative decay
138 and hence the fluorescence lifetime of Bodipy-C₁₂ is viscosity [20].

139 Given the hydrophobic structure of the Bodipy-C₁₂ rotor, in particu-
140 lar its saturated C₁₂ hydrocarbon chain, we expect partitioning of the
141 probe in all the hydrophobic domains of the spore, namely the inner
142 and the outer membranes and the protein coat. FLIM provides the
143 means to obtain lifetime information (and hence the microviscosity
144 via Eq. (2)) in every pixel of a diffraction-limited fluorescence image.
145 We performed FLIM imaging of whole dormant or coatless spores, ger-
146 minated spores and vegetative cells to directly determine the viscosity
147 of internal layers for the first time.

148 2. Materials and methods

149 2.1. Spores and cell culture

150 The *Bacillus subtilis* strains used in this work were wild type 168
151 (*Bacillus* Genetic Stock Center, Department of Biochemistry, The
152 Ohio State University, Columbus, OH 43010, USA) or PS533. We also
153 employed the strain PS4150 in which most of the *cotE* and *gerE* coding
154 sequences are deleted, hence this strain lacks most of its coat [26].
155 PS533 and PS4150 (both from the Department of Molecular, Microbial,

and Structural Biology, University of Connecticut Health Center, USA) 156
are derivatives of isogenic strain PS832, a prototrophic derivative of 157
strain 168. PS533 carries a plasmid pUB110 encoding resistance to 158
kanamycin [27]. We ensured that similar fluorescence lifetime values 159
were obtained in dormant PS533 and strain 168 spores. In the text 160
168 strain is referred to as wild type spores and PS4150 strain as *cotE* 161
gerE. 162

163 Spores were prepared at 37 °C in 2xSchaeffer's-glucose liquid 163
medium. Pre-warmed medium was inoculated with the preculture 164
at a ratio of 1:10 in a baffled flask. After sufficient sporulation was 165
achieved, spores were harvested, washed 4 times with cold distilled 166
water and stored at 4 °C until further use. Purification of spores was 167
performed by washing with water for several days as previously 168
described [28]. If required, the spores were further purified by 169
Histodenz® (Sigma Aldrich) centrifugation and extensively washed 170
to have purity above 95% of phase bright spores. 171

172 The molecular rotor Bodipy-C₁₂ was synthesized as previously de- 172
scribed [21]. The stock solution of Bodipy-C₁₂ in DMSO (2.15 mM) 173
was added to the medium containing cells ca. 3 hours after inocula- 174
tion to create the final concentration of the dye of 4.3 μM. Control 175
experiments verified that the presence of the probe had no effects 176
on growth and germination of spores. Fluorescence images were 177
acquired at least 7 days after spore production. 178

179 Vegetative cells were grown and stained following the procedure 179
adapted from [7] in Luria Broth (LB) medium (Sigma-Aldrich) until 180
an OD_{600nm} of ca. 0.2 was achieved. Bodipy-C₁₂ was then added at a 181
final concentration of 4.3 μM and vegetative cells remained in contact 182
with the probe for 2 to 3 hours. The cells were then harvested by 183
centrifugation, washed with free LB medium and re-suspended in 184
physiological buffer for observation. 185

2.2. Spores germination and coat fragments

186 Prior to germination, spores of *B. subtilis* were heat activated for 187
30 min in a water bath at 70 °C and then immediately cooled down 188
on ice. For germination, spores were re-suspended at an OD_{600 nm} of 189
ca. 1 in LB rich medium or in 10 mM L-alanine in 25 mM Tris-HCl 190
buffer at 37 °C. 168 (wild type) and PS4150 (*cotE gerE* mutant) 191
were germinated for 45 min and 1 hour, respectively. After this 192
time, spores were harvested by centrifugation, washed with distilled 193
water at 4 °C and then re-suspended in fluorophore-free water, after 194
which the FLIM images were recorded. Coat fragments were identi- 195
fied by transmission and lifetime microscopy following germination 196
of wild type spores for at least 1.5 hours. 197

2.3. Decoated spores preparation

198 Decoated spores were prepared according to a procedure de- 199
scribed in [11]. Spores were suspended at an OD_{600 nm} of ca. 10–15 200
for 30 min at 70 °C in 1% sodium dodecyl sulfate (SDS), 0.1 M 201
NaOH, 0.1 M NaCl and 0.1 M dithiothreitol in order to extract coat 202
proteins. Thus decoated spores were washed extensively with dis- 203
tilled water (ca. 8 times) and stored at 4 °C in PBS. The decoating 204
efficiency was checked by following the decrease in OD_{600 nm} in the 205
presence of 0.5 mg/ml of lysozyme. 206

2.4. Microscopy and FLIM analysis

207 In all microscopy experiments an aliquot of spores or vegetative 208
cells sample (10 μl) was placed on a microscope coverslip and 209
covered with a pad of 10% agarose to hold the cells in place and to 210
preserve moisture. The slides were discarded after 30 min of imaging. 211

212 The transmission and fluorescence images of stained spores and 212
vegetative cells were captured on a Nikon C1Si Eclipse TE 2000 U con- 213
focal microscope and analyzed using the EZ-C1 software 3.50 (Nikon, 214
Japan). Imaging was carried out with a ×100 PlanApo objective 215

216 (NA: 1.4, oil, Nikon, Japan) at a scanning speed of one frame per
 217 second. The FLIM system (LSM kit, Picoquant) was incorporated into
 218 the microscope and consisted of a pulsed diode laser (485 nm,
 219 FWHM = 83 ps, 40 MHz) and a double SPAD detector. Images of
 220 256×256 pixels were recorded for about 210 s with a pixel dwell
 221 of 9.60 μ s. TCSPC lifetime recording was performed over 200 tempo-
 222 ral channels (final resolution of 0.128 ps/channel). The absence of
 223 Bodipy-C₁₂ aggregates, which could be detected by a broad emission
 224 band at >600 nm was verified for the different samples, to ensure
 225 the robustness of lifetime analysis [20,29].

226 FLIM images were analyzed using TRI2 software version 2.4.4.1
 227 (Gray Institute, Oxford, [30]). In order to obtain between 1000 and
 228 10,000 counts in the pixel peak maxima, circular binning of 4 was
 229 used for analysis of the different spore samples, unless otherwise
 230 stated. We have also applied a signal threshold between 10–20%
 231 and 100% to avoid background noise and signal from weakly stained
 232 internal parts of spores (the spore's core). Wild type spores, coat
 233 fragments, de-coated and germinated spores were analyzed using a
 234 bi-exponential fitting (Marquardt algorithm) for each pixel of the
 235 decay curves. *cotE gerE* were analyzed by a mono-exponential fitting
 236 since the biexponential algorithm did not produce an improvement
 237 in χ^2_r (monoexponential fit χ^2_r between 1.1 and 1.2, biexponential
 238 fit χ^2_r between 1.0 and 1.1). Vegetative cells were analyzed using a
 239 mono-exponential fitting with the Bayesian algorithm, which allows
 240 a decay trace with lower pixel counts to be fitted. This procedure
 241 helped to avoid excessive binning and a reduction of spatial resolution.
 242 For vegetative cells, a circular binning of 2 and a threshold of
 243 between 10–20% and 100% was used. In all cases, the instrument
 244 response function (IRF) was recorded by detecting the extremely
 245 short-lived fluorescence of fluorescein (0.2 mM) diluted in a saturated
 246 solution of KI, using the same setup parameters as for the sample. For
 247 biexponential decays the amplitudes of each component are represented
 248 as 'fractional intensities' (Fi) varying between 0 and 1 (equivalent to
 249 0–100%).

250 The lifetime and fractional intensity histograms were exported and
 251 analyzed using Origin software (Origin Pro 8, Origin Lab). The "Fit
 252 multiple peaks" tool was used to determine the maxima and FWHM
 253 (full-width half maxima) of the peak representing the average and
 254 error bars of each lifetime and fractional intensity value respectively.

3. Results

3.1. Measuring viscosity of dormant spores

257 Confocal fluorescence images of wild type spores were collected at
 258 least 7 days after harvesting (Fig. 1) and showed bright green fluores-
 259 cence typical of Bodipy-C₁₂. Thus molecular rotor incorporated deeply
 260 into spores and was stable. At the same time the fluorescence intensi-
 261 ty in the central region of the spore was ca. 10% of the outside
 262 region, indicating a low level of staining in the spore's core. Apart
 263 from the central region, fluorescence appeared uniform across the
 264 external layers of spores. It was not possible to distinguish between
 265 different structures, at least with the diffraction-limited resolution,
 266 and based on the acquired fluorescence intensity images.

267 The Bodipy-C₁₂ fluorophore utilized here is a hydrophobic probe,
 268 and we expect it to stain the hydrophobic parts of the spores. There-
 269 fore, in dormant spores, we expect the inner and outer membrane
 270 and the coat to be stained with Bodipy-C₁₂ [31]. We hypothesized that
 271 the viscosity-sensitive lifetime of Bodipy-C₁₂ would allow us to differ-
 272 entiate these structures based on their respective viscosity/rigidity, in
 273 spite of the fact that their spacing was below the resolution of confocal
 274 microscopy.

275 The FLIM image of Bodipy-C₁₂ obtained in wild type spores is shown
 276 in Fig. 2. The time-resolved fluorescence decay curves in each pixel of
 277 the image required biexponential fitting (Fig. 2a). As homogeneous
 278 samples, including organic solvents, model lipid bilayers and mono-
 279 layers, and even cellular membranes, display monoexponential decays
 280 [20,22], we concluded that in dormant spores Bodipy-C₁₂ was probing
 281 at least two environments of different viscosity, in every pixel of
 282 the image. This could be expected as the distance between two lipid
 283 membranes in the spore and protein core is below the resolution
 284 limit, e.g. see Fig. 1c for the TEM image of a dormant spore [32].

285 A lifetime histogram measured in wild type spores is shown in
 286 Fig. 2b: the shorter lifetime τ_2 is 1.1 ± 0.3 ns and the longer lifetime
 287 τ_1 is between 3 and 5.5 ns. While the histogram for τ_2 has a Gaussian
 288 distribution, the histogram of τ_1 is clearly asymmetric. By fitting the
 289 asymmetric histogram in Origin we could identify two separate
 290 peaks: 3.4 ± 0.2 ns and 4.2 ± 0.5 ns. In order to assign the observed
 291 lifetimes τ_1 and τ_2 to a particular spore layer and to observe how the

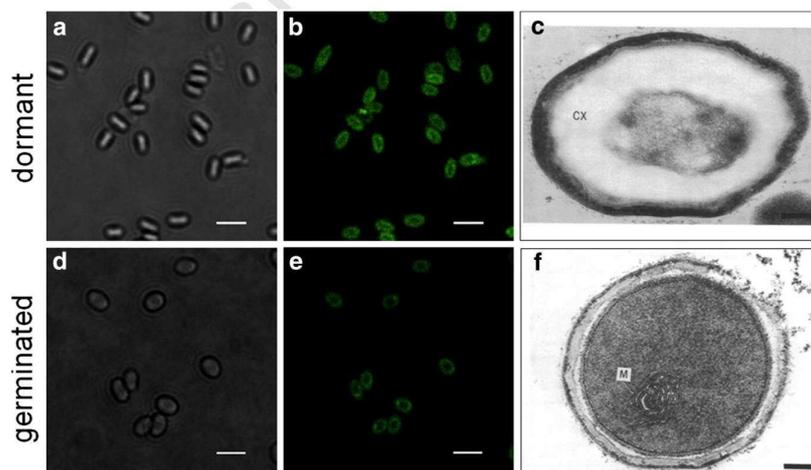


Fig. 1. Transmission (a, d) and fluorescence (b, e) images of dormant and germinated wild type spores stained during sporulation with 4.3 μ M solution of Bodipy-C₁₂. Images were obtained by confocal microscopy with 488 nm excitation. TEM images (c, f) of dormant and germinated spores. Scale bars = 2 μ m for a, b, d, e; 0.1 μ m for c and f. (c) and (f) are reproduced with permission from [32] (original images Fig. 2a and e). Copyright American Society for Microbiology, 2013. Original legends: M, "Mesosome" (artifact); CX, Cortex.

Please cite this article as: P. Loison, et al., Direct investigation of viscosity of an atypical inner membrane of *Bacillus* spores: A molecular rotor/FLIM study, *Biochim. Biophys. Acta* (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbame.2013.06.028>

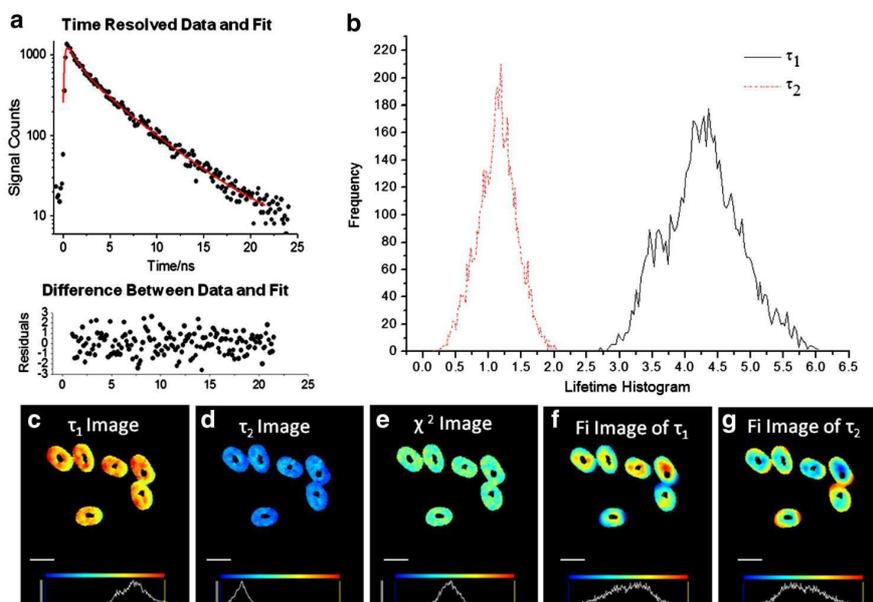


Fig. 2. Fluorescence lifetime image analysis of dormant wild type spores stained with 4.3 μM solution of Bodipy-C₁₂. (a) A typical time-resolved fluorescence decay curve, showing a biexponential decay; difference between data and fit is weighted by 1/sqrt fit. (b) A lifetime histogram of τ_1 and τ_2 and corresponding images of τ_1 (c), τ_2 (d), χ^2 (e) and fractional intensities (Fi) of τ_1 (f) and τ_2 (g). The false-color lifetime scale is from 0.2 to 5.6 ns, χ^2 scale from 0.2 to 2.0 and the fractional intensity scale from 0.2 to 0.8. Scale bar = 1 μm .

292 viscosity of the layers changed upon spore perturbation, we performed
293 additional experiments and data analysis.

294 Firstly, to visualize the primary localization of τ_1 and τ_2 in
295 dormant spores, we performed global lifetime analysis of the FLIM
296 image. This protocol assumes that the lifetimes τ_1 and τ_2 are shared
297 between all pixels in the image. Using this algorithm the fractional
298 intensity images of τ_1 and τ_2 can be determined more precisely, as
299 shown in Fig. 2f and g. The false color scheme corresponds to intensities
300 between 20% and 80%. From these images it can be clearly seen that the
301 shorter lifetime τ_2 has the highest intensity (65% – shown by the
302 orange-to-red color in Fig. 2g) in the thin layer on the outside of the
303 spore, and is low on the inside (35% – shown by the green-to-blue
304 color in Fig. 2g). Conversely, the longer lifetime τ_1 has the highest
305 intensity (65%) in the inner part of the spore (Fig. 2f). These lifetime
306 images highlighted a significant degree of spatial offset between the two
307 lifetimes in dormant spores and allowed the separation of different domain
308 contributions by image analysis. It is important to emphasize that no
309 separation of spore domains is possible by standard intensity imaging
310 (cf. Fig. 1).

311 3.2. Separation of domain contributions by image analysis

312 Using the lifetime image obtained from a global analysis as a
313 guide, we used the masking tool in the TRI2 software to divide each
314 imaged wild type spore into two parts. Firstly, the outer part of the
315 spore was isolated for analysis (Fig. 3b), which consisted of a thin
316 rim of material, characterized by a green-blue color in Fig. 2f. Secondly,
317 applying the information from the TEM image of a dormant spore
318 (Fig. 1c), a separation line can be drawn anywhere within the cortex
319 layer isolating the coat and the outer membrane from the inner mem-
320 brane. Even though both parts should have some contribution from
321 the cortex, it was anticipated to be only weakly stained by Bodipy-C₁₂
322 due to its hydrophilic nature.

323 Fig. 3 shows maps of fractional intensities of the inside and outside
324 of the wild type spores. It can be seen that the τ_2 values vary little
325 between the inner and outer parts: 0.9 ± 0.4 ns in the outer part
326 and 1.1 ± 0.4 ns in the central part. These values correspond to an
327 average viscosity of ca. 80 cP, according to the Bodipy-C₁₂ calibration
328 [Eq. (2)].

329 At the same time, τ_1 showed significant differences: 3.3 ± 0.5 ns
330 (the outer part) and 4.1 ± 0.5 ns (the inner part) ($p < 0.001$ according
331 to the Mann-Whitney Rank Sum Test, with no equality of the variance).
332 In the external part, the slow decay with τ_1 contributed 42% of the total
333 intensity (blue color), while the fast decay with τ_2 contributed 58%
334 of the total. On the contrary, in the inner part, the fractional intensity
335 of τ_1 was significant in comparison to τ_2 (yellow-red color, 56% of
336 the total decay), as shown in Fig. 3a and c. The partial masking of the
337 spore allowed us to distinguish between the values of the longer life-
338 time τ_1 in the outer and the inner parts of the spore, 3.3 ns (725 cP)
339 and 4.1 ns (1090 cP), respectively. In fact, the corresponding peaks
340 could also be clearly seen on the τ_1 histogram of the whole spore
341 (Fig. 2b) and this gave us the confidence to conclude that these differ-
342 ences were not an artifact of the fitting and/or masking.

343 3.3. Coatless spores and germination residues

344 In order to assist the assignment of viscosity values to a particular
345 domain within the spores, we obtained FLIM images of chemically
346 de-coated wild type spores and coat residues formed as a result of a
347 germination process, as well as of mutant spores *cotE gerE*. Persistent
348 fluorescence of Bodipy-C₁₂ after the de-coating treatment confirms
349 that the probe is firmly incorporated into the inner membrane.
350 Fig. 4 provides the average τ_1 and τ_2 values measured in all these
351 samples.

352 The de-coating process used in our experiments is known to
353 remove a large amount of coat proteins and also a very large part

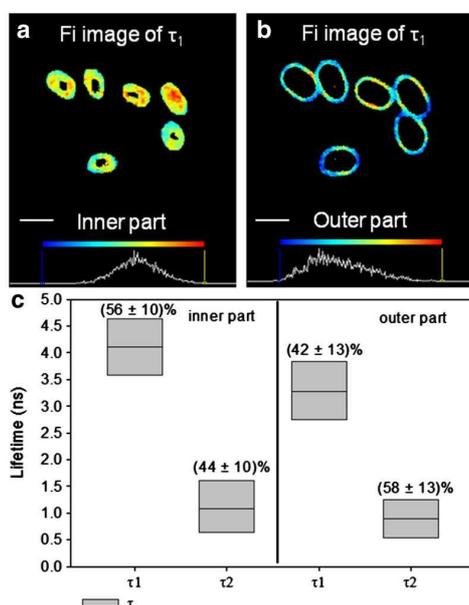


Fig. 3. Analysis of fluorescence lifetime image of dormant wild type spores stained with 4.3 μ M solution of Bodipy-C₁₂ by spatial masking of the inner and the outer parts of the spore. A circular binning of 2 was used. Fractional intensity (Fi) images obtained in the masked inner (a) and the outer (b) parts of the spore. (c) Average τ_1 and τ_2 values (y scale, with error bars shown as boxes) and the corresponding fractional intensities (shown as % in the graph) measured in the inner and the outer parts of the spore. Scale bar = 1 μ m.

(if not all) of the outer membrane [33,34]. In the decoated spore sample, the fluorescence decays required fitting with a bi-exponential model. Here, the most significant lifetime contribution was from τ_1 (4.4 ± 0.6 ns) with an average fractional intensity of 66% (Fig. 4c).

Conversely, in the coat residues the dominant lifetime was τ_2 (72% of the total decay) with an average value of 0.7 ± 0.2 ns. This value is close to the dominant lifetime found in the masked outer part in dormant spores (Fig. 3c).

Finally, we imaged *cotE gerE*, the mutant spores known to lack most coat proteins except for a thin layer of insoluble coat material [26]. For *cotE gerE* spores a mono-exponential model was sufficient to fit the decay curves with good $\chi^2 = 1.1$ –1.2. The lifetime measured was 3.9 ± 0.2 ns, i.e. close to the τ_1 value of decoated spores and whole dormant spores. No shorter component of ca. 1 ns was detected for *cotE gerE*, providing strong evidence that this component originated from the protein coat, which is missing in *cotE gerE*.

These data allowed us to assign Bodipy-C₁₂ lifetimes to particular structures within spores. In wild type decoated and *cotE gerE* spores, the hydrophobic structures remaining were the membranes, in particular the inner membrane, apart from a small amount of coat proteins. Thus, the matching and dominant τ_1 lifetimes (Fig. 4a) measured in dormant, decoated and *cotE gerE* spores were attributed to the inner membrane. The average lifetime value of 3.9–4.4 ns corresponds to a viscosity range between 990 and 1220 cP, which is consistent with the weak mobility suggested for this membrane by other workers investigating *Bacillus subtilis* or *Clostridium* spp. spores [7,35].

The shorter lifetime τ_2 was dominant in the wild type spore coat residues (72%) and in the outer masked part of the whole dormant spore (58%), but was missing in *cotE gerE* spores and had a minimal contribution in wild type decoated spores. On this basis we assign

the τ_2 lifetime of Bodipy-C₁₂ as residing in the spore coat. Finally, the τ_1 value of 3.4 ± 0.2 ns, detected as a shoulder on a histogram of whole dormant spores (Fig. 2b) and as a 42% contribution in the outer masked part of the spore (Fig. 3) most likely corresponded to the outer spore membrane. This contribution was absent in wild type decoated and *cotE gerE* spores. The viscosity of this membrane (725 cP) was significantly lower than that of the inner membrane.

We note that a shorter lifetime τ_2 (= 1.4 ns) was still observed in decoated spores (34% of the total decay), and τ_2 (= 1.1 ns) was observed in the inner masked part of the whole dormant spore (44% of the total decay). This lifetime is unlikely to be due to the cortex staining as no such lifetime was detected in the *cotE gerE* sample, which has an intact cortex. The masking process is of course not robust. Likewise, the decoating process is supposed to remove most of the outer membrane and a large amount of coat, however some proteins still remains and this could explain why even the inner part shows some contribution from τ_2 .

3.4. Evolution of the spore environments during germination

We also examined how the viscosity of different spore compartments, in particular the inner membrane, changed during germination. For this purpose, stained wild type and *cotE gerE* spores were tested for germination in L-alanine. FLIM measurements were performed after 45 min of germination for wild type and after 1 hour for *cotE gerE* spores. At these germination times, both types of spores were in stage II, as reported previously [13]. This meant that the cortex was already degraded by enzymes and the coat had split open [13,32]. The TEM structure of the germinated wild type spore is shown in Fig. 1f.

In wild type spores, the probe visualized two environments using FLIM before germination, and still detected two fluorescent lifetimes after germination, $\tau_1 = 3.0 \pm 0.4$ ns (41%) and $\tau_2 = 0.9 \pm 0.2$ ns (59%). The principal component τ_2 , assigned to the spore coat, was not modified by germination. On the contrary, the lifetime attributed to the membrane decreased to an average value of 3.0 ± 0.4 ns, equivalent to a viscosity of 610 cP (Fig. 5d). This significant reduction in viscosity is likely due to the shape changes that the inner membrane has to undergo during germination. The membrane is very compact in the dormant state and has to increase its area by ca 1.6 fold to follow the increase in volume of the core upon germination [7].

We have also recorded FLIM images of germinated mutant *cotE gerE* spores. For these spores a single fluorescence lifetime was recorded both before (Fig. 5a) and after germination (Fig. 5b). The average lifetime measured in *cotE gerE* spores changed from 3.9 ± 0.2 ns to 2.9 ± 0.1 ns as a result of germination, which corresponds to a viscosity decrease from 990 to 570 cP.

The lifetime values 2.9 and 3.0 ns, measured in germinated *cotE gerE* and wild type spores, respectively, were similar to the monoexponential lifetime measured in the membrane of vegetative cells, 2.7 ± 0.2 ns (Fig. 5c). Thus, during germination, the inner membrane transforms to acquire the viscoelastic properties of a vegetative cells membrane. This is in agreement with previous observation of how the inner membrane modifies during germination [7].

4. Discussion

Viscosity is a vital parameter that determines the rate of diffusion of species in a condensed media. In spite of its importance, very few viscosity values have been reported to date for bacterial cells. In *Escherichia coli*, spin labels inserted in the membrane's vesicles were used to measure viscosity [36], giving a value of 250 cP at 23 °C.

Using single-point FRAP [7] measurements of di-4-ANEPPS, it was previously demonstrated in dormant spores that the lipid mobility of the inner membrane is very low. Indeed, the fluorophore mobile fraction measured in dormant spores was 0.31 compared to 0.75 in

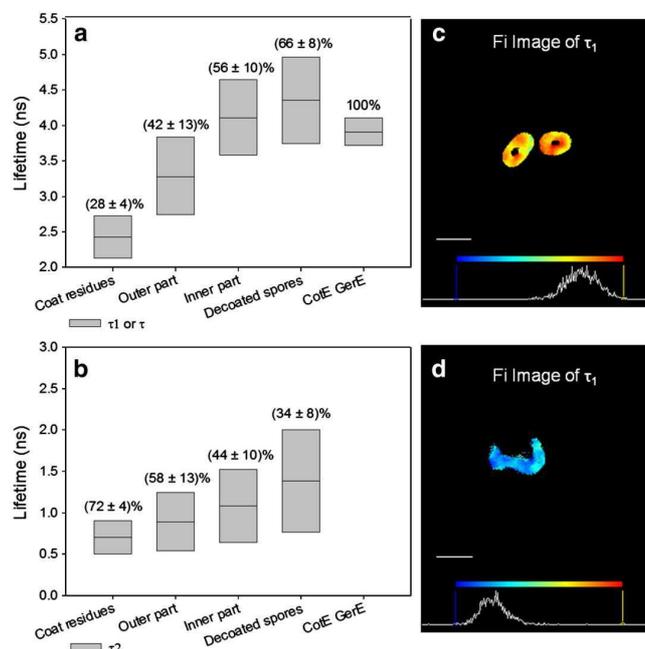


Fig. 4. Comparison of lifetime components obtained in wild type and *cotE gerE* spores stained with 4.3 μM solution of Bodipy-C₁₂. Average lifetimes τ_1 (a) and τ_2 (b) measured in various samples of wild type spores (inner and outer parts, chemically decoated and coat residues) and in *cotE gerE* spores; corresponding fractional intensities are shown as % in the graph. Fractional intensity images of τ_1 for decoated wild type spores (c) and coat residues (d), scale from 0.2 to 0.8. Scale bar = 1 μm .

germinated spores or vegetative cells. Moreover, this work suggested that the inner leaflet of this membrane could be partly in the gel phase. A recent study reported GP values of Laurdan in *Clostridium sporogenes* vegetative cells vs. dormant (or decoated) spores to be 0.31 and 0.77, respectively. These values again suggested a high degree of lipid order in the inner membrane of these spores [35].

Molecular rotors provide a new type of probe for imaging microviscosity in microbiological environments. The rotor used in this study is based on the highly fluorescent Bodipy structure that partitions in the hydrophobic and lipid-rich regions of the spore. We add the probe during sporulation, to ensure that it is well incorporated in the deepest hydrophobic regions of spores and, in particular, its inner membrane [7,37]. Importantly, the use of fluorescence lifetime to quantify viscosity makes it possible to separate and visualize the contributions from different domains inside whole spores. This provides significant advantages compared to intensity-based imaging as well as the single point measurements of diffusion coefficients, such as FRAP and FCS.

In wild type spores, fitting FLIM data required a biexponential model. We attributed the biexponential decays to the fact that Bodipy-C₁₂ stains several domains that are below the resolution limit of the confocal microscopy (ca. 200 nm) and so every pixel in the image contains information from at least two spore domains. The long Bodipy-C₁₂ lifetime of ca. 4 ns (1100 cP) was assigned to the inner membrane, thereby confirming its extremely high viscosity.

In wild type spores, the dominant Bodipy-C₁₂ lifetime (τ_2) of ca. 1 ns (70–80 cP) was assigned to the coat. The coat represents a high fraction of the entire spore volume in dormant spores. According to the literature values the total coat thickness is about 77 nm, while a total spore “radius” is about 577 nm [38]. Approximating the spore as a sphere, the coat volume amounts to about 35% of the total spore

volume while the coat proteins represent 50% to 80% of the total spore protein [39]. This could explain why τ_2 (assigned to the coat) was the dominant contribution in the FLIM images of wild type spores. Since the coat is not a homogeneous environment, we were not able to ensure whether 70–80 cP was a real value of solvent-like viscosity inside the protein network, or whether it was due to partial binding of the probe.

Alternatively, it is possible that the short lifetime originates from a small fraction of the Bodipy-C₁₂ probe, localized in the very viscous inner membrane itself. We have measured the decays of Bodipy-C₁₂ from model lipid bilayers above and below their phase transition temperature. While in the fluid disordered phase (above T_i) the decays were monoexponential, the decay became biexponential when the bilayer was in the gel phase, i.e. for Bodipy-C₁₂ embedded in a DPPC bilayer at room temperature 1.5 \pm 0.1 ns and 4.5 \pm 0.3 ns decays (ca. 50:50 contribution) were measured. The values of lifetimes measured in various spores in this study were very similar to the above example, with τ_1 between 3.9 and 4.4 ns. Thus, the data indicate that the inner membrane of the *B. subtilis* spore might be in the gel rather than the fluid phase. The high viscosity values alone (990–1220 cP) are fully consistent with the gel phase hypothesis, which can go some way to explain the inner membrane’s rigidity and impermeability to most chemicals.

In *cotE gerE* spores, a viscosity of 990 cP was attributed to the inner membrane. We note that in the literature, the inner membrane of this mutant is described as less impermeable than that of wild type spores [9], which is in agreement with our data.

We have demonstrated that the outer membrane of dormant wild type spores has a viscosity of about 725 cP. This value is slightly higher than measured in the membrane of vegetative cells. It indicates that this membrane is slightly more viscous than a classical membrane, which

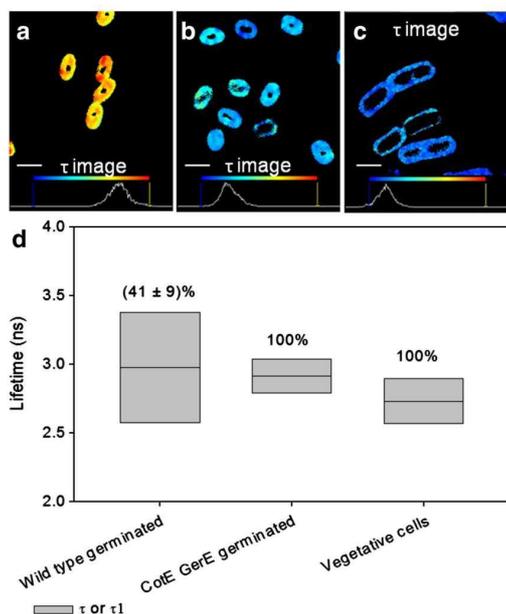


Fig. 5. The changes in lifetime upon germination of *B. subtilis* spores stained with 4.3 μ M solution of Bodipy-C₁₂. Fluorescence lifetime images of *cotE gerE* spores before (a) or after 1 hour of germination in 10 mM L-alanine (b) and in vegetative cells (c). The false-color lifetime scale is from 2.3 to 4.65 ns. (d) Fluorescence lifetimes (τ_1 for biexponential decay in wild type spores) measured in various spore samples; Corresponding fractional intensities are shown as % in the graph. Scale bar = 1 μ m.

could be due to its localization between the coat and the cortex, adding extra rigidity to the structure. However, the outer membrane is not thought to be a significant permeability barrier [40], which is consistent with the lower viscosity value measured by Bodipy-C₁₂. We were not able to detect a specific lifetime related to the outer membrane in mutant *cotE gerE* spores.

During germination, the inner membrane of the spore becomes the cell membrane of the outgrowing cell [11]. Thus, it loses its special characteristics of low permeability and rigidity and acquires features of the future plasma membrane of vegetative cell. Our FLIM data on germinated spores (stage II) incubated with Bodipy-C₁₂ demonstrate that the viscosity of the inner membrane becomes 600 cP and 570 cP in wild type and *cotE gerE* spores respectively, which is a viscosity reduction of approximately a half, in excellent agreement with the 2-fold increase in mobility measured upon germination by FRAP [7].

5. Conclusions

Lifetime-based viscosity determination using molecular rotors is a very promising technique for measuring the rigidity of different layers in spores, where the concentration of a fluorophore introduced during sporulation is very difficult to estimate. FLIM microscopy allows the measurement of microviscosity without any of the problems associated with unknown probe concentration. For bacterial spores, this presented a real advantage when studying the internal layers of whole unmodified spores. Our data demonstrate the power of FLIM imaging using molecular rotors for the non-destructive yet detailed study of bacterial spores in their natural environment. Our future studies will concentrate on establishing how the viscoelastic properties of the hydrophobic domains in bacterial spores respond

to environmental stress, such as high pressure and temperature and administration of toxic chemicals which are known to alter membrane properties.

Competing financial interests

The authors declare no competing financial interests.

Acknowledgments

PL thanks the French Ministry of Research and the Regional Council of Burgundy for financial support. MKK is thankful to the UK's Engineering and Physical Sciences Research Council (EPSRC) for the Career Acceleration Fellowship (grant number: EP/E038980/1). We would like to thank Mr Yilei Wu for the synthesis of Bodipy-C₁₂. We are grateful to Barbara Setlow (Department of Molecular, Microbial, and Structural Biology, University of Connecticut Health Center, USA) for providing the PS533 and PS4150 mutant strains. We also thank Yann Roche of the Plateau Technique PIMS IFR 92 (University of Burgundy, Dijon, France) for technical support during FLIM measurements. We also wish to thank Dr P. R Barber (Oxford) for providing access to TRI2 software.

References

- [1] A. Driks, Overview: development in bacteria: spore formation in *Bacillus subtilis*, *Cell. Mol. Life Sci.* 59 (2002) 389–391.
- [2] J. Errington, Regulation of endospore formation in *Bacillus subtilis*, *Nat. Rev. Microbiol.* 1 (2003) 117–126.
- [3] W.L. Nicholson, N. Munakata, G. Horneck, H.J. Melosh, P. Setlow, Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64 (2000) 548–572.
- [4] W. Nicholson, P. Fajardo-Cavazos, R. Rebeil, T. Slieman, P. Riesenman, J. Law, Y. Xue, Bacterial endospores and their significance in stress resistance, *Antonie Van Leeuwenhoek* 81 (2002) 27–32.
- [5] A. Atri, S.J. Foster, Bacterial endospores the ultimate survivors, *Int. Dairy J.* 12 (2002) 217–223.
- [6] K. Griffiths, P. Setlow, Effects of modification of membrane lipid composition on *Bacillus subtilis* sporulation and spore properties, *J. Appl. Microbiol.* 106 (2009) 2064–2078.
- [7] A.E. Cowan, E.M. Olivastro, D.E. Koppel, C.A. Loshon, B. Setlow, P. Setlow, Lipids in the inner membrane of dormant spores of *Bacillus* species are largely immobile, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101 (2004) 7733–7738.
- [8] D.E. Cortezzo, K. Koziol-Dube, B. Setlow, P. Setlow, Treatment with oxidizing agents damages the inner membrane of spores of *Bacillus subtilis* and sensitizes spores to subsequent stress, *J. Appl. Microbiol.* 97 (2004) 838–852.
- [9] E.P. Sunde, P. Setlow, L. Hederstedt, B. Halle, The physical state of water in bacterial spores, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106 (2009) 19334–19339.
- [10] P. Setlow, I will survive: DNA protection in bacterial spores, *Trends Microbiol.* 15 (2007) 172–180.
- [11] M. Paidhungat, P. Setlow, Localization of a Germinant Receptor Protein (GerBA) to the inner membrane of *Bacillus subtilis* spores, *J. Bacteriol.* 183 (2001) 3982–3990.
- [12] A. Moir, B.M. Corfe, J. Behravan, Spore germination, *Cell. Mol. Life Sci.* 59 (2002) 403–409.
- [13] P. Setlow, Spore germination, *Curr. Opin. Microbiol.* 6 (2003) 550–556.
- [14] M.J. Dayel, E.F.Y. Hom, A.S. Verkman, Diffusion of green fluorescent protein in the aqueous-phase lumen of endoplasmic reticulum, *Biophys. J.* 76 (1999) 2843–2851.
- [15] P. Kapusta, M. Wahl, A. Benda, M. Hof, J. Enderlein, Fluorescence lifetime correlation spectroscopy, *J. Fluoresc.* 17 (2007) 43–48.
- [16] J. Koriach, P. Schwill, W.W. Webb, G.W. Feigenson, Characterization of lipid bilayer phases by confocal microscopy and fluorescence correlation spectroscopy, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96 (1999) 8461–8466.
- [17] N.L. Thompson, A.M. Lieto, N.W. Allen, Recent advances in fluorescence correlation spectroscopy, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 12 (2002) 634–641.
- [18] R. Iino, A. Kusumi, Single-fluorophore dynamic imaging in living cells, *J. Fluoresc.* 11 (2001) 187–195.
- [19] G. Hungerford, A. Allison, D. McLoskey, M.K. Kuimova, G. Yahioglu, K. Suhling, Monitoring sol-to-gel transitions via fluorescence lifetime determination using viscosity sensitive fluorescent probes, *J. Phys. Chem. B* 113 (2009) 12067–12074.
- [20] M.K. Kuimova, G. Yahioglu, J.A. Levitt, K. Suhling, Molecular rotor measures viscosity of live cells via fluorescence lifetime imaging, *J. Am. Chem. Soc.* 130 (2008) 6672–6673.
- [21] J.A. Levitt, M.K. Kuimova, G. Yahioglu, P.-H. Chung, K. Suhling, D. Phillips, Membrane-bound molecular rotors measure viscosity in live cells via fluorescence lifetime imaging, *J. Phys. Chem. C* 113 (2009) 11634–11642.
- [22] N.A. Hosny, G. Mohamedi, P. Rademeyer, J. Owen, Y. Wu, M.-X. Tang, R.J. Eckersley, E. Stride, M.K. Kuimova, Mapping microbubble viscosity using fluorescence lifetime imaging of molecular rotors, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110 (2013) 9225–9230.

Please cite this article as: P. Loison, et al., Direct investigation of viscosity of an atypical inner membrane of *Bacillus* spores: A molecular rotor/FLIM study, *Biochim. Biophys. Acta* (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbame.2013.06.028>

- 609 [23] M.K. Kuimova, Mapping viscosity in cells using molecular rotors, *Phys. Chem.*
610 *Chem. Phys.* 14 (2012) 12671–12686.
- 611 [24] J. Karolin, L.B.A. Johansson, L. Strandberg, T. Ny, Fluorescence and absorption
612 spectroscopic properties of dipyrrometheneboron difluoride (BODIPY) deriva-
613 tives in liquids, lipid membranes, and proteins, *J. Am. Chem. Soc.* 116 (1994)
614 7801–7806.
- 615 [25] F. López Arbeloa, T. López Arbeloa, I. López Arbeloa, Electronic spectroscopy of
616 pyromethene 546, *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* 121 (1999) 177–182.
- 617 [26] S. Ghosh, B. Setlow, P.G. Wahome, A.E. Cowan, M. Plomp, A.J. Malkin, P. Setlow, Char-
618 acterization of spores of *Bacillus subtilis* that lack most coat layers, *J. Bacteriol.* 190
619 (2008) 6741–6748.
- 620 [27] B. Setlow, P. Setlow, Role of DNA repair in *Bacillus subtilis* spore resistance,
621 *J. Bacteriol.* 178 (1996) 3486–3495.
- 622 [28] W.L. Nicholson, P. Setlow, Sporulation, Germination and Outgrowth, in: C. Hardwood,
623 S. Cutting (Eds.), *Molecular Biological Methods for Bacillus*, John Wiley & Sons Ltd.,
624 Chichester, UK, 1990, pp. 391–450.
- 625 [29] F. Bergstrom, I. Mikhaylov, P. Hagglof, R. Wortmann, T. Ny, L.B. Johansson, Dimers
626 of dipyrrometheneboron difluoride (BODIPY) with light spectroscopic applica-
627 tions in chemistry and biology, *J. Am. Chem. Soc.* 124 (2002) 196–204.
- 628 [30] P.R. Barber, S.M. Ameer-Beg, J. Gilbey, L.M. Carlin, M. Keppler, T.C. Ng, B. Vojnovic,
629 Multiphoton time-domain fluorescence lifetime imaging microscopy: practical
630 application to protein–protein interactions using global analysis, *J. R. Soc., Inter-
631 face 6* (2009) S93–S105.
- 632 [31] A. Magge, B. Setlow, A.E. Cowan, P. Setlow, Analysis of dye binding by and membrane
633 potential in spores of *Bacillus* species, *J. Appl. Microbiol.* 106 (2009) 814–824.
- [32] L.Y. Santo, R.H. Doi, Ultrastructural analysis during germination and outgrowth of
634 *Bacillus subtilis* spores, *J. Bacteriol.* 120 (1974) 475–481. 635
- [33] V.R. Vepachedu, P. Setlow, Localization of SpoVAD to the inner membrane of
636 spores of *Bacillus subtilis*, *J. Bacteriol.* 187 (2005) 5677–5682. 637
- [34] M. Paidhungat, K. Ragkousi, P. Setlow, Genetic requirements for induction of
638 germination of spores of *Bacillus subtilis* by Ca²⁺-dipicolinate, *J. Bacteriol.* 183
639 (2001) 4886–4893. 640
- [35] S. Hofstetter, C. Denter, R. Winter, L.M. McMullen, M.G. Ganzle, Use of the fluores-
641 cent probe LAURDAN to label and measure inner membrane fluidity of endo-
642 spores of *Clostridium* spp., *J. Microbiol. Methods* 91 (2012) 93–100. 643
- [36] M. Sinensky, Homeoviscous adaptation—A homeostatic process that regulates the
644 viscosity of membrane lipids in *Escherichia coli*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 71
645 (1974) 522–525. 646
- [37] J. Pogliano, N. Osborne, M.D. Sharp, A. Abanes-De Mello, A. Perez, Y.-L. Sun, K.
647 Pogliano, A vital stain for studying membrane dynamics in bacteria: a novel mech-
648 anism controlling septation during *Bacillus subtilis* sporulation, *Mol. Microbiol.* 31
649 (1999) 1149–1159. 650
- [38] A.J. Westphal, P.B. Price, T.J. Leighton, K.E. Wheeler, Kinetics of size changes of in-
651 dividual *Bacillus thuringiensis* spores in response to changes in relative humidity,
652 *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100 (2003) 3461–3466. 653
- [39] M.J. Leggett, G. McDonnell, S.P. Denyer, P. Setlow, J.Y. Maillard, Bacterial spore
654 structures and their protective role in biocide resistance, *J. Appl. Microbiol.* 113
655 (2012) 485–498. 656
- [40] P. Setlow, Spores of *Bacillus subtilis*: their resistance to and killing by radiation,
657 heat and chemicals, *J. Appl. Microbiol.* 101 (2006) 514–525. 658
659

Effect of sporulation conditions on the resistance of *Bacillus subtilis* spores to heat and high pressure

Hue Nguyen Thi Minh · Alain Durand ·
Pauline Loison · Jean-Marie Perrier-Cornet ·
Patrick Gervais

Received: 10 November 2010 / Revised: 14 February 2011 / Accepted: 14 February 2011 / Published online: 5 March 2011
© Springer-Verlag 2011

Abstract *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*) cells were placed in various environmental conditions to study the effects of aeration, water activity of the medium, temperature, pH, and calcium content on spore formation and the resulting properties. Modification of the sporulation conditions lengthened the growth period of *B. subtilis* and its sporulation. In some cases, it reduced the final spore concentration. The sporulation conditions significantly affected the spore properties, including germination capacity and resistance to heat treatment in water (30 min at 97°C) or to high pressure (60 min at 350 MPa and 40°C). The relationship between the modifications of these spore properties and the change in the spore structure induced by different sporulation conditions is also considered. According to this study, sporulation conditions must be carefully taken into account during settling sterilization processes applied in the food industry.

Keywords *Bacillus subtilis* · Spore resistance · Sporulation · Germination · Heat · High pressure

Introduction

The formation of dormant spores is one of the ultimate adaptation modes of *Bacillus* and *Clostridium* species in response to environmental inclemency. In this state, bacterial spores are highly resistant to stress and become

disseminated widely in the environment (Vreeland et al. 2000), where they can become common contaminants of food. In general, dormant spores can act as food-borne pathogens, and complete spore inactivation is required to preserve food qualities. Heat treatment at 121°C for 20 min is used generally to minimize the microbial load (including bacterial spores) of foods. However, this treatment significantly reduces the nutritional and sensory qualities of foods. High-pressure treatment can preserve food qualities but is not very efficient for spore destruction.

Application of pressure cycling (Nguyen Thi Minh et al. 2010a) or the combination of different stresses (Bull et al. 2009) may be necessary to optimize the efficiency of these treatments. However, previous experiments were performed on spore crops produced in optimum conditions for cell growth and spore formation on a laboratory scale. In nature, spore formation may occur during various adverse conditions such as fluctuating temperature, relative humidity, and pressure. Spores might exhibit different properties in these cases because cells are largely disturbed under these conditions. In fact, variation in the water potential has a large effect on bacterial viability (Poirier et al. 1997), and *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*) cells grow weakly at an water activity of 0.930 (Hosono and Hahn-Hägerdal 1986). Increasing the pressure also causes reduction of cell volume (Perrier-Cornet et al. 1995) or permeabilizes cell membrane (Perrier-Cornet et al. 1999), which consequently alter cell viability.

Foods can be contaminated directly by bacterial spores from various environments. Because spore history seems to influence spore properties and resistance, we were interested in studying the effect of sporulation conditions on spore properties with the aim of using this information to optimize food treatment. In

H. Nguyen Thi Minh · A. Durand · P. Loison ·
J.-M. Perrier-Cornet (✉) · P. Gervais
Laboratoire de Génie des Procédés Microbiologiques
et Alimentaires, Université de Bourgogne,
AgroSup Dijon, 1 Esplanade Erasme,
21000 Dijon, France
e-mail: jpperrier@u-bourgogne.fr

this study, *B. subtilis* cells were cultivated in various conditions to simulate perturbations in aeration, temperature, pH, water activity (a_w), and calcium concentration in the medium. The sporulation rate of *B. subtilis* cells under these conditions was studied first. The spores obtained from these modified conditions were then submitted to heat or high-pressure treatment and grown in low- a_w media to study further the effect of sporulation conditions on various spore properties.

Materials and methods

Bacterial strains and spore production

The wild-type strain used was *B. subtilis* ATCC 31324 (DSM 704) obtained from DSMZ (Germany).

Production of spores in standard conditions

A preculture was prepared by incubating a colony in 100 ml compound medium at 37°C with agitation (150 rpm) for 18 h. The compound medium comprised KH_2PO_4 0.5 g L⁻¹, K_2HPO_4 2.5 g L⁻¹, NaCl 1 g L⁻¹, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g L⁻¹, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.5 mg L⁻¹, KCl 1 g L⁻¹, ZnSO_4 5 mg L⁻¹, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 5 mg L⁻¹, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 mg L⁻¹, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g L⁻¹, glucose 15 g L⁻¹, and yeast extract 32 g L⁻¹. The sporulation of *B. subtilis* was initiated in a fermentor by inoculation of 100 mL of preculture in 1 L of the same medium at 37°C, pH 8.0, with air flow of 4 L min⁻¹ and agitation (450 rpm) to ensure oxygen saturation of the medium (Nguyen Thi Minh et al. 2008).

Production of spores in the modified conditions

To study the effect of sporulation conditions on spore properties, only one parameter was modified for each test, and this modification was applied from the beginning to the end of the test. Numerous parameters were tested: low aeration; 0.950- a_w level in the medium with two solutes, glycerol and NaCl; cultivation temperature (45°C and 19°C); pH (10 and 6); and calcium-deficient medium. When spores were produced under the low-aeration condition, to provide 10% dissolved oxygen in the medium, a mixture of air and nitrogen was injected into the fermentor instead of air. Low- a_w medium was obtained by adding 180 g glycerol or 70 g NaCl per 1 L of the compound medium. For conditions at different pH, the medium was adjusted to pH 10 by addition of 1 M NaOH or to pH 6 by addition of 1 M HCl. Calcium-deficient spores were prepared in a medium deprived of CaCl_2 salt.

Harvest and purification of spores

To test the sporulation completion, samples of 1 mL were taken regularly during fermentation, observed under microscope and submitted to heat treatment at 80°C for 10 min. When more than 95% of the microorganisms in the samples survived after heat treatment, the spore suspension in the fermentor was harvested. After four washes with sterile distilled water, the spores produced at pH 10 and 6 were frozen at -20°C (because of the low quantities obtained). The other spore suspensions were spray-dried (Mini Spray Dryer B-290, Buchi, France) with an inlet temperature of 135°C and then stored in a powder form in a dry container at 4°C. All spore preparations used were then free of growing cells and cell debris, as observed by microscopy (TE2000, Nikon, Japan).

Scanning electronic microscopy

Spray-dried spores were suspended in sterile distilled water (10⁹ spores mL⁻¹). Frozen spores produced at pH 10 and 6 were thawed. Spore suspensions were then sonicated for 30 min at 240 W, 20 kHz, 40% active cycle, and room temperature (Vibracell, Fisher Bioblock, France). The spores were washed five times with distilled water and centrifuged at 4,500 rpm for 10 min at 4°C. The pellets were dried in air and then equilibrated at a_w 0.113. Finally, they were metallized with carbon and observed using a JEOL JSM 6400-F electron microscope (Croissy-sur-Seine, France).

Spore size was measured directly on the images using ImageJ software. The data presented here were obtained from the analysis of 30 spores or more of each spore type, except for the spores produced at a_w 0.950 with glycerol.

Germination assay

The germination capacity of *B. subtilis* spores was tested on media prepared at different hydration conditions. The a_w levels of the Columbia agar medium (Biokar Diagnostics, France) were varied by adding appropriate amounts of glycerol (Table 1). The a_w level was controlled at 25°C with a Decagon-AquaLab CX-2 osmometer (Pullman, USA)

Table 1 Solute addition to adjust the water activity of the media at 25°C according to Norrish's equation (Norrish 1966)

a_w	Mass of glycerol (g/1,000 g medium)
0.993	0
0.930	308
0.910	411.6
0.890	515.4

equipped with a Peltier temperature controller. Triplicate determinations were performed to measure the a_w values. The germination kinetics of different types of spores was studied at six a_w levels: 0.890, 0.910, 0.930, 0.950, 0.970, and 0.993. Germination was validated when colonies of at least 1 mm diameter were observed on the plates. This germination assay included not only the germination step, but also outgrowth, and cell multiplications until colony appearance.

High-pressure treatment

Sample preparation

Spore powder was suspended in sterile distilled water. The spore suspensions were mildly sonicated for 30 min at 240 W, 20 kHz, 40% active cycle, and room temperature (Vibracell, Fisher Bioblock, France) to eliminate clumps of spores as determined by microscopy. The final spore concentration was about 2×10^9 spores mL^{-1} . The sample of about 1 mL of spore suspension was transferred into a sterile polyethylene bag, which had been aseptically heat-sealed and stored at room temperature until treatment.

High-pressure treatment

High-pressure treatments were performed in a 1.5-L vessel (GEC Alsthom ACB, France), which was maintained at a constant temperature ($40^\circ\text{C} \pm 3^\circ\text{C}$) and was capable of operating at up to 600 MPa. Hydrostatic pressure was generated by a hydraulic high-pressure pump (Hydro Process, France) connected to the vessel. The pressure and temperature inside the vessel were controlled by a pressure gauge (Sedeme, France) and a K-type thermocouple (Top Industrie, France), respectively. High-pressure treatment was performed at 350 MPa and 40°C , and these conditions were maintained for 1 h because previous work showed that this treatment induces significant inactivation of standard spores. Pressure loading and unloading were performed at about 12 MPa s^{-1} .

Heat treatment

One milliliter of spore suspension (10^9 spores mL^{-1}) was added to 5 mL of distilled water in a 20-mL Pyrex tube

maintained at 97°C in a water bath. After 30-min holding time, the suspension was cooled by immersion of the heat-treated sample in a water bath maintained at room temperature for 10 min.

Viability measurement

The viability of spores was measured using the Colony-Forming Unit (CFU) method. After dilution in physiological water (0.9% NaCl *w/v*), the microbial suspension was spread manually over Columbia agar medium (Biokar Diagnosticxs) and then incubated at 37°C for 24 h. For each resistant test, two controls were carried out: one control was treated at 80°C for 10 min and one control was not treated. The CFU numbers of these two controls were always not significantly different, which means that only spores were present in the spore suspension. All experiments were performed at least in triplicate.

Results

Sporulation efficiency in different conditions

The effects of the sporulation conditions on the efficiency of the sporulation process are presented in Table 2. In the standard optimum condition, 3 days were enough for all cells to complete spore formation, and the final spore concentration was high, at about 10^9 spores mL^{-1} . Sporulation completion corresponded to the survival of 95% or more of the population after heat treatment at 80°C for 10 min. Any change in the sporulation condition lengthened the sporulation phase and reduced the final spore concentration (Table 2), but the amplitude of the changes depended largely on the parameter modified.

In each case, because cell growth and spore formation occurred in the same medium and under the same condition, the modifications in sporulation duration and spore concentration could have resulted from perturbations at different levels such as cell growth and spore formation. Decreasing the aeration rate had the weakest influence on the spore formation process; the same spore concentration and a slightly longer sporulation could be attributed to an increase in the latency growth phase (Kirakosyan et al.

Table 2 Final spore concentrations and times needed for complete growth and sporulation in different conditions

Sporulation conditions	Standard	Low aeration	a_w 0.950 (glycerol)	a_w 0.950 (NaCl)	45°C	19°C	pH 10	pH 6	Calcium deficiency
Time (days)	3	8	17	17	10	14	20	20	14
Concentration (spores mL^{-1})	2.5×10^9	1.8×10^9	2.8×10^8	8.8×10^7	2×10^8	5.4×10^7	1.6×10^7	1.5×10^5	7.2×10^8

2004). For the other cases, the sporulation duration was significantly longer but the spore concentrations were 10% of the values obtained in the standard condition. Among the parameters studied in this work, pH modification, especially decreasing the pH, had the most effect on the spore formation process. The resultant low spore concentrations could be explained by less spore formation because cell growth at the same extent (about 10^9 cell mL⁻¹) was always observed in all cases, even at pH 6. The properties and activities of some enzymes involved in the sporulation process are affected by reduced a_w of the medium (Lee and Kim 1995), temperature modification (Zhou and Chen 2001), and changed pH (Niemi and Vepsäläinen 2005), and any of these can lengthen sporulation duration. Because accumulation of the complex Ca-dipicolinic acid in the prespore is required for progression of the sporulation process (Murrell 1981), removing calcium ions from the sporulation medium disturbed spore formation markedly. These modifications of the sporulation conditions might also affect the morphology and size of spores, which are described in the following section.

Morphology and size of spores produced in different conditions

The morphology of the spores produced in different conditions was examined by scanning electronic microscopy; the results are presented in Fig. 1. As shown in Fig. 1a, *B. subtilis* spores produced in the standard condition had an oval form, measured 1.32 μm in length and 0.84 μm in width, and had many ridges extending along the long axis on the spore surface. These spores have been observed using atomic force microscopy (Chada et al. 2003). According to these authors, these ridges are formed early during spore formation when the spore volume decreases, and they allow spore swelling at the beginning of the germination process. These ridges are also observed in other *Bacillus* spores (e.g., *Bacillus cereus* and *Bacillus anthracis*) but they differ significantly between species (Zolock et al. 2006). Depending on the surface properties, modified spores can be classified into two groups: smooth surface spores and rough surface spores. For each group, images of two spore types are presented. The spores produced at low aeration (Fig. 1b) or at low a_w (Fig. 1c) are classified in the smooth-surface group, whereas the spores produced in the low-calcium medium and at modified pH or temperatures (Fig. 1d,e) belong to the rough-spore group. Modifications of the pH of the sporulation medium also changed the color of the spore obtained. The brown color of standard spores, low- a_w spores and low-aeration spores was bright, but the spores produced at pH 6 were dark-colored and the spores produced at pH 10 were yellowish in color. The average

sizes of these different types of spores are presented in Table 3. In general, modified spores were slightly smaller than the standard spores.

Germination capacity of the spores produced in different conditions

The change in spore size and morphology might influence spore behavior, such as germination ability in detrimental conditions or resistance of spores to stress. The germination ability of these spores was first tested in media with different a_w values. The results are presented in Table 4.

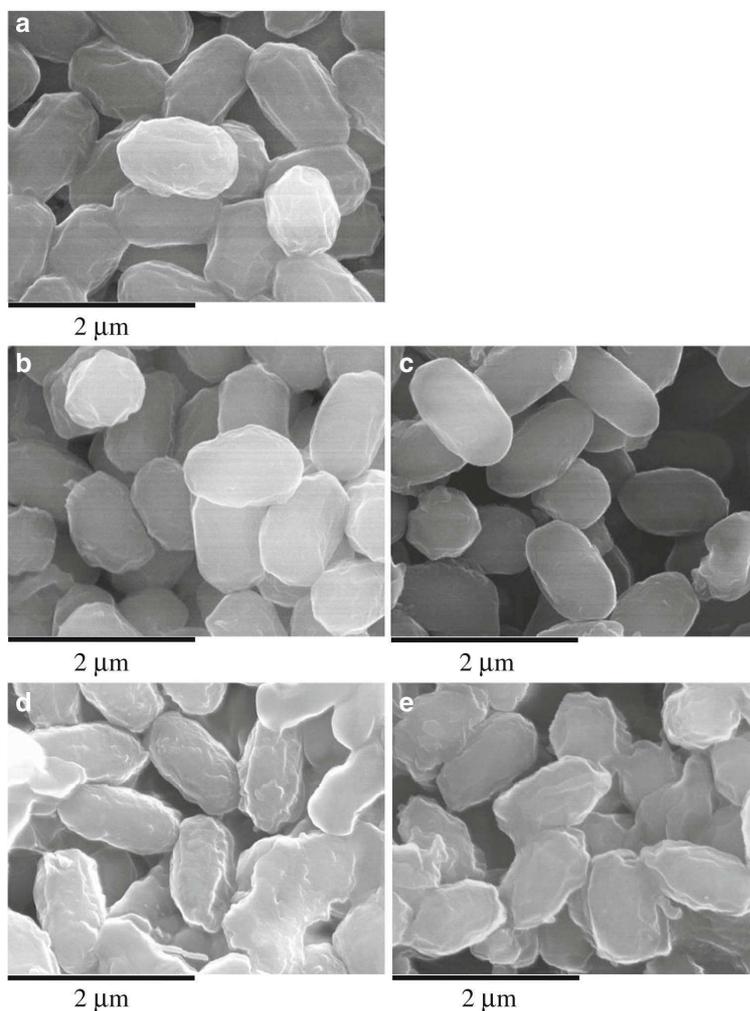
As shown in Table 4, at a_w 0.993, which is the a_w of the recovery medium without glycerol, all spore types germinated and visible colonies were observed after similar incubation times of 1 day. At a_w 0.930, all spores also germinated but visible colonies appeared after longer incubation times (2–6 days), depending on the sporulation conditions. However, when the a_w of the incubation medium was decreased to 0.910, visible colonies were observed only after a longer period (up to 1 month) for spores produced at a_w 0.950, at low temperature (19°C), or at pH 10. It has also been described that *B. cereus* spores have a higher germination capacity in the presence of both inosine and L-alanine when produced at lower temperature (Gounina-Allouane et al. 2008). We note that these three types of spores came from media that induced sparse and difficult sporulation, as described above (cf. Table 2). In this study, the incubation time included the germination step, outgrowth, and cell multiplications until colony appearance. To identify the step where the colony formation of the standard spores was inhibited at a_w 0.910, the coat layers of these spores were removed using a chemical method (Nguyen Thi Minh et al. 2010b), and decoated spores were spread on an agar plate at this a_w level. Visible colonies were observed for the decoated standard spores at a_w 0.910 after an incubation time of 1 day. Thus, growth and cell multiplication were not inhibited at a_w 0.910; these results suggest that the presence of an intact coat in the optimum conditions inhibits the germination at low a_w .

Heat resistance

The resistance of different modified spores to heat was tested. All spores were suspended in distilled water and exposed to 97°C for 30 min. The results are presented in Table 5.

As shown in Table 5, modification of the sporulation conditions had different effects on spore resistance to heat. In some cases, modification of the sporulation conditions sensitized the spores to heat (a_w 0.950, 19°C, or calcium deficiency) and, in other cases, reinforced spore heat resistance (pH 10, 45°C, or low aeration). The spore

Fig. 1 Images of standard spores (a), spores produced at low aeration (b), in a medium at a_w 0.950 with NaCl (c), at 45°C (d), at 19°C (e), obtained by scanning electronic microscopy ($\times 30,000$)



resistance to heat was not affected when glycerol or NaCl was used as the depressor solute. These results show that the optimum conditions for sporulation do not correspond to the optimum conditions for spore heat resistance. For

example, spore production at pH 10 was difficult and only a small amount of spores was obtained, but these spores were highly resistant to heat. By contrast, spore production in the calcium-deficient condition occurred more easily and

Table 3 Size of *Bacillus subtilis* spores by analysis of scanning electronic microscopy images

Sporulation conditions	Standard	Low aeration	a_w 0.950 (glycerol)	a_w 0.950 (NaCl)	45°C	19°C	pH 10	Calcium deficiency
Image in Fig. 1	a	b		c	d	e		
Length (μm) \pm SD	1.32 \pm 0.13	1.25 \pm 0.14	1.20 \pm 0.02	1.32 \pm 0.13	1.30 \pm 0.10	1.30 \pm 0.12	1.34 \pm 0.13	0.81 \pm 0.16
Width (μm) \pm SD	0.84 \pm 0.06	0.80 \pm 0.06	0.85 \pm 0.04	0.76 \pm 0.07	0.77 \pm 0.05	0.76 \pm 0.08	0.78 \pm 0.08	0.58 \pm 0.09

The spores produced at pH 6 are not included because an insufficient number of qualified images was obtained

Table 4 Incubation times to obtain visible colonies of *Bacillus* spores produced in different conditions as a function of the water activity of the germination medium

a _w of germination and outgrowth medium	0.993	0.930	0.910	0.890
Sporulation conditions				
Standard	1 day	6 days	None	None
Low aeration	1 day	4 days	None	None
a _w 0.950 (glycerol)	1 day	6 days	20 days	None
a _w 0.950 (NaCl)	1 day	2 days	3 days	None
45°C	1 day	6 days	None	None
19°C	1 day	6 days	7 days	None
pH 10	1 day	4 days	4 days	None
pH 6	1 day	4 days	None	None
Calcium deficiency	1 day	6 days	None	None

produced more spores in less time than at pH 10, but these spores lost their heat resistance.

The effects of the medium composition (Cazemier et al. 2001), temperature (Baweja et al. 2008; Melly et al. 2002), and pH (Mazas et al. 1997) during sporulation on the properties of *Bacillus* spores or spore germination (Gounina-Allouane et al. 2008) have been reported. Spores with a rough surface have a greater resistance to heat than those with a smooth surface (Lindsay et al. 1990). Our results agree with those of previous studies.

Resistance to high pressure

The resistance of these modified spores to high hydrostatic pressure was examined. Spores were suspended in distilled water and then submitted to pressure treatment at 350 MPa for 60 min at 40°C. The inactivation rates are presented in Table 6.

Compared with the spore response to heat treatment at 97°C for 30 min, pressure treatment at 350 MPa for 60 min at 40°C caused less destruction of all spore types. However, similar to the effects of heat, modification of the sporulation conditions produced spores with greater resistance to pressure. The spores produced at pH 10 were the most resistant to the pressure treatment. Thus, modification of the sporulation conditions changed the spore resistance to hydrostatic pressure; the spores acquired greater resistance

to pressure when not produced in optimum conditions. The resistance and germination properties of *B. subtilis* spores can be modified when they are produced in liquid or in agar medium (Rose et al. 2007).

Discussion

All the modifications of the sporulation conditions used in this study corresponded to those used to induce different types of stress during the growth and subsequent sporulation of *B. subtilis* cells. Low spore yields were recovered after long sporulation times in the modified conditions, and the sporulation often produced small spores (cf. Fig. 1 and Table 2). Interestingly, these modifications of the sporulation conditions were not always detrimental to spore resistance because, for some sporulation conditions, the corresponding spores were more resistant than were the standard spores, as summarized in Table 7.

The results in Table 7 do not show any common correlation between spore properties for any of the sporulation conditions, suggesting that germination capacity, thermal, and hyperbaric resistance are not related. Therefore, the interaction between spore properties and sporulation for each sporulation condition is discussed in the following sections.

Germination rate at low a_w: implication of the spore outer layers

The sporulation rate correlated inversely with the germination rate at low a_w in the modified spores. Sporulation was always more difficult in the modified conditions, but these spores germinated better at low a_w than did the standard spores. This suggests that the modification of the sporulation conditions did not produce *Bacillus* spores with a well-formed structure. These spores could then easily lose their dormancy in the presence of nutrients and thus had greater germination ability at low a_w than the standard spores. However, because some modified spores were more resistant to heat or to pressure than the standard spores, as shown in Table 7, these spores seem to have formed normally and the previous assumption is not valid. The difference in the germination rates at a_w 0.910 between the standard and modified spores might be explained by the

Table 5 Inactivation of *Bacillus subtilis* spores by heat treatment at 97°C for 30 min in distilled water

Sporulation conditions	Standard	Low aeration	a _w 0.950 (glycerol)	a _w 0.950 (NaCl)	45°C	19°C	pH 10	pH 6	Calcium deficiency
Log (N/N ₀) ± SD	-3.53± 0.10	-1.56± 0.36	-8	-8	-2.00± 0.60	-5.50± 0.30	-2.10± 0.58	-3.63± 0.33	-8

Table 6 Inactivation of *Bacillus subtilis* spores by high-pressure treatment at 350 MPa for 60 min at 40°C in distilled water

Sporulation conditions	Standard	Low aeration	a _w 0.950 (glycerol)	a _w 0.950 (NaCl)	45°C	19°C	pH 10	pH 6	Calcium deficiency
Log (N/N ₀) ± SD	-1.82±0.20	-2.23±0.21	-1.73±0.05	-1.15±0.03	-2.31±0.17	-3.37±0.22	-0.66±0.23	-3.37±0.30	-1.09±0.10

observation that the vegetative cells of the *B. subtilis* strain used in this study can grow at this a_w and that colonies appeared after 1 day. Thus, a_w 0.910 seems to inhibit the germination of the standard spores only in the early steps. Decreasing the sporulation temperature to 19°C, adjusting the pH to 10, or reducing the a_w to 0.950 must induce some changes in the spore functionalities that allowed them to germinate at a_w 0.910. Because the binding of nutrients to receptors is the first event in the germination process, the modification of the spore outer layer permeation to germinants (e.g., by change of the GerP proteins in spore coat) might be responsible for the better germination of the modified spores at low a_w (Behravan et al. 2000). Interestingly, when the coat of the standard spores was removed using a chemical method, as described previously (Nguyen Thi Minh et al. 2010b), these decoated spores germinated at a_w 0.910 after an incubation time of 1 day. Increasing the sporulation temperature also decreases the level of at least one coat protein, CotA (Melly et al. 2002). Modifications of the germinant permeation of the spore outer layers might explain the better germination ability at low a_w.

Variation in heat resistance: effect of inner membrane and protoplast composition

A large variation of heat resistance is observed among modified spores, but no clear link was observed between

spore germination ability and spore resistance to heat, as shown in Table 7. For example, decreasing the sporulation temperature to 19°C or increasing the medium pH to 10 each significantly improved the spore germination capacity at low a_w but they inversely affected spore resistance to heat. Although spores produced at pH 10 were more resistant to heat than were the standard spores, those produced at 19°C lost much of their heat resistance. This might be because heat directly inactivates spores without inducing germination (Setlow 2007). The two important aspects of spore structure that might affect their heat resistance are inner membrane fluidity and protoplast composition. When submitted to the different conditions of cell growth and sporulation used in this study, vegetative cells can regulate their membrane fluidity by altering the lipid compositions to maintain their homeoviscous adaptation, as shown by the references in Table 7. As shown by the data in this table, the increase in membrane fluidity of vegetative cells correlated with the spore sensitivity to heat, except in the case of spores produced at pH 10. For example, at low a_w or at 19°C, when the vegetative cells have a more fluid membrane, the spores were significantly more sensitive to heat. By contrast, when vegetative cells have a more rigid membrane, such as spore production at low aeration or at 45°C, these spores were more heat resistant than were the standard spores.

Modification of the sporulation conditions also changes the composition of the spore protoplast. For example,

Table 7 Properties of *Bacillus subtilis* spores according to sporulation conditions compared with those obtained in standard conditions

Sporulation conditions	Low aeration	a _w 0.950 (glycerol)	a _w 0.950 (NaCl)	45°C	19°C	pH 10	pH 6	Calcium deficiency
Sporulation rate	—	—	—	—	—	—	—	—
Spore properties								
Germination rate at low a _w	+	++	++	=	++	++	+	=
Survival in response to heat	+	—	—	+	—	+	=	—
Survival in response to pressure	=	=	+	=	—	+	—	+
Membrane fluidity of vegetative cells (Published data)	— (Ouvry et al. 2002)	+	+	—	+	+	—	No data
		(Turk et al. 2007)		(Cortezzo and Setlow 2005)		(Giotis et al. 2007)	(Petrackova et al. 2010)	

(++) much higher; (+) higher; (=) equal; (–) lower; (—) much lower

removing calcium ions from the sporulation medium might inhibit the formation of the complex Ca^{2+} -dipicolinic acid. This complex is important for protecting macromolecules, and calcium-deficient spores are sensitive to heat (Cazemier et al. 2001). Changes in the mineral content of the spores produced at pH 10 (Kihm et al. 1990) might also explain their higher heat resistance compared with standard spores.

High-pressure resistance and germination process

Unlike heat, modification of the sporulation conditions had only a slight effect on the spore resistance to high pressure. We found no correlation between heat resistance and high-pressure resistance properties. This observation has been described for several *Bacillus* strains (Nakayama et al. 1996) and *Clostridium* strains (Margosch et al. 2004). Because a pressure level of 350 MPa first induces spore germination and subsequently inactivates germinated spores (Paidhungat et al. 2002; Black et al. 2007), better germination capacity would produce spores that are more sensitive to pressure. However, this relationship was observed only for the spores produced at 19°C and pH 6. A lack of dipicolinic acid in spores exposed to calcium-deficient sporulation medium might cause inefficient germination under pressure; this could explain their greater pressure resistance. Then, the germination process induced by a pressure level of 350 MPa would not be similar to the classical nutrient-induced germination. Modification of the sporulation conditions might suppress some Ger proteins needed for pressure-induced spore germination. Variation of membrane fluidity might also be involved in spore resistance to high pressure because the germination apparatus is situated mainly in this membrane (Abee et al. 2010). We observed that increasing membrane fluidity of vegetative cells seems to increase spore resistance to high pressure, except for spores produced at 19°C (cf. Table 7). Because high hydrostatic pressure reduces membrane fluidity (Fernanda et al. 2010), greater fluidity might maintain the membrane properties by balancing this phenomenon and thus would increase spore resistance to pressure.

In conclusion, modifying the sporulation conditions to simulate different types of stress during cell growth can perturb spore structural characteristics such as the coat, membrane fluidity, or protoplast composition. These structural perturbations can then affect spore properties such as the germination rate and resistance to heat or to high pressure. Such modifications, which often occur in extreme environments on Earth (e.g., in deep sea or deserts), induce a large variation in spore resistance to heat and to high pressure. Attention is needed when setting up the sterilization scale because food-contaminating spores, which can be produced in different environments, can have different resistance levels.

Acknowledgments We thank the Regional Council of Burgundy and the Ministry of National Education, Higher Education and Research of the French Republic for funding this study.

References

- Abee T, Groot MN, Tempelaars M, Zwietering M, Moezelaar R, Voort Mvd (2010) Germination and outgrowth of spores of *Bacillus cereus* group members: diversity and role of germinant receptors. *Food Microbiol*. doi:10.1016/j.fm.2010.03.015
- Baweja RB, Zaman MS, Mattoo AR, Sharma K, Tripathi V, Aggarwal A, Dubey GP, Kurupati RK, Ganguli M, Chaudhury NK, Sen S, Das TK, Gade WN, Singh Y (2008) Properties of *Bacillus anthracis* spores prepared under various environmental conditions. *Arch Microbiol* 189(1):71–79
- Behravan J, Chirakkal H, Masson A, Moir A (2000) Mutations in the *gerp* locus of *Bacillus subtilis* and *Bacillus cereus* affect access of germinants to their targets in spores. *J Bacteriol* 182(7):1987–1994
- Black EP, Setlow P, Hocking AD, Stewart CM, Kelly AL, Hoover DG (2007) Response of spores to high pressure processing. *Compr Rev Food Sci Food Saf* 6(4):103–119
- Bull MK, Olivier SA, van Diepenbeek RJ, Kormelink F, Chapman B (2009) Synergistic inactivation of spores of proteolytic *Clostridium botulinum* strains by high pressure and heat is strain and product dependent. *Appl Environ Microbiol* 75(2):434–445
- Cazemier AE, Wagenaars SF, ter Steeg PF (2001) Effect of sporulation and recovery medium on the heat resistance and amount of injury of spores from spoilage bacilli. *J Appl Microbiol* 90(5):761–770
- Chada VG, Sanstad EA, Wang R, Driks A (2003) Morphogenesis of *Bacillus* spore surfaces. *J Bacteriol* 185(21):6255–6261
- Cortezzo DE, Setlow P (2005) Analysis of factors that influence the sensitivity of spores of *Bacillus subtilis* to DNA damaging chemicals. *J Appl Microbiol* 98(3):606–617
- Fernanda B, MdF J, Fernandes AAR, Patricia MBF (2010) High hydrostatic pressure and the cell membrane. *Ann NY Acad Sci* 1189:127–132
- Giotis ES, McDowell DA, Blair IS, Wilkinson BJ (2007) Role of branched-chain fatty acids in pH stress tolerance in *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol* 73(3):997–1001
- Gounina-Allouane R, Broussolle V, Carlin F (2008) Influence of the sporulation temperature on the impact of the nutrients inosine and l-alanine on *Bacillus cereus* spore germination. *Food Microbiol* 25(1):202–206
- Hosono K, Hahn-Hägerdal B (1986) Effect of water activity on the growth and the production of camp phosphodiesterase inhibitor with *Bacillus subtilis*. *Appl Microbiol Biotechnol* 24(3):224–229
- Kihm DJ, Hutton MT, Hanlin JH, Johnson EA (1990) Influence of transition metals added during sporulation on heat resistance of *Clostridium botulinum* 113b spores. *Appl Environ Microbiol* 56(3):681–685
- Kirakosyan G, Bagramyan K, Trchounian A (2004) Redox sensing by *Escherichia coli*: effects of dithiothreitol, a redox reagent reducing disulphides, on bacterial growth. *Biochem Biophys Res Commun* 325(3):803–806
- Lee SB, Kim KJ (1995) Effect of water activity on enzyme hydration and enzyme reaction rate in organic solvents. *J Ferment Bioeng* 79(5):473–478
- Lindsay JA, Barton LE, Leinart AS, Pankratz HS (1990) The effect of sporulation temperature on spore characteristics of *Bacillus subtilis* a. *Curr Microbiol* 21:75–79
- Margosch D, Ehrmann MA, Ganzle MG, Vogel RF (2004) Comparison of pressure and heat resistance of *Clostridium botulinum* and other endospores in mashed carrots. *J Food Prot* 67(11):2530–2537

removing calcium ions from the sporulation medium might inhibit the formation of the complex Ca^{2+} -dipicolinic acid. This complex is important for protecting macromolecules, and calcium-deficient spores are sensitive to heat (Cazemier et al. 2001). Changes in the mineral content of the spores produced at pH 10 (Kihm et al. 1990) might also explain their higher heat resistance compared with standard spores.

High-pressure resistance and germination process

Unlike heat, modification of the sporulation conditions had only a slight effect on the spore resistance to high pressure. We found no correlation between heat resistance and high-pressure resistance properties. This observation has been described for several *Bacillus* strains (Nakayama et al. 1996) and *Clostridium* strains (Margosch et al. 2004). Because a pressure level of 350 MPa first induces spore germination and subsequently inactivates germinated spores (Paidhungat et al. 2002; Black et al. 2007), better germination capacity would produce spores that are more sensitive to pressure. However, this relationship was observed only for the spores produced at 19°C and pH 6. A lack of dipicolinic acid in spores exposed to calcium-deficient sporulation medium might cause inefficient germination under pressure; this could explain their greater pressure resistance. Then, the germination process induced by a pressure level of 350 MPa would not be similar to the classical nutrient-induced germination. Modification of the sporulation conditions might suppress some Ger proteins needed for pressure-induced spore germination. Variation of membrane fluidity might also be involved in spore resistance to high pressure because the germination apparatus is situated mainly in this membrane (Abee et al. 2010). We observed that increasing membrane fluidity of vegetative cells seems to increase spore resistance to high pressure, except for spores produced at 19°C (cf. Table 7). Because high hydrostatic pressure reduces membrane fluidity (Fernanda et al. 2010), greater fluidity might maintain the membrane properties by balancing this phenomenon and thus would increase spore resistance to pressure.

In conclusion, modifying the sporulation conditions to simulate different types of stress during cell growth can perturb spore structural characteristics such as the coat, membrane fluidity, or protoplast composition. These structural perturbations can then affect spore properties such as the germination rate and resistance to heat or to high pressure. Such modifications, which often occur in extreme environments on Earth (e.g., in deep sea or deserts), induce a large variation in spore resistance to heat and to high pressure. Attention is needed when setting up the sterilization scale because food-contaminating spores, which can be produced in different environments, can have different resistance levels.

Acknowledgments We thank the Regional Council of Burgundy and the Ministry of National Education, Higher Education and Research of the French Republic for funding this study.

References

- Abee T, Groot MN, Tempelaars M, Zwietering M, Moezelaar R, Voort Mvd (2010) Germination and outgrowth of spores of *Bacillus cereus* group members: diversity and role of germinant receptors. *Food Microbiol*. doi:10.1016/j.fm.2010.03.015
- Baweja RB, Zaman MS, Mattoo AR, Sharma K, Tripathi V, Aggarwal A, Dubey GP, Kurupati RK, Ganguli M, Chaudhury NK, Sen S, Das TK, Gade WN, Singh Y (2008) Properties of *Bacillus anthracis* spores prepared under various environmental conditions. *Arch Microbiol* 189(1):71–79
- Behravan J, Chirakkal H, Masson A, Moir A (2000) Mutations in the *gerp* locus of *Bacillus subtilis* and *Bacillus cereus* affect access of germinants to their targets in spores. *J Bacteriol* 182(7):1987–1994
- Black EP, Setlow P, Hocking AD, Stewart CM, Kelly AL, Hoover DG (2007) Response of spores to high pressure processing. *Compr Rev Food Sci Food Saf* 6(4):103–119
- Bull MK, Olivier SA, van Diepenbeek RJ, Kormelink F, Chapman B (2009) Synergistic inactivation of spores of proteolytic *Clostridium botulinum* strains by high pressure and heat is strain and product dependent. *Appl Environ Microbiol* 75(2):434–445
- Cazemier AE, Wagenaars SF, ter Steeg PF (2001) Effect of sporulation and recovery medium on the heat resistance and amount of injury of spores from spoilage bacilli. *J Appl Microbiol* 90(5):761–770
- Chada VG, Sanstad EA, Wang R, Driks A (2003) Morphogenesis of *Bacillus* spore surfaces. *J Bacteriol* 185(21):6255–6261
- Cortezzo DE, Setlow P (2005) Analysis of factors that influence the sensitivity of spores of *Bacillus subtilis* to DNA damaging chemicals. *J Appl Microbiol* 98(3):606–617
- Fernanda B, Mdf J, Fernandes AAR, Patricia MBF (2010) High hydrostatic pressure and the cell membrane. *Ann NY Acad Sci* 1189:127–132
- Giotis ES, McDowell DA, Blair IS, Wilkinson BJ (2007) Role of branched-chain fatty acids in pH stress tolerance in *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol* 73(3):997–1001
- Gounina-Allouane R, Broussolle V, Carlin F (2008) Influence of the sporulation temperature on the impact of the nutrients inosine and l-alanine on *Bacillus cereus* spore germination. *Food Microbiol* 25(1):202–206
- Hosono K, Hahn-Hägerdal B (1986) Effect of water activity on the growth and the production of camp phosphodiesterase inhibitor with *Bacillus subtilis*. *Appl Microbiol Biotechnol* 24(3):224–229
- Kihm DJ, Hutton MT, Hanlin JH, Johnson EA (1990) Influence of transition metals added during sporulation on heat resistance of *Clostridium botulinum* 113b spores. *Appl Environ Microbiol* 56(3):681–685
- Kirakosyan G, Bagramyan K, Trchounian A (2004) Redox sensing by *Escherichia coli*: effects of dithiothreitol, a redox reagent reducing disulphides, on bacterial growth. *Biochem Biophys Res Commun* 325(3):803–806
- Lee SB, Kim KJ (1995) Effect of water activity on enzyme hydration and enzyme reaction rate in organic solvents. *J Ferment Bioeng* 79(5):473–478
- Lindsay JA, Barton LE, Leinart AS, Pankratz HS (1990) The effect of sporulation temperature on spore characteristics of *Bacillus subtilis* a. *Curr Microbiol* 21:75–79
- Margosch D, Ehrmann MA, Ganzle MG, Vogel RF (2004) Comparison of pressure and heat resistance of *Clostridium botulinum* and other endospores in mashed carrots. *J Food Prot* 67(11):2530–2537