



**HAL**  
open science

# Mécanismes d'adaptation de *Moorella thermoacetica*/*thermoautotrophica* sur les lignes de production de produits alimentaires appertisés

Tiffany Malleck

► **To cite this version:**

Tiffany Malleck. Mécanismes d'adaptation de *Moorella thermoacetica*/*thermoautotrophica* sur les lignes de production de produits alimentaires appertisés. Bactériologie. Université d'Avignon, 2017. Français. NNT : 2017AVIG0339 . tel-02275777v2

**HAL Id: tel-02275777**

**<https://theses.hal.science/tel-02275777v2>**

Submitted on 2 Sep 2019

**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.



Ecole Doctorale 536 « Sciences et Agrosociétés »

## THÈSE

pour obtenir le grade de Docteur en Sciences de l'Université d'Avignon et des Pays du Vaucluse

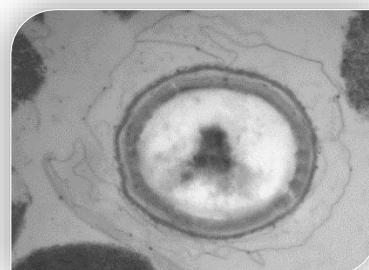
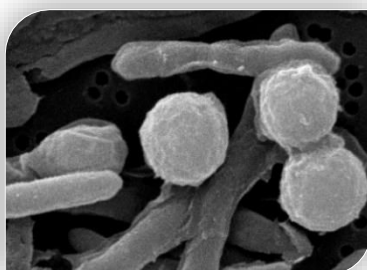
Discipline : Biologie

préparée par **Tiffany Malleck**

---

### Mécanismes d'adaptation de *Moorella thermoacetica/thermoautotrophica* sur les lignes de production de produits alimentaires appertisés

---



**Soutenue le 21 Décembre 2017**, devant le Jury composé de :

---

M. Louis Coroller	PR, Université de Bretagne Occidentale	Rapporteur
M. Michel Hébraud	DR, INRA Clermont-Ferrand	Rapporteur
Mme Catherine Duport	PR, Université d'Avignon	Examinatrice
Mme Isabelle Martin-Verstraete	PR, Université Paris VII	Examinatrice
Mme Stella Planchon	Chargée de projet, CTCPA Avignon	Co-directrice de thèse
Mme Véronique Broussolle	CR, INRA PACA	Directrice de thèse

**Laboratoire académique : INRA UMR 408 « Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale »**

**Industriel : Centre Technique de la Conservation des Produits Agricoles**



## REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier en premier lieu mes directrice et co-directrice de thèse, Véronique Broussolle et Stella Planchon, pour la confiance qu'elles m'ont accordée depuis le début de cette thèse et durant ces trois années intenses. Vous avez toujours été de bon conseil, avez su me motiver quand la motivation faisait parfois défaut et avez su vous rendre disponibles quand il le fallait. Je n'oublierai jamais l'enthousiasme et la bonne humeur dont vous avez fait preuve et qui ont été un moteur pour moi.

Je remercie les membres de mon jury de thèse, Mr Louis Coroller, Mr Michel Hébraud, Mme Catherine Duport ainsi que Mme Isabelle Martin-Verstraete, d'avoir accepté de juger mon travail. Merci également aux membres de mon comité de thèse, Mr Frédéric Carlin, Mr Mohamed Jebbar et encore une fois à Isabelle Martin-Verstraete qui a suivi l'évolution de mes travaux pendant ces 3 ans et a pris de son temps pour partager son savoir avec moi. Merci pour les discussions et conseils que vous m'avez tous prodigués.

Je tiens également à remercier Mme Catherine Renard de l'INRA ainsi que Mr Stéphane André au CTCPA de m'avoir accueillie au sein de l'UMR SQPOV et de l'équipe microbiologie du CTCPA.

Je remercie également les personnes ayant contribué à la réussite de ce projet. Je pense notamment à Isabelle Bornard pour sa bonne humeur pendant nos nombreuses séances de microscopie passées à rechercher une spore de *Moorella* (si possible entière) échouée au milieu d'un océan de débris cellulaires. Ce fut compliqué, mais nous avons réussi ! Je pense également à Renaud Duboscq pour son aide et sa pédagogie ainsi qu'à Eloi Haudebourg de la plateforme PAPPSO pour sa disponibilité concernant l'analyse des données protéomiques.

Mes sincères remerciements vont également à Guillaume et Fatima. Merci pour l'aide que vous m'avez apportée. J'ai pris beaucoup de plaisir à vous encadrer durant vos stages. Je ne peux que vous souhaiter bonne continuation et toute la réussite que vous méritez amplement.

J'adresse mes remerciements à l'ensemble de l'UMR SQPOV et plus particulièrement à l'équipe de microbiologie. Je remercie les techniciennes Claire, Stéph, Béné avec un petit clin d'œil particulier à Stef qui a su me remonter le moral quand Momo ne voulait pas croître et se montrait particulièrement récalcitrante ! J'adresse mes remerciements mais aussi tous mes

encouragements à Marina et Ludivine pour la poursuite de leur thèse qui, je n'en doute pas, sera réussie.

Je remercie également tout le personnel du CTCPA pour leur accueil et particulièrement les membres de l'équipe microbiologie. Je n'oublierai jamais les délires communs, la folie du « joli petit papillon » Sandra et la presque gentillesse de papy Benoît. Je n'oublierai jamais non plus les nombreuses fois où Sandra, Benoît, Eddy et Barbara m'ont saucissonnée avec du scoth dans à peu près toutes les pièces du laboratoire... Je remercie également ma Florette et mon petit microbe Adeline, que j'adore tout particulièrement. Merci à vous deux d'avoir contribué à mon bien-être quotidien en redécorant mon bureau à coup de licornes et de dessins mal faits... Vous êtes au top ! J'ai beaucoup aimé travailler avec vous tous, quoique j'en sorte un peu traumatisée !

Je remercie du fond du cœur mes amis proches Arlette, Chucky, Gwen, mon Pierrot, Vanessou... Je n'ai pas souvent eu l'occasion de vous voir pendant ces 3 ans mais le peu de fois où j'en ai eu l'occasion ont suffi à me rebooster.

Ces remerciements ne seraient pas complets si je ne mentionnais pas les collègues devenus, avec le temps, de bons amis. J'ai une pensée pour Nizar, mon collègue de thèse, collègue de bureau (sans chauffage, merci Nizar !) et surtout ami. Au cours de ces quelques années, tu m'as toujours soutenue et a toujours plus cru en mes capacités que je ne le fais moi-même. Tu as toujours été prêt à m'aider dans le travail mais aussi en dehors. Pour tout cela, je te remercie grandement. Je pense également au globetrotteur Martine ou le « Nem Provençal » qui a été une belle rencontre. Je te souhaite tout le meilleur pour la suite et surtout de trouver ton bonheur dans le Sud. Je remercie également Naïma, Jean-Marc « El Fuego » et Benoît De Sarrau (arrivé au CTCPA aussi vite qu'il en est reparti). Merci à vous d'avoir été présents, pour l'initiation à la rando et à l'escalade, les verres d'après travail... Merci pour votre soutien, votre enthousiasme et votre motivation qui ont été autant de bouffées d'oxygène.

Enfin, je remercie ma famille. Je remercie notamment Philippe, Cécile et mes trois petites Leïlou, Luna et Maya que j'ai vu grandir au cours de ces années.

Les derniers mots de mes remerciements sont adressés à toi, maman. Je te remercie du fond du cœur d'avoir su te rendre disponible et d'avoir fait autant d'efforts pour me rendre visite aussi fréquemment que possible. Tu as toujours cru en moi et j'espère te rendre fière en achevant cette thèse.





## Table des matières

INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	1
Contexte .....	1
Objectifs de la thèse .....	2
Chapitre 1 .....	5
Introduction bibliographique .....	5
1. <i>Procédés de conservation</i> .....	7
1.1. Généralités.....	7
1.2. L'appertisation.....	7
1.3. Choix du traitement thermique en fonction du pH de l'aliment .....	10
1.4. Barème de traitement thermique et notion de thermorésistance.....	12
1.5. Qualité microbiologique des conserves .....	16
1.5.1. <i>Notion de stabilité microbiologique</i> .....	16
1.5.2. <i>Conséquences des non-stabilités</i> .....	16
1.6. Les bactéries sporulées thermophiles en conserverie .....	17
2. <i>Moorella thermoacetica/thermoautotrophica</i> .....	19
2.1. Généralités sur le genre <i>Moorella</i> .....	19
2.2. Caractéristiques de <i>Moorella thermoacetica/thermoautotrophica</i> .....	20
2.3. Réservoirs.....	21
2.4. Physiologie de <i>Moorella thermoacetica/thermoautotrophica</i> .....	21
3. La sporulation.....	25
3.1. Généralités.....	25
3.2. Formation de la spore .....	26
3.3. Programme moléculaire de la sporulation.....	28
3.4. Conservation des gènes de sporulation .....	32
4. Propriétés des spores .....	35
4.1. Structure et composition protéique de la spore bactérienne .....	35
4.2. Résistance des spores .....	41
4.2.1. <i>Résistance aux UV, enzymes lytiques et biocides</i> .....	41
4.2.2. <i>Résistance thermique</i> .....	42
4.3. Propriétés de germination des spores.....	44
4.4. Impact de la température sur les propriétés des spores .....	49
Chapitre 2 : Effet de la température sur la sporulation et les propriétés de résistance des spores de <i>Moorella thermoacetica</i> .....	55
1. Problématique .....	57



2. Objectif et stratégie .....	57
3. Principaux résultats .....	58
4. Article 1: Temperature impacts the sporulation capacities and spore resistance of <i>Moorella thermoacetica</i> .....	61
Chapitre 3 : Caractérisation de la structure et de la composition protéique des spores de <i>Moorella thermoacetica</i> produites à différentes températures .....	89
1. Problématique .....	91
2. Objectif et stratégie .....	91
3. Principaux résultats .....	93
4. Article 2: Insights into the structure and the composition of <i>Moorella thermoacetica</i> spores produced at different temperatures .....	95
Chapitre 4 : Mécanismes moléculaires impliqués dans la sporulation chez <i>Moorella thermoacetica</i> .....	133
1. Problématique .....	135
2. Objectifs et stratégie .....	135
3. Principaux résultats .....	136
4. Article 3: Transcriptional profiling during sporulation of the thermophilic anaerobe <i>Moorella thermoacetica</i> .....	139
Discussion générale .....	169
Conclusion générale et perspectives .....	183
Références bibliographiques .....	191
Valorisation des travaux de thèse .....	217
Publications scientifiques .....	219
Communications scientifiques .....	220
Encadrements de stagiaires .....	222
Poster présenté au congrès 7 <sup>th</sup> European Spores Conference, London, 4-6 April 2016 .....	224
Poster présenté au congrès 2 <sup>nd</sup> Euro-Mediterranean Symposium on Fruit and Vegetable Processing, Avignon, 4-6 April 2016 .....	226





## Liste des figures

### Chapitre 1

- Figure 1 : Conserve métallique de soupe datant du XIXème siècle.** (ArdaghGroup)..... 9
- Figure 2 : Exemple de destruction thermique : détermination des paramètres A)  $D$  et B)  $\delta$ .** Les paramètres  $D$  et  $\delta$  sont déterminés à une température constante par dénombrement des spores survivantes exprimé en log (UFC/mL) en fonction du temps. A) 1 log de la population est détruit en 10 minutes. B) Lorsque la destruction n'est pas linéaire et présente un épaulement (courbe bleue), le premier log est détruit après 15 min de traitement. Quand la courbe présente une traînée (courbe verte), le premier log est détruit après 2,5 min de traitement..... 13
- Figure 3 : Exemple de variation du  $D$  en fonction de la température d'appertisation : détermination du paramètre  $z$ .** Le facteur  $D$  est déterminé à différentes températures de traitement. La valeur de  $D$  en minutes est reportée en fonction de la température de traitement. Ici, le log ( $D$ ) est représenté afin de linéariser la courbe. Dans cet exemple, le  $D$  varie de 1000 min à 100 min en augmentant la température de 107 °C à 117 °C : le paramètre  $z$  est donc de 10 °C..... 14
- Figure 4: Le procédé conserve en conserverie de légumes (Bonduelle, 2015).** Les étapes 1 à 3 correspondent à la récolte, la réception et le tri des légumes. Les étapes 4, 7 et 9-10 correspondent au lavage/épierrage, blanchiment et scellage-traitement thermique des conserves. Dans un premier temps, les légumes sont lavés et/ou parés, épierrés puis sont blanchis dans un bain d'eau portée à une température proche de 100 °C. Ces étapes visent à diminuer la charge microbienne et, dans le cas du blanchiment, à réduire également l'activité enzymatique. Les légumes sont ensuite acheminés sur des tapis convoyeurs et sont mis en conserve. Un jutage à chaud est alors effectué. Cette étape consiste à recouvrir les légumes avec un jus constitué d'eau et d'épices. Les conserves sont scellées puis traitées thermiquement..... 18
- Figure 5 : Observation au microscope électronique A) de la souche de référence de *M. thermoacetica* ATCC 39073 en sporulation et B) d'une spore de *M. thermoacetica* JW/DB-2 (D'après Drake et Daniel, 2004 et Byrer *et al.*, 2002).** Dans le panel B, P = protoplaste ou cœur, C = cortex, S = tuniques et X = exosporium. .... 20
- Figure 6 : Voie de Wood-Ljungdahl (Schuchmann et Müller, 2014).** Les bactéries acétogènes produisent de l'acétate à partir de deux molécules de CO<sub>2</sub> via la voie de Wood-Ljungdahl : une molécule est réduite en composés méthylés dans la branche méthyl et l'autre molécule est réduite en CO dans la branche carbonyl. Le CO formé fusionne avec le groupe méthyl et le coenzyme A pour former l'acétyl CoA. Enfin, l'acétyl CoA est transformé en une mole d'acétate. Pendant l'acétogénèse en conditions de croissance hétérotrophes, le glucose est oxydé en deux molécules d'acétate et aboutit à la formation d'équivalents réducteurs (= 1H<sup>+</sup> + 1e<sup>-</sup>). Ces équivalents réducteurs sont ensuite ré-oxydés par réduction des deux molécules de CO<sub>2</sub> dans la voie de Wood-Ljungdahl. Fd = ferredoxine ; Fd<sup>2-</sup> = ferredoxine réduite; [H], équivalent réducteur (= 1e<sup>-</sup> + 1H<sup>+</sup>)..... 22
- Figure 7 : Cycle de sporulation décrit A) chez *B. subtilis* et B) *C. acetobutylicum* (McKenney *et al.*, 2013 ; Al-Hinai *et al.*, 2015) ..... 27**

<b>Figure 8 : Modèle de sporulation proposé A) chez <i>Bacillus</i> et B) chez <i>Clostridium</i> (d'après Al-Hinai <i>et al.</i>, 2015) .....</b>	<b>31</b>
<b>Figure 9 : Liste minimale des gènes impliqués dans la machinerie de sporulation chez 90 % des bactéries sporulées (Abecasis <i>et al.</i>, 2013). L'étude <i>in silico</i> a été menée sur environ 70 espèces sporulées ou non et comprend 111 gènes et le régulon auquel ils appartiennent. La présence d'un gène dans le génome d'une espèce considérée est codifiée par « • ». L'absence d'un gène dans le génome d'une espèce considérée est codifiée par une absence de symbole. Les espèces notées en bleu, rose, vert et rouge correspondent aux espèces bactériennes endosporulées dont <i>M. thermoacetica</i> ATCC 39073, exosporulées (mécanisme de différenciation cellulaire différent de l'endosporulation), aux mycobactéries et aux non sporulées respectivement. La liste à droite correspond aux gènes signatures de sporulation présents chez au moins 90 % des bactéries sporulées et chez moins de 5 % des bactéries non sporulées.....</b>	<b>34</b>
<b>Figure 10 : Structure schématique d'une spore bactérienne (Paredes-Sabja <i>et al.</i>, 2011). La spore bactérienne est constituée, de la structure la plus interne vers la plus externe, du cœur, la paroi cellulaire, la membrane interne, le cortex, la membrane externe et les tuniques. La dernière structure représentée sur le schéma et correspondant à l'exosporium n'est pas présente chez toutes les espèces et est notamment absente chez <i>B. subtilis</i>. Les tailles des différentes couches ne sont pas à l'échelle.....</b>	<b>35</b>
<b>Figure 11 : Spores de différentes espèces bactériennes appartenant aux genres <i>Bacillus</i> et <i>Clostridium</i> observées en microscopie électronique à transmission. Les spores observées correspondent aux spores des souches de <i>Bacillus subtilis</i> PY79, <i>Bacillus anthracis</i>, <i>Bacillus cereus</i> ATCC 4342, <i>Clostridium difficile</i> 630 et R20291 et de <i>Clostridium perfringens</i> H6 et 222 (Novak <i>et al.</i>, 2003, Henriques et Moran Jr, 2007, Fazzini <i>et al.</i>, 2010, McKenney <i>et al.</i>, 2010, Paredes-Sabja <i>et al.</i>, 2014). Co ou C = cœur ; Cx = cortex ; Ct = tuniques, IC = tuniques internes ; OC = tuniques externes ; IS = inter-espace ; Hn = structures « hair-like » ; Ex = exosporium et Cr = crust.....</b>	<b>37</b>
<b>Figure 12 : Composition protéique des tuniques d'une spore de <i>Bacillus subtilis</i> (Adapté de McKenney et Eichenberger, 2012). La couche basale, les tuniques internes, les tuniques externes et le crust sont représentées en bleu, orange, violet et rouge, respectivement. Les ronds représentent les protéines morphogénétiques de chacune des couches protéiques. Les protéines indiquées dans les boîtes colorées correspondent à des protéines impliquées dans la morphogénèse des couches correspondantes. Les protéines SpoVM et SpoVID sont essentielles pour l'établissement d'une couche protéique continue de tuniques.....</b>	<b>39</b>
<b>Figure 13 : Observations en microscopie électronique à balayage (MEB) de spores de <i>Clostridium sporogenes</i> pendant l'émergence et la reprise de croissance des cellules (d'après Brunt <i>et al.</i>, 2015). Pendant la germination des spores de <i>C. sporogenes</i>, un creux se forme dans la tunique sporale. Ce creux est toujours orienté en face d'une ouverture présente dans l'exosporium et nommée « sporiduct ». Lors de l'émergence, la cellule sort par le sporiduct et commence à croître et se diviser. a) émergence de la cellule par le sporiduct, b) émergence et reprise de croissance de la cellule, c) élongation de la cellule accompagnée de la distension du sporiduct, d) cellules émergentes en division, e) élongation de la cellule en division qui est encore entourée de l'ancien exosporium de la spore. Les flèches vertes en a) et d) montrent respectivement la sortie de la cellule par le sporiduct qui est détendu et une cellule libre. Les flèches rouges en a), b) et c) montrent la cellule émergeant par le sporiduct et des cellules émergentes en division en d) et e).....</b>	<b>49</b>

**Figure 14: Effet de la température sur la croissance, la sporulation et la thermorésistance des spores de *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 12980 (Mtimet *et al.*, 2015).** Les figures A et B représentent l'effet de la température sur le taux spécifique maximal de croissance  $\mu_{max}$  et sur la quantité de spores obtenues, respectivement. La figure C représente l'effet de la température de sporulation sur la thermorésistance des spores obtenues..... 53

## Chapitre 2

**Figure 1:** Physical resistance properties of *M. thermoacetica* strain ATCC 39073 spores produced at (□) 45°C (n = 3) and (●) 55°C (n = 3).....70

**Figure 2:** Resistance to biocides of *M. thermoacetica* strain ATCC 39073 spores produced at (□) 45°C (n = 3) and (●) 55°C (n = 3).....71

**Figure 3:** Wet-heat resistance at 125°C of spores of *M. thermoacetica* as a function of the sporulation temperature.....74

## Chapitre 3

**Figure 1:** *Moorella thermoacetica* strain ATCC 39073 spores observed by scanning electron microscopy.....103

**Figure 2:** Ultrastructure of *Moorella thermoacetica* strain ATCC 39073 spores produced at 55 °C (A) and 45 °C (B) on MLA plates, observed by transmission electron microscopy...104

**Figure 3:** Coat structure of *Moorella thermoacetica* spores produced at 45 °C (panels B, D and E) and at 55°C (panels A and C).....105

## Chapitre 4

**Figure 1:** Growth and sporulation of *Moorella thermoacetica* strain ATCC 39073 at 55 °C in regulated conditions.....146

**Figure 2:** Gene groups and associated expression profiles during sporulation kinetics of *M. thermoacetica*.....149

## Liste des tableaux

### Chapitre 1

<b>Tableau 1 : Catégories d'aliments regroupés en fonction de leur acidité (DGAL, 2015).</b> Source : Instruction technique DGAL/SDSSA/2015-364 du 06 octobre 2015.....	10
<b>Tableau 2 : Type de traitement thermique appliqué aux denrées pré-emballées selon la nature du produit.</b> Source : Instruction technique DGAL/SDSSA/2015-364 du 06 octobre 2015.....	11
<b>Tableau 3 : Paramètres de thermorésistance de spores de bactéries d'altération mésophiles et thermophiles (André <i>et al.</i>, 2013).</b> Les données indiquées pour les paramètres des spores de <i>C. botulinum</i> ne sont pas issues de André <i>et al.</i> , 2013 mais correspondent aux paramètres de thermorésistance admis pour cette espèce. ....	15
<b>Tableau 4 : Principales caractéristiques physiologiques de <i>Moo t/t</i>.</b> ....	24
<b>Tableau 5 : Inducteurs de la germination des spores identifiés chez différentes espèces bactériennes sporulées</b> .....	45
<b>Tableau 6 : Effet de la température de sporulation sur la thermorésistance des spores de diverses espèces bactériennes.</b> Les gammes de température de croissance renseignées dans le tableau ont été déterminées au cours des études mentionnées. La thermorésistance est exprimée par le paramètre $\delta$ qui correspond au temps de traitement nécessaire pour inactiver le premier log de la population de spores. Lorsque le paramètre $\delta$ n'est pas disponible dans l'étude considérée, le paramètre $D$ est précisé, c'est-à-dire le temps de réduction décimal correspondant au temps de traitement nécessaire pour détruire un log de la population de spores lorsque la destruction est linéaire.....	51

### Chapitre 2

<b>Table 1:</b> Phenotypic and genotypic characteristics of the <i>Moorella thermoacetica</i> strains selected for this study. ....	65
<b>Table 2:</b> Concentration of spore suspensions formed at 45°C, 55°C and 65°C for 8 strains of <i>M. thermoacetica</i> and associated spore wet-heat resistance at 125°C as determined using a Weibull model with $p^* = 0.71$ .....	73

### Chapitre 3

<b>Table 1:</b> Spore-related proteins identified in <i>Moorella thermoacetica</i> strain ATCC 39073.107	
<b>Table 2:</b> Spore proteins identified in <i>Moorella thermoacetica</i> ATCC 39073 proteome of spores produced at 55 °C and 45 °C.....	110

<b>Table S1:</b> Spore coat and exosporium proteins identified in <i>Moorella thermoacetica</i> strain ATCC 39073 by <i>in silico</i> analysis.....	119
<b>Table S2:</b> Spore coat and exosporium proteins not identified in <i>Moorella thermoacetica</i> strain ATCC 39073.....	125

## Chapitre 4

<b>Table 1:</b> Gene expression patterns during sporulation kinetics of <i>M. thermoacetica</i> .....	148
<b>Table 2:</b> Sporulation-related genes expression of <i>Moorella thermoacetica</i> strain ATCC 39073 at 55 °C in regulated conditions.....	150





# INTRODUCTION GÉNÉRALE

## Contexte

L'appertisation consiste en l'application d'un traitement thermique supérieur à 100 °C à un aliment contenu dans un emballage étanche aux liquides et aux microorganismes, le but étant de détruire la plupart des microorganismes, des spores et des toxines éventuellement présents initialement dans l'aliment. L'appertisation est un des procédés de conservation des aliments les plus efficaces appliqués en industrie et permet d'augmenter le délai de conservation des denrées de façon considérable, jusqu'à 5 ans à température ambiante.

Les spores correspondent à des formes de résistance produites par certains microorganismes dits sporulés. Les microorganismes sporulés sont ubiquitaires et peuvent survivre de nombreuses années dans l'environnement et notamment dans les sols qui constituent le principal réservoir en spores. De ce fait, les matières premières utilisées en conserverie peuvent être contaminées par des spores hautement résistantes qui se retrouvent ensuite au niveau des lignes de production. Ces spores constituent un problème majeur du fait de leur extrême résistance à de nombreux facteurs environnementaux (dessiccation, traitements thermiques, molécules chimiques, rayonnements...) qui leur confère une capacité à s'implanter sur les lignes où elles sont difficiles à éradiquer.

Bien que l'appertisation détruise la plupart des spores, certaines possèdent la capacité de résister aux traitements thermiques d'appertisation. Les spores survivant à ces traitements sont hautement thermorésistantes et sont généralement produites par des bactéries thermophiles. La survie de ces spores est particulièrement problématique : elles peuvent potentiellement germer et redonner des cellules végétatives pouvant croître dans le produit et entraîner une altération lors d'un stockage à haute température (au-delà de 40°C). Les spores de microorganismes thermophiles d'altération sont classées parmi les plus résistantes. Bien qu'ils ne représentent pas de risque sanitaire, ces microorganismes thermophiles d'altération sont à l'origine de lourdes pertes économiques.

L'espèce bactérienne *Moorella thermoacetica/thermoautotrophica* (*Moo t/t*) est une bactérie sporulée thermophile d'altération qui constitue l'une des principales causes d'altération à 55 °C, notamment de conserves de légumes.

Actuellement, l'essentiel des données bibliographiques concernant *Moo t/t* est orienté vers l'étude de caractéristiques métaboliques particulières. En effet, *Moo t/t* est principalement étudiée pour ses capacités de production de molécules d'intérêt technologique telles que l'acide acétique et l'éthanol ou plus récemment pour ses capacités à dégrader l'acide cyanurique à des fins de biorémédiation (Andreesen *et al.*, 1973, Schwartz et Keller, 1982b, Lundie et Drake, 1984, Wang et Wang, 1984, Savage *et al.*, 1987, Daniel *et al.*, 1990, Hsu *et al.*, 1990, Daniel et Drake, 1993, Fröstl *et al.*, 1996, Witjitra *et al.*, 1996, Seifritz *et al.*, 1999, Seifritz *et al.*, 2002, Seifritz *et al.*, 2003, Li *et al.*, 2009, Xue *et al.*, 2014).

En revanche, il n'existe que peu de données concernant la sporulation et les propriétés des spores de cette espèce. De même, il n'existe que peu voire pas de données publiées sur les mécanismes moléculaires mis en place par *Moorella* pendant la sporulation ou sur l'impact des conditions environnementales sur la structure et les propriétés de résistance des spores. Or, ces données sont essentielles à la compréhension de la résistance si particulière de ces spores et, *in fine*, à leur maîtrise sur les lignes de production.

### **Objectifs de la thèse**

Mon projet de thèse s'intéresse à l'étude des mécanismes d'adaptation de *Moo t/t* dans des conditions pouvant être rencontrées sur les lignes de production d'aliments appertisés, l'objectif étant de mieux maîtriser sa présence sur les lignes.

Les températures rencontrées en conserverie étant très variables, nous nous intéressons à l'impact de celle-ci sur les capacités de sporulation et les caractéristiques des spores de *M. thermoacetica*. Pour cela, des sporulations sont effectuées aux températures optimale et limites puis la résistance des spores à divers stress (chaleur humide, biocides, UV-C) est étudiée. Afin d'explorer la diversité des capacités de sporulation chez *M. thermoacetica*, les sporulations ainsi que la caractérisation des spores produites sont effectuées pour plusieurs souches de collection ou isolées de conserves altérées. Des souches de *Moo t/t* sont ainsi sélectionnées pour leur diversité en termes de capacité de croissance, de thermorésistance des spores ou encore d'origine de la souche. Cette partie de l'étude permettra de fournir de nouvelles données utiles aux industriels pour comprendre l'impact de la température de sporulation sur la résistance des spores de *Moorella*.

Afin de déterminer l'impact de la température sur la structure des spores, les spores de la souche de collection ATCC 39073 produites aux différentes températures sont observées par microscopie électronique. La surface des spores est observée par microscopie électronique à balayage (MEB) tandis que l'ultrastructure est révélée par microscopie électronique à transmission (MET). La composition protéique des spores est également investiguée par une approche protéomique. L'objectif est ici de déterminer si un lien existe entre la structure, la composition en protéines et les caractéristiques physiologiques des spores.

Enfin, les mécanismes moléculaires de sporulation n'étant pas décrits chez *M. thermoacetica*, des cultures en conditions optimales, régulées en température et pH, sont réalisées avec la souche séquencée ATCC 39073 afin de décrire la cinétique de sporulation. Nous suivons différents paramètres (concentration en cellules végétatives et spores, évolution de la densité optique et du potentiel d'oxydoréduction) et réalisons des prélèvements à partir desquels des ARN sont extraits et séquencés par une approche RNAseq. Les données acquises sont exploitées en vue de décrire les mécanismes mis en place pendant la croissance et la sporulation de *M. thermoacetica*. Ces travaux permettront de générer de nouvelles connaissances quant aux mécanismes de sporulation chez les bactéries anaérobies thermophiles sporulées.



# *Chapitre 1*

## *Introduction bibliographique*



## 1. *Procédés de conservation*

### 1.1. Généralités

La conservation des denrées alimentaires consiste en l'application d'un traitement permettant d'éliminer et/ou empêcher le développement de microorganismes dans un aliment tout en préservant ses qualités gustatives et nutritionnelles.

Il existe trois grandes catégories de procédés visant à augmenter la durée de conservation des denrées alimentaires :

- Les traitements par la chaleur
- Les traitements par le froid
- Les autres types de traitements qui regroupent les procédés de conservation par élimination de l'eau (déshydratation) ou diminution de l'activité de l'eau (ajout de sel, sucre...), acidification, ionisation ou encore modification de l'atmosphère.

Certains de ces procédés peuvent aboutir à un ralentissement de l'activité métabolique des microorganismes et non à leur destruction. C'est notamment le cas des traitements par le froid ou encore par modification de l'atmosphère. En revanche, d'autres tels que l'ionisation ou les traitements par la chaleur ont pour but d'éliminer les microorganismes.

Lorsqu'il s'agit de conservation de longue durée, les procédés de conservation par la chaleur sont les plus utilisés (DGCCRF, 2014). Les traitements par la chaleur se classent en deux principales catégories en fonction de la température appliquée :

- La pasteurisation où les aliments sont traités à des températures inférieures à 100°C
- La stérilisation, dont l'appertisation, où les aliments sont traités à des températures supérieures à 100°C.

### 1.2. L'appertisation

L'appertisation est un procédé de conservation inventé au XVIIIème siècle et qui tient son nom de son inventeur, le français Nicolas Appert. C'est en 1784 que cet ancien confiseur et distillateur s'intéresse à la problématique de la conservation des aliments. En effet, à l'époque, les procédés de conservation utilisés tels que le salage, le fumage, l'utilisation de vinaigre ou



encore les confits dans le sucre ou la graisse modifient profondément les propriétés organoleptiques des produits et ne permettent qu'une conservation partielle des denrées. Il développe alors une méthode empirique basée sur le chauffage des aliments à plus de 100 °C, qu'il décompose en quatre points : i) les produits sont enfermés dans des bouteilles de champagne ou bocaux de verre, ii) les contenants sont ensuite bouchés précautionneusement de façon hermétique, iii) les produits contenus dans les récipients sont soumis à de hautes températures dans un bain-marie, plus ou moins longtemps selon la denrée et iv) les produits sont retirés du bain et refroidis.

Après que la marine française a approuvé l'efficacité de ce procédé sur diverses denrées, Nicolas Appert publie ses découvertes dans son ouvrage " L'art de conserver, pendant plusieurs années, toutes les substances animales et végétales" (Appert, 1810). L'ouvrage fut à l'époque tiré à 6000 exemplaires, traduit et publié en Allemagne, en Angleterre et en Amérique. A l'époque, l'efficacité de l'appertisation, bien que constatée, reste inexplicée. Ce n'est que plusieurs décennies plus tard, en 1865, que Pasteur identifia les microorganismes et démontra que l'altération des denrées est due à leur prolifération mais que ces derniers sont détruits à haute température. Du fait de leurs propriétés de préservation des apports nutritionnels, notamment en vitamine C, les conserves furent principalement utilisées par l'armée et la marine jusqu'en 1920 et permirent d'éradiquer le scorbut chez les marins pour qui l'apport en vitamine C au cours de leurs voyages était jusqu'alors insuffisant. Après les années 1920, la conserve alimentaire cessa d'être consommée uniquement par les marins et son utilisation se répandit dans les foyers.

N. Appert n'ayant pas breveté sa découverte, c'est en 1810 qu'un brevet est déposé par Pierre Durand, un français émigré au Royaume-Uni. P. Durand fait alors évoluer la technique en remplaçant les bocaux de verre par des boîtes métalliques en fer blanc plus résistantes, plus légères et plus facilement scellées (Figure 1). La production des premières conserves alimentaires était alors très coûteuse. En effet, les conserves étaient constituées de trois pièces en fer blanc soudées à la main au rythme de 6 boîtes par heure. C'est à partir de 1815 que la fabrication de conserves se développe en France et en Angleterre avec l'appertisation des viandes fraîches, des fruits et des légumes. Ce n'est qu'en 1818 que la conserve commença à se développer en Australie ainsi qu'aux Etats-Unis



**Figure 1 : Conserve métallique de soupe datant du XIXème siècle.** (ArdaghGroup)

En 1841 naît le concept de "contrôle qualité" des conserves grâce aux britanniques Donkin, Hall et Gamble, qui utilisent alors pour la première fois une étuve de contrôle pour s'assurer de la stérilité des conserves produites. La production de conserves se mécanise progressivement et c'est dans les années 1920 que le premier train automatique de fabrication de boîtes en fer blanc est mis en service en France.

Les matériaux utilisés dans la conception des boîtes ont quant à eux également évolué avec l'utilisation à partir des années 1930 d'acier et d'aluminium puis d'acier sans étain ou acier chromé à partir de 1975. De nos jours, le décret n°55-241 de 1955 stipule que seules sont considérées comme "conserves", "les denrées alimentaires d'origine végétale ou animale, périssables, dont la conservation est assurée par l'emploi combiné des deux techniques suivantes: i) conditionnement dans un récipient étanche aux liquides, aux gaz et aux micro-organismes à toute température inférieure à 55 °C, ii) traitement par la chaleur, ou par tout autre mode autorisé par arrêté pris de concert entre les ministres de l'agriculture, de la santé publique et de la population, de l'industrie et du commerce ou, le cas échéant, du ministre chargé de la marine marchande. Ce traitement doit avoir pour but de détruire ou d'inhiber totalement, les enzymes d'une part, et d'autre part, les micro-organismes et leurs toxines, dont la présence ou la prolifération pourrait altérer la denrée considérée ou la rendre impropre à l'alimentation humaine" (Décret, 1955).

Actuellement, on estime qu'environ 80 milliards d'aliments appertisés ou conserves alimentaires destinés à l'alimentation humaine sont produits chaque année dans le monde dont 3 milliards en France, ce qui représente un marché de 4 milliards d'euros (UPPIA, 2015). Les

derniers chiffres publiés par l'Union interprofessionnelle pour la Promotion des Industries de la conserve Appertisée (UPPIA) révèlent que 99,7 % des foyers français achètent des conserves pour une consommation annuelle s'élevant à 50 kg par personne, les produits les plus consommés étant de loin les légumes qui représentent 65 % des conserves achetées (UPPIA, 2015).

### 1.3. Choix du traitement thermique en fonction du pH de l'aliment

Le choix du traitement thermique à appliquer dépend à la fois du type de produit et du risque de survie des bactéries et des spores.

Différents paramètres physico-chimiques peuvent jouer un rôle sur l'efficacité d'un traitement thermique, le pH étant le plus important. En effet, plus un produit est acide, plus les bactéries sont fragilisées et thermosensibles. A titre d'exemple, le Tableau 1 décrit les 4 classes de denrées alimentaires en fonction de leur niveau d'acidité (DGAL, 2015).

**Tableau 1 : Catégories d'aliments regroupés en fonction de leur acidité (DGAL, 2015).** Source : Instruction technique DGAL/SDSSA/2015-364 du 06 octobre 2015.

Type d'aliment	pH associé	Exemples
Peu acide	$\geq 4,5$	Viandes, poissons, la plupart des légumes, plats cuisinés
Moyennement acide	$4,2 \leq \text{pH} \leq 4,5$	Tomates, certains fruits (pommes, fraises), produits volontairement acidifiés
Acide	$3,8 \leq \text{pH} \leq 4,2$	La plupart des fruits, spécialités volontairement acidifiées
Fortement acide	$< 3,8$	Agrumes, baies, choucroute au naturel, jus de fruits

La limite entre un produit peu acide et acide est fixée à un pH de 4,5. En dessous, le produit est considéré comme acide et au-dessus comme faiblement acide. En fonction du niveau d'acidité du produit à traiter thermiquement, une pasteurisation ou une stérilisation peuvent être recommandées (Tableau 2).

#### ✧ Cas des conserves acides

La pasteurisation est réalisée pour des produits acides dont le pH est inférieur à 4,5. Cette limite de pH est fixée de façon à maîtriser le risque botulique. En effet, l'agent causal du botulisme, *Clostridium botulinum*, ne peut pas se développer dans ces conditions de pH. La pasteurisation est effectuée à des températures inférieures à 100 °C. Ce traitement permet de

détruire la plupart des microorganismes thermosensibles, telles que les cellules végétatives de bactéries mésophiles ou thermophiles, de levures ou encore de moisissures. D'autre part, les spores peu thermorésistantes de moisissures ou de bactéries acidophiles peuvent également être inactivées par ce type de traitement.

Des spores peuvent subsister après pasteurisation mais l'acidité intrinsèque du produit inhibe la germination et de ce fait la prolifération bactérienne. De plus, la survie de spores dans les produits acides pasteurisés ne représente pas de risque sanitaire puisque les bactéries acidophiles associées aux cas d'altérations de ces denrées ne sont pas pathogènes. Les produits acides pasteurisés sont généralement stockés à température ambiante sur de longues périodes. Ces produits sont caractérisés par une date de durabilité minimale ou DDM (anciennement date limite d'utilisation optimale ou DLUO). La DDM diffère de la durée limite de consommation ou DLC de par son caractère non impératif. En effet, après cette date, le produit peut avoir perdu tout ou partie de ses propriétés sans pour autant représenter un risque pour la santé. De ce fait, les denrées peuvent être consommées après cette date si et seulement si l'aspect de la conserve et du produit reste inchangé.

**Tableau 2 : Type de traitement thermique appliqué aux denrées pré-emballées selon la nature du produit.** Source : Instruction technique DGAL/SDSSA/2015-364 du 06 octobre 2015.

	Produits à pH inférieur à 4,5	Produits à pH supérieur ou égal à 4,5
Cibles microbiologiques à détruire par le traitement thermique	<p>a) Thermosensibles : Formes <u>végétatives</u> des bactéries pathogènes et d'altération, des moisissures, levures, virus, enzymes, toxines</p> <p>b) <b>Faiblement</b> thermorésistantes : Ascospores de moisissures acidotolérantes, spores d'espèces acidophiles</p>	<p>a) Thermosensibles : Formes <u>végétatives</u> des bactéries pathogènes et d'altération, des moisissures, levures, virus, enzymes, toxines</p> <p>b) faiblement thermorésistantes : Ascospores de moisissures</p> <p>c) <b>Fortement</b> thermorésistantes : <u>Spores</u> des bactéries pathogènes et d'altération, ascospores</p>
Traitement thermique requis	Températures typiquement entre <b>85°C et 100°C</b> <b>= PASTEURISATION</b>	Températures typiquement entre <b>105°C et 140°C</b> <b>= STERILISATION</b>
Résultat obtenu	Il peut rester des spores bactériennes viables mais le pH acide du produit, doit inhiber leur germination (pH<4,5)	Il ne reste aucune forme bactérienne capable de se développer dans le produit dans les conditions de stockage attendues
<p>Les traitements thermiques mentionnés ci-dessus associés notamment au pH des produits finis et à un conditionnement étanche garantissent la stabilité biologique des produits à température ambiante: <b>PRODUITS APPERTISES ou CONSERVES</b></p>		

La pasteurisation peut également être appliquée à des produits peu acides. Dans ce cas, des cellules végétatives ainsi que des spores de bactéries mésophiles et/ou psychrotrophes peuvent notamment résister et germer dans le produit au cours du stockage au frais. En effet, du fait du risque d'altération et/ou du risque sanitaire, ces produits doivent être stockés au frais et ont donc une durée de vie limitée. Cette durée de vie est matérialisée par la détermination d'une DLC qui figure sur les produits microbiologiquement très périssables et fixe une date limite impérative après laquelle le produit ne peut en aucun cas être consommé du fait d'un risque pour la santé.

#### ✧ Cas des conserves peu acides

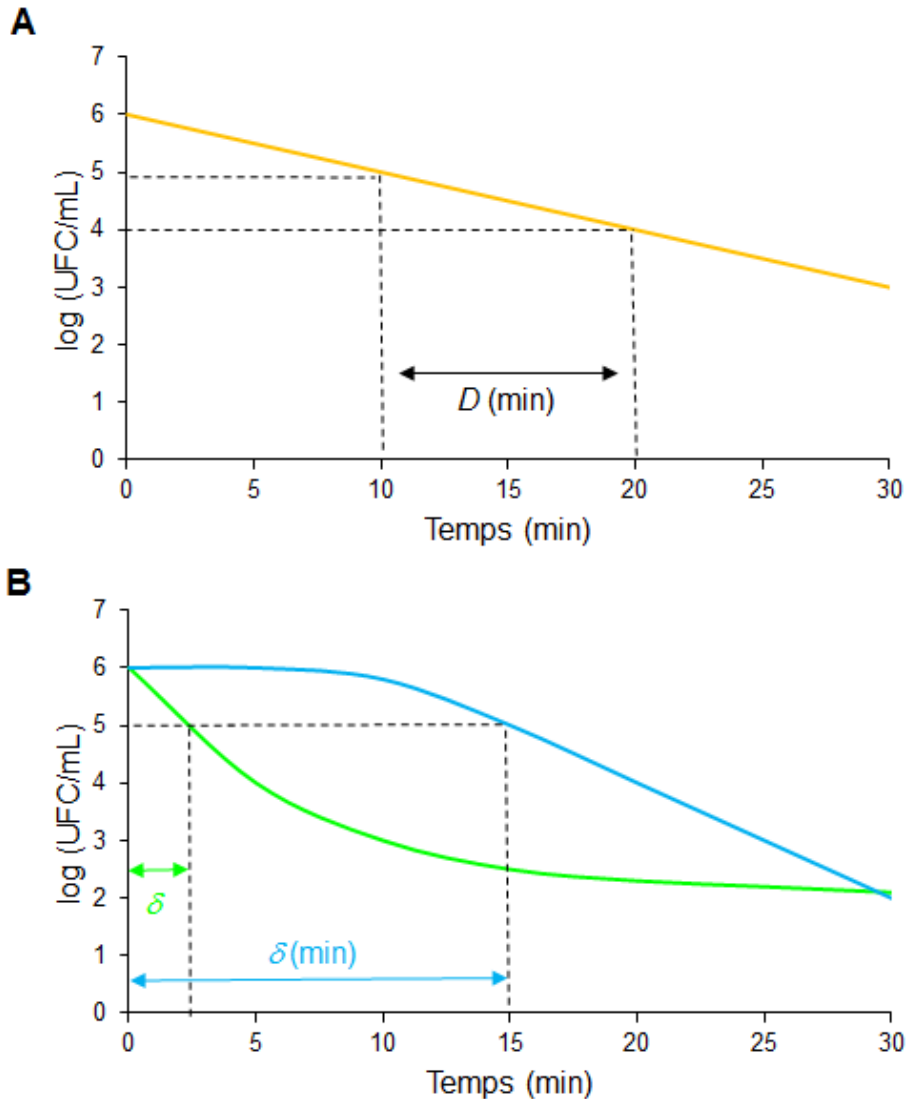
Les conserves faiblement acides, c'est-à-dire caractérisées par un  $\text{pH} > 4,5$  sont classiquement stérilisées, c'est-à-dire traitées à des températures supérieures à  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$  de façon à détruire tous les microorganismes et spores. Au même titre que la pasteurisation, la stérilisation permet d'inactiver les cellules végétatives ainsi que les spores faiblement thermorésistantes. En revanche, la stérilisation permet également d'inactiver les spores thermorésistantes de bactéries thermophiles. En effet, contrairement à la pasteurisation, la stérilisation vise à éliminer la totalité des microorganismes et spores présents dans l'aliment (Tableau 2). Les conserves sont stockées à température ambiante et peuvent rester stables microbiologiquement pendant plusieurs années. Ces conserves sont donc également caractérisées par une DDM.

#### 1.4. Barème de traitement thermique et notion de thermorésistance

Le barème de stérilisation appliqué aux conserves consiste en un couple temps/température déterminé en fonction de l'aliment considéré. La détermination de ce couple temps/température repose sur des notions de thermorésistance. En effet, la stérilisation vise à tuer les cellules végétatives mais surtout les spores bactériennes dont les propriétés de thermorésistance sont plus importantes.

La thermorésistance de cellules ou de spores d'une souche donnée dans une matrice donnée est évaluée à l'aide de deux paramètres :  $D_T$  et  $z$ .

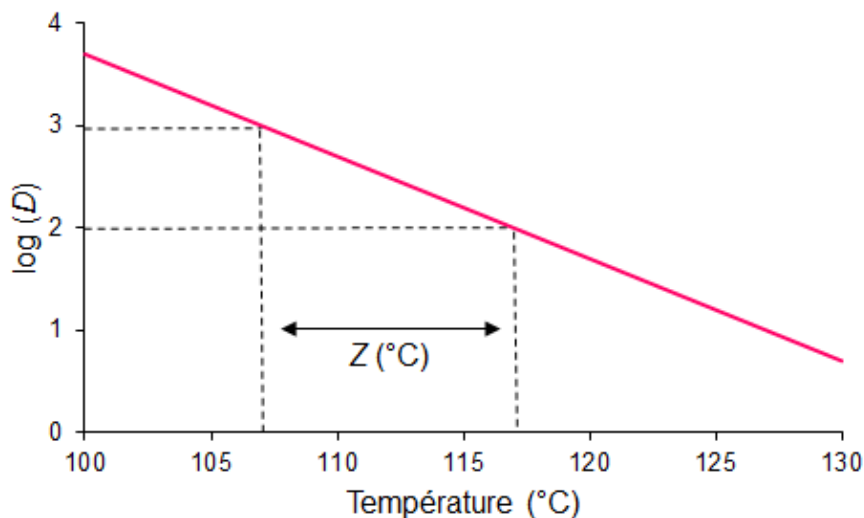
✧ Le paramètre  $D_T$  correspond au temps de réduction décimale, c'est-à-dire au temps nécessaire pour réduire la population d'un log, soit 90%, à une température  $T$  donnée, généralement 121°C pour la stérilisation (Figure 2). Bien que ce paramètre soit utilisé au niveau industriel, son utilisation est limitée puisqu'il n'est applicable que dans le cas où la destruction suit une loi log-linéaire.



**Figure 2 : Exemple de destruction thermique : détermination des paramètres A)  $D$  et B)  $\delta$ .** Les paramètres  $D$  et  $\delta$  sont déterminés à une température constante par dénombrement des spores survivantes exprimé en log (UFC/mL) en fonction du temps. A) 1 log de la population est détruit en 10 minutes. B) Lorsque la destruction n'est pas linéaire et présente un épaulement (courbe bleue), le premier log est détruit après 15 min de traitement. Quand la courbe présente une traînée (courbe verte), le premier log est détruit après 2,5 min de traitement.

Dans le cas où la destruction présente un épaulement ou une traînée, le paramètre  $\delta$  est déterminé (Figure 2). La détermination de ce paramètre prend en compte la tendance suivie par la courbe de destruction et correspond ainsi au temps de première réduction décimale, c'est-à-dire au temps de traitement nécessaire pour observer la destruction du premier log de la population considérée.

- ✧ Le paramètre  $z$  correspond quant à lui à l'écart de température nécessaire pour faire varier d'un facteur 10 le temps de réduction décimale  $D$  (Figure 3). Plus  $z$  est grand, plus les spores sont tolérantes à la variation de température. Le  $z$  peut également être calculé à partir de valeurs de  $\delta$ .



**Figure 3 : Exemple de variation du  $D$  en fonction de la température d'appertisation : détermination du paramètre  $z$ .** Le facteur  $D$  est déterminé à différentes températures de traitement. La valeur de  $D$  en minutes est reportée en fonction de la température de traitement. Ici, le  $\log(D)$  est représenté afin de linéariser la courbe. Dans cet exemple, le  $D$  varie de 1000 min à 100 min en augmentant la température de 107 °C à 117 °C : le paramètre  $z$  est donc de 10 °C.

L'intensité du traitement thermique à appliquer est déterminée par une valeur stérilisatrice VS. La VS se définit comme la durée en minutes d'un traitement thermique à la température de référence de 121,1 °C, appliquée à cœur du produit. Cette température de référence correspond à la température permettant l'inactivation des spores de la bactérie pathogène *C. botulinum* responsable du botulisme, maladie létale dans 5 à 10 % des cas (WHO, 2013). Cette bactérie mésophile est une référence pour les produits appertisés peu acides car elle produit les spores les plus thermorésistantes parmi les espèces sporulées pathogènes pouvant être rencontrées dans ce type de produit. Le barème de stérilisation est ainsi déterminé de façon à assurer une destruction minimale de 12 log de spores de *C. botulinum*, sachant que le

$D_{121\text{ °C}}$  est estimé à environ 0,25 minutes pour un  $z$  de 10. Le traitement thermique minimal assurant la destruction de 12 log de spores de *C. botulinum* est de 2,5 minutes à 121,1 °C. Une VS minimale de 3 est requise pour la maîtrise du risque botulique (DGAL, 2015), ce qui équivaut à un traitement de 3 minutes à 121,1 °C, appliqué au cœur du produit.

Cette notion de VS permet de comparer l'intensité des traitements thermiques. En effet, la température de traitement est variable selon le produit considéré. Dans le cas où le produit est traité pendant un temps  $t$  à une température  $T$  différente de la température de référence  $T_{ref}$ , la VS peut ainsi être déterminée à l'aide de l'équation (1).

$$(1) \text{ VS} = t \times 10^{\frac{T-T_{ref}}{10}}$$

Bien que permettant la maîtrise du risque botulique, la VS ne prend pas en compte les spores hyperthermorésistantes de bactéries thermophiles (Tableau 3). De ce fait, la VS permet de garantir une stabilité sanitaire mais pas une stabilité commerciale.

**Tableau 3 : Paramètres de thermorésistance de spores de bactéries d'altération mésophiles et thermophiles (André *et al.*, 2013).** Les données indiquées pour les paramètres des spores de *C. botulinum* ne sont pas issues de André *et al.*, 2013 mais correspondent aux paramètres de thermorésistance pris en références pour cette espèce.

Espèce bactérienne	Caractéristiques de développement	D (min)	z (°C)
<i>Clostridium botulinum</i> *	Mésophile	$D_{121\text{ °C}}$ : 0,25	10
<i>Bacillus coagulans</i>	Méso-thermophile	$D_{105\text{ °C}}$ : 1,3-23	6,2-8,5
<i>Bacillus subtilis</i>	Mésophile	$D_{105\text{ °C}}$ : 19-26	8,9-10
<i>Clostridium sporogenes</i>	Mésophile	$D_{105\text{ °C}}$ : 6,2-9,0	6,6-7,8
<i>Moorella thermoacetica</i>	Thermophile	$D_{121\text{ °C}}$ : 30-38	6,1-8,2
<i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i>	Thermophile	$D_{120\text{ °C}}$ : 2,3	5,8
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	Thermophile	$D_{121\text{ °C}}$ : 0,9 - 1,2	7,7-9,4

Il apparaît en effet dans le Tableau 3 qu'un traitement thermique efficace sur les spores de *C. botulinum* ne sera que peu efficace contre les spores de bactéries thermophiles et notamment contre les spores de *M. thermoacetica* qui sont considérées comme faisant partie des spores les plus thermorésistantes dans le domaine agroalimentaire (André *et al.*, 2016).



## 1.5. Qualité microbiologique des conserves

### 1.5.1. Notion de stabilité microbiologique

Les cas d'altérations ou de non-stabilités concernent des denrées alimentaires en conserves ayant subi des modifications après l'étape de traitement thermique, pendant la phase de stockage. Une non-stabilité peut avoir diverses origines : soit le procédé de stérilisation appliqué au produit en question est insuffisant, soit la conserve présente un défaut de fermeture/sertissage favorisant la pénétration de germes de recontamination. Dans le cas où la non-stabilité ne provient pas d'une recontamination, l'altération est due à la résistance des spores de bactéries mésophiles ou thermophiles ayant pu survivre au traitement thermique.

La présence de bactéries et/ou de spores dans le produit fini est contrôlée dans le cadre de tests de stabilité encadrés par des normes de l'association française de normalisation AFNOR (AFNOR, 1997b, AFNOR, 1997a). Les tests de stabilité sont effectués par incubation des denrées à 37 °C pendant 7 jours (ou 32°C pendant 21 jours) pour mettre en évidence la présence de bactéries mésophiles dans le produit final ou à 55°C durant 7 jours pour détecter la présence de bactéries thermophiles. Un lot de produits appertisés peut être mis sur le marché uniquement si la conserve ne montre pas de modification de sa forme extérieure (bombage, flochage, becquets), ni de développement bactérien, c'est-à-dire aucune altération de l'aspect, du goût, de l'odeur et notamment du pH. En effet, le pH ne doit pas varier de plus de 0,5 unité après incubation en comparaison à un témoin conservé à température ambiante pendant 7 jours.

### 1.5.2. Conséquences des non-stabilités

Lorsqu'une non-stabilité est observée après incubation à 37°C (ou 32 °C), la consommation de la denrée représente un risque sanitaire. En effet, ces cas de non-stabilité sont provoqués par la présence de bactéries mésophiles et/ou de spores de bactéries mésophiles ayant germé et abouti à un développement bactérien durant la période de stockage. Les bactéries mésophiles responsables de non-stabilités peuvent être soit dépourvues de pouvoir pathogène comme *Bacillus coagulans* soit au contraire représenter un risque pour la santé comme *Clostridium perfringens* ou encore *Bacillus cereus*. Ces agents pathogènes peuvent provoquer des cas d'intoxication (ingestion de toxines produites par ces bactéries toxigènes) ou des cas de toxi-infections alimentaires (ingestion des spores et/ou cellules végétatives).

L'ingestion de toxine de *C. botulinum* entraîne le botulisme, qui est une intoxication, tandis que l'ingestion de cellules/spores est à l'origine du botulisme infantile. Du fait du danger potentiel pour la santé humaine, les lots de produits appertisés non stables après incubation à 32 °C ou 37 °C doivent être détruits.

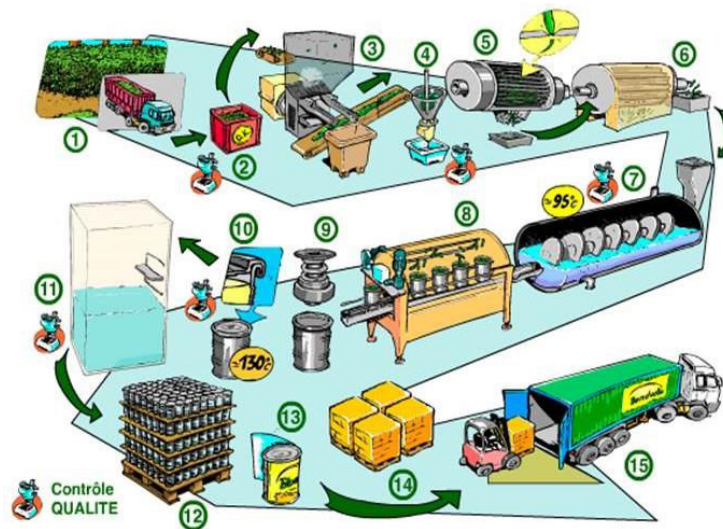
Les cas de non-stabilité détectés après un stockage à 55°C sont provoqués par la présence de bactéries thermophiles et/ou de spores de bactéries thermophiles d'altération ayant germé pendant le stockage. Parmi les bactéries responsables de ces altérations, figurent *Thermoanaerobacterium*, *Geobacillus stearothermophilus*, ainsi que *Moo t/t*, qui n'ont pas de pouvoir pathogène et ne représentent donc pas un risque sanitaire. Cependant, leur développement dans le produit modifie ses propriétés organoleptiques. Ainsi, le développement de *M. thermoacetica* s'accompagne de l'acidification du produit sans phénomène de bombage de la conserve. Du fait de l'absence de risque sanitaire, les stocks ne sont pas détruits. Cependant, les conditions d'export sont restreintes, notamment à destination des pays chauds, et les procédures d'hygiène appliquées dans la conserverie doivent être revues (DGAL, 2015). En effet, la présence de ces espèces bactériennes traduit un problème d'hygiène au niveau des lignes de production (André *et al.*, 2013).

#### 1.6. Les bactéries sporulées thermophiles en conserverie

Les microorganismes sporulés sont ubiquitaires et peuvent survivre de nombreuses années dans l'environnement, les sols constituant le principal réservoir en spores (Carlin *et al.*, 2000, Carlin, 2011). On peut ainsi trouver  $10^4$  à  $10^6$  spores de *B. cereus* par gramme de sol (Heyndrickx, 2011). Une étude récente a montré que les sols sont la principale cause d'entrée de spores dans les industries via des matières premières contaminées (Durand *et al.*, 2015). En effet, de  $10^2$  à  $10^3$  spores de bactéries thermophiles aérobies et anaérobies ont été mises en évidence dans des échantillons de sols et de carottes crues (Durand *et al.*, 2015) et la prévalence de *M. thermoacetica* a été évaluée à 4,7 % et 1,6 % dans les carottes et haricots verts frais, respectivement (Sevenier *et al.*, 2012).

Le procédé d'appertisation dans une conserverie de légumes se décompose en plusieurs étapes (Figure 4). La zone s'étendant du blancheur à la mise en conserve et au jutage est dite « zone chaude » avec des températures relevées variant de 41 °C à 69 °C (Durand *et al.*, 2015). Une analyse d'écologie de ligne réalisée en conserverie de légumes de type petits pois et carottes a

récemment révélé que le procédé même d'appertisation tend à « sélectionner » les spores hautement thermorésistantes de bactéries thermophiles. En effet, bien que la charge en spores de bactéries mésophiles et thermophiles diminue au cours du process, un pic de prévalence des espèces sporulées thermophiles *G. stearotherophilus* et *M. thermoacetica* est détecté après le blanchiment (Durand *et al.*, 2015).



**Figure 4: Le procédé conserve en conserverie de légumes (Bonduelle, 2015).** Les étapes 1 à 3 correspondent à la récolte, la réception et le tri des légumes. Les étapes 4, 7 et 9-10 correspondent au lavage/épierrage, blanchiment et sertissage-traitement thermique des conserves. Dans un premier temps, les légumes sont lavés et/ou parés, épierrés puis sont blanchis dans un bain d'eau portée à une température proche de 100 °C. Ces étapes visent à diminuer la charge microbienne et, dans le cas du blanchiment, à réduire également l'activité enzymatique. Les légumes sont ensuite acheminés sur des tapis convoyeurs et sont mis en conserve. Un jutage à chaud est alors effectué. Cette étape consiste à recouvrir les légumes avec un jus constitué d'eau et d'épices. Les conserves sont serties puis traitées thermiquement.

Ainsi, les spores hautement thermorésistantes résistent à l'étape de blanchiment, le blanchiment constituant ainsi un point critique. Par ailleurs, des zones d'accumulation de matières organiques sur les tapis convoyeurs ont également été identifiées comme points critiques, pouvant potentiellement promouvoir la croissance et/ou la sporulation des spores sélectionnées par le process.

Récemment, une étude rétrospective portant sur l'altération d'aliments en conserves a montré que 35 % des cas d'altérations de conserves peu acides après incubation à 55 °C sont dus à *G. stearotherophilus* et 10 % des cas à *Thermoanaerobacterium* (André *et al.*, 2013). *M. thermoacetica* est associée à 36 % des non-stabilités de conserves peu acides après

incubation à 55 °C et notamment de conserves de légumes ou à base de produits carnés (André *et al.*, 2013). Ainsi, *M. thermoacetica* est la principale cause de non-stabilités de conserves peu acides constatées à 55 °C et représente un risque de pertes économiques important pour les industriels de la filière. Cette bactérie a été également associée à des cas d'altérations de « shiruko » et de boissons en canettes, telles que le café au Japon (Matsuda *et al.*, 1982, Nakano, 2015).

## **2. *Moorella thermoacetica/thermoautotrophica***

### 2.1. Généralités sur le genre *Moorella*

En 1994, le genre *Clostridium* a fait l'objet d'une reclassification qui a donné lieu à la description de cinq nouveaux genres dont *Moorella* (Collins *et al.*, 1994). *Moorella* appartient au phylum des Firmicutes et à la classe des Clostridia. Elle est classée dans l'ordre des *Thermoanaerobacterales* et la famille *Thermoanaerobacteraceae*.

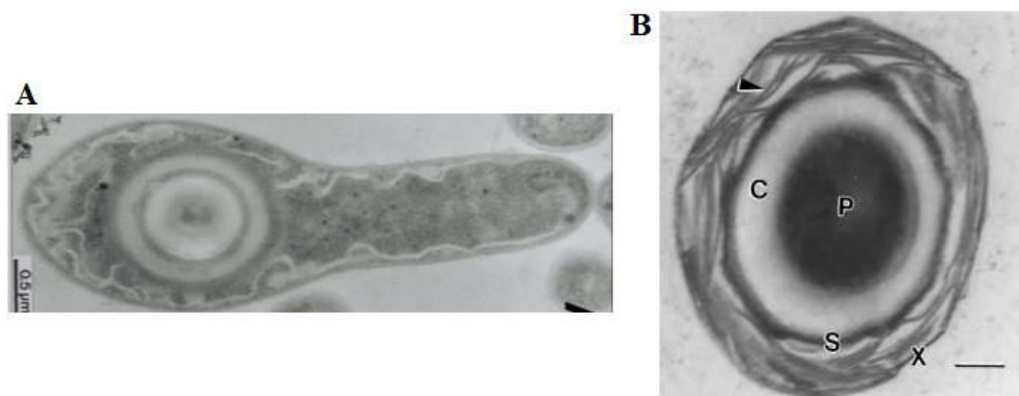
Le genre *Moorella* est composé de sept espèces. *Moorella thermoacetica* (anciennement *Clostridium thermoaceticum*) est la première espèce à avoir été isolée en 1942 (Fontaine *et al.*, 1942) et est considérée comme l'espèce type du genre. Six autres espèces ont été décrites par la suite : *Moorella thermoautotrophica* (anciennement *Clostridium thermoautotrophicum*) (Wiegel *et al.*, 1981), *Moorella glycerini* (Slobodkin *et al.*, 1997), *Moorella mulderi* (Balk *et al.*, 2003), *Moorella perchloratireducens* (Balk *et al.*, 2008), *Moorella humiferrea* (Nepomnyashchaya *et al.*, 2012) et *Moorella stamsii* (Alves *et al.*, 2013).

Bien qu'étant décrites comme deux espèces différentes, *M. thermoacetica* et *M. thermoautotrophica* sont très proches physiologiquement et génétiquement : la similarité entre les séquences codant l'ARNr 16S de souches sauvages et de collection de *M. thermoacetica* et *M. thermoautotrophica* est comprise entre 99 et 100 % (Carlier et Bedora-Faure, 2006). De plus, la valeur de réassociation ADN/ADN entre les deux souches de collection de *M. thermoacetica* DSM 521 et de *M. thermoautotrophica* DSM 1974 a été évaluée à plus de 70 % au cours de cette même étude. Cette proximité génétique a également été mise en évidence sur deux souches de *Moorella* dont la séquence codant l'ARNr 16S était à 99,8 % et 99,5 % similaire à celles de *M. thermoacetica* et *M. thermoautotrophica* respectivement (Byrer *et al.*, 2000). De ce fait, l'existence de ces deux espèces a été remise en question (Carlier et Bedora-Faure, 2006, Kimura *et al.*, 2016), la

similarité de *M. thermoacetica* et *M. thermoautotrophica* suggérant de les regrouper en un seul et même taxon (Carlier et Bedora-Faure, 2006). Les divergences observées entre les deux espèces seraient alors due à une variabilité inter-souches.

## 2.2. Caractéristiques de *Moorella thermoacetica/thermoautotrophica*

*Moo t/t* est un bacille thermophile à Gram positif mesurant de 0,4 x 2,8  $\mu\text{m}$  et 0,8-1 x 3-6  $\mu\text{m}$  pour *M. thermoacetica* et *M. thermoautotrophica* respectivement (van Rijssel *et al.*, 1992, de Vos *et al.*, 2009). Les bacilles du genre *Moorella* présentent des flagelles pérित्रiches mais sont peu ou non motiles et sont décrits comme des bâtonnets ayant une tendance au polymorphisme en conditions de stress (de Vos *et al.*, 2009). *Moo t/t* est une bactérie anaérobie stricte, acétogène, capable de synthétiser de l'acide acétique comme toutes les espèces du genre *Moorella*. Le genre *Moorella* est également capable d'endosporulation (notée sporulation dans la suite du document). Les spores produites sont terminales, déformantes, de forme ronde à légèrement ovale (diamètre 1-1,5  $\mu\text{m}$  x 2,5-3  $\mu\text{m}$ ) et caractérisées par la présence d'un exosporium (Figure 5).



**Figure 5 :** Observation au microscope électronique A) de la souche de référence de *M. thermoacetica* ATCC 39073 en sporulation et B) d'une spore de *M. thermoacetica* JW/DB-2 (D'après Drake et Daniel, 2004 et Byrer *et al.*, 2002). Dans le panel B, P = protoplaste ou cœur, C = cortex, S = tuniques et X = exosporium.

Les spores de *M. thermoacetica* et *M. thermoautotrophica* sont parmi les plus thermorésistantes ayant été isolées à ce jour avec un  $D_{121}^{\circ\text{C}}$  variant de 1 min à 111 min (Matsuda *et al.*, 1982, van Rijssel *et al.*, 1992, Byrer *et al.*, 2000, André *et al.*, 2013, André *et al.*, 2016).

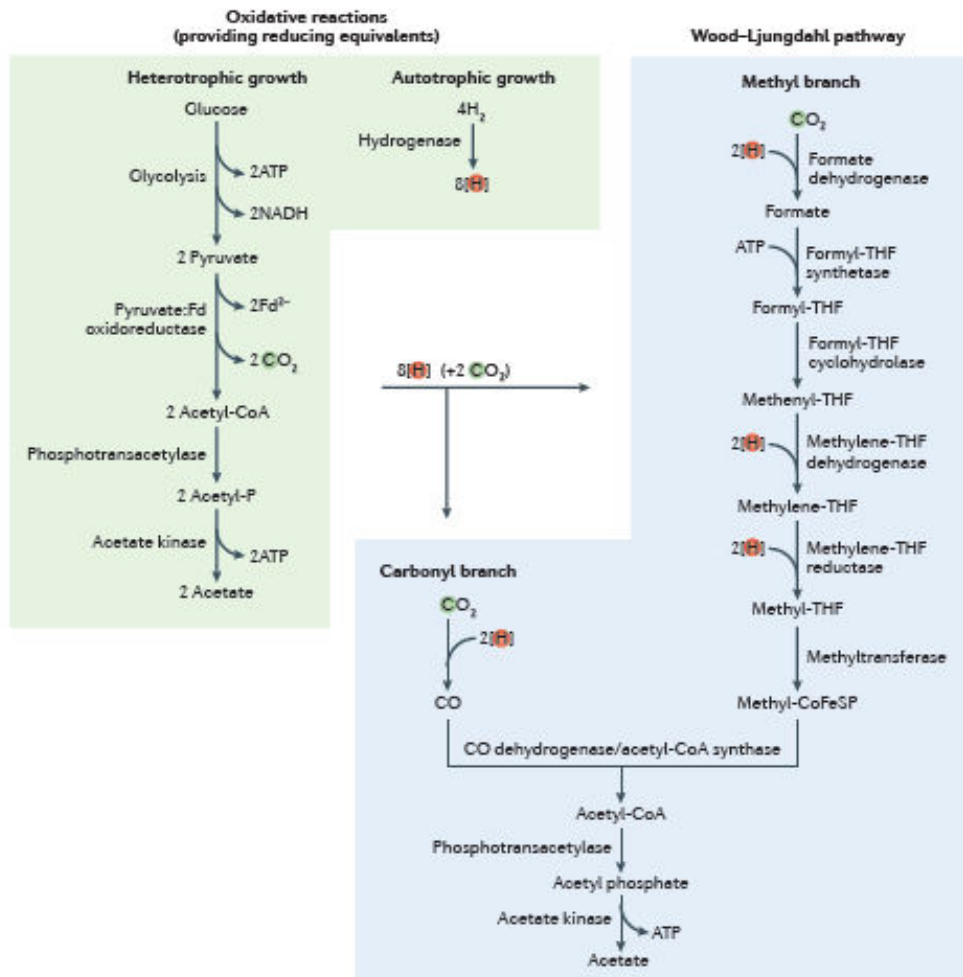
### 2.3. Réservoirs

*M. thermoacetica* a été isolée pour la première fois de fumier de cheval (Fontaine *et al.*, 1942) et a par la suite été également retrouvée au sein d'écosystèmes soumis à de hautes températures. *M. thermoacetica* a ainsi notamment été isolée de sols de prairies au Kansas et en Egypte (Göbßner *et al.*, 1999), dans des prélèvements de boues (Inokuma *et al.*, 2007) ainsi que dans une source géothermale au Japon (Kaksonen *et al.*, 2006). Des souches de *M. thermoacetica* ont pu également être isolées de milieux autoclavés (Byrer *et al.*, 2000), soulignant ainsi la capacité des spores à résister aux procédés de stérilisation utilisés notamment en conserveries. *M. thermoautotrophica* a été isolée de divers échantillons d'eau collectés de sources chaudes provenant d'Allemagne et du parc national de Yellowstone aux Etats-Unis ou encore de sols ou de boues prélevés à Hawaï, en Afrique ainsi qu'en Italie (Wiegel *et al.*, 1981).

### 2.4. Physiologie de *Moorella thermoacetica/thermoautotrophica*

*M. thermoacetica* est le microorganisme modèle d'étude de l'acétogénèse, qui est un processus métabolique mettant en jeu des enzymes particulièrement sensibles à l'oxygène et par lequel deux molécules de CO<sub>2</sub> sont réduites en acétate. *M. thermoacetica* a ainsi été intensivement étudiée afin d'élucider cette voie nommée voie Acétyl Coenzyme A (AcCoA) ou voie de Wood-Ljungdahl d'après le nom des deux biochimistes ayant décrit la voie chez *M. thermoacetica* (Schuchmann et Müller, 2014).

Les bactéries acétogènes sont décrites comme des microorganismes anaérobies utilisant la voie Acétyl Coenzyme A (AcCoA) pour (i) la synthèse réductive de la partie acétyl de l'acétyl CoA (ii) la conservation de l'énergie et (iii) l'assimilation autotrophe du CO<sub>2</sub> en biomasse. Il s'agit de la seule voie de fixation du CO<sub>2</sub> couplée à un mécanisme de conservation d'énergie et considérée comme l'une des plus anciennes voies métaboliques permettant la production d'ATP et de biomasse (Schuchmann et Müller, 2014). Bien que la production d'acide acétique soit une caractéristique des bactéries acétogènes, ce trait ne rentre pas dans la définition car elle dépend du microorganisme considéré mais également des conditions environnementales (Drake *et al.*, 2008). La voie AcCoA peut avoir lieu en conditions autotrophes ou en conditions hétérotrophes par fermentation d'hexoses (Figure 6).



**Figure 6 : Voie de Wood-Ljungdahl (Schuchmann et Müller, 2014).** Les bactéries acétogènes produisent de l'acétate à partir de deux molécules de CO<sub>2</sub> via la voie de Wood-Ljungdahl : une molécule est réduite en composés méthylés dans la branche méthyl et l'autre molécule est réduite en CO dans la branche carbonyl. Le CO formé fusionne avec le groupe méthyl et le coenzyme A pour former l'acétyl CoA. Enfin, l'acétyl CoA est transformé en une mole d'acétate. Pendant l'acétogénèse en conditions de croissance hétérotrophes, le glucose est oxydé en deux molécules d'acétate et aboutit à la formation d'équivalents réducteurs (= 1H<sup>+</sup> + 1e<sup>-</sup>). Ces équivalents réducteurs sont ensuite réoxydés par réduction des deux molécules de CO<sub>2</sub> dans la voie de Wood-Ljungdahl. Fd = ferredoxine ; Fd<sup>2-</sup> = ferredoxine réduite; [H], équivalent réducteur (= 1e<sup>-</sup> + 1H<sup>+</sup>).

*Moo t/t* peut croître dans de larges gammes de températures, allant de 36 °C à 70 °C selon la souche et les conditions (Byrer *et al.*, 2000, Durand, 2014), son optimum étant classiquement situé entre 55 °C et 60 °C (Drake et Daniel, 2004). De même, elle est capable de se développer pour des gammes de pH variant de 4,5 à 7,6 (Drake et Daniel, 2004).

*Moo t/t* est par ailleurs caractérisée par la possibilité de croître de façon autotrophe et hétérotrophe. La croissance peut s'effectuer via l'utilisation d'un large panel de donneurs et accepteurs d'électrons et requiert la présence de métaux à l'état de traces dans le milieu de culture ainsi que de l'acide nicotinique qui sert de précurseur des cofacteurs NAD et NADP (Lundie et Drake, 1984, Drake et Daniel, 2004). Les caractéristiques physiologiques de *Moo t/t* sont consignées dans le Tableau 4.

*Moo t/t* peut utiliser de nombreux types de substrats comme donneurs d'électrons. En conditions autotrophes, *Moo t/t* est capable de croître en présence de composés à 1 C comprenant le CO, H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>, le méthanol, le formate ou encore les groupements méthyles. Le gaz H<sub>2</sub> constitue le donneur d'électron le plus simple utilisé par les systèmes biologiques et représente la seule source non carbonée favorisant la croissance des bactéries acétogènes. Cependant, le rendement cellulaire en présence de H<sub>2</sub> est souvent faible (Daniel *et al.*, 1990, Drake *et al.*, 2008). En conditions chimioorganotrophes, de nombreux substrats (sucres, acides organiques ou alcools) peuvent également être utilisés par *Moo t/t* (Tableau 4).

De même, *Moo t/t* est capable d'utiliser des accepteurs d'électron de diverses natures. Le CO<sub>2</sub> est notamment utilisé comme accepteur terminal d'électron dans la voie Wood-Ljungdahl. Cependant, en conditions chimioorganotrophes, lorsque *M. thermoacetica* croît en présence d'oxalate, le CO<sub>2</sub> est préférentiellement utilisé en tant qu'accepteur d'électron alors que le nitrate est utilisé de préférence lorsque *Moo t/t* croît en présence de glyoxylate (Seifritz *et al.*, 1999). Dans ce cas, le métabolisme est dévié de la voie Wood-Ljungdahl pour assurer la dissimilation du nitrate. Cette déviation peut s'expliquer par l'absence d'expression du cytochrome b qui joue un rôle de transporteur d'électron dans la chaîne de transport mise en place dans la voie Wood-Ljungdahl (Fröstl *et al.*, 1996, Seifritz *et al.*, 1999). Par ailleurs, il a également été montré qu'en absence de CO<sub>2</sub> exogène, *M. thermoacetica* peut se développer en présence de groupements carboxyles issus de composés aromatiques dont la décarboxylation fournit des groupements carboxyles équivalant au CO<sub>2</sub> (Hsu *et al.*, 1990).

L'intégralité des données du Tableau 4 montrent qu'en plus d'être proches génétiquement, *M. thermoacetica* et *M. thermoautotrophica* partagent des caractéristiques métaboliques très semblables. De ce fait, dans un souci de simplification, nous parlerons uniquement de *M. thermoacetica* et non plus de *M. thermoacetica/thermoautotrophica* dans la suite de ce manuscrit.



**Tableau 4 : Principales caractéristiques physiologiques de *Moo tft*.**

		<i>M. thermoacetica</i>	<i>M. thermoautotrophica</i>	Références
<b>Température de croissance en °C</b>	Optimale	55-65	55-65	Fontaine <i>et al.</i> , 1942 ; Wiegel <i>et al.</i> , 1981 ; Matsuda <i>et al.</i> , 1982 ; Balk <i>et al.</i> , 2003 ; Durand., 2014
	Min/max	45/68	36/69-70	Fontaine <i>et al.</i> , 1942 ; Wiegel <i>et al.</i> , 1981 ; Byrer <i>et al.</i> , 2000 ; Balk <i>et al.</i> , 2003 ; Carlier et Bedora-Faure., 2006 ; Durand., 2014
<b>pH de croissance</b>	Optimal	5.5-7,0	5.5-7,0	Wiegel <i>et al.</i> , 1981 ; Balk <i>et al.</i> , 2003 ; Durand, 2014
	Min/max	4,5 / >7,5	4,5 / 7,6	Fontaine <i>et al.</i> , 1942 ; Wiegel <i>et al.</i> , 1981 ; Balk <i>et al.</i> , 2003 ; Durand, 2014
<b>Donneurs d'électrons en croissance chimiolithotrophe</b>	Gaz	H <sub>2</sub> , CO	H <sub>2</sub> , CO	Wiegel <i>et al.</i> , 1981 ; Savage <i>et al.</i> , 1987 ; Daniel <i>et al.</i> , 1990 ; Daniel et Drake, 1993 ; Slobodkin <i>et al.</i> , 1997 ;
<b>Donneurs d'électrons en croissance chimioorganotrophe</b>	Sucres	Glucose, mannose, fructose, galactose, arabinose, xylose, esculine	Glucose, mannose, fructose, galactose, arabinose, xylose, lactose, maltose,	Fontaine <i>et al.</i> , 1942 ; Andreesen <i>et al.</i> , 1973 ; Wiegel <i>et al.</i> , 1981 ; Daniel <i>et al.</i> , 1990 ; van Rijssel <i>et al.</i> , 1992 ; Daniel et Drake, 1993 ; Balk <i>et al.</i> , 2003 ; Xue <i>et al.</i> , 2014
	Alcools	Méthanol, n-propanol*, éthanol*, n-butanol	Méthanol, n-propanol*, ethanol*	Wiegel <i>et al.</i> , 1981 ; Daniel <i>et al.</i> , 1990 ; ; van Rijssel <i>et al.</i> , 1992 ; Slobodkin <i>et al.</i> , 1997 ; Seifritz <i>et al.</i> , 1999 ; Balk <i>et al.</i> , 2003 ; Pierce <i>et al.</i> , 2008
	Acides organiques	Formate, pyruvate, acide gluconique, acide lactique, glyoxylate, oxalate, glycolate	Lactate, pyruvate, gluconate, galacturonate, formate, glycérate, glyoxylate, oxalate	Fontaine <i>et al.</i> , 1942 ; Barker et Kamen, 1945 ; Wiegel <i>et al.</i> , 1981 ; ; van Rijssel <i>et al.</i> , 1992 ; Daniel et Drake, 1993 ; Slobodkin <i>et al.</i> , 1997 ; Seifritz <i>et al.</i> , 1999 ; Seifritz <i>et al.</i> , 2002 ; Balk <i>et al.</i> , 2003
<b>Accepteurs d'électrons</b>	C	CO <sub>2</sub> , groupements carboxyles issus de la décarboxylation de composés aromatiques	CO <sub>2</sub> , groupements carboxyles issus de la décarboxylation de composés aromatiques	Wiegel <i>et al.</i> , 1981 ; Hsu <i>et al.</i> , 1990 ; Daniel et Drake, 1993 ; Balk <i>et al.</i> , 2003
	N	Nitrate/nitrite	Nitrate/nitrite	Fontaine <i>et al.</i> , 1942 ; Fröstl <i>et al.</i> , 1996 ; Slobodkin <i>et al.</i> , 1997 ; Seifritz <i>et al.</i> , 2002 ; Pierce <i>et al.</i> , 2008 ; Schuchmann et Keller, 2014
	S	Thiosulfate, diméthylsulfoxyde	Thiosulfate, diméthylsulfoxyde	Seifritz <i>et al.</i> , 1999 ; Balk <i>et al.</i> , 2003 ; Pierce <i>et al.</i> , 2008 ; Schuchmann et Keller, 2014

\*L'éthanol et le propanol sont utilisés comme substrats uniquement quand le nitrate ou le thiosulfate (ou diméthylsulfoxyde) sont utilisés comme accepteurs d'électron.

### 3. La sporulation

#### 3.1. Généralités

La sporulation est un mécanisme apparu il y a plus de 2 milliards d'années, dont le déclenchement s'opère lorsque les bactéries sporulantes sont confrontées à des conditions hostiles. De ce fait, la spore bactérienne est considérée comme une forme de résistance conférant aux bactéries la capacité de survivre durant plusieurs années voire plusieurs millions d'années (Vreeland *et al.*, 2000). Ce mécanisme est retrouvé uniquement chez les bactéries appartenant au phylum des Firmicutes et plus précisément chez certaines bactéries à Gram positif des genres *Bacilli* et *Clostridia* pour les bactéries aérobies et anaérobies, respectivement.

Les bactéries sporulées possèdent donc un cycle de développement comprenant une forme végétative et une forme spore. Alors que les cellules végétatives ont une activité métabolique et sont capables de se diviser et se multiplier, les spores sont considérées comme métaboliquement dormantes (Setlow *et al.*, 2006). Des travaux récents montrent cependant que les spores seraient capables de maintenir une activité métabolique plusieurs jours après leur libération (Segev *et al.*, 2012). En effet, le contenu en ARNm de ces spores est très dynamique pendant cette période d'adaptation : les ARNm sont dégradés lorsque les spores sont stockées à température ambiante ou élevée tandis qu'une activité transcriptionnelle est détectée lorsque les spores sont incubées à basse température (Segev *et al.*, 2012).

Les facteurs déclencheurs de la sporulation diffèrent selon le genre bactérien considéré : chez *Bacillus subtilis* et plus globalement chez le genre *Bacillus*, la sporulation est initiée en cas de carence nutritionnelle (Setlow *et al.*, 2006, Al-Hinai *et al.*, 2015). Chez les Clostridies, une carence nutritionnelle peut également contribuer au déclenchement de la sporulation bien qu'il ne s'agisse pas du facteur déclencheur principal. Chez les Clostridies solvantogènes, la production d'acides organiques, tels que l'acide butyrique et l'acide acétique provoque une baisse de pH interne et externe au cours de la croissance. L'environnement devient toxique pour les cellules végétatives, qui en réponse produisent des solvants tels que du butanol et de l'acétone. Cette production de solvants déclenche alors la sporulation (Dürre et Hollergschwandner, 2004, Steiner *et al.*, 2012, Al-Hinai *et al.*, 2015).

La densité cellulaire joue également un rôle dans la sporulation. En effet, un mécanisme de type quorum-sensing (QS) codé par le locus *agrBDCA* a été mis en évidence chez *C. acetobutylicum*. Ce type de système correspond à un mécanisme de communication cellule-cellule permettant de coordonner l'expression des gènes à l'échelle de la population. Bien que ce système joue un rôle dans la sporulation, il n'est pas indispensable pour qu'elle se produise (Steiner *et al.*, 2012). Ce même type de système est retrouvé chez *Bacillus* et serait fréquemment retrouvé chez les Clostridies (Steiner *et al.*, 2012).

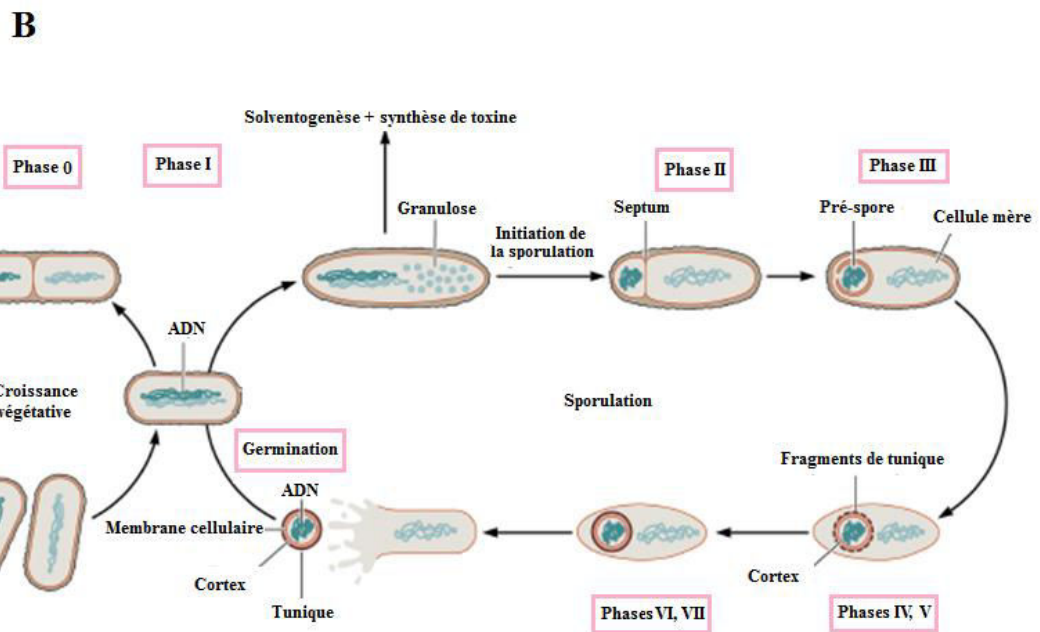
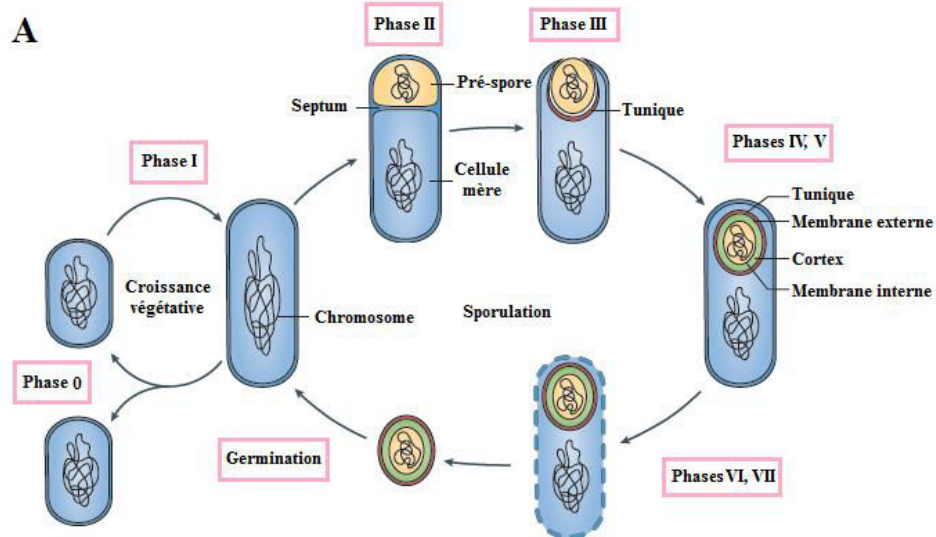
### 3.2. Formation de la spore

La sporulation est un processus classiquement divisée en 7 grandes phases morphologiques (Figure 7), conservées chez les bactéries sporulées (Leggett *et al.*, 2012, Al-Hinai *et al.*, 2015, Talukdar *et al.*, 2015).

La phase 0 correspond à la bactérie dans sa forme végétative. Contrairement à ce qui est observé chez les Bacilli, les Clostridies solvantogènes subissent une étape de différenciation juste avant l'entrée en sporulation. Cette étape nommée « clostridial stage » est caractérisée par un gonflement des cellules qui prennent une forme de cigare et accumulent au sein de leur cytoplasme des granules de réserves faites d'amylopectine (Dürre et Hollergschwandner, 2004, Al-Hinai *et al.*, 2015).

L'entrée en sporulation chez les Bacilli et les Clostridies est ensuite marquée par la duplication de l'ADN bactérien qui se condense en un filament axial lors de la phase I.

La cellule végétative se divise ensuite asymétriquement en phase II ; ce qui résulte en la formation de deux compartiments, séparés par un septum formé par invagination de la membrane plasmique. Le plus petit compartiment correspond à la future spore ou pré-spore, le plus grand à la cellule mère ou sporange ; chacun des deux compartiments contenant une copie du génome. Cependant, il est à noter que seul 1/3 de l'ADN de la future spore est initialement présent dans le compartiment correspondant et que les 2/3 restant y sont transloqués par la suite sous l'action de la translocase SpoIIIE (Higgins et Dworkin, 2012, Tan et Ramamurthi, 2014).



**Figure 7 : Cycle de sporulation décrit A) chez *B. subtilis* et B) *C. acetobutylicum* (McKenney *et al.*, 2013 ; Al-Hinai *et al.*, 2015)**

Au cours de la phase III, la membrane de la cellule mère englobe la pré-spore, qui s'enkyste alors dans le sporange et aboutit à la formation de l'endospore qui possède alors une membrane interne et une membrane externe (Higgins et Dworkin, 2012, Tan et Ramamurthi, 2014). Cette étape met en jeu l'action d'un complexe protéique DMP constitué des trois protéines SpoIID, SpoIIM et SpoIIP qui génèrent la force nécessaire au mouvement de la

membrane. De même, les protéines SpoIIAH et SpoIIQ joueraient également un rôle dans l'étape d'enkystement (Higgins et Dworkin, 2012, Tan et Ramamurthi, 2014, Serrano *et al.*, 2016a). A la fin de cette étape, la pré-spore est libérée dans le cytosol de la cellule mère et est entourée d'une membrane interne et d'une membrane externe. A partir de ce stade, la sporulation est irréversible. Par la suite, le cortex de la spore est synthétisé. Cette structure s'établit entre les membranes interne et externe de l'endospore lors de la phase IV.

La formation du cortex est suivie de la synthèse des tuniques sporales dans la cellule mère au cours de la phase V. C'est au cours des phases IV et V qu'a lieu la synthèse abondante de l'acide dipicolinique ou DPA. Cette molécule est produite par la cellule mère et s'accumule ensuite dans l'endospore sous forme chélatée avec des cations divalents et notamment les ions  $Ca^{2+}$  (Gould, 1977, Setlow, 2007, Paredes-Sabja *et al.*, 2011, Leggett *et al.*, 2012). L'accumulation du DPA contribue à la déshydratation du cœur et se traduit par l'acquisition du caractère réfringent des spores en microscopie à contraste de phase (Setlow, 2006). Des protéines SASP de type  $\alpha/\beta$  (small acid-soluble DNA-binding protein) sont également synthétisées juste avant l'entrée du DPA dans le cœur. Elles se lient à l'ADN sporal, le saturent et le stabilisent (Setlow *et al.*, 2006, Setlow, 2006). Ces molécules sont très abondantes et représentent 5 à 10 % des protéines totales du cœur des spores de *Bacillus* et *Clostridium* (Setlow, 2007).

La phase VI correspond à la maturation de la spore et à l'acquisition de ses propriétés de résistance. La spore mature est enfin libérée en phase VII par lyse cellulaire. La structure de la spore protège alors le microorganisme à l'état dormant jusqu'à ce que les conditions environnementales redeviennent favorables. La spore est alors ré-activée et entre dans un processus de germination aboutissant à la formation d'une nouvelle cellule végétative qui redevient active métaboliquement et capable de croître.

### 3.3. Programme moléculaire de la sporulation

Les mécanismes moléculaires mis en jeu dans la sporulation ont essentiellement été étudiés chez *Bacillus* et plus particulièrement chez *B. subtilis*, qui est de ce fait l'organisme modèle d'endosporulation (de Hoon *et al.*, 2010, Setlow, 2012, Abecasis *et al.*, 2013, McKenney *et al.*, 2013, Dworkin, 2014, Al-Hinai *et al.*, 2015).

Il existe 6 grands facteurs de transcription impliqués dans la sporulation, que ce soit chez les Bacilli ou les Clostridies (Higgins et Dworkin, 2012, Dürre, 2014, Al-Hinai *et al.*, 2015) : Spo0A et les 5 « facteurs sigma »  $\sigma^H$ ,  $\sigma^E$ ,  $\sigma^F$ ,  $\sigma^G$  et  $\sigma^K$ . La protéine Spo0A (codée par le gène *spo0A*) est le régulateur principal de la sporulation et est exprimée à un faible niveau basal chez *B. subtilis*. Son activation est contrôlée par phosphorylation via 5 histidines kinases orphelines (HKs) KinA à KinE (Kroos *et al.*, 1999, Jiang *et al.*, 2000). La régulation de son expression est sous le contrôle du facteur  $\sigma^H$  qui est le premier facteur sigma à être activé (de Hoon *et al.*, 2010, Higgins et Dworkin, 2012, Tan et Ramamurthi, 2014).

Les facteurs sigma gouvernent l'expression des gènes lors de la sporulation en agissant en tant que facteurs d'initiation promouvant l'attachement de l'ARN polymérase à des sites de fixation spécifiques, induisant ainsi l'expression de certains gènes. Les 4 facteurs  $\sigma^E$ ,  $\sigma^F$ ,  $\sigma^G$  et  $\sigma^K$  sont exprimés spécifiquement soit dans la cellule mère soit dans la pré-spore. En effet, les facteurs  $\sigma^F$  et  $\sigma^G$  sont actifs dans la pré-spore tandis que  $\sigma^E$  et  $\sigma^K$  sont actifs spécifiquement dans la cellule mère (Kroos *et al.*, 1999, Higgins et Dworkin, 2012, Tan et Ramamurthi, 2014). L'expression ainsi que l'activation des facteurs sigma codés par les gènes *sigE*, *sigF*, *sigG* et *sigK* sont contrôlées spatialement et temporellement. Les gènes *sigF* et *sigE* sont exprimés avant la division asymétrique tandis que les gènes *sigG* et *sigK* sont exprimés plus tardivement, après la division (Kroos *et al.*, 1999). Par ailleurs, les facteurs  $\sigma^F$  et  $\sigma^E$  sont activés après la division asymétrique alors que  $\sigma^G$  et  $\sigma^K$  sont activés tardivement après la fin de l'enkystement (Kroos *et al.*, 1999, Higgins et Dworkin, 2012, Tan et Ramamurthi, 2014). Ainsi, les facteurs  $\sigma^F$  et  $\sigma^E$  régulent l'expression précoce des gènes de sporulation tandis que les facteurs  $\sigma^G$  et  $\sigma^K$  interviennent dans la régulation de l'expression des gènes tardifs.

Chez *B. subtilis*, la carence nutritionnelle induit l'activation des 5 HK KinA, KinB, KinC, KinD et KinE qui initient un phosphorelais correspondant à une cascade de phosphorylations successives de facteurs de transcription (Tan et Ramamurthi, 2014). Le facteur Spo0F est tout d'abord phosphorylé par les HKs. Spo0F-P phosphoryle Spo0B qui phosphoryle à son tour Spo0A qui se trouve alors activé sous forme Spo0A-P (de Hoon *et al.*, 2010, Tan et Ramamurthi, 2014). Spo0A-P contrôle un très large régulon de gènes, c'est-à-dire un ensemble de gènes dont l'expression est co-réglée. Ces gènes sont impliqués dans la division asymétrique et l'activation des facteurs sigma spécifiques de la sporulation (McKenney *et al.*, 2013).

Le facteur  $\sigma^H$  codé par *sigH* intervient en tant que régulateur de la transcription de *spo0A* dans la cellule avant la division (de Hoon *et al.*, 2010). Ce facteur est constitutivement exprimé et

son expression est indirectement stimulée par Spo0A-P. En effet, Spo0A-P a pour effet de réguler négativement *abrB*, codant pour un répresseur de *sigH* (de Hoon *et al.*, 2010, Higgins et Dworkin, 2012) ce qui se traduit par une régulation positive de *sigH* et donc de *spo0A*. Lorsqu'un niveau de Spo0A-P critique est atteint, celui-ci va activer la transcription de *spoIIE* ainsi que la transcription des deux opérons *spoIIAA-spoIIAB-sigF* et *spoIIG-sigE* codant pour les facteurs  $\sigma^F$  et  $\sigma^E$  respectivement (Tan et Ramamurthi, 2014).

Le facteur  $\sigma^F$  synthétisé est maintenu inactif par l'anti-facteur sigma SpoIIAB, lui-même maintenu inactif par phosphorylation par l'anti-anti-facteur sigma SpoIIAA inactif. Cette inactivation est levée par l'activation de la phosphatase membranaire SpoIIE qui permet à SpoIIAA d'interagir avec SpoIIAB et de libérer  $\sigma^F$  qui n'est actif que dans le compartiment de la pré-spore après la division asymétrique (Tan et Ramamurthi, 2014). Le facteur  $\sigma^E$  est quant à lui synthétisé à l'état de pro-facteur sigma inactif. Son activation est rendue possible par l'expression de SpoIIR sous le contrôle de  $\sigma^F$ . La protéine SpoIIR est sécrétée au niveau de la membrane de la pré-spore et va interagir dans l'espace intermembranaire du septum avec la protéine SpoIIGA située au niveau de la membrane de la cellule mère. La protéase SpoIIGA clive alors  $\sigma^E$  le rendant actif dans la cellule mère (Tan et Ramamurthi, 2014).

Le facteur  $\sigma^E$  actif régule ensuite l'activation de  $\sigma^G$  dans la pré-spore. En effet, *sigG* est exprimé sous le contrôle de  $\sigma^F$ , cependant il n'est activé qu'après la fin de l'enkystement de la pré-spore. L'activation de  $\sigma^G$  dépend de la formation du « feeding tube » constitué des protéines SpoIIQ ainsi que des 8 protéines SpoIIIA dont l'expression est sous le contrôle de  $\sigma^F$  et  $\sigma^E$ , respectivement. Le « feeding tube » permettrait alors des échanges de molécules entre la cellule mère et la pré-spore, ces échanges résultant en l'activation de  $\sigma^G$  (Higgins et Dworkin, 2012, Tan et Ramamurthi, 2014, Ramírez-Guadiana *et al.*, 2017).

D'autre part,  $\sigma^E$  et SpoIIID activent la transcription de *sigK*. Chez *B. subtilis*, *sigK* est constitué des deux gènes *spoIIIC* (extrémité 3') et *spoIVCB* (extrémité 5') entrecoupés d'un élément de 48 kb appelé *skin* pour "sigma K intervening element" (SubtiWiki, Fimlaid et Shen, 2015). Cet élément correspond à une séquence d'ADN prophagique codant une recombinase SpoIVCA, exprimée dans la cellule mère pendant les phases tardives de la sporulation (Fimlaid et Shen, 2015). L'expression de cette recombinase permet la réorganisation de l'ADN par excision de l'élément *skin*, restaurant ainsi une expression fonctionnelle de *sigK* (Fimlaid et Shen, 2015, Serrano *et al.*, 2016b). La séquence *skin* peut être de taille et d'orientation variables selon l'espèce considérée et est absente chez certaines espèces de *Bacillus*. Au même titre que  $\sigma^E$ , le facteur  $\sigma^K$  est synthétisé sous forme inactive

pro- $\sigma^K$  (Tan et Ramamurthi, 2014). Le clivage de la partie N-terminale de pro- $\sigma^K$  en  $\sigma^K$  dépend de  $\sigma^G$ . En effet, l'expression de  $\sigma^G$  induit au niveau de l'endospore l'expression d'une protéine SpoIVB qui interagit alors avec la protéine SpoIVFA. L'interaction entraîne un clivage de SpoIVFA et une levée de l'inhibition de SpoIVFB exercée par SpoIVFA. La protéase SpoIVFB clive alors le pro- $\sigma^K$  en  $\sigma^K$  qui est ainsi le dernier facteur sigma à être activé (Higgins et Dworkin, 2012, Tan et Ramamurthi, 2014).

L'étude des mécanismes de sporulation chez d'autres espèces et notamment chez les Clostridies a permis de mettre en évidence que, même si les mécanismes de sporulation restent globalement les mêmes, des différences existent (Figure 8).

En effet, chez les Clostridies, l'initiation de la sporulation dépend également de la phosphorylation de Spo0A, mais contrairement à ce qui est observé chez *B. subtilis*, Spo0A n'est pas activé via un phosphorelais complexe mais par des HK orphelines qui vont directement phosphoryler Spo0A (Dürre et Hollergschwandner, 2004, Galperin *et al.*, 2012, Saujet *et al.*, 2013, Al-Hinai *et al.*, 2015).

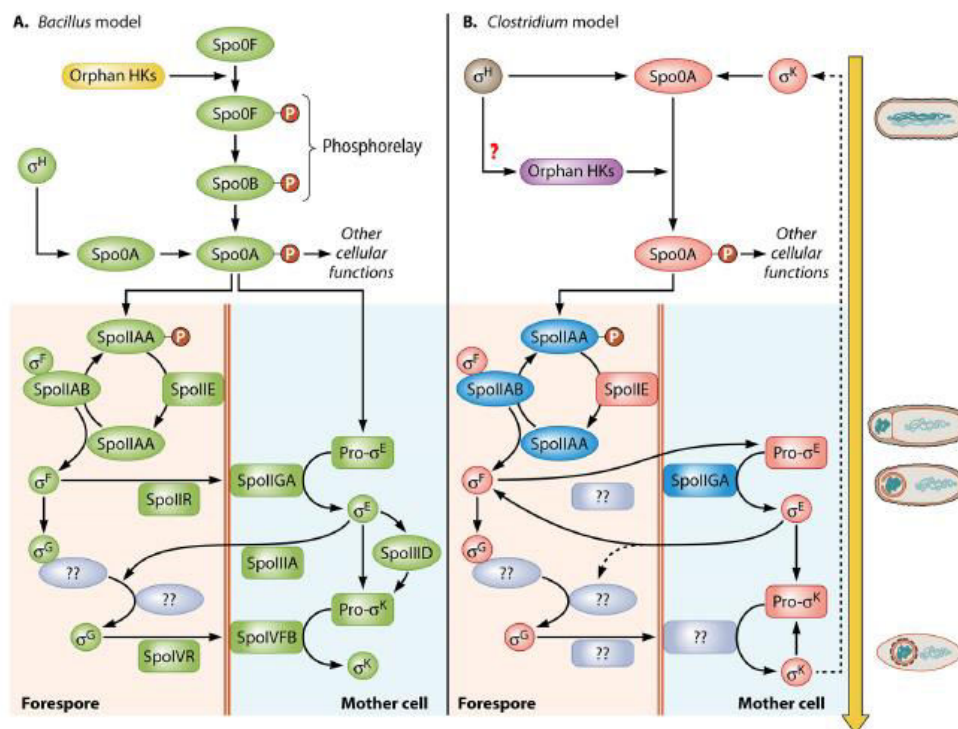


Figure 8 : Modèle de sporulation proposé A) chez *Bacillus* et B) chez *Clostridium* (d'après Al-Hinai *et al.*, 2015)



Par ailleurs, des différences de régulation de l'expression de  $\sigma^E$ ,  $\sigma^F$ ,  $\sigma^G$  et  $\sigma^K$  ont été mises en évidence : ces facteurs sont présents et s'expriment dans les mêmes compartiments cellulaires que chez *B. subtilis*, cependant l'activation de leur transcription peut différer, comme cela a été observé chez *C. difficile* (Pereira *et al.*, 2013, Dembek *et al.*, 2015). En effet, contrairement à ce qui est décrit chez *B. subtilis*, l'activation de la transcription de *sigE* chez *C. difficile* n'est pas totalement dépendante de  $\sigma^F$  (Pereira *et al.*, 2013). De même, l'activation de  $\sigma^G$  et  $\sigma^K$  chez *C. difficile* ne requiert pas l'action de  $\sigma^E$  et  $\sigma^G$ , respectivement (Pereira *et al.*, 2013). Ces observations ont conduit les auteurs à émettre l'hypothèse que la communication entre les 2 compartiments cellulaires, c'est-à-dire la cellule mère et la pré-spore, est moins évoluée chez *C. difficile*.

Par ailleurs,  $\sigma^K$ , le dernier facteur sigma activé chez *B. subtilis* est caractérisé par un double rôle dans la sporulation chez *C. acetobutylicum*. En effet, ce facteur intervient dans les étapes tardives de la sporulation mais également dans les étapes précoces (Al-Hinai *et al.*, 2013, Al-Hinai *et al.*, 2015). Chez *C. botulinum* et *C. perfringens*, ce facteur est également exprimé tôt au cours de la sporulation, avant la division asymétrique et jouerait un rôle dans la production d'entérotoxines chez *C. perfringens* (Pereira *et al.*, 2013, Fimlaid et Shen, 2015). De plus, l'activation de  $\sigma^K$  chez *C. difficile* ne nécessite pas de clivage protéolytique contrairement à ce qui est observé chez *B. subtilis*. En effet, le  $\sigma^K$  de *C. difficile* ne dispose pas de propeptide en N-terminal, ni ne possède la machinerie permettant son excision (Pishdadian *et al.*, 2015). Bien que la présence de cet élément ne soit pas essentielle dans la sporulation chez *B. subtilis*, sa délétion chez *C. difficile* altère sa capacité à produire des spores thermorésistantes (Dürre et Hollergschwandner, 2004, Al-Hinai *et al.*, 2015). Enfin, les données de séquençage de plusieurs génomes de Clostridies montrent que *sigK* n'est entrecoupé d'un élément *skin* que pour certaines souches de *C. difficile* et *C. tetani* et n'est donc pas systématiquement retrouvé au sein même des Clostridies (Al-Hinai *et al.*, 2015).

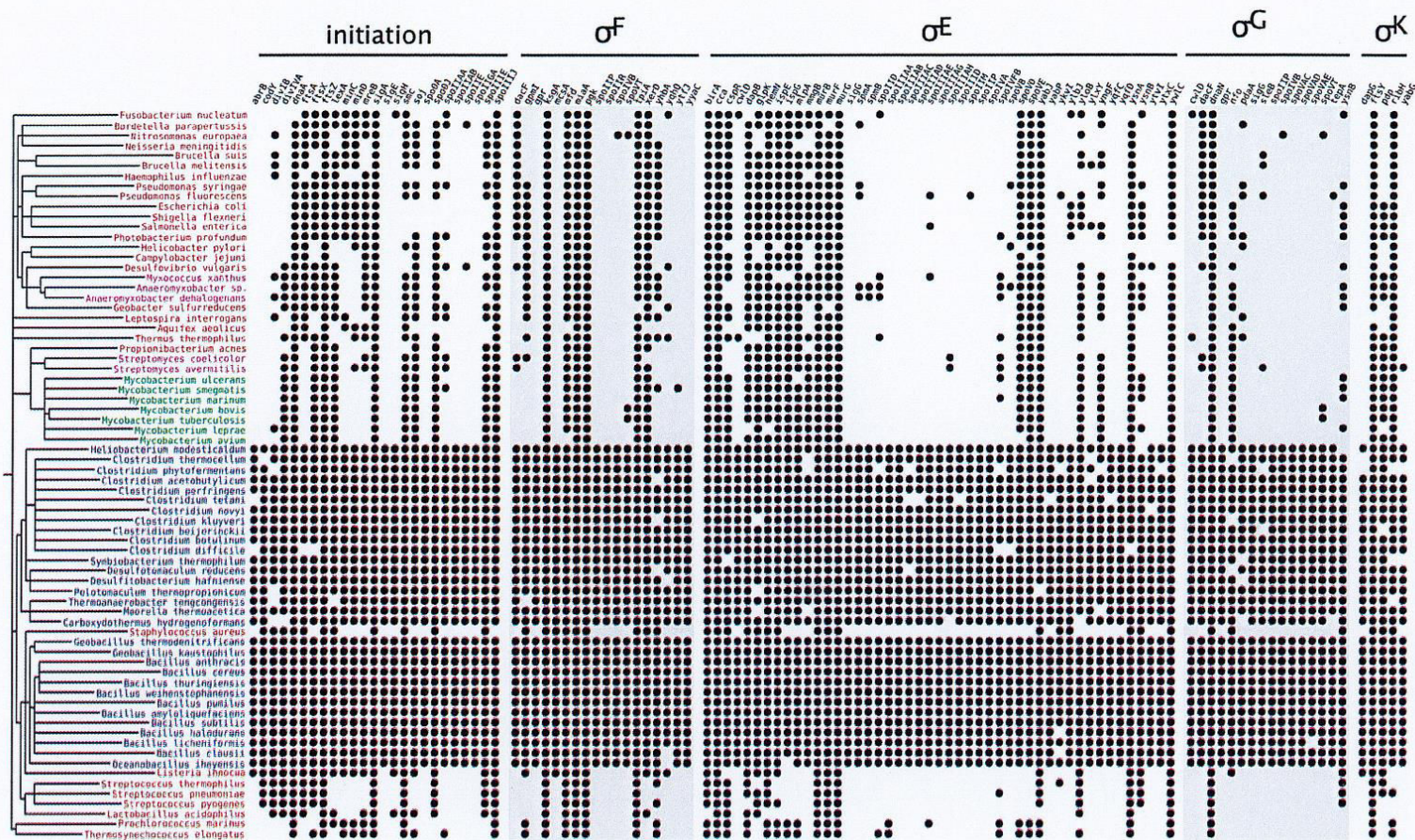
### 3.4. Conservation des gènes de sporulation

Plus de 600 gènes associés à la sporulation ont été identifiés chez *B. subtilis* (Abecasis *et al.*, 2013). Des études récentes ont permis également de mettre en évidence les gènes impliqués dans la sporulation chez d'autres espèces bactériennes. Ainsi, chez *C. difficile*, 798 gènes jouant un rôle dans la sporulation ont été identifiés (Dembek *et al.*, 2015). Chez cette même espèce, un total de 228 gènes appartenant aux régulateurs  $\sigma^F$ ,  $\sigma^G$ ,  $\sigma^E$  et  $\sigma^K$  ont été mis en

évidence, soit deux fois moins que chez *B. subtilis* (Pereira *et al.*, 2013, Saujet *et al.*, 2013). Bien que les mécanismes de sporulation soient étudiés chez différents genres bactériens et diverses espèces, la majorité des données expérimentales a été obtenue pour *B. subtilis*. De ce fait, ceux-ci restent inconnus chez de très nombreuses espèces dont *M. thermoacetica*.

Des travaux récents de comparaison de génomes de bactéries sporulées ont récemment été menés pour déterminer le niveau de conservation des gènes de sporulation et définir un ensemble de gènes spécifiques de ce processus. Le génome de *B. subtilis* a ainsi été comparé à celui de diverses espèces bactériennes sporulées (de Hoon *et al.*, 2010). De même, une étude a été menée en 2012 sur 140 espèces sporulées connues ou supposées, dont *M. thermoacetica* ATCC 39073, 30 espèces non sporulées possédant le gène *spo0A* et 80 espèces ne le possédant pas (Galperin *et al.*, 2012). Cette étude a permis d'identifier les gènes de sporulation les plus conservés, c'est-à-dire ceux partagés par toutes les Bacilli et Clostridies sporulées de l'étude. Une autre étude a permis de comparer les génomes de 70 espèces bactériennes endosporulées, dont *M. thermoacetica*, d'espèces exosporulées, d'espèces non sporulées et de mycobactéries (Abecasis *et al.*, 2013). Parmi les 654 gènes identifiés chez *B. subtilis*, seuls 111 ont été identifiés comme étant présents chez 90 % des espèces sporulées étudiées (Figure 9).

Cependant, près de la moitié de ces gènes ne sont pas uniquement associés à la sporulation mais sont également essentiels au métabolisme cellulaire (division cellulaire, ségrégation de l'ADN, synthèse du peptidoglycane...). Cette même étude a permis de définir un cœur d'environ 40 gènes signatures de la sporulation, présents chez au moins 90 % des bactéries sporulées et chez moins de 5 % des bactéries non sporulées de l'étude (Figure 9). Bien que ces études n'apportent pas de preuves expérimentales de l'implication des gènes lors de la sporulation chez les différentes espèces étudiées, elles rapportent les gènes présents chez *M. thermoacetica* et renseignent sur les mécanismes potentiellement mis en place par cette bactérie au cours de la sporulation. En effet, les gènes codant les 4 facteurs sigma  $\sigma^F$ ,  $\sigma^G$ ,  $\sigma^E$  et  $\sigma^K$ , régulant l'expression des gènes dans la pré-spore et dans la cellule mère, sont présents dans le génome de *M. thermoacetica* ATCC 39073. De même, un gène codant pour le « master regulator » de la sporulation Spo0A a été identifié. De ce fait, les principaux régulateurs de la sporulation sont présents dans le génome de cette bactérie, ce qui suggère que le mécanisme général est conservé. Cependant, peu de gènes de sporulation sont partagés par une grande partie des bactéries sporulées et notamment les gènes sous le contrôle de  $\sigma^K$  (Figure 9).



Gènes signatures (cut-off 5 %)	
<i>yyaC</i>	<i>spoVAE</i>
<i>abrB</i>	<i>spoVAF</i>
<i>yabG</i>	<i>spoIIM</i>
<i>spoVT</i>	<i>spoOA</i>
<i>yabP</i>	<i>spoIVB</i>
<i>spolIE</i>	<i>spolIIAA</i>
<i>sigH</i>	<i>spolIIAB</i>
<i>cwlD</i>	<i>spolIIAC</i>
<i>spolIG</i>	<i>spolIIAD</i>
<i>sigG</i>	<i>spolIIAE</i>
<i>ylmC</i>	<i>spolIIAF</i>
<i>spoVS</i>	<i>spolIIAG</i>
<i>tepA</i>	<i>spolIIAH</i>
<i>spoIVA</i>	<i>yqfC</i>
<i>spmB</i>	<i>yqfD</i>
<i>spolIAB</i>	<i>gpr</i>
<i>spoVAA</i>	<i>spolIP</i>
<i>spoVAB</i>	<i>ytaF</i>
<i>spoVAC</i>	<i>ytlI</i>
<i>spoVAD</i>	<i>spolIR</i>
<i>spolIID</i>	

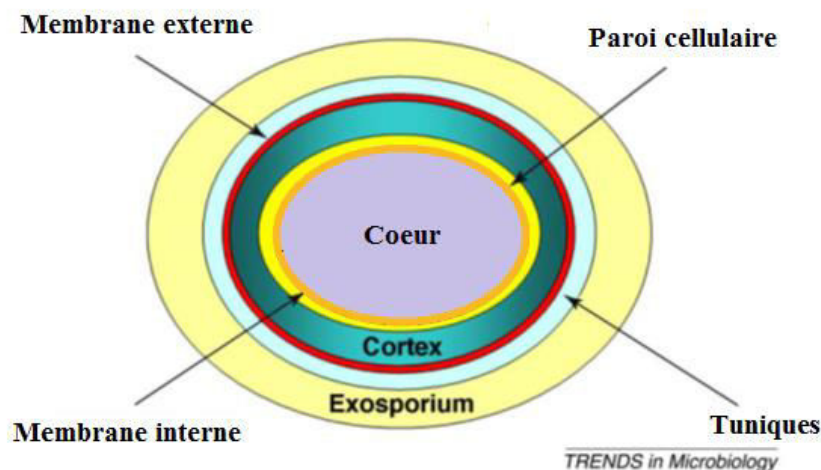
**Figure 9 : Liste minimale des gènes impliqués dans la machinerie de sporulation chez 90 % des bactéries sporulées (Abecasis *et al.*, 2013). L'étude *in silico* a été menée sur environ 70 espèces sporulées ou non et comprend 111 gènes (le régulon auquel ils appartiennent est précisé au-dessus du nom des gènes). La présence d'un gène dans le génome d'une espèce considérée est codifiée par « • ». L'absence d'un gène dans le génome d'une espèce considérée est codifiée par une absence de symbole. Les espèces notées en bleu, rose, vert et rouge correspondent aux espèces bactériennes endosporeulées dont *M. thermoacetica* ATCC 39073, exosporeulées (mécanisme de différenciation cellulaire différent de l'endosporeulation), aux mycobactéries et aux non sporulées, respectivement. La liste à droite correspond aux gènes signatures de sporulation présents chez au moins 90 % des bactéries sporulées et chez moins de 5 % des bactéries non sporulées.**

Cette observation est probablement due au fait que  $\sigma^K$  contrôle l'expression des gènes tardifs, dont des gènes codant des protéines des couches externes des spores en contact direct avec l'environnement. A titre d'exemple, seules 8 protéines de tunique sur les 70 identifiées chez *B. subtilis* sont conservées chez *C. difficile* (Saujet *et al.*, 2013), ces protéines tendant ainsi à être de nature variable car soumises à une sélection selon les conditions environnementales. Cela suggère que les gènes de sporulation codant des protéines des couches externes de la spore ne sont que peu, voire pas identifiés chez la grande majorité des espèces bactériennes sporulées.

#### 4. Propriétés des spores

##### 4.1. Structure et composition protéique de la spore bactérienne

Les caractéristiques structurales des spores diffèrent de celles des cellules végétatives, du fait de la présence de différentes couches successives relativement bien conservées chez toutes les bactéries sporulées (Figure 10).



**Figure 10 : Structure schématique d'une spore bactérienne (Paredes-Sabja *et al.*, 2011).** La spore bactérienne est constituée, de la structure la plus interne vers la plus externe, du cœur, la paroi cellulaire, la membrane interne, le cortex, la membrane externe et les tuniques. La dernière structure représentée sur le schéma et correspondant à l'exosporium n'est pas présente chez toutes les espèces et est notamment absente chez *B. subtilis*. Les tailles des différentes couches ne sont pas à l'échelle.

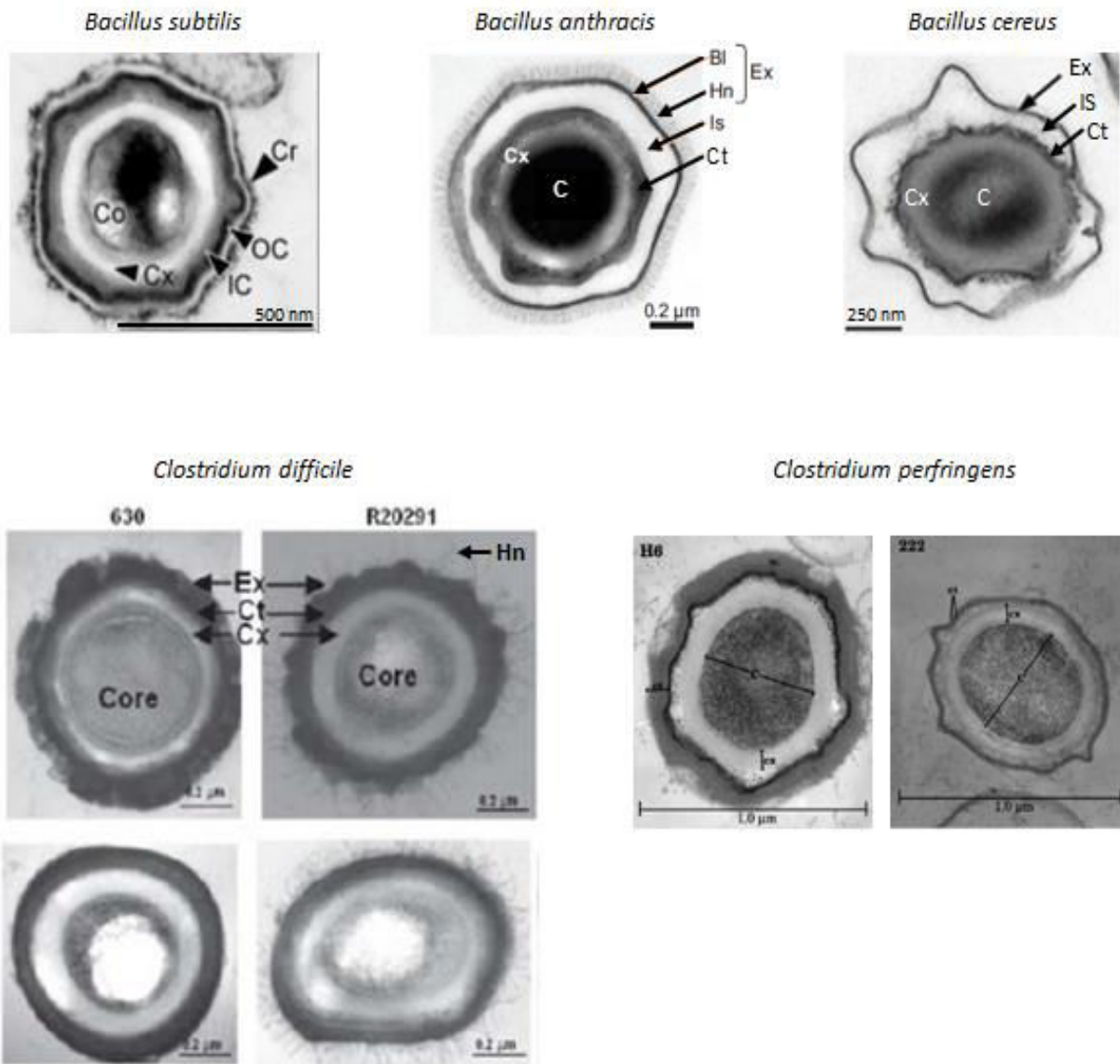
### ✧ L'exosporium

L'exosporium correspond à la structure la plus externe de la spore bactérienne chez certaines espèces dont *B. cereus*, *C. difficile*, *Bacillus anthracis* ou encore *Clostridium sporogenes* (Leggett *et al.*, 2012, Paredes-Sabja *et al.*, 2014, Brunt *et al.*, 2015, Stewart, 2015). Cette structure, principalement étudiée chez *B. anthracis* et *B. cereus*, est définie comme étant lâche ou « balloon-like », de forme irrégulière et constituée d'une couche basale sur laquelle des structures protéiques en filaments « hair-like » sont visibles (Henriques et Moran Jr, 2007, Stewart, 2015).

Cependant, l'apparence de l'exosporium varie selon l'espèce considérée. En effet, cette structure ancrée aux tuniques via des interactions protéine-protéine est physiquement séparée par un espace plus ou moins grand chez *Bacillus*, tandis qu'il semble être plus étroitement lié aux tuniques chez *C. difficile* (Paredes-Sabja *et al.*, 2014, Stewart, 2015). De plus, les filaments protéiques ne sont pas observés chez toutes les espèces (Figure 11).

Chez *B. anthracis*, 25 protéines d'exosporium ou associées à l'exosporium ont été décrites. Parmi celles-ci se trouve la protéine morphogénétique CotE essentielle à la formation des tuniques externes chez *Bacillus* et qui pourrait jouer un rôle indirect dans la formation de l'exosporium (Henriques et Moran Jr, 2007, Bressuire-Isoard *et al.*, 2016). Par ailleurs, la protéine BclA est la principale protéine de l'exosporium, formant à la surface des projections prenant l'aspect de filaments « hair-like » (Figure 11). Cette protéine est conservée et a notamment été identifiée chez *C. difficile* (Abhyankar *et al.*, 2013, Díaz-González *et al.*, 2015).

Cependant, les protéines d'exosporium sont globalement peu conservées (Henriques et Moran Jr, 2007, Stewart, 2015). Récemment, 26 protéines d'exosporium ont été identifiées chez *C. difficile*, dont 19 non caractérisées. Parmi les protéines caractérisées, 2 protéines morphogénétiques de l'exosporium, CdeC et CdeM, ont été mises en évidence (Díaz-González *et al.*, 2015). De plus, une protéine CotE a été identifiée mais sa fonction diffère de la protéine CotE de *Bacillus*. Parmi les protéines non caractérisées identifiées se trouvent également des enzymes pouvant jouer un rôle dans la protection de la spore, telles que des rubrérythrines (Gil *et al.*, 2017).



**Figure 11 : Spores de différentes espèces bactériennes appartenant aux genres *Bacillus* et *Clostridium* observées en microscopie électronique à transmission.** Les spores observées correspondent aux spores des souches de *Bacillus subtilis* PY79, *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus* ATCC 4342, *Clostridium difficile* 630 et R20291 et de *Clostridium perfringens* H6 et 222 (Novak *et al.*, 2003, Henriques et Moran Jr, 2007, Fazzini *et al.*, 2010, McKenney *et al.*, 2010, Paredes-Sabja *et al.*, 2014). Co ou C = cœur ; Cx = cortex ; Ct = tuniques, IC = tuniques internes ; OC = tuniques externes ; IS = inter-espace ; Hn = structures « hair-like » ; Ex = exosporium et Cr = crust.

Les spores de *B. subtilis* ne possèdent pas d'exosporium mais sont en revanche caractérisées par la présence d'une structure spécifique nommée le « crust » qui peut être considéré comme faisant partie des tuniques (McKenney *et al.*, 2010, McKenney et Eichenberger, 2012, Segev *et al.*, 2012, McKenney *et al.*, 2013).

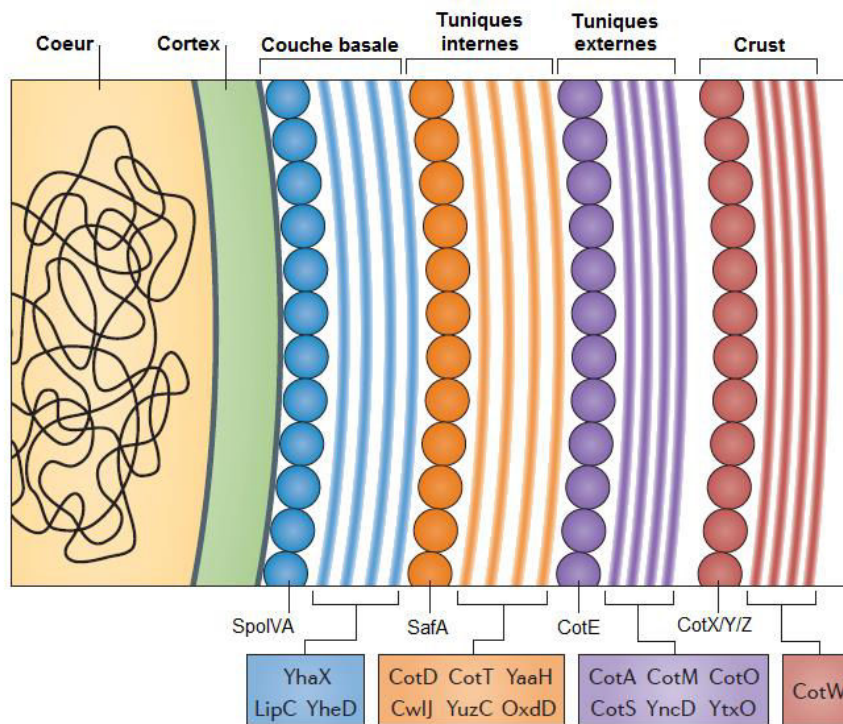
### ✧ Les tuniques

Sous l'exosporium (lorsque cette structure est présente) sont présentes les tuniques, constituées de couches protéiques concentriques dont le nombre dépend de l'espèce considérée. Chez *B. subtilis*, on distingue, du centre vers l'extérieur, la couche basale, les tuniques internes, les tuniques externes et le crust.

Cette structure forme une barrière semi-perméable protégeant le cortex contre la dégradation par les enzymes lytiques. En effet, les tuniques empêchent le passage des molécules de poids moléculaire  $\geq 5$  kDa (Ghosh *et al.*, 2008). Chez *B. subtilis*, les tuniques sont constituées de plus de 70 protéines spécifiques (Henriques et Moran Jr, 2007, Ghosh *et al.*, 2008, Abhyankar *et al.*, 2011, Stewart, 2015). Environ 30 % des protéines des tuniques sont liées de façon covalente et constituent une fraction insoluble résistante aux techniques d'extraction protéique basées sur l'utilisation de traitements alcalins en combinaison ou non avec des agents réducteurs du type dithiothréitol (DTT) ou  $\beta$ -mercaptoéthanol (Ghosh *et al.*, 2008, Abhyankar *et al.*, 2011, Zheng *et al.*, 2016).

Chez *B. subtilis*, 6 protéines morphogénétiques des tuniques ont été décrites (Figure 12) : SpoVID, SpoVM et SpoIVA qui jouent un rôle essentiel dans la formation de la couche basale, SafA, CotE et CotZ qui jouent un rôle crucial dans la formation des tuniques internes, externes et du crust, respectivement (McKenney et Eichenberger, 2012). Par ailleurs, un rôle essentiel dans la morphogénèse des tuniques a été mis en évidence pour les protéines membranaires SpoIIQ et SpoIIIAH (McKenney et Eichenberger, 2012).

Récemment, 351 protéines ont été identifiées à partir des tuniques de *B. subtilis*, dont les protéines morphogénétiques SafA, CotE et CotZ (Abhyankar *et al.*, 2016). Chez *B. cereus*, 100 protéines associées aux structures externes ont été mises en évidence, celles-ci correspondant à la fois aux protéines de tuniques et aux protéines de l'exosporium co-extraites. Ainsi, 42 protéines ont pu être assignées aux tuniques de *B. cereus*, dont les protéines SafA, CotE, CotX et CotY (Abhyankar *et al.*, 2013).



**Figure 12 : Composition protéique des tuniques d'une spore de *Bacillus subtilis* (Adapté de McKenney et Eichenberger, 2012).** La couche basale, les tuniques internes, les tuniques externes et le crust sont représentées en bleu, orange, violet et rouge, respectivement. Les ronds représentent les protéines morphogénétiques de chacune des couches protéiques. Les protéines indiquées dans les boîtes colorées correspondent à des protéines impliquées dans la morphogenèse des couches correspondantes. Les protéines SpoVM et SpoVID sont essentielles pour l'établissement d'une couche protéique continue de tuniques.

Peu de données sont disponibles quant à la composition des tuniques de Clostridies. Cependant, une étude récente a permis d'identifier 54 protéines de tuniques chez *C. difficile*, dont 12 uniquement retrouvées chez cette espèce (Abhyankar *et al.*, 2013).

#### ✧ Les structures internes

Sous les tuniques se trouvent la membrane externe puis le cortex. Le cortex est constitué de peptidoglycane. Contrairement au peptidoglycane présent dans la paroi cellulaire des cellules végétatives, le peptidoglycane du cortex présente des modifications au niveau des chaînes glycoprotéiques d'acide N-acétyl muramique et est caractérisé par moins de réticulations que le peptidoglycane des parois cellulaires (Paredes-Sabja *et al.*, 2011). De ce fait, ce peptidoglycane possède moins de liaisons entre les chaînes peptidiques. La principale fonction du cortex serait d'assurer une contrainte mécanique permettant de maintenir le niveau d'hydratation du cœur de la spore (Novak *et al.*, 2003).



Sous le cortex se situe une couche de peptidoglycane qui deviendra la paroi cellulaire de la future cellule végétative, après germination. Contrairement au peptidoglycane du cortex, sa structure serait identique à celle du peptidoglycane des parois cellulaires observées chez les cellules végétatives (Paredes-Sabja *et al.*, 2011).

Enfin, sous ce peptidoglycane se trouve la membrane interne qui est caractérisée par son imperméabilité. Chez *B. subtilis*, plus de 300 protéines ont été identifiées comme des protéines candidates de la membrane interne (Zheng *et al.*, 2016). La majorité des protéines mises en évidence correspond à des protéines associées à la sporulation et à la germination. La membrane interne possède l'essentiel des composants nécessaires à la germination. En effet, les protéases Gpr et YfmB responsables de la dégradation des SASP, ainsi que la protéase YpeB essentielle à l'assemblage de la protéine lytique du cortex SleB ont été identifiées (Zheng *et al.*, 2016). De même, la membrane interne contient des récepteurs spécifiques aux molécules inductrices de la germination (également appelées germinants). Chez *Bacillus*, les principaux récepteurs aux germinants (GR) sont codés par 3 opérons tricistroniques *gerA*, *gerB* et *gerK*. Les GR nommés GerA, GerB et GerK sont constitués de 3 sous-unités A, B et C. Certaines de ces sous-unités ont été mises en évidence au niveau de la membrane interne (Zheng *et al.*, 2016). Ces récepteurs sont très abondants chez *B. subtilis* : environ 1100 molécules GerA par spore contre environ 700 molécules de GerB et GerK (Leggett *et al.*, 2015). Par ailleurs, 5 des protéines codées par l'opéron *spoVA* (de SpoVAA à SpoVAF) impliquées dans l'entrée de DPA dans le cœur pendant la sporulation, ont été mises en évidence au niveau de la membrane interne (Zheng *et al.*, 2016). Des protéines également impliquées dans la réparation de l'ADN ou encore dans la résistance au stress ont également été retrouvées (Zheng *et al.*, 2016).

La structure la plus centrale de la spore correspond au cœur ou "core" et équivaut au protoplaste. Le cœur contient le matériel génétique ainsi que les ribosomes et une majeure partie des enzymes de la spore. Cette structure est caractérisée par son faible contenu en eau variant de 28 à 57 % chez *Bacillus* contre 73 à 77 % du poids humide du protoplaste de la cellule végétative (Beaman et Gerhardt, 1986, Setlow, 2007, Paredes-Sabja *et al.*, 2011). Il est également caractérisé par un pH d'environ 6,5 ; soit une unité pH de moins que le protoplaste des cellules végétatives (Setlow, 2007). De plus, un composant spécifique de la spore, le DPA, est retrouvé au niveau du cœur et représente 25 % du poids sec de cette structure (Paredes-Sabja *et al.*, 2011, Paredes-Sabja *et al.*, 2014). Le cœur contient également des protéines SASP de type  $\alpha/\beta$ .

## 4.2. Résistance des spores

La forme sporulée confère aux bactéries des propriétés de résistance à différents facteurs auxquels les cellules végétatives sont habituellement sensibles. Les spores sont ainsi plus résistantes aux UV, aux enzymes lytiques, aux hautes températures, à la pression ou encore aux agents antimicrobiens (Gould, 1977, Beaman et Gerhardt, 1986, Setlow *et al.*, 2006, Setlow, 2006, Paredes-Sabja *et al.*, 2008b, Leggett *et al.*, 2012, Setlow, 2014a, Talukdar *et al.*, 2015). Cette résistance est assurée par la structure même de la spore.

### 4.2.1. Résistance aux UV, enzymes lytiques et biocides

La forme sporulée est associée à une résistance accrue aux UV. Chez *B. subtilis*, les spores sont ainsi 10 à 50 fois plus résistantes que les cellules végétatives (Setlow et Setlow, 1993, Setlow, 2014a).

Cette résistance est liée aux SASP de type  $\alpha/\beta$  (Popham *et al.*, 1995b, Setlow *et al.*, 2006, Setlow, 2006, Raju *et al.*, 2007, Paredes-Sabja *et al.*, 2008c, Leggett *et al.*, 2012). En effet, la liaison des SASP à l'ADN sporal modifie sa conformation. De ce fait, les dommages à l'ADN provoqués par une exposition aux UV ne sont pas les mêmes chez les cellules végétatives que chez les spores.

Chez les cellules végétatives, l'exposition aux UV induit notamment la formation de dimères de pyrimidines de type cyclobutane (ou CPD pour « cyclobutane pyrimidine dimer ») ou de photoproduits-(6-4) (64PP) formés entre deux résidus pyrimidines. En revanche, l'exposition des spores aux UV aboutit à la formation d'adduits thyminy-thymine spécifiques appelés photoproduits sporaux (SP). Tout comme les CPD, les SP sont potentiellement toxiques mais les mécanismes de réparation mis en place au cours de l'émergence de la spore les rendent moins délétères (Setlow et Setlow, 1993, Setlow, 2007, Setlow, 2014a).

Les SASP de type  $\alpha/\beta$  jouent également un rôle dans la protection des spores contre les produits génotoxiques pouvant entrer dans la composition de désinfectants du fait de la non-accessibilité de l'ADN à ces molécules (Setlow *et al.*, 2006). La présence de ces SASP est notamment associée à une résistance accrue vis-à-vis de l'acide chlorhydrique et du peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$  (Leggett *et al.*, 2016) mais aussi vis-à-vis de l'acide nitreux et du formaldéhyde à la fois chez *C. perfringens* et *B. subtilis* (Paredes-Sabja *et al.*, 2008b, Paredes-

Sabja *et al.*, 2008c). En revanche, chez *B. subtilis*, la résistance des spores vis-à-vis du peroxyde d'hydrogène est liée à la teneur en eau du cœur : plus le cœur est hydraté, plus les spores sont sensibles (Popham *et al.*, 1995b).

Les tuniques jouent également un rôle de protection contre les enzymes lytiques du cortex mais aussi contre les produits chimiques, dont le peroxyde d'hydrogène chez *B. subtilis* (Riesenman et Nicholson, 2000). Elles sont également associées à la résistance vis-à-vis du peroxyde d'hydrogène, de l'hypochlorite, de l'ozone, du peroxyde d'azote ou encore du dioxyde de chlore (Setlow, 2006, Henriques et Moran Jr, 2007, Ghosh *et al.*, 2008, Leggett *et al.*, 2015, Talukdar *et al.*, 2015, Leggett *et al.*, 2016).

Les mécanismes sous-jacents expliquant cette résistance ne sont pas connus. L'une des hypothèses avancées consisterait en l'existence d'une action détoxifiante assurée par des enzymes potentiellement présentes dans les tuniques. Cette action permettrait de rendre le composé inactif avant d'atteindre l'ADN sporal (Setlow, 2014a). Cependant, seule une protéine de tuniques possédant une activité directe de détoxification a été mise en évidence. Il s'agit de la CotA laccase dirigée contre le peroxyde d'hydrogène et identifiée chez *B. subtilis* (Henriques et Moran Jr, 2007, Leggett *et al.*, 2016).

#### 4.2.2. Résistance thermique

Les spores bactériennes sont caractérisées par une résistance accrue à la chaleur pouvant être jusqu'à  $10^5$  fois supérieure à celle des cellules végétatives au sein d'une même espèce (Gould, 1977). La résistance thermique se décompose en deux types : la résistance à la chaleur humide (en milieu liquide) et à la chaleur sèche.

La résistance à la chaleur humide est principalement due à la déshydratation du protoplaste de la spore qui est étroitement liée à la minéralisation du cœur et au contenu en DPA. En effet, plus la quantité en minéraux et DPA est importante, plus la déshydratation du cœur est grande et la résistance accrue du fait de la stabilisation des molécules et structures (Beaman et Gerhardt, 1986, Setlow *et al.*, 2006, Setlow, 2006).

Chez *B. subtilis*, l'absence de DPA induit notamment une perte de résistance à la chaleur humide (Setlow *et al.*, 2006). Par ailleurs, l'absence des protéines SpmA et SpmB (codées par l'opéron *dacB-spmA-spmB*), impliquées dans l'hydratation du cœur, résulte en une plus forte

hydratation qui se traduit par une plus grande sensibilité à la chaleur humide (Popham *et al.*, 1995b, Paredes-Sabja *et al.*, 2008c).

La structure du cortex serait également impliquée dans la résistance à la chaleur humide chez les spores de *B. subtilis* et *C. perfringens* (Paredes-Sabja *et al.*, 2008c). En effet, chez *B. subtilis*, l'absence de protéine DacB impliquée dans le degré de réticulation du peptidoglycane du cortex aboutit à la production de spores dont le contenu en eau est normal mais dont la résistance à la chaleur humide est moindre (Paredes-Sabja *et al.*, 2008c).

Dans le cas de la chaleur sèche, la résistance des spores de *B. subtilis* est principalement assurée par les SASP de type  $\alpha/\beta$  qui saturent l'ADN et empêchent les dommages au génome pouvant être causés par la chaleur (Popham *et al.*, 1995b, Setlow *et al.*, 2006). Cependant, il semblerait que ce rôle soit plus limité chez *C. perfringens* (Raju *et al.*, 2007). Les SASP de type  $\alpha/\beta$  sont également impliqués dans la résistance des spores à la chaleur humide. En effet, une baisse de la quantité de ces molécules dans les spores de *B. subtilis* et *C. perfringens* est associée à une perte de thermorésistance (Popham *et al.*, 1995b, Raju *et al.*, 2007, Setlow, 2007, Paredes-Sabja *et al.*, 2008c).

La résistance thermique des spores varie en fonction des conditions de sporulation. En effet, la thermorésistance des spores est corrélée à la gamme de température de croissance des microorganismes : les spores de bactéries mésophiles sont moins résistantes que celles des bactéries thermophiles (André *et al.*, 2013). De même, les spores de bactéries hautement thermophiles sont plus résistantes à la chaleur que celles produites par les bactéries thermophiles.

Enfin, le milieu de sporulation a également une influence sur la résistance des spores. Cette influence dépend à la fois de la composition du milieu ainsi que de son état, à savoir solide ou liquide (Rose *et al.*, 2007, Stecchini *et al.*, 2009, Abhyankar *et al.*, 2016). Ainsi, il a notamment été montré que les spores de *B. subtilis* produites sur milieu liquide sont à la fois moins résistantes à la chaleur que des spores produites sur ce même milieu solide (Rose *et al.*, 2007). De même, la composition en nutriments du milieu de sporulation influe sur les propriétés de thermorésistance des spores de *B. cereus* (Stecchini *et al.*, 2009). Cette même tendance a été rapportée pour *M. thermoacetica* dont les spores produites en conditions chimiolithoautotrophes sont plus résistantes à la chaleur que celles produites en conditions chimioorganohétérotrophes (Byrer *et al.*, 2000).

### 4.3. Propriétés de germination des spores

#### ✧ L'activation

La transition spore/cellule végétative implique un processus composé de 3 étapes : activation, germination et émergence d'une nouvelle cellule. L'activation consiste en une étape réversible pouvant être initiée par un traitement thermique ou chimique sub-létal (Paredes-Sabja *et al.*, 2008a, Setlow, 2014b, Moir et Cooper, 2015). Ainsi, un traitement à 121°C pendant 15 minutes peut aboutir à une activation plutôt qu'à une destruction des spores de *M. thermoacetica* (Byrer *et al.*, 2000). De même, un changement de pH ou encore l'exposition à des produits chimiques peuvent également déclencher l'activation des spores (Setlow, 2006).

#### ✧ La germination

La germination est un mécanisme initié en réponse à divers stimuli environnementaux. Tout comme la sporulation, la germination est un processus étudié uniquement chez certaines espèces du genre *Bacillus* et dans une moindre mesure chez *Clostridium*. Une liste non exhaustive des principaux inducteurs de la germination identifiés chez diverses espèces bactériennes est renseignée dans le Tableau 5.

La germination peut être induite par des germinants nutritifs via la fixation de ces petites molécules à des GR situés dans la membrane interne de la spore (Moir et Cooper, 2015). Ces germinants correspondent à de petites molécules spécifiques de l'espèce considérée. Dans certains cas, la présence de co-germinants peut être requise pour que la germination ait lieu. Ces co-germinants sont décrits comme des composés qui, seuls, ne peuvent pas induire la germination mais dont la présence peut stimuler l'activité d'un autre co-germinant ou d'un germinant (Paredes-Sabja *et al.*, 2011).

D'après le Tableau 5, on constate qu'un même germinant peut agir sur des spores de différentes espèces. A titre d'exemple, certaines spores listées ici sont capables d'engager un processus de germination en milieu riche en réponse au mélange AGFK constitué de glucose, fructose, K<sup>+</sup> et d'un acide aminé pouvant être de la L-alanine ou de la L-asparagine (Zhou *et al.*, 2013, Georget *et al.*, 2015, Luu *et al.*, 2015).

**Tableau 5 : Inducteurs de la germination des spores identifiés chez différentes espèces bactériennes sporulées**

Microorganisme	Récepteur impliqués*	Germinant nutritif	Co-germinant	Germinant non nutritif	Références
<i>B. subtilis</i>	Inconnu Implication d'une kinase PrKC			Fragments de peptidoglycane de cellules de la même espèce ou d'une espèce proche	Paredes-Sabja <i>et al.</i> , 2011
	GerA	L-alanine			
	GerA, GerB et GerK			Hautes pressions (100-400 MPa)	Paredes-Sabja <i>et al.</i> , 2011 Paidhungat <i>et al.</i> , 2002
		L-asparagine L-valine			Luu <i>et al.</i> , 2015
	GerB et GerK	AGFK			Paredes-Sabja <i>et al.</i> , 2011 Luu <i>et al.</i> , 2015
<i>B. anthracis</i>	GerK et GerL	Inosine	Proline ou méthionine (GerK) Serine ou valine (GerL)		Paredes-Sabja <i>et al.</i> , 2011
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>		AGFK			
		L-valine			Zhou <i>et al.</i> , 2013
				Dodécylamine  Ca-DPA	Georget <i>et al.</i> , 2015

<i>C. difficile</i>	CspC (récepteur aux sels biliaires)	Taurocholate	Glycine	Howerton <i>et al.</i> , 2011 Paredes-Sabja <i>et al.</i> , 2011 Paredes-Sabja <i>et al.</i> , 2014	
		Taurocholate	L-alanine		
		Taurocholate	L-pénylalanine		
		Taurocholate	L-arginine	Howerton <i>et al.</i> , 2011	
		L-asparagine + KCl			
		KCl			
		Dodécylamine	Paredes-Sabja <i>et al.</i> , 2008a		
		Ca-DPA			
<i>C. perfringens</i>	GerKA-GerKC	L-asparagine et KCl		Paredes-Sabja <i>et al.</i> , 2011	
	GerKA-GerKC GerO-GerQ	NaPi		Paredes-Sabja <i>et al.</i> , 2009 Paredes-Sabja <i>et al.</i> , 2011	
		L-cystéine L-glutamine L-asparagine L-thréonine		Udompijtkul <i>et al.</i> , 2014	
	GerKA-GerKC	Ca-DPA		Paredes-Sabja <i>et al.</i> , 2011	
<i>C. botulinum</i>		L-alanine	L-lactate	Plowman and Peck, 2002	
		L-sérine	L-lactate	Alberto <i>et al.</i> , 2003	
		L-valine	L-lactate	Brunt <i>et al.</i> , 2014	
		Glycine	L-lactate	Alberto <i>et al.</i> , 2003	
		L-phénylalanine L-cystéine	L-lactate L-lactate	Brunt <i>et al.</i> , 2014	

NaPi = tampon phosphate de sodium

AGFK = D-glucose + D-fructose + ions K<sup>+</sup> + acide aminé (L-alanine ou L-asparagine)

\*Le récepteur n'est pas indiqué quand il n'est pas précisé dans l'étude correspondante

La germination peut également être initiée par la présence de phosphate inorganique associé avec des ions  $K^+$  ou par l'action d'un acide aminé tel que la L-alanine, la L-sérine, la L-asparagine ou encore la glycine (Plowman et Peck, 2002, Alberto *et al.*, 2003, Paredes-Sabja *et al.*, 2009, Howerton *et al.*, 2011, Paredes-Sabja *et al.*, 2011, Brunt *et al.*, 2014, Udompijitkul *et al.*, 2014, Luu *et al.*, 2015). Parmi les germinants non nutritifs figurent le surfactant cationique dodécylamine ainsi que le Ca-DPA qui déclenchent la sporulation chez les Bacilli et Clostridies (Paredes-Sabja *et al.*, 2008a, Zhou *et al.*, 2013, Brunt *et al.*, 2014, Georget *et al.*, 2015, Moir et Cooper, 2015). Des facteurs physiques ou mécaniques déclenchent également la germination, tels que les hautes pressions (Paidhungat *et al.*, 2002, Paredes-Sabja *et al.*, 2011, Luu *et al.*, 2015, Moir et Cooper, 2015). Une étude menée sur *B. subtilis* a montré que le traitement de spores à 100 MPa ou 500 MPa permet la germination d'environ 30 % des spores directement après le traitement en absence de nutriments. Dans le cas du traitement à 500 MPa, le mécanisme de germination est indépendant de la présence de GR et serait initié par l'activation d'une ou plusieurs enzymes lytiques du cortex des spores (Paidhungat *et al.*, 2002). En revanche, dans le cas d'un traitement à 100 MPa, la présence des GR est requise et la germination pourrait être due à une stimulation de ces récepteurs. Chez *B. subtilis*, les hautes pressions hydrostatiques (150 MPa) agiraient ainsi via les récepteurs GerA, GerB et GerK (Luu *et al.*, 2015).

Par ailleurs, une autre voie inductrice de la germination a été découverte chez *B. subtilis*. Cette voie est indépendante des GR et est déclenchée par des mucopeptides provenant de fragments de peptidoglycane de cellules en croissance de la même espèce ou d'une espèce proche. Ces mucopeptides sont reconnus par une protéine kinase PrkC localisée au niveau de la membrane interne des spores qui, par phosphorylation de résidus sérine/thréonine, va enclencher le mécanisme de germination. Des protéines orthologues de PrkC ont été identifiées chez certaines Clostridies mais leur rôle n'a pas encore été élucidé (Paredes-Sabja *et al.*, 2011, Olguin-Araneda *et al.*, 2015).

La niche écologique occupée par les microorganismes sporulés joue également un rôle dans la réponse aux germinants. En effet, les spores de *C. difficile* sont les seules ayant été identifiées à ce jour comme nécessitant la présence des sels biliaires cholates et taurocholates et de L-glycine pour germer (Olguin-Araneda *et al.*, 2015). Cette spécificité est due au fait que les spores de *C. difficile* colonisent le tractus intestinal.

Une fois la germination déclenchée, des cations monovalents tels que  $K^+$ ,  $Na^+$  et  $H^+$  sont relargués ainsi que les complexes Ca-DPA présent au niveau du cœur de la spore (Setlow,

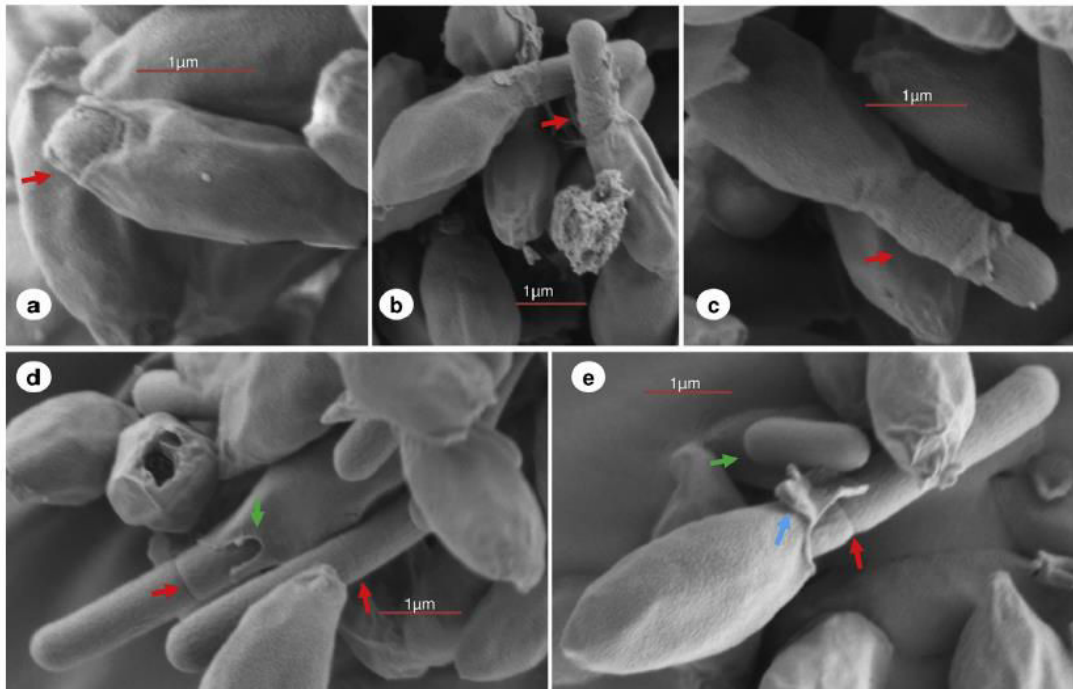


2006, Paredes-Sabja *et al.*, 2011, Moir et Cooper, 2015, Xiao *et al.*, 2015). La sortie de Ca-DPA a lieu via des canaux constitués en partie de la protéine SpoVA et localisés au niveau de la membrane interne des spores (Paredes-Sabja *et al.*, 2014, Moir et Cooper, 2015). Cette sortie massive d'ions et de Ca-DPA a pour conséquence d'activer des enzymes lytiques du cortex, nommées CLE pour « cortex lytic enzymes ». Les enzymes SleB et CwlJ ont été identifiées chez *B. subtilis* (Moir et Cooper, 2015). L'enzyme CwlJ est activée directement par les complexes Ca-DPA tandis que SleB pourrait être activée par une déformation partielle du cortex (Paredes-Sabja *et al.*, 2014). Ces CLE sont conservées et des homologues ont notamment été identifiés chez *B. anthracis*, *Bacillus megaterium* ou encore *C. sporogenes* (Paredes-Sabja *et al.*, 2011, Moir et Cooper, 2015). D'autres CLE nommées SleC et SleM ont été identifiées chez *C. perfringens* et *C. difficile* ainsi que 2 protéines « protease-like » CspB et CspC (Paredes-Sabja *et al.*, 2011, Paredes-Sabja *et al.*, 2014, Moir et Cooper, 2015, Olguin-Araneda *et al.*, 2015). L'hydrolyse du cortex permet une entrée d'eau et une expansion du cœur (Moir et Cooper, 2015). La composition en eau dans le cœur est alors équivalente à celle d'une cellule en croissance et les spores n'apparaissent plus réfringentes en microscopie à contraste de phase (Paredes-Sabja *et al.*, 2011, Moir et Cooper, 2015).

La germination est irréversible et s'accompagne de la perte des caractéristiques de résistance des spores ainsi que du rétablissement de la mobilité des protéines et de l'activité enzymatique (Moir et Cooper, 2015). Les SASP se dissocient de l'ADN et sont dégradées par la protéase Gpr de façon à ce que celui-ci soit de nouveau accessible pour permettre la transcription mais également la réplication de l'ADN (Setlow, 2007, Leggett *et al.*, 2012, Moir et Cooper, 2015). Les produits issus de la dégradation de ces SASP sont ensuite digérés par des peptidases qui libèrent des acides aminés utilisés pour le métabolisme et la synthèse protéique de la nouvelle cellule végétative (Setlow, 2007, Dworkin, 2014).

#### ✧ L'émergence

La dernière étape correspond à l'émergence d'une nouvelle cellule, nommée « outgrowth » et précède la reprise de croissance active (Figure 13).



**Figure 13 : Observations en microscopie électronique à balayage (MEB) de spores de *Clostridium sporogenes* pendant l'émergence et la reprise de croissance des cellules (d'après Brunt *et al.*, 2015).** Pendant la germination des spores de *C. sporogenes*, un creux se forme dans la tunique sporale. Ce creux est toujours orienté en face d'une ouverture présente dans l'exosporium et nommée « sporiduct ». Lors de l'émergence, la cellule sort par le sporiduct et commence à croître et se diviser. a) émergence de la cellule par le sporiduct, b) émergence et reprise de croissance de la cellule, c) élongation de la cellule accompagnée de la distension du sporiduct, d) cellules émergentes en division, e) élongation de la cellule en division qui est encore entourée de l'ancien exosporium de la spore. Les flèches vertes en a) et d) montrent respectivement la sortie de la cellule par le sporiduct qui est détendu et une cellule libre. Les flèches rouges en a), b) et c) montrent la cellule émergeant par le sporiduct et des cellules émergentes en division en d) et e).

Les étapes de l'émergence ont récemment été étudiées chez *C. sporogenes* (Figure 13) : les spores de cette espèce sont caractérisées par la présence d'une ouverture dans l'exosporium au niveau de l'un des pôles de la spore, ouverture nommée sporiduct. Au cours de la germination, il a été montré qu'un creux se formait dans les tuniques systématiquement face au sporiduct. La nouvelle cellule émerge alors en passant par ces ouvertures et poursuit sa croissance (Brunt *et al.*, 2015).

#### 4.4. Impact de la température sur les propriétés des spores

Les conditions environnementales, notamment la température de sporulation, jouent un rôle dans les propriétés de résistance des spores (Tableau 6). En effet, les spores de *B. cereus*

produites à température optimale sont plus résistantes aux produits de décontamination tels que le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, le NaOH ou encore le glutaraldéhyde en comparaison avec des spores produites à 10 °C (Planchon *et al.*, 2011). La même tendance a été observée concernant des spores de *B. subtilis* vis-à-vis du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et du glutaraldéhyde ainsi que pour des spores de *B. anthracis* vis-à-vis du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, HCl et NaOH (Melly *et al.*, 2002, Baweja *et al.*, 2008).

La température de sporulation influe également sur la résistance des spores aux UV-C. Cependant, les observations ne vont pas toutes dans le même sens : dans les conditions testées de certaines études, la température de sporulation ne joue pas de rôle dans la résistance des spores de *B. subtilis* et *B. weihenstephanensis* vis-à-vis des UV-C (Melly *et al.*, 2002, Planchon *et al.*, 2011). En revanche, la caractérisation de spores de *B. cereus* produites à 2 températures a permis de mettre en évidence que les spores produites à 37 °C sont plus sensibles aux UV-C que les spores produites à 20 °C (Bressuire-Isoard *et al.*, 2016). Contrairement à ce qui est constaté pour les spores de *B. cereus*, les spores de *B. anthracis* sont plus résistantes aux UV-C lorsqu'elles sont produites à haute température (Baweja *et al.*, 2008).

De nombreux travaux menés sur diverses espèces bactériennes ont montré que la température de sporulation joue également un rôle dans la thermorésistance des spores (Tableau 6). Il est ainsi généralement admis que plus la température de sporulation est élevée, plus la résistance à la chaleur est importante pour une souche donnée (Beaman et Gerhardt, 1986, Byrer *et al.*, 2000).

Ainsi, les spores de bactéries mésophiles telles que *B. subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *C. perfringens* ou encore de bactéries psychrotrophes telles que *B. weihenstephanensis* sont plus thermorésistantes lorsque la température de sporulation augmente (Melly *et al.*, 2002, Paredes-Sabja *et al.*, 2008c, Planchon *et al.*, 2011, Baril *et al.*, 2012a, Baril *et al.*, 2012b). Le même résultat a été obtenu pour des spores de bactéries thermophiles et notamment pour les spores de la bactérie d'altération *G. stearothermophilus* (Mtimet *et al.*, 2015). De même, les spores de *M. thermoacetica* sont plus thermorésistantes quand la température de sporulation est élevée (Byrer *et al.*, 2000).

**Tableau 6 : Effet de la température de sporulation sur la thermorésistance des spores de diverses espèces bactériennes.** Les gammes de température de croissance renseignées dans le tableau ont été déterminées au cours des études mentionnées. La thermorésistance est exprimée par le paramètre  $\delta$  qui correspond au temps de traitement nécessaire pour inactiver le premier log de la population de spores. Lorsque le paramètre  $\delta$  n'est pas disponible dans l'étude considérée, le paramètre  $D$  est précisé, c'est-à-dire le temps de réduction décimale correspondant au temps de traitement nécessaire pour détruire un log de la population de spores lorsque la destruction est linéaire.

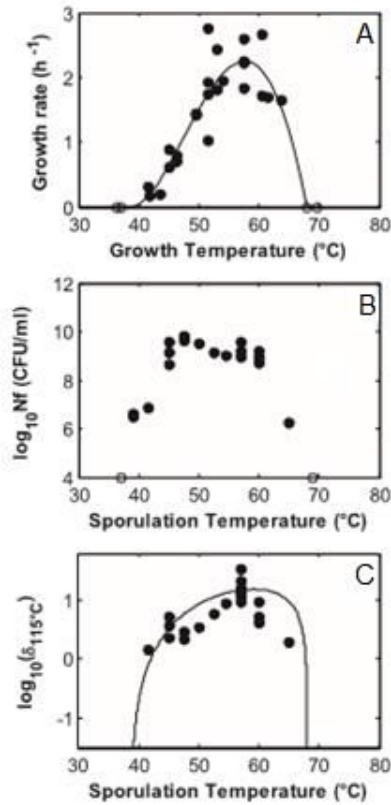
Souche	T° de sporulation	Temps de première réduction décimale $\delta$ en min	Références
<b><i>B. weihenstephanensis</i> KBAB4</b>	10 °C	$\delta_{85\text{ °C}} = 10.2$	Planchon <i>et al.</i> , 2011
	30 °C	$\delta_{85\text{ °C}} = 20.5$	
<b><i>B. weihenstephanensis</i> KBAB4</b>	5 °C	Spores obtenues 1 fois sur 3	Baril <i>et al.</i> , 2012a
	10 °C	$\delta_{90\text{ °C}} = 1.98$	
	30 °C	$\delta_{90\text{ °C}} = 6$	
	35 °C	$\delta_{90\text{ °C}} = 2.88$	
	40 °C	Pas de spores	
<b><i>B. licheniformis</i> AD978</b>	20 °C	$\delta_{100\text{ °C}} = 0.59$	Baril <i>et al.</i> , 2012b
	45 °C	$\delta_{100\text{ °C}} = 3,78$	
	50 °C	$\delta_{100\text{ °C}} = 1,61$	
<b><i>C. perfringens</i> SM101</b>	26 °C	$D_{100\text{ °C}} = 15$	Paredes-Sabja <i>et al.</i> , 2008b
	32 °C	$D_{100\text{ °C}} = 26$	
	37 °C	$D_{100\text{ °C}} = 49$	
	42 °C	$D_{100\text{ °C}} = 54$	
<b><i>Gbs</i> ATCC 12980</b>	35 °C	Pas de spores	Mtimet <i>et al.</i> , 2015
	45 °C	$\delta_{115\text{ °C}} = 1,93$	
	57 °C	$\delta_{115\text{ °C}} = 12,27$	
	65 °C	$\delta_{115\text{ °C}} = 3,74$	
	72 °C	Pas de spores	
<b><i>M. thermoacetica</i> JW/DB-2</b>	25 °C	$D_{121\text{ °C}} = 43$	Byrer <i>et al.</i> , 2000
	60 °C	$D_{121\text{ °C}} = 83$	
<b><i>M. thermoacetica</i> JW/DB-4</b>	25 °C	$D_{121\text{ °C}} = 23$	
	60 °C	$D_{121\text{ °C}} = 111$	

Ce phénomène serait dû à une déshydratation plus importante du cœur des spores formées à haute température (Leggett *et al.*, 2012). Selon certains auteurs, le cœur des spores plus thermorésistantes serait plus déshydraté donc plus minéralisé et contiendrait plus de DPA que des spores moins thermorésistantes. Cette hypothèse a été vérifiée dans certains cas (Baweja *et al.*, 2008, Planchon *et al.*, 2011) même s'il n'y a pas toujours de corrélation entre contenu en DPA et thermorésistance (Hayrapetyan *et al.*, 2016)

Cependant, les observations concernant l'impact de la température de sporulation sur la thermorésistance des spores sont à nuancer. En effet, les études menées sur la sporulation de ces espèces ont montré que les capacités de sporulation sont optimales lorsqu'on se situe dans les gammes de température de croissance (Figure 14). Ainsi, plus la température de sporulation est proche des extrêmes, moins la densité en spores obtenues est importante et moins les spores sont thermorésistantes. En outre, les capacités de germination peuvent également être impactées par la température de sporulation, comme décrit chez *B. cereus* ou encore *B. anthracis* (Baweja *et al.*, 2008, Garcia *et al.*, 2010, Planchon *et al.*, 2011).

Les propriétés de résistance et de germination des spores étant associées à certains de leurs constituants comme décrit au paragraphe 4.2., des équipes se sont intéressées à l'impact de la température de sporulation sur la composition des spores. Ainsi, il ressort que la température de sporulation affecte la composition en acides gras des spores (Melly *et al.*, 2002, Planchon *et al.*, 2011). De même, les spores de *B. subtilis* produites à haute température sont caractérisées par une abondance moindre de la protéine structurale CotA dans les tuniques (Melly *et al.*, 2002).

De même, la protéine morphogénétique CotE, jouant un rôle clé dans l'assemblage des tuniques et de l'exosporium chez *B. cereus*, est plus abondante dans les tuniques des spores produites à 20 °C par rapport aux spores produites à 37 °C (Bressuire-Isoard *et al.*, 2016). Cette plus grande quantité de protéine détectée peut s'expliquer par à une plus forte quantité de la protéine et/ou à une meilleure extractabilité dans les spores produites à basse température. Dans le cas où la protéine serait plus facile à extraire, cela impliquerait que le degré de liaison ou « cross-linking » entre les protéines est moindre et donc que la structure serait différente.



**Figure 14: Effet de la température sur la croissance, la sporulation et la thermorésistance des spores de *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 12980 (Mtimet *et al.*, 2015).** Les figures A et B représentent l'effet de la température sur le taux spécifique maximal de croissance  $\mu_{max}$  et sur la quantité de spores obtenues, respectivement. La figure C représente l'effet de la température de sporulation sur la thermorésistance des spores obtenues.

Ainsi, la température de sporulation influence sur les propriétés de résistance et de germination des spores bactériennes de différentes espèces, ces propriétés étant en lien avec la structure et/ou la composition protéique des spores.



***Chapitre 2 : Effet de la température sur la sporulation et les propriétés de résistance des spores de *Moorella thermoacetica****





## 1. Problématique

Les spores de *M. thermoacetica* sont considérées comme faisant partie des spores les plus thermorésistantes isolées à ce jour en industrie agroalimentaire. En effet, le temps de réduction décimale de ces spores à 121 °C ou  $D_{121\text{ °C}}$ , c'est-à-dire le temps nécessaire pour observer la destruction de 90 % de la population de spores à 121 °C, peut atteindre 111 min (Matsuda *et al.*, 1982, Byrer *et al.*, 2000, André *et al.*, 2013). A titre de comparaison, le  $D_{95\text{ °C}}$  de spores de *B. cereus* varie de 5 à 85 minutes (Heyndrickx, 2011). Du fait de leur très forte thermorésistance, les spores de *M. thermoacetica* peuvent survivre aux traitements thermiques appliqués aux aliments en conserves, engendrant de lourdes pertes économiques aux industriels de la filière.

Des travaux récents menés au CTCPA rapportent que les températures atteintes en zone chaude d'une conserverie de légumes, s'étendant du blancheur à la mise en conserve, sont très variables et comprises entre 41 °C et 69 °C (Durand *et al.*, 2015). Ces températures sont compatibles avec la croissance de *M. thermoacetica* (de 45 °C à 68 °C) et potentiellement avec la sporulation de cette espèce.

L'impact de la température sur la sporulation et sur les propriétés de résistance des spores de *M. thermoacetica* a été peu étudié, alors que de nombreuses études ont montré que la température de sporulation joue un rôle important dans la résistance des spores de bactéries thermophiles telles que *G. stearothermophilus*, de bactéries mésophiles comme *B. subtilis* et de bactéries psychrotrophes telles que certaines souches du genre *B. cereus* (Melly *et al.*, 2002, Planchon *et al.*, 2011, Baril *et al.*, 2012b, Mtimet *et al.*, 2015).

Comprendre l'impact de la température sur les propriétés de résistance des spores de *M. thermoacetica* permettrait de définir quelles conditions permettent de limiter la formation de spores résistantes et ainsi de mieux maîtriser leur présence sur les lignes de production.

## 2. Objectif et stratégie

L'objectif de cette étude est de déterminer si la température de sporulation influe i) sur la capacité de sporulation et ii) sur les propriétés de résistance des spores de différentes souches de *M. thermoacetica* présentant des caractéristiques physiologiques variées.

Pour cela, 8 souches de *M. thermoacetica* provenant de collections ou isolées de conserves non stables à 55 °C ont été sélectionnées pour cette étude.

La sporulation des souches a été réalisée à températures optimale (i.e. 55 °C) et limites basse et haute de croissance (45 °C et 65 °C, respectivement). Nous avons déterminé la résistance des spores obtenues vis-à-vis de la chaleur humide à 125 °C ou 130 °C, et analysé plus en détail l'impact de la température de sporulation sur les spores de la souche *M. thermoacetica* ATCC 39073 (dont le génome est séquencé), en déterminant leur résistance vis-à-vis des UV-C et de cinq biocides (hypochlorite de sodium, acide peracétique, peroxyde d'hydrogène, glutaraldéhyde et hydroxyde de sodium).

La résistance des spores produites a été évaluée par détermination du paramètre  $\delta$  ou *FI* correspondant respectivement au temps ou à la dose d'UV-C nécessaires pour détruire le premier log de la population de spores. Afin de comparer les données de résistance, nous avons choisi de déterminer le temps de première réduction décimale  $\delta$  plutôt que le temps de réduction décimale *D*, le paramètre  $\delta$  prenant en compte l'allure non linéaire des courbes de destruction.

### 3. Principaux résultats

Après 3 à 6 semaines d'incubation aux températures de sporulation étudiées, des spores thermorésistantes ont été produites par les 8 souches à la température optimale de 55 °C, alors que 7 souches sur 8 ont sporulé à 45 °C et 6 souches sur 8 seulement à 65 °C. Par ailleurs, la concentration en spores thermorésistantes produites à 55 °C varie de 4,8 à 8,1 log CFU/mL, de 3 à 7,5 log CFU/ml à 45 °C et de 3,4 à 5 CFU/mL à 65 °C. Ainsi, il apparaît que la capacité de sporulation est variable entre souches de *M. thermoacetica* en fonction des températures et qu'elle est meilleure lorsque la sporulation a lieu à température optimale.

Les spores formées à 45 °C sont caractérisées par un  $\delta_{125\text{ °C}}$  compris entre < 0,4 min à 3,4 min tandis que le  $\delta_{125\text{ °C}}$  des spores produites à 55 °C varie entre 3,4 min et 10,8 min. En revanche, les spores produites à 65 °C sont caractérisées par une thermorésistance semblable à celle des spores produites à 55 °C, avec un  $\delta_{125\text{ °C}}$  compris entre 1,3 min et 9,2 min. Nous avons montré que la température de sporulation influe significativement sur la résistance thermique des spores produites, en particulier à basse température.

Par ailleurs, les spores de la souche ATCC 39073 produites à 55 °C sont plus thermorésistantes que les spores produites à 45 °C et plus résistantes à l'acide peracétique. En revanche, la résistance de ces spores vis-à-vis des rayonnements UV-C n'apparaît pas impactée par la température de sporulation dans les conditions testées.

Cette étude a donc montré que *M. thermoacetica* peut sporuler aux températures limites basse et haute pouvant être rencontrées sur une ligne de fabrication de produits appertisés. Ces travaux montrent également que la thermorésistance des spores est variable selon la souche considérée. Cependant, les spores produites à 55 °C et 65 °C sont, dans la très grande majorité des cas, plus thermorésistantes que celles produites à 45 °C. De plus, les spores de la souche ATCC 39073 produites à 55 °C sont également plus chimiorésistantes que celles produites à 45 °C.

Ainsi, la maîtrise de la température en conserverie pourrait permettre de limiter la formation de spores hautement thermorésistantes par *M. thermoacetica*.



#### **4. Article 1: Temperature impacts the sporulation capacities and spore resistance of *Moorella thermoacetica***

Tiffany Malleck, Guillaume Daufouy, Stéphane André, Véronique Broussolle\* and Stella Planchon\*

<sup>1</sup> Unité d'Expertise dans la Maîtrise du Risque Industriel en Thermorésistants Sporulés (EMaiRIT'S), Centre Technique pour la Conservation des Produits Agricoles (CTCPA), 449 Avenue Clément Ader, 84911 Avignon, France

<sup>2</sup> UMR408 SQPOV Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale, INRA, Université d'Avignon et des Pays du Vaucluse, 84000 Avignon, France

\*Corresponding authors. Address correspondence to:

Stella Planchon, email: [splanchon@ctcpa.org](mailto:splanchon@ctcpa.org), Phone: +33(0)490843246

Véronique Broussolle, email: [veronique.broussolle@inra.fr](mailto:veronique.broussolle@inra.fr), Phone: +33(0)432722518

Authors' emails:

[tmalleck@ctcpa.org](mailto:tmalleck@ctcpa.org); [gdaufouy@ctcpa.org](mailto:gdaufouy@ctcpa.org); [sandre@ctcpa.org](mailto:sandre@ctcpa.org); [veronique.broussolle@inra.fr](mailto:veronique.broussolle@inra.fr);  
[splanchon@ctcpa.org](mailto:splanchon@ctcpa.org)

***Manuscript published in Food Microbiology***

## ABSTRACT

Temperatures encountered in cannery allow growth of thermophilic spore-forming bacteria, including the strictly anaerobe *Moorella thermoacetica*, which grows optimally from 55°C to 65°C and is the main cause of spoilage of low-acid canned foods (LACFs) at high temperature. Resistance to wet-heat, biocides and UV-C of spores formed at different temperatures was assessed either for a selection of *M. thermoacetica* strains or for the strain *M. thermoacetica* ATCC 39073. Spores formed at 45°C were significantly more sensitive to wet-heat than spores produced at 55°C, while spores produced at 65°C were as heat-resistant as spores produced at 55°C. Spores of *M. thermoacetica* ATCC 39073 produced at 45°C were significantly less resistant to peracetic acid than spores formed at 55 °C, while no difference in sensitivity to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> or to UV-C treatment was observed whatever the sporulation temperature. However, both types of treatment enabled at least a 3.3 log CFU/mL reduction of *M. thermoacetica* ATCC 39073 spores. *M. thermoacetica* spores thus showed higher resistance properties when sporulation temperature was close to optimal growth temperature. These findings suggest food spoilage due to *M. thermoacetica* species could be controllable by holding temperatures below optimal growth temperature from the blanching step to the can filling step.

**Keywords:** Wet-heat, biocides, UV-C, thermophile, spoilage

## 1. Introduction

Bacterial spores are widely found in soils, which are considered their main habitat (Carlin, 2011, Heyndrickx, 2011). Spores contaminate raw food materials and are a major source of contamination in food processing plants where they can persist (Sevenier *et al.*, 2012, Durand *et al.*, 2015). Spores are characterized by high resistance to extreme conditions, such as high temperature, biocides or UV-C light (Beaman et Gerhardt, 1986). These properties may enable spores, particularly Highly Heat-Resistant Spores (HHRS), to survive the heat treatments applied to stabilize low-acid canned food products (LACFs). Sterilization selects HHRS, so any spores surviving this process might then germinate under favorable conditions, leading to bacterial development and then canned foods spoilage. *Moorella thermoacetica* and *Moorella thermoautotrophica* (formerly known as *Clostridium thermoaceticum* and *Clostridium thermoautotrophicum*) are thermophilic and strictly anaerobes that produce HHRS (de Vos *et al.*, 2009). Even though *M. thermoacetica* and *M. thermoautotrophica* were originally described as two distinct species (Fontaine *et al.*, 1942, Wiegel *et al.*, 1981), recent research has challenged this view (Carlier et Bedora-Faure, 2006, de Vos *et al.*, 2009, Kimura *et al.*, 2016). Indeed, they share very similar physiological characteristics, and the region coding their 16S rDNA cannot be differentiated (Byrer *et al.*, 2000, Carlier et Bedora-Faure, 2006). Moreover, the genome of strain DSM 7417, which had originally been described as *M. thermoautotrophica*, was recently sequenced and deposited in the NCBI database as a *M. thermoacetica* strain ([www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/PRJNA330911](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/PRJNA330911)). Consequently, all the strains tested in the study reported here were considered as belonging to the species *M. thermoacetica*.

*M. thermoacetica* spores are the most heat-resistant in food industry, with a decimal reduction time (*D*) reaching 111 min at 121°C (Matsuda *et al.*, 1982, Byrer *et al.*, 2000, André *et al.*, 2013, Durand, 2014). *M. thermoacetica* is mostly associated with spoilage of canned vegetables stored at temperatures higher than 40°C but has also been retrieved from spoiled canned coffee beverages and ‘shiruko’ (Matsuda *et al.*, 1982, André *et al.*, 2013, Durand, 2014, Nakano, 2015). Recently, a 10-year study performed on samples from 122 French canned-food industries revealed that *M. thermoacetica* was the main cause of LACF spoilage detected during a 55°C-incubation test (André *et al.*, 2013).

Several studies have been carried out to determine the impact of environmental conditions on sporulation abilities and spore resistance properties of different bacterial species, and most



have found that spores produced at higher temperatures are more resistant to wet-heat and certain disinfectants (Planchon *et al.*, 2011, Baril *et al.*, 2012b, Mtimet *et al.*, 2015). However, to our knowledge, only one study has reported that *M. thermoacetica* spores are more wet-heat-resistant when produced at higher temperature (Byrer *et al.*, 2000). It was recently shown that conditions allowing the growth and sporulation of thermophilic bacteria such as *Moorella*, *Geobacillus stearothermophilus* or *Thermoanaerobacterium* spp. can be encountered during the vegetables canning process, specifically after the blanching step where temperatures ranged from 41°C to 69°C (Durand *et al.*, 2015). Thus, *M. thermoacetica* is likely to grow and/or sporulate in niches such as organic matter or wastes lying on conveyor belts where temperature remains high and oxygen availability low (Durand *et al.*, 2015). This makes it important to more precisely determine the effect of sporulation temperature on the resistance properties of *M. thermoacetica* spores.

Here we investigated the impact of sporulation temperature on *Moorella* spore resistance to wet-heat, biocides and UV-C light. We first focused our study on the strain *M. thermoacetica* ATCC 39073 and then extended to several strains of *M. thermoacetica* to investigate the variability of sporulation abilities and spore heat-resistance. The goal here was to determine how environmental conditions on food processing lines can influence the resistance of *M. thermoacetica* spores. We chose to focus on the impact of temperature on sporulation and spore resistance properties, as temperature is highly variable in canneries, thus allowing the formation of spores with contrasted properties. Moreover, we chose to include several strains to give an overview of the impact of temperature on *M. thermoacetica* spore resistance. The study is thus designed to provide clues on how to control the presence of *M. thermoacetica* spores on the food processing lines before the sterilization process.

## **2. Material and methods**

### **2.1. Strains**

Eight strains of *M. thermoacetica* were used in this study (Table 1): three strains from the American Type Culture Collection (ATCC, Molsheim, France) and Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Germany) international collections, and five strains isolated at the CTCPA from spoiled canned foods. Strains were selected in terms of (i) origin of the strain, (ii) growth capacities at different temperatures, (iii)

wet-heat-resistance of spores produced at 55°C and (iv) genotypic variability according to M13-PCR typing (Durand, 2014).

**Table 1: Phenotypic and genotypic characteristics of the *Moorella thermoacetica* strains selected for this study.**

Strain	Strain origin	M13-PCR group <sup>a</sup>	<i>D</i> <sub>130°C</sub> (min) of spores produced at 55°C <sup>b</sup>	Growth capacities <sup>c</sup>	
				at 45°C	at 68°C
<b>ATCC 39073</b>	ATCC	2	6.6	ND <sup>f</sup>	ND
<b>DSM 1974<sup>d</sup></b>	DSMZ	ND	ND	ND	ND
<b>DSM 7417<sup>d</sup></b>	DSMZ	ND	ND	ND	ND
<b>1901 042<sup>e</sup></b>	Spoiled milk drink	12	2	+	+
<b>1901 057<sup>e</sup></b>	Spoiled green peas	6	2.2	+	+
<b>1142-5<sup>e</sup></b>	Spoiled sweetcorn	ND	ND	ND	ND
<b>1901 020<sup>e</sup></b>	Spoiled stuffed cabbage	4	2.5	-	+
<b>1902 042<sup>e</sup></b>	Spoiled salt pork	17	2.3	+	+

<sup>a</sup> Phylogenetic group determined using M13-PCR (Durand, 2014)

<sup>b</sup> Spores produced at 55°C on MLA plates (Durand, 2014)

<sup>c</sup> Growth performed in DTB medium (Durand, 2014)

<sup>d</sup> Strains deposited in the DSMZ collection as *Moorella thermoautotrophica*

<sup>e</sup> *Moorella thermoacetica* strains isolated from spoiled low-acid-canned foods at the CTCPA

<sup>f</sup> Not determined

ATCC: American Type Culture Collection

DSMZ: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen Kollektion

“+”: growth; “-”: no growth

## 2.2. Sporulation conditions

Strains were kept at  $-80^{\circ}\text{C}$  in cryogenic preservative solution with beads (AES Chemunex, Bruz, France). Three beads were dropped in 10 mL of modified DTB medium ( $_{\text{mod}}\text{DTB}$ : 9 g/L tryptone, 4 g/L tryptose, 7 g/L soytone, 5 g/L yeast extract, 5 g/L sodium chloride, 1 g/L potato starch, 10 g/L D-glucose). All components were purchased from Biokar Diagnostics, (Allonne, France) or Thermo Fischer (Dardilly, France). Anaerobiosis was maintained by pouring paraffin into the tubes after inoculation. These pre-cultures were incubated at  $55^{\circ}\text{C}$  for 4 to 6 days. For each strain, 200  $\mu\text{L}$  of the pre-culture was used to inoculate 10-mL tubes of  $_{\text{mod}}\text{DTB}$  reduced in an anaerobic chamber during 24 to 48 hours (90 %  $\text{N}_2$ , 5 %  $\text{H}_2$ , 5 %  $\text{CO}_2$ , Whitley A35 Workstation, Don Whitley Scientific, UK). Cultures were covered with paraffin and incubated at  $55^{\circ}\text{C}$  for 4 to 5 days, except for the strain 1142-5 which required 11-day incubation. For sporulation, a total of 5–10 plates were inoculated under anaerobiosis with 500  $\mu\text{L}$ –2 mL of culture spread on meat liver agar plates MLA (Biokar Diagnostics, Allonne, France) or MLA supplemented with 10 g/L of Phytigel<sup>TM</sup> (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France) for sporulation performed at  $65^{\circ}\text{C}$ . Plates were incubated under anaerobiosis (Oxoid<sup>TM</sup> AnaeroGen<sup>TM</sup> jars and sachets, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France) either at  $45^{\circ}\text{C}$ ,  $55^{\circ}\text{C}$  or  $65^{\circ}\text{C}$ . Sporulation was checked and stopped after 3 or 6-week incubation. Plates were incubated at room temperature for one more week. Spores were then harvested by pouring cold sterile water on plates and scraping their surface. Spore suspensions were centrifuged at 1,400 g for 20 min at  $4^{\circ}\text{C}$  and spores were resuspended in sterile water. The suspensions were heated for 10 min at  $100^{\circ}\text{C}$  in a thermostated oil bath to inactivate residual vegetative forms and germinated spores. Spore batches were stored at  $4^{\circ}\text{C}$  until use.

## 2.3. Spore resistance to heat

Spore suspensions ( $10^4$  to  $10^8$  CFU/mL) were diluted 1:3 (v/v) in phosphate buffer pH 7.0. Heat-resistance was determined at either  $125^{\circ}\text{C}$  or at  $130^{\circ}\text{C}$ , as previously described (André *et al.*, 2012). Counts of surviving spores were determined by plating serial dilutions of the content of each capillary on MLA plates which were then incubated for 5 days at  $55^{\circ}\text{C}$  under anaerobiosis (Oxoid<sup>TM</sup> AnaeroGen<sup>TM</sup> jars/sachets, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France) according to the French standard method (AFNOR, 2011).

#### 2.4. Spore resistance to UV-C

Spore resistance to UV-C was determined using a laboratory-made device made out of 3 germicidal lamp tubes delivering monochromatic UV-C at 254 nm. Initial concentration of spore suspensions ranged from  $10^6$  to  $10^7$  CFU/mL. One hundred microliters of decimal dilutions of spore suspensions were plated on the surface of MLA plates subjected to UV-C treatment after complete drying. Controls were performed by plating serial dilutions of the suspensions without subjecting them to any UV-C treatment. Inoculated MLA plates were incubated 5 days at 55°C under anaerobiosis (Oxoïd™ AnaeroGen™ jars/sachets, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France).

#### 2.5. Spore resistance to biocides

Spore resistance to biocides was investigated on spore suspensions at an initial concentration ranging from  $10^5$  to  $10^6$  CFU/mL. Spore resistance was determined by mixing spore suspensions with one of the following molecules: 3000 ppm (v/v) sodium hypochlorite (Laboratoire Oxena, Romans-sur-Isère, France), 250 ppm (v/v) peracetic acid (PAA), 5% (v/v) hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ), 4% (v/v) glutaraldehyde (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) and 4 M sodium hydroxide (NaOH) (Thermo Fischer, Dardilly, France). Suspensions were then incubated at room temperature for different contact times. At each sampling point, biocide activity was neutralized for 10 min by diluting the sample 10-fold in 2% glycine for glutaraldehyde-treated spores, 2% bovine catalase for  $H_2O_2$ -treated spores and 1% sodium thiosulfate for PAA and sodium hypochlorite-treated spores. Samples were diluted 100-fold in 0.1 M  $KH_2PO_4$  for spores treated with NaOH. Controls were performed by adding sterile water instead of biocides. Immediately after treatment and neutralization, serial dilutions of samples were plated on MLA plates, and counts of surviving spores was determined after a 5-day incubation (AFNOR, 2011).

#### 2.6. Determination of treatment efficiency

At the end of incubation, individual colonies were enumerated on plates. The threshold of the method represents one colony on the plate corresponding to the lowest dilution. For each

treatment, results were expressed as the decimal reduction of spore counts using the following equation (1):

$$(1) \log_{10}(n) = \log_{10}\left(\frac{N}{N_0}\right),$$

where  $N_0$  is the initial CFU count and  $N$  is the CFU count after a treatment.

## 2.7 Fitting of the destruction curves

Destruction curves obtained for heat-treated and biocide-treated spores were fitted using a modified Weibull model as described in equations (2) and (3) (Mafart *et al.*, 2002):

$$(2) N = N_0 * 10^{\left(\frac{-t}{\delta}\right)^{p^*}}$$

$$(3) n = \log_{10}\left(\frac{N}{N_0}\right) = -\left(\frac{t}{\delta}\right)^{p^*}$$

where  $n$  is the decimal reduction ratio,  $N_0$  is the initial CFU count and  $N$  is the CFU count after the treatment. Parameter  $\delta$  is the scale parameter representing the time of first decimal reduction, *i.e.* the treatment time leading to the first 10-fold reduction in spore count.

Curves obtained for UV-C treated spores were fitted using the same model as described in equation (4):

$$(4) n = \log_{10}\left(\frac{N}{N_0}\right) = -\left(\frac{F}{F_1}\right)^{p^*}$$

Where  $F$  and  $F_1$  are the fluence applied and the fluence necessary to inactivate the first log of the spore population, respectively.

Parameter  $p^*$  corresponds to the shape parameter and describes the tendency followed by the curve. When  $p^* = 1$ , the reduction is linear and  $\delta$  or  $F_1 = D$ , corresponding to the decimal reduction time or fluence necessary to inactivate 1 log of the spore population. When  $p^* < 1$  or  $p^* > 1$ , the curve is upward concave (presence of a tail) or downward concave (presence of a shoulder), respectively.

## 2.8. Statistical analysis

Mean values and standard deviations were calculated on data obtained from 3 independent biological replicates. Parameters  $\delta$  and  $F_1$  were determined using the solver functionality

available in Excel 2013. Treatment efficiency was assessed by comparing  $\delta$  obtained at different temperatures using a Student's *t*-test assuming unequal variances.

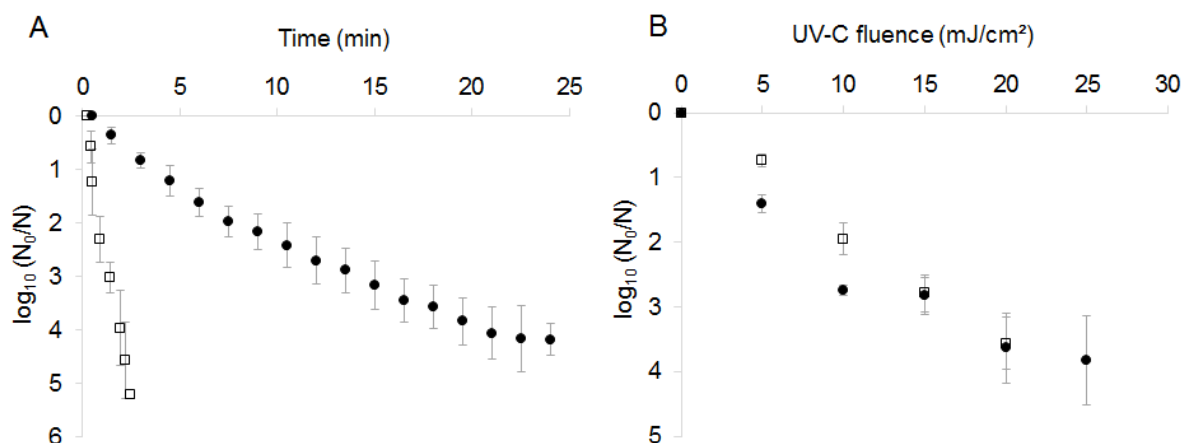
When resistance parameters were not directly comparable (different  $p^*$  values), a Kruskal-Wallis test was used to compare the effect of sporulation temperature on spore resistance. We also used a Kruskal-Wallis test to compare heat-resistance values obtained for the 8 strains tested according to sporulation temperature. The null hypothesis was rejected for  $p < 0.05$ . Statistical analysis using the *t*-test function were performed with Excel 2013. Kruskal-Wallis tests were performed using a utility software (AnaStats Scop ARL, Rilly-sur-Vienne, France).

### 3. Results

#### 3.1. Effect of temperature on sporulation and spore properties of *M. thermoacetica* ATCC 39073

To investigate the effect of temperature on sporulation capacity, spores of *M. thermoacetica* ATCC 39073 were produced on MLA plates at 45°C, 55°C and 65°C. Final concentrations of spore suspensions (n=3 for both conditions) were  $7.6 \pm 0.3$  log CFU/mL and  $8.3 \pm 0.5$  log CFU/mL for batches produced at 45°C and 55°C after 3–4 weeks of incubation, respectively. Growth was observed on plates at 65°C but the spore suspension concentration was below the threshold, *i.e.* 2.0 log CFU/mL, even after a 6-week incubation. Consequently, we considered that no sporulation leading to a significant amount of heat-resistant spores occurred in this condition. Thus, resistance to wet-heat, UV-C and biocides was assessed on spores formed at 45°C and 55°C. Spore wet-heat resistance was tested at 130°C (Figure 1A).

The destruction curves followed a slightly upward concave tendency, according to the Weibull model. Indeed, a single shape parameter  $p^*$  was determined based on all the curves obtained and was equal to 0.71 for both sporulation temperatures. Destruction of at least 4.2 log CFU was observed for spores produced at either 45°C or at 55°C. Destruction was faster for spores produced at 45 °C than for spores produced at 55°C (Figure 1A). Indeed, the first decimal reduction time  $\delta_{130^\circ\text{C}}$  was  $0.2 \pm 0.0$  min and  $2.6 \pm 0.4$  min at 130°C for spores obtained at 45°C and 55°C, respectively (see Supplementary data for details). Spores produced at 45°C were significantly more wet-heat-sensitive than spores produced at 55°C ( $p < 0.05$ ).

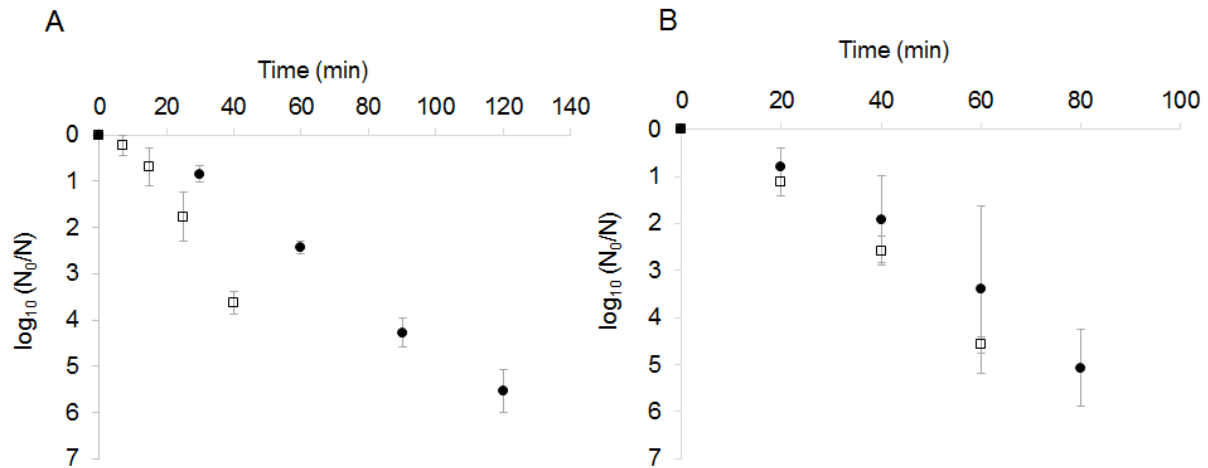


**Figure 1: Physical resistance properties of *M. thermoacetica* strain ATCC 39073 spores produced at (□) 45°C (n = 3) and (●) 55°C (n = 3).** (A) wet-heat resistance at 130°C and (B) resistance to UV-C. The initial spore suspension concentrations (N<sub>0</sub>) were 6.5 ± 0.38 and 7.6 ± 0.47 log CFU/mL for spores produced at 45 °C and 55 °C, respectively. For spores formed at 45°C, the surviving spore population at 25 mJ.cm<sup>-2</sup> was below the detection threshold, *i. e.* 2 log CFU/mL. Values mentioned refer to mean values +/- Standard Deviation.

The resistance to UV-C light of *M. thermoacetica* ATCC 39073 spores produced at 45°C and 55°C was also assessed. Different fluences from 0 to 25 mJ cm<sup>-2</sup> were tested. Destruction curves did not follow the same tendency: curves were upward concave for spores produced at 55°C but linear for spores produced at 45°C (Figure 1 B). Thus, modeling data with a single shape parameter  $p^*$  was not relevant, and the curves did not fit our data. We thus modeled curves with  $p^* = 1$  and  $p^* = 0.53$  for spores produced at 45°C and 55°C, respectively. The resulting mean  $F_1$  was 5.4 ± 0.5 mJ/cm<sup>2</sup> and 2.0 ± 0.4 mJ/cm<sup>2</sup> for spores produced at 45°C and 55°C, respectively. As  $p^*$  were different, the  $F_1$  values could not be compared. We therefore compared spore destruction obtained for both types of spores. As seen on Figure 1B, spore destruction increased with rising UV-C dose for both types of spores. Maximum destruction was obtained for a dose of 20 mJ/cm<sup>2</sup> with 3.3 ± 0.0 log CFU and 3.6 ± 0.4 log CFU spores formed at 55°C and 45°C being inactivated, respectively. Statistical analysis revealed that spore destruction was not significantly different between spores produced at 45°C and spores produced at 55°C ( $p > 0.05$ ).

Spore resistance to different biocides, *i.e.* PAA (250 ppm), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (5%), NaOH (4 M), sodium hypochlorite (3000 ppm) and glutaraldehyde (4%), was assessed by monitoring destruction after different contact times for spores produced at 45°C or 55°C. For both conditions, the

curves followed a slightly downward concave shape as determined by the Weibull model with a unique shape parameter  $p^*$  of 1.31 (Figure 2).



**Figure 2: Resistance to biocides of *M. thermoacetica* strain ATCC 39073 spores produced at (□) 45°C (n = 3) and (●) 55°C (n = 3).** (A) Resistance to 250 ppm PAA, (B) 5 % (v/v)  $H_2O_2$ . The initial spore suspension concentrations ( $N_0$ ) were  $4.4 \pm 0,28$  and  $5.8 \pm 0,08$  log CFU/mL for spores produced at 45°C and 55°C, respectively. The surviving population of spores produced at 45°C for a contact time of 60 min with PAA or 80 min with  $H_2O_2$  was below the detection threshold, i. e. 2 log CFU/mL. Values mentioned refer to mean values +/- Standard Deviation.

Destruction curves obtained for PAA-treated spores showed that spores produced at 45°C were more readily inactivated than spores produced at 55°C (Figure 2A). Indeed, 3.6 log CFU of spores produced at 45°C were killed after 40 min of contact while 4.3 log CFU of spores produced at 55°C were inactivated after 90 min (Figure 2A). Moreover, the first decimal reduction time  $\delta$  was evaluated as  $14 \pm 1.5$  min and  $32 \pm 1.4$  min for spores produced at 45°C and 55°C, respectively. Spores formed at 45°C were significantly more sensitive to 250 ppm PAA than spores formed at 55°C ( $p < 0.05$ ).

When a 5%- $H_2O_2$  treatment was applied, a destruction of  $4.6 \pm 0.4$  log CFU and  $3.4 \pm 1.8$  log CFU was obtained for spores produced at 45°C or at 55°C, respectively, after 60 min of contact. Spores produced at 45°C were characterized by a  $\delta$  of  $19 \pm 0.4$  min vs.  $24 \pm 4.0$  min for spores produced at 55°C (shape parameter  $p^* = 1.31$ ) (Figure 2B). Statistical analysis revealed that  $\delta$ -values were not significantly different between spores produced at 45°C and 55 °C ( $p > 0.05$ ), indicating that sporulation temperature had no impact on  $H_2O_2$  spore



resistance in the tested conditions. Finally, *M. thermoacetica* ATCC 39073 spores formed at either 45°C or 55°C did not show any sensitivity to 3000 ppm sodium hypochlorite, 4 % glutaraldehyde or 4 M NaOH in the tested conditions and for contact-times of up to 2 h (data not shown).

### 3.2 Sporulation diversity among *M. thermoacetica* species

Sporulation capacity was assessed at 45°C, 55°C and 65°C for 8 *M. thermoacetica* strains from collections or isolated from spoiled LACF. The aim was to determine whether the observations reported above for the ATCC strain 39073 could be extended to other *M. thermoacetica* strains (Table 1). Here, and as already stated for the ATCC strain 39073, we considered that no sporulation occurred when the spore suspension concentration was below the threshold, i.e. 2.0 log CFU/mL. Among the 8 *M. thermoacetica* strains, spore suspension concentration ranged from 3 log CFU/mL to 8.1 log CFU/mL (Table 2). While all strains sporulated at 55°C, 7 strains out of 8 strains sporulated at 45°C and 6 out of 8 produced spores at 65°C (Table 2). Spore suspensions were globally more concentrated when spores were produced at 55 °C (4.8–8.1 log CFU/mL) than 45°C (3–7.5 log CFU/mL) or 65°C (3.4–5 log CFU/mL).

Wet-heat-resistance at 125°C was determined on spores produced at 45°C, 55°C or 65°C for all 8 selected strains, according to their sporulation capacities at those temperatures. The effect of sporulation temperature on spore wet-heat resistance was evaluated by calculating the  $\delta_{125^\circ\text{C}}$  with a single shape parameter of  $p^* = 0.71$  for all spore suspensions. The  $\delta_{125^\circ\text{C}}$  values were plotted as a function of sporulation temperature (Figure 3).

A destruction of at least 3 log CFU/mL was achieved for all suspensions, except for 1142-5 and DSM 1974 spores produced at 45°C and 65°C, respectively (see Supplementary data for details). The wet-heat resistance of spores produced at 55°C was high, with  $\delta_{125^\circ\text{C}}$  ranging from 3.4 to 10.8 min (Figure 3, Table 2). The  $\delta_{125^\circ\text{C}}$  of spores produced at 45°C, ranging from < 0.4 to 3.4 min, was significantly lower ( $p < 0.05$ ) than the  $\delta_{125^\circ\text{C}}$  of spores produced at 55°C (Figure 3, Table 2). Spores produced at 45°C had a  $\delta_{125^\circ\text{C}}$  below 1.5 min, except for strain 1142-5 spores.

**Table 2: Concentration of spore suspensions formed at 45°C, 55°C and 65°C for 8 strains of *M. thermoacetica* and associated spore wet-heat resistance at 125°C as determined using a Weibull model with  $p^* = 0.71$ .**

Strain	45°C		55°C		65°C	
	Spore concentration (log CFU/mL)	$\delta_{125^\circ C}$ (min)	Spore concentration (log CFU/mL)	$\delta_{125^\circ C}$ (min)	Spore concentration (log CFU/mL)	$\delta_{125^\circ C}$ (min)
ATCC 39073 <sup>a</sup>	5.5	0.9	5.8	7.7	<2	ND
DSM 7417 <sup>a</sup>	3.2	< 0.4 <sup>e</sup>	5.0	5.7	<2	ND
1901 042 <sup>b</sup>	6.1	1.2	6.0	10.8	4.8	2.0
1901 057 <sup>b</sup>	4.5	0.6	5.8	10.1	5	9.2
1142-5 <sup>b</sup>	4.1	3.4	6.1	8.0	5	1.3
DSM 1974 <sup>b</sup>	3	< 0.4 <sup>e</sup>	8.1	3.7	3.4	3.9
1901 020 <sup>b</sup>	7.5	0.4	6.4	3.6	4.8	2.7
1902 042 <sup>c</sup>	<2	ND	4.8	3.4	4	4.7

<sup>a</sup> Strains sporulating at 45°C and 55°C, with n=1

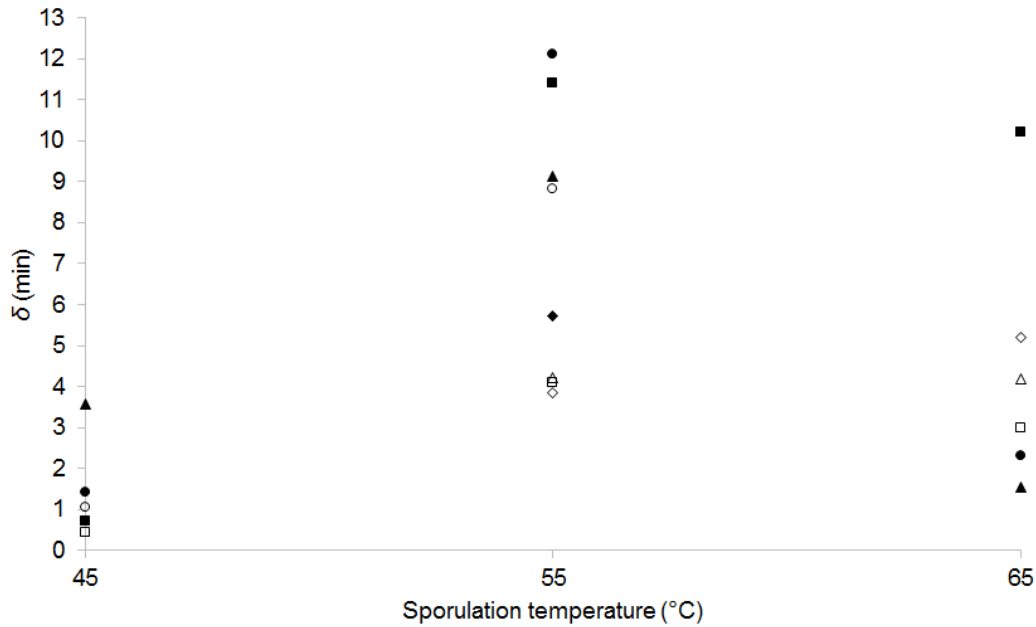
<sup>d</sup> Not determined

<sup>b</sup> Strains sporulating at 45°C, 55°C and 65°C, with n=1

<sup>e</sup> Destruction  $\geq 1.5$  log in 0.5 min

<sup>c</sup> Strains sporulating at 55°C and 65°C, with n=1

The sign “< 2” means that the concentration was below the threshold of detection



**Figure 3: Wet-heat resistance at 125°C of spores of *M. thermoacetica* as a function of the sporulation temperature.** The wet-heat resistance was determined in phosphate buffer pH 7.0. Determination of the  $\delta_{125^\circ\text{C}}$  was performed using one spore batch obtained at each temperature. Absence of values indicated that spores were too sensitive to determine a  $\delta_{125^\circ\text{C}}$  (spores of the DSM 1974 and DSM 7417 strains produced at 45°C) or that the strain did not sporulate in this condition. Strains (○) ATCC 39073, (□) 1901 020, (△) DSM 1974, (◇) 1902 042, (●) 1901 042, (■) 1901 057, (▲) 1142-5, (◆) DSM 7417.

The low concentration of DSM 1974 and DSM 7417 spore suspensions produced at 45°C did not allow determination of a  $\delta_{125^\circ\text{C}}$  in the tested conditions. However, they were the most sensitive spores tested, showing at least 1.5 log CFU/mL inactivated within 0.5 min at 125°C. Spores produced at 65°C were globally more heat-resistant than spores produced at 45°C but just as resistant as spores produced at 55°C (Figure 3, Table 2). Nonetheless, two exceptions were observed: spores of 1142-5 and 1901 042 strains had a 6-fold and 5-fold lower  $\delta_{125^\circ\text{C}}$  when formed at 65°C than at 55°C. Interestingly, spores of strain 1901 042 which were the most heat-resistant spores when produced at 55°C were among the most heat-sensitive when produced at 65°C (Table 2 and Figure 3). The higher resistance of spores produced at 55°C compared to spores produced at 45°C was confirmed statistically ( $p > 0.05$ ). There was no statistical difference between spores formed at 55°C vs 65°C or between spores formed at 45°C vs 65°C ( $p > 0.05$ ).

#### 4. Discussion

Temperature is a crucial factor involved in the growth and sporulation of spore-forming bacteria that allows them to develop and persist on food-processing lines. Temperature in the vegetables canning industry can range from 41°C to 69°C after the blanching step generally performed at 90–95°C (Durand *et al.*, 2015). These temperatures are compatible with the growth and sporulation of thermophilic spore-formers such as *M. thermoacetica*, which grows from 45°C to 68°C, depending on strain (Matsuda *et al.*, 1982, Byrer *et al.*, 2000, Balk *et al.*, 2003, Durand, 2014). Here, we led a study to investigate the effect of temperature on the sporulation and spore properties of *M. thermoacetica*. We studied the sporulation capacity of 8 strains at optimal and limit growth temperatures (45°C, 55°C and 65°C), as well as the wet-heat resistance of the resulting spores. Spores of ATCC strain 39073 produced at 45°C and 55°C were further characterized by determining their resistance properties to biocides and UV-C.

We first showed that most of the strains tested could sporulate at limit and optimal temperatures. This shows that the capacity to grow and sporulate in these conditions is a common feature of *M. thermoacetica* strains. Moreover, sporulation of most *M. thermoacetica* strains was greater when occurring at a temperature close to the optimal growth temperature i.e. 55°C. Several studies performed on *Bacillus*, *G. stearothermophilus* and *C. perfringens* have shown that the range of sporulation temperatures corresponds to growth temperatures, with optimal sporulation temperature close to optimal growth temperature (Raso *et al.*, 1995, Planchon *et al.*, 2011, Baril *et al.*, 2012a, Baril *et al.*, 2012b, Mtimet *et al.*, 2015). Here, the spores of the 8 strains formed at 55°C showed a  $\delta_{125^\circ\text{C}}$  ranging from 3.4 min to 10.8 min, which is in accordance with André *et al.* (2013) who reported  $\delta_{125^\circ\text{C}}$  ranging from 5.9 min to 10.5 min, including for strain 1901 020 included here (André *et al.*, 2013). Other wet-heat resistance values for *M. thermoacetica* spores have been reported in the literature (Matsuda *et al.*, 1982, Byrer *et al.*, 2000), but in conditions different to those used here, and it is well known that sporulation conditions significantly impact spore wet-heat resistance, as reported for other species (Byrer *et al.*, 2000, Rose *et al.*, 2007, Baweja *et al.*, 2008, Stecchini *et al.*, 2009, Setlow, 2014a).

Here, our results revealed that *Moorella* spores were significantly less heat-resistant when formed at 45°C than at 55°C. This has already been observed for other species (Planchon *et al.*, 2011, Baril *et al.*, 2012b, Mtimet *et al.*, 2015), but to our knowledge, has only been

reported once for *M. thermoacetica* JW/DB-2 and JW/DB-4 spores which were less heat-resistant when sporulation was performed at 25°C compared to 60°C (Byrer *et al.*, 2000). Indeed, spore heat-resistance is known to reach its maximum when spores are formed at temperatures close to the optimal growth temperature of the microorganism (Paredes-Sabja *et al.*, 2008c, Baril *et al.*, 2012a, Baril *et al.*, 2012b, Mtimet *et al.*, 2015). The optimal growth temperature of *M. thermoacetica* is between 55°C and 65°C depending on the strain (Fontaine *et al.*, 1942, Wiegel *et al.*, 1981, Byrer *et al.*, 2000, Balk *et al.*, 2003, Carlier et Bedora-Faure, 2006, Durand, 2014). Moreover, 45°C proved to be the low-limit temperature for growth of *M. thermoacetica* (Durand, 2014), which could explain the higher sensitivity to wet-heat observed for spores produced at this temperature. We showed that spores produced at 65 °C were statistically as heat-resistant as spores produced at 55°C, maybe because 65°C is the optimal growth temperature of some *M. thermoacetica* strains such as 1901 057 and 1902 042 (Durand, 2014). Here, the wet-heat resistance of spores produced at 45°C and 65°C was not significantly different, even if values were systematically higher for spores produced at 65°C than at 45°C, except for one strain. Absence of difference between heat resistance at 45°C and 65°C was probably due to the strong variability in  $\delta$  values for spores formed at 65°C.

The major factor involved and directly correlated to spore wet-heat resistance is core dehydration: “the more dehydrated, the more resistant” (Beaman et Gerhardt, 1986, Setlow *et al.*, 2006, Setlow, 2006, Leggett *et al.*, 2012). Dehydration of the spore core is known to be associated to its level of mineralization induced by the accumulation of dipicolinic acid complexed with Ca<sup>2+</sup> ions (Ca-DPA). Moreover, it has been shown that the protein composition of the spore core is also involved in the core dehydration and, consequently, heat resistance of *B. subtilis* and *C. perfringens* (Popham *et al.*, 1995b, Paredes-Sabja *et al.*, 2008c). There are grounds to posit that *M. thermoacetica* spores produced at 55°C have a more dehydrated core than spores produced at 45°C.

The effect of sporulation temperature was further investigated by studying the resistance to UV-C of the ATCC 39073 spores. UV-C light is frequently used for surface decontamination mainly because the technology is odorless, easy to apply without flushing, and does not damage material surfaces in plants, in contrast to some biocides like PAA and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. In the tested conditions, *M. thermoacetica* ATCC 39073 spores produced at 45°C were as resistant to UV-C as those produced at 55°C. Our results are in accordance with studies led on *B. cereus* and *B. subtilis* showing that spore resistance to UV-C, mainly associated with the

content of  $\alpha/\beta$ -type SAPSs (Popham *et al.*, 1995b, Raju *et al.*, 2007, Setlow, 2014a), is not sporulation temperature-dependent (Melly *et al.*, 2002, Planchon *et al.*, 2011).

Decontamination steps in the food industry generally entail the use of biocides, sodium hypochlorite being one of the most popular. Glutaraldehyde is currently used as a surrogate for formaldehyde but is progressively being replaced by other molecules like PAA due to its high toxicity. Biocides such as PAA, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and sodium hypochlorite are used for equipment surface sanitation or for fruits and vegetable decontamination in industry (Vandekinderen *et al.*, 2009, André *et al.*, 2012, Neal *et al.*, 2012). Here, we found that *M. thermoacetica* ATCC 39073 spores produced at 55°C were more PAA-resistant than those produced at 45°C. A previous study showed that *M. thermoacetica* and *G. stearothermophilus* spores were more PAA-resistant than spores of the mesophilic *C. sporogenes*, with *M. thermoacetica* spores being the most resistant ones (André *et al.*, 2012). It was recently reported that PAA treatment targets the *B. subtilis* spore inner membrane, with some of its activity directed specifically against the GerB and GerK germination receptors (Leggett *et al.*, 2015). Resistance to oxidizing agents was shown to be associated with potential detoxifying properties of the coats and impermeability properties of the inner membrane (Riesenman et Nicholson, 2000, Melly *et al.*, 2002, Cortezzo *et al.*, 2004, Setlow *et al.*, 2013, Setlow, 2014a, Leggett *et al.*, 2015, Leggett *et al.*, 2016). As properties of spore coats are correlated with resistance to some peroxides, we hypothesize that the composition of coats might differ when spores of *M. thermoacetica* are produced at different temperatures, as observed for *B. subtilis* spores (Melly *et al.*, 2002). The fatty acid composition of the inner membrane might also differ depending on sporulation temperature (Planchon *et al.*, 2011).

*M. thermoacetica* ATCC 39073 spores produced at 55°C were as resistant to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> as those produced at 45°C, while previous studies reported that resistance of *B. cereus* and *B. subtilis* spores to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> increased with sporulation temperature (Melly *et al.*, 2002, Planchon *et al.*, 2011). Here, we found no sporicidal effect on *Moorella* spores after sodium hypochlorite, NaOH and glutaraldehyde treatments in the tested conditions, whatever the sporulation temperature. The concentrations used in this study were higher than or similar to those shown to be effective on *B. subtilis* and *B. cereus* spores (Tennen *et al.*, 2000, Melly *et al.*, 2002, Planchon *et al.*, 2011). Despite a lack of sporicidal effect of NaOH in this study, it was recently shown that NaOH efficiently killed spores of *G. stearothermophilus* when used at high temperature (Pinho *et al.*, 2015). Our results highlight the difficulty of inactivating spores of the thermophilic *M. thermoacetica* on processing lines using classical biocides at

concentrations validated for standard microorganisms, as previously shown for PAA-based formulations (André *et al.*, 2012).

## 5. Conclusion

This study showed that sporulation temperature plays a role in the sporulation capacity but also on the resistance to wet-heat and to biocides of *M. thermoacetica* spores. Spores produced at optimal temperature turned out to be more resistant to wet-heat for most of the tested strains. However, some strains were particularly resistant even if formed at limit temperatures. *M. thermoacetica* species may thus be able to grow and sporulate in niches on processing lines, even at limit temperatures. This means that in-cannery temperatures after the blanching step should be controlled to limit the formation of spores that would likely survive the canning or decontamination processes.

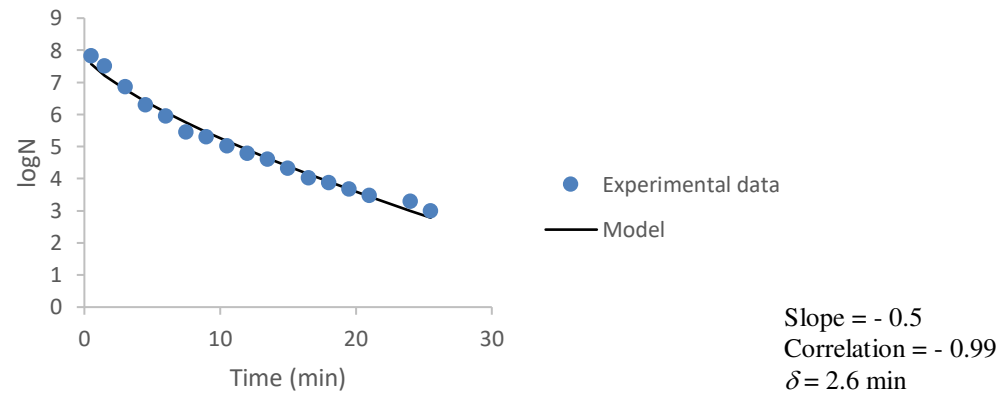
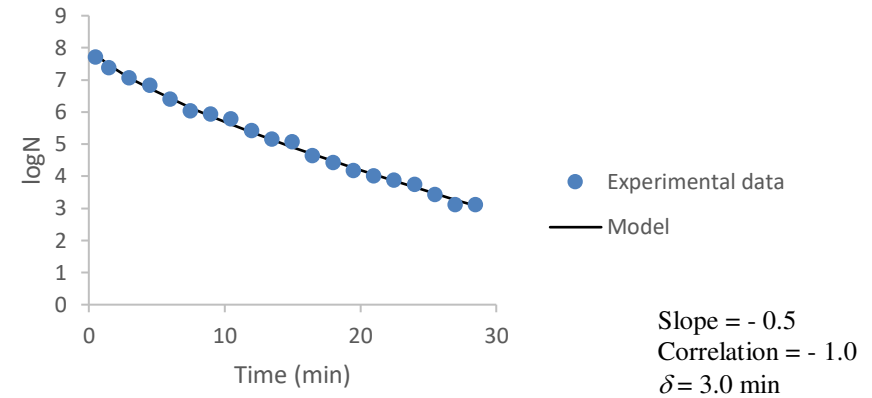
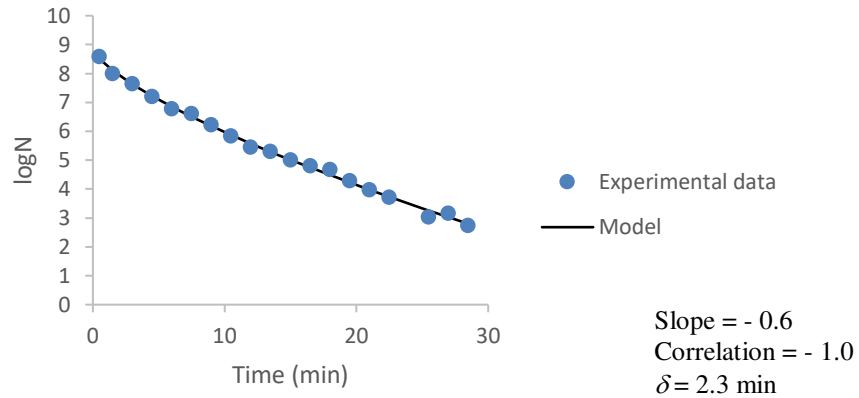
All the data obtained on the ATCC 39073 strain suggest that spores produced at 55°C might have a more dehydrated and mineralized core, as they were more resistant to wet-heat and to PAA than spores produced at 45°C. The difference of sensitivity to PAA between spores produced at 55°C and 45°C might be due to differences in spore coat composition and/or level of core dehydration. It would be interesting to determine the water content of the spores produced at 45°C and 55°C and characterize their protein composition. Further work is needed for a better understanding of the differences in resistance observed between spores produced at 45°C and 55°C.

## Acknowledgments

This work is a part of T. Malleck's PhD thesis given financial support from the Association Nationale de la Recherche et de la Technologie (ANRt), France and FranceAgriMer (FAM). The authors thank Pr I. Martin-Verstraete and Pr M. Jebbar for fruitful discussions, Dr F. Carlin for helpful advice on statistical analysis, and Dr F. Zuber for critical review of the manuscript. We also thank N. Al Fata for assistance on data modeling, and B. Budzeszewski and F. Guglielmi for their technical support.

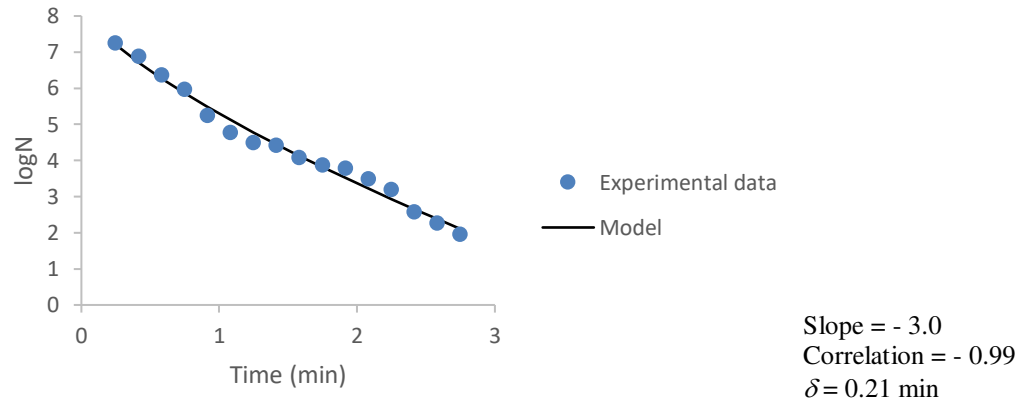
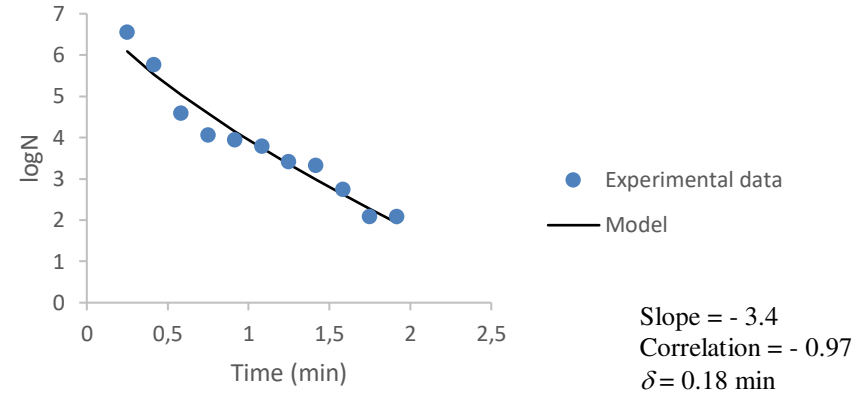
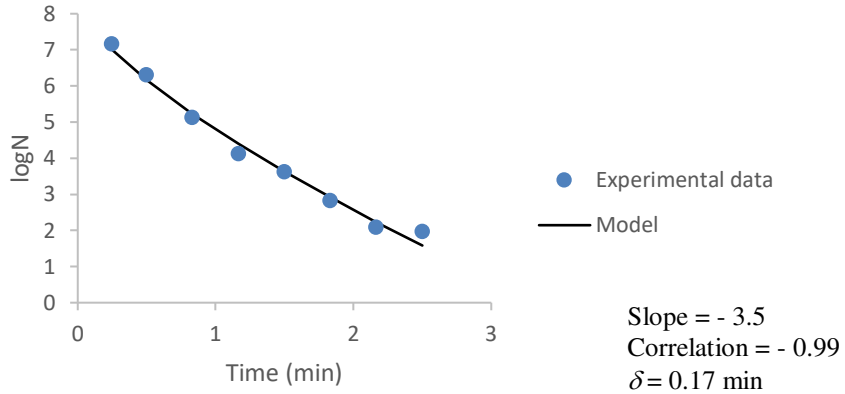
Supplementary data: Wet-heat resistance of *M. thermoacetica* spores determined with the Weibull model (Mafart *et al.*, 2002)

Wet-heat resistance at 130°C determined on 3 batches of *M. thermoacetica* ATCC 39073 spores produced at 55°C ( $p = 0.71$ )





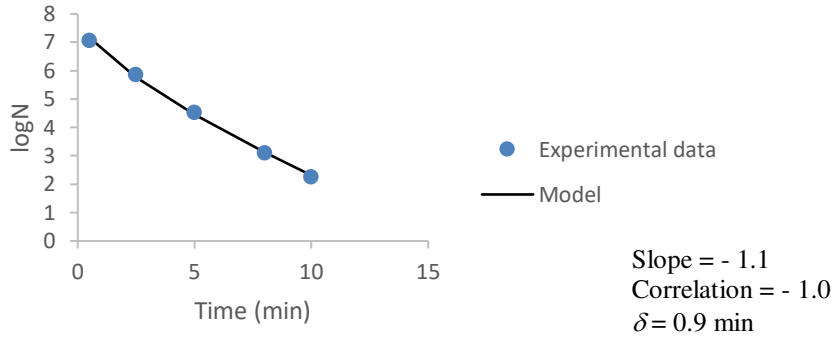
Wet-heat resistance at 130°C determined on 3 batches of *M. thermoacetica* ATCC 39073 spores produced at 45°C ( $p = 0.71$ )



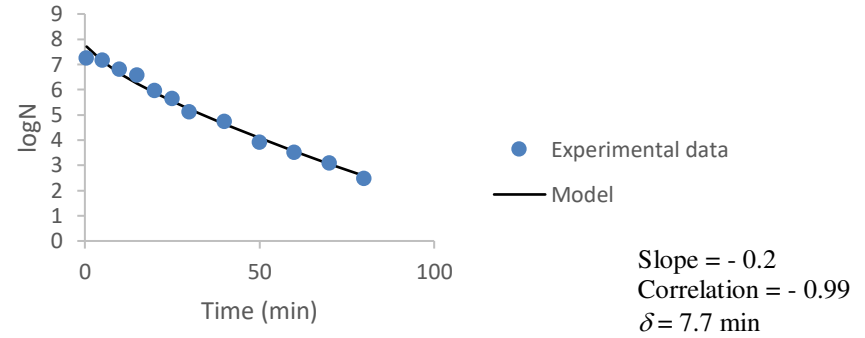
Wet-heat resistance at 125°C determined on spores of 8 strains of *M. thermoacetica* produced at 45°C, 55°C and 65°C ( $p = 0.71$ )

➤ ATCC 39073 strain

45 °C (n = 1)

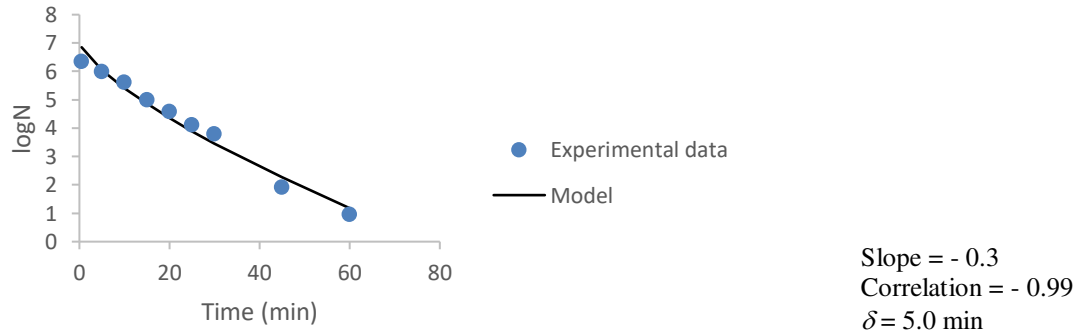


55 °C (n = 1)



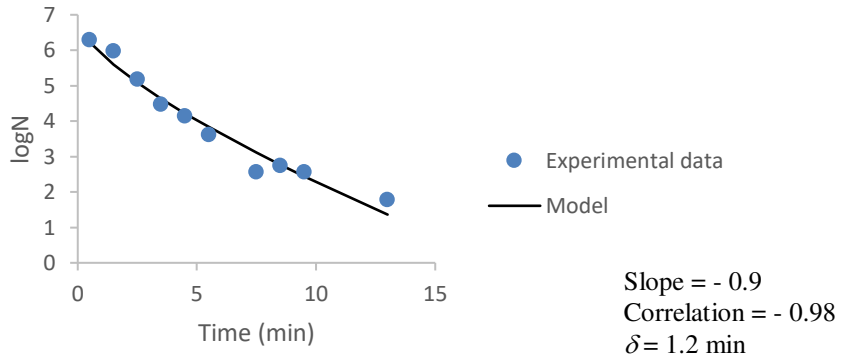
➤ DSM 7417 strain

(55 °C, n = 1)

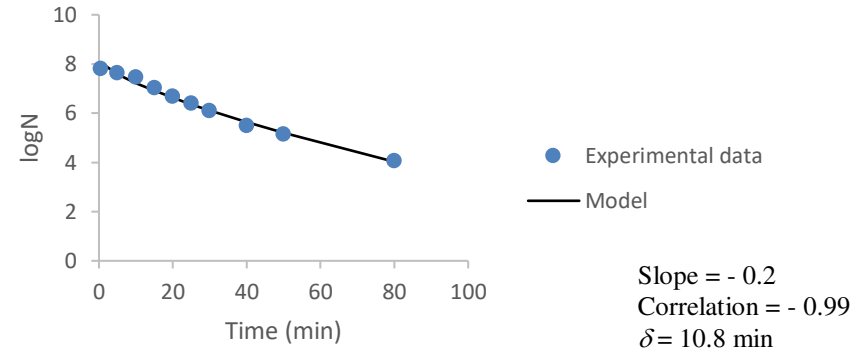


➤ 1901 042 strain

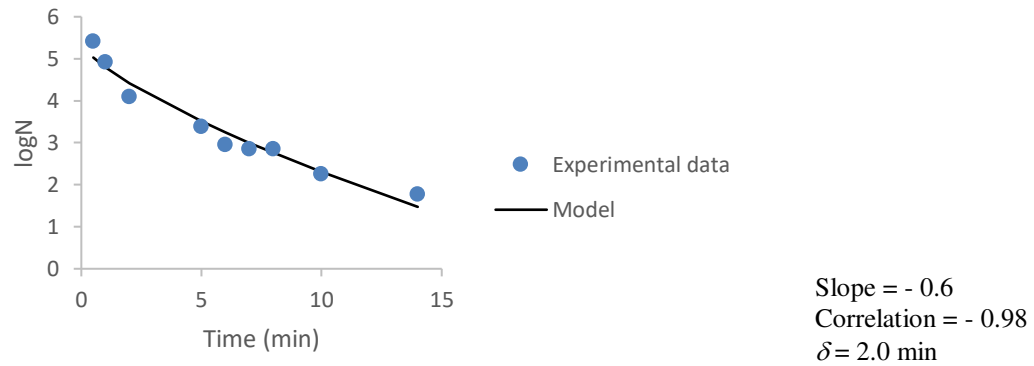
45 °C (n = 1)



55 °C (n = 1)

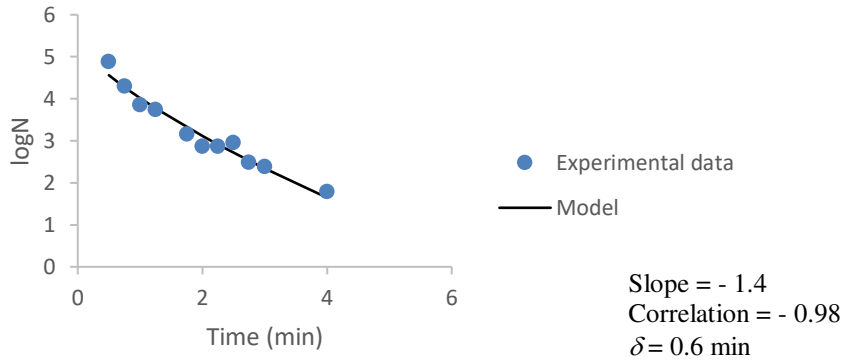


65 °C (n = 1)

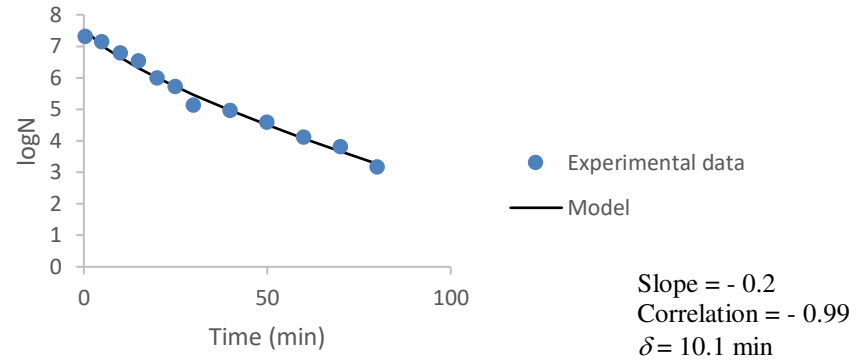


➤ 1901 057 strain

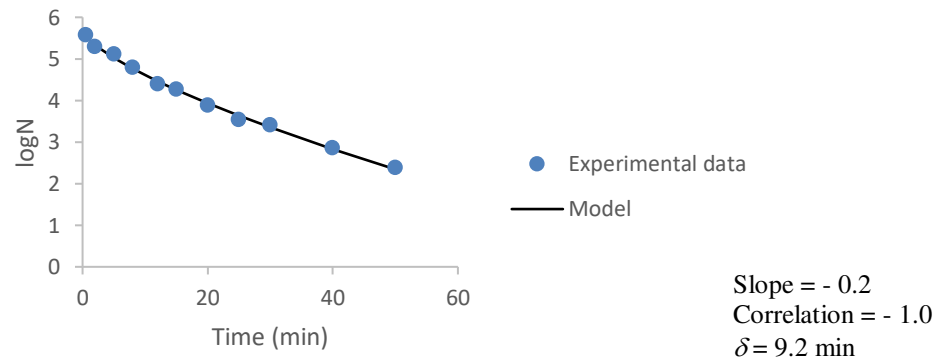
45 °C ( n = 1)



55 °C ( n = 1)

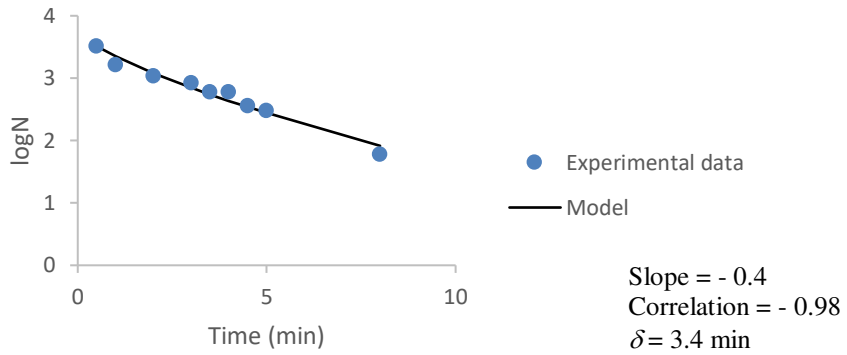


65 °C ( n = 1)

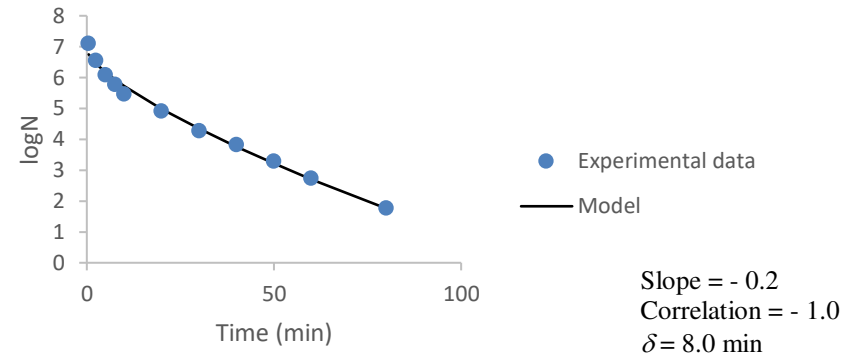


➤ 1142-5 strain

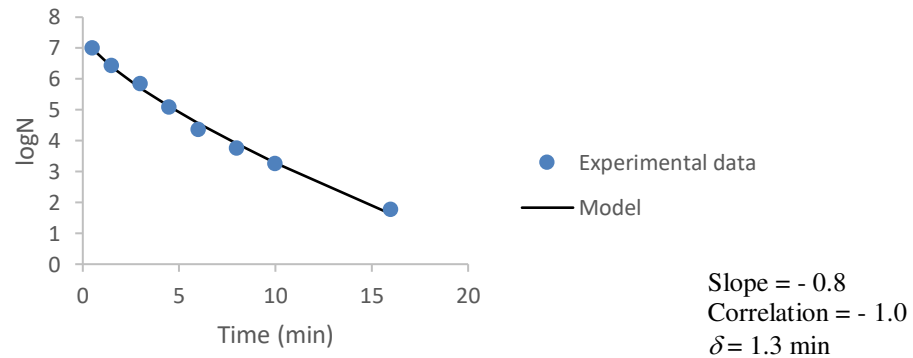
45 °C (n = 1)



55 °C (n = 1)

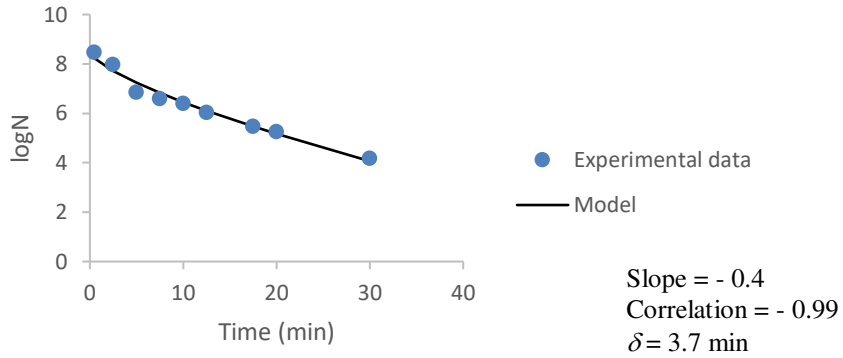


65 °C (n = 1)

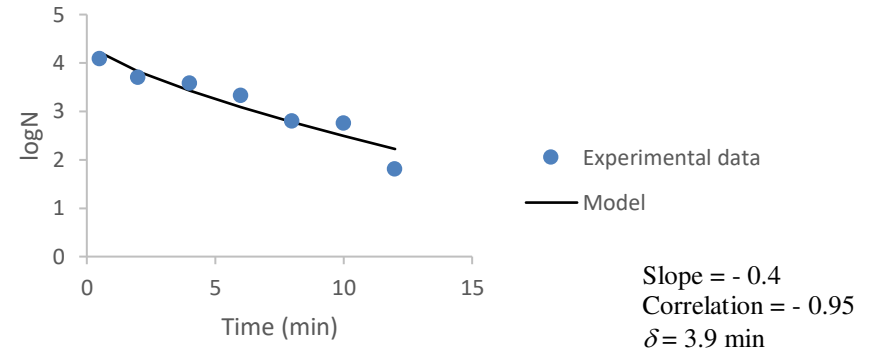


➤ DSM 1974 strain

55 °C (n = 1)

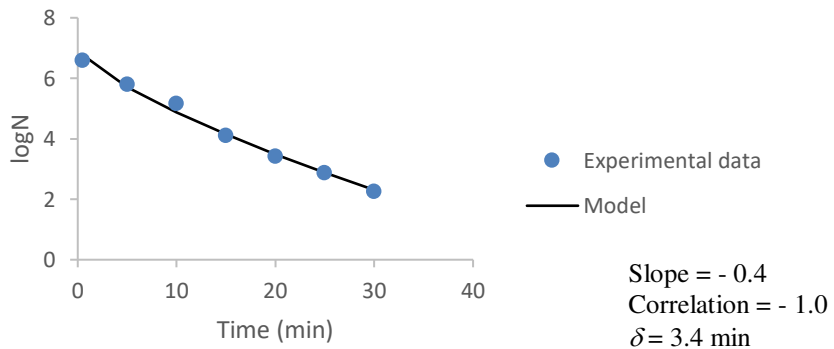


65 °C (n = 1)

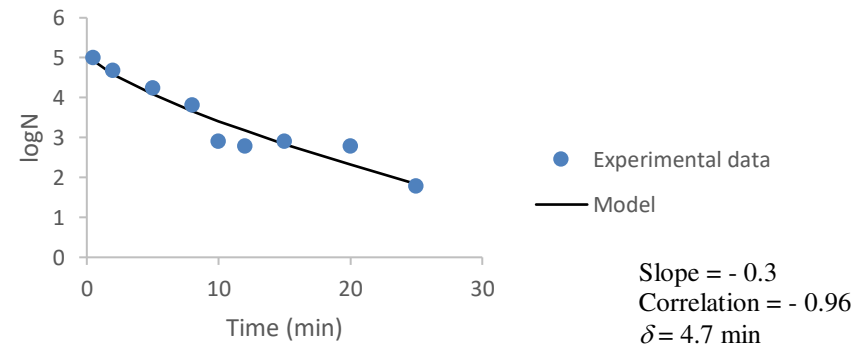


➤ 1902 042 strain

55 °C (n = 1)

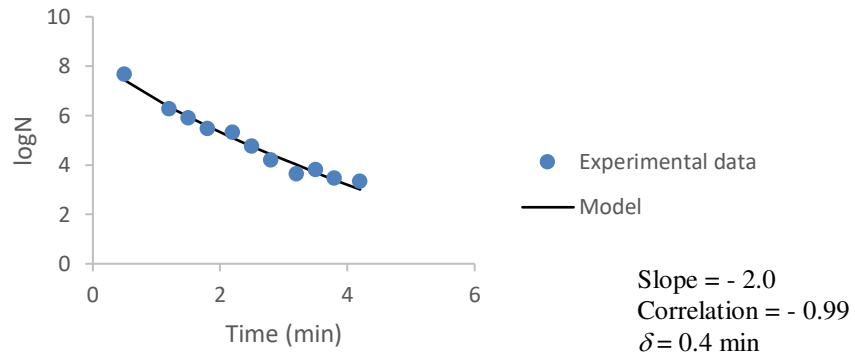


65 °C (n = 1)

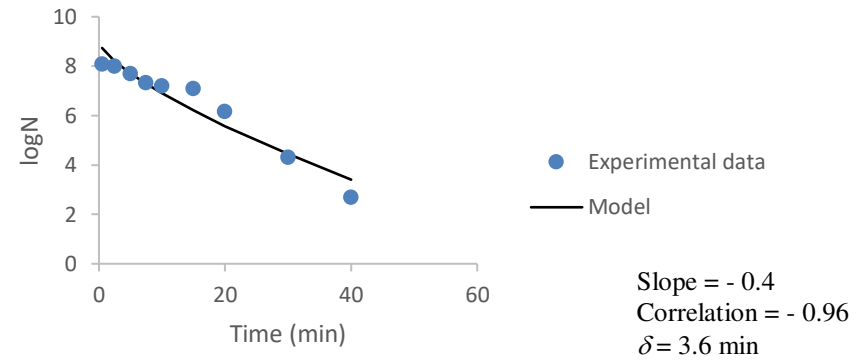


➤ 1901 020 strain

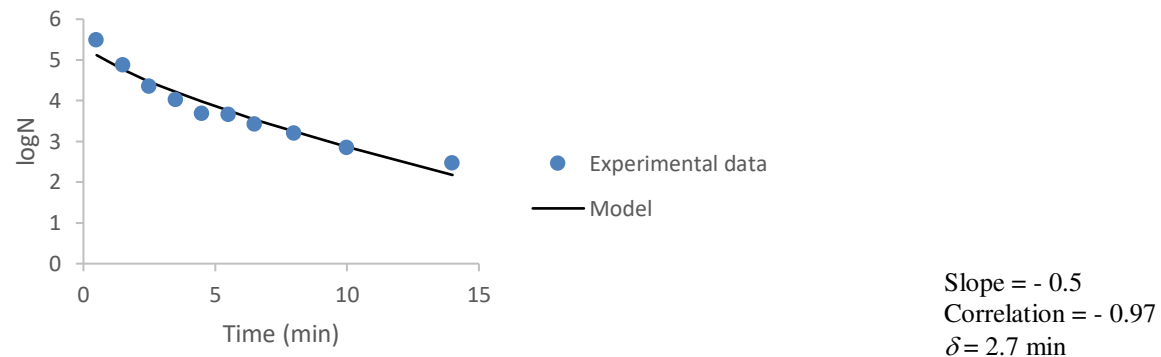
45 °C (n = 1)



55 °C (n = 1)



65 °C (n = 1)









***Chapitre 3 : Caractérisation de la structure et  
de la composition protéique des spores de  
Moorella thermoacetica produites à différentes  
températures***



## 1. Problématique

Lors des travaux présentés dans le chapitre 2, nous avons montré que les spores de la souche ATCC 39073 de *M. thermoacetica* produites à la température limite basse de croissance i.e. 45 °C sont moins résistantes à la chaleur et à l'acide peracétique que les spores produites à la température optimale i.e. 55 °C.

Des travaux réalisés sur la bactérie modèle *B. subtilis*, sur d'autres Bacilli ainsi que sur la bactérie thermophile *Geobacillus stearothermophilus*, ont rapporté que les propriétés des spores dépendent des conditions de sporulation, notamment la température et le milieu de sporulation (Rose *et al.*, 2007, Baweja *et al.*, 2008, Planchon *et al.*, 2011, Baril *et al.*, 2012b, Mtimet *et al.*, 2015, Bressuire-Isoard *et al.*, 2016). Des études ont également montré que la composition protéique et en acides gras de spores de Bacilli produites dans différentes conditions de sporulation pouvait être affectée (Melly *et al.*, 2002, Abhyankar *et al.*, 2016).

Actuellement, une seule étude réalisée sur les souches de *M. thermoacetica* JW/DB-2 et JW/DB-4 mentionne l'impact de la température de sporulation sur la thermorésistance des spores produites et présente la structure d'une spore (Byrer *et al.*, 2000). Toutefois, l'impact de la température sur la structure des spores de *M. thermoacetica* et la composition de celles-ci demeure inconnu. Dans ce travail, nous avons donc déterminé la structure, analysé et comparé la composition protéique des spores de *M. thermoacetica* produites à 45 °C et à 55 °C.

## 2. Objectif et stratégie

Cette étude a pour objectif de décrire la structure et la composition en protéines des spores de la souche ATCC 39073 de *M. thermoacetica* obtenues pour deux conditions de température de sporulation, 45 °C et 55 °C. Les caractéristiques structurales et protéiques ont été également comparées afin de déterminer si un lien existe entre la structure et/ou la composition protéique et les propriétés de résistance des spores que nous avons préalablement étudiées (Chapitre 2).

Des spores de la souche ATCC 39073 de *M. thermoacetica* ont été produites sur milieu solide à 45 °C et 55 °C, tel que décrit dans le chapitre 2. La structure des spores a été déterminée pour 4 suspensions indépendantes de spores produites à 45 °C ou à 55 °C, fraîchement

récoltées et non traitées thermiquement. La surface des spores a été observée par MEB et l'ultrastructure des spores a été étudiée par MET.

La composition protéique des spores de *M. thermoacetica* produites à 45 °C et 55 °C a été analysée par chromatographie en phase liquide couplée à un spectromètre de masse, en label free (LC-MS/MS). Cette analyse nécessitait une étape préalable de purification des spores. En effet, tout comme certaines Clostridies, les suspensions de spores de *Moorella* sont caractérisées par la présence de cellules et de débris, souvent majoritaires par rapport aux spores, ce que nous avons constaté aux deux températures de sporulation testées (Aoyama, 2014, Jamroskovic *et al.*, 2016). Divers protocoles ont été testés dont la purification sur gradient de Gastrografine (Bressuire-Isoard *et al.*, 2016), des lavages successifs dans un tampon contenant des concentrations décroissantes en Tween (Warda *et al.*, 2016) ou encore des lavages successifs dans de l'eau couplés à une centrifugation à vitesse décroissante. Aucun des protocoles testés n'a permis d'obtenir des suspensions de spores pures. Nous avons finalement adopté avec des modifications un protocole précédemment décrit pour la purification de spores de *M. thermoacetica*, consistant en une étape de lyse des cellules et débris par un traitement au lysozyme, suivi d'un traitement SDS 1 % (Aoyama, 2014).

Nous avons également mis au point un protocole d'extraction protéique pour les spores de *M. thermoacetica*, aucun protocole n'étant alors disponible dans la littérature. Dans le cadre de la mise au point, nous avons testé divers protocoles combinés à savoir (i) une extraction mécanique au FastPrep et/ou (ii) plusieurs chocs thermiques consistant en un traitement à 100 °C suivi d'un stockage à -80 °C et/ou (iii) un traitement lysozyme. Le contrôle microscopique à l'issue des essais de lyse ayant montré que l'effet des divers protocoles était semblable, nous avons choisi d'appliquer le protocole de lyse mécanique. Les protéines lysées ont ensuite été chauffées 10 min à 100 °C en conditions dénaturantes avant migration courte sur gel SDS-PAGE. Chaque piste correspondant à un échantillon a été découpée, les protéines digérées par trypsinolyse et ensuite analysées par LC-MS/MS. Les quantités relatives de chaque protéine (après normalisation) ont été comparées pour les deux conditions de température de sporulation. L'ensemble de ces analyses a été réalisé avec des triplicats biologiques.

### 3. Principaux résultats

L'analyse par MEB des spores de *M. thermoacetica* produites à 45 °C et 55 °C n'a pas montré de différence de structure de la surface. En revanche, les spores produites à 45 °C apparaissent significativement plus petites que celles produites à 55 °C, leur diamètre variant de 0,85 à 1,46 µm (moyenne =  $1,1 \pm 0,1$  µm) et 0,87 à 1,65 µm (moyenne =  $1,2 \pm 0,1$  µm), respectivement. L'analyse par MET montre que les spores de *M. thermoacetica* ont une structure caractérisée par la présence d'un cœur, d'un cortex, de tuniques internes lamellaires et de tuniques externes mais également d'un exosporium large et lâche. Cette structure est retrouvée pour les spores produites à 45 °C et 55 °C.

Nous avons observé des spores avec deux types d'arrangements de tuniques différents aux deux températures de sporulation étudiées : (i) d'une part, des spores avec des tuniques internes lamellaires en contact avec des tuniques externes plus fines, denses et diffuses (ii) d'autre part, des spores où les tuniques internes et externes sont séparées par une zone moins dense aux électrons. Le premier type de tuniques est observé majoritairement pour les spores produites à 55 °C (30 spores sur 45 observées) tandis que le deuxième type est plus fréquemment retrouvé pour les spores produites à 45 °C (34 sur 39 spores observées). De plus, certaines spores présentent des anomalies au niveau de l'arrangement des tuniques internes et/ou externes, plus fréquemment observées pour les spores produites à 45 °C que pour les spores produites à 55 °C (17 sur 39 spores vs 9 spores sur 45, respectivement).

La purification des spores de *M. thermoacetica* a permis d'éliminer une grande partie des débris mais pas la totalité. De ce fait, nous avons choisi d'orienter l'analyse des résultats de l'étude protéomique principalement sur les protéines de tuniques et de l'exosporium, décrites chez d'autres espèces bactériennes sporulées. Le génome de *M. thermoacetica* ATCC 39073 comprenant un grand nombre de gènes codant pour des protéines de fonction inconnue, une étude *in silico* a été réalisée pour identifier plus précisément les protéines sporales. Seuls 60 orthologues sur environ 200 protéines recherchées ont été retrouvés chez cette souche, avec peu de protéines des structures externes de la spore conservées chez *M. thermoacetica* ATCC 39073, en particulier les protéines composant l'exosporium.

Parmi les protéines identifiées *in silico*, 24 ont été identifiées par analyse LC-MS/MS. Il est intéressant de noter que la plupart des protéines identifiées correspond à des protéines de tuniques mais que leur nombre reste faible. Ce résultat pourrait être dû à des problèmes de

solubilisation des protéines observés pour les extraits protéiques des spores, quelle que soit la température de sporulation. De ce fait, une partie des protéines, correspondant probablement à la fraction insoluble des tuniques, n'a pas pu être analysée par LC-MS/MS. Une optimisation du protocole de solubilisation des protéines extraites à partir de spores purifiées est donc nécessaire afin de caractériser plus finement la composition des spores et identifier de potentielles nouvelles protéines de spores, notamment de tuniques et d'exosporium spécifiques de *Moorella*.

Parmi les 24 protéines identifiées par LC-MS/MS. Trois protéines de tuniques sont significativement moins abondantes dans les extraits protéiques de spores produites à 45°C vs 55 °C, parmi lesquelles CotJC ou encore une protéine annotée comme « coatF-containing protein ». De même, la protéine morphogénétique SpoIVA apparaît moins abondante à 45 °C. Par ailleurs, les protéines de tuniques CotSA et SodF n'ont pas été retrouvées dans les spores produites à 45 °C. Ces différences tendent à montrer que les spores produites à 45 °C ont une composition protéique différente des spores produites à 55 °C et/ou que l'extractabilité des protéines de spores est impactée par la température de sporulation.

Cette étude a donc permis de montrer que la température de sporulation impacte la composition et/ou la structuration protéique des spores de *M. thermoacetica*, ces différences étant potentiellement corrélées aux différences d'ultrastructure observées selon la température de sporulation. De plus, les différences de structure et composition des spores pourraient au moins en partie expliquer des différences de résistance entre les spores produites à températures optimale et limite basse.

#### **4. Article 2: Insights into the structure and the composition of *Moorella thermoacetica* spores produced at different temperatures**

Tiffany Malleck<sup>1,2</sup>, Fatima Fekraoui<sup>1</sup>, Isabelle Bornard<sup>3</sup>, Eloi Haudebourg<sup>4</sup>, Stella Planchon<sup>1\*</sup>  
and Véronique Broussolle<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> Unité d'Expertise dans la Maîtrise du Risque Industriel en Thermorésistants Sporulés (EMaiRIT'S), Centre Technique pour la Conservation des Produits Agricoles (CTCPA), 449 Avenue Clément Ader, 84911 Avignon, France

<sup>2</sup> UMR408 SQPOV Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale, INRA, Université d'Avignon et des Pays du Vaucluse, 84000 Avignon, France

<sup>3</sup> UR0407, Unité de Pathologie Végétale, INRA, Avignon Université, F-84143 Montfavet, France

<sup>4</sup> UMR 1319, MICALIS, PAPPSO, INRA, Jouy-en-Josas, France

\*Corresponding authors. Address correspondence to:

Véronique Broussolle, email: [veronique.broussolle@inra.fr](mailto:veronique.broussolle@inra.fr), Phone: +33(0)432722518

Stella Planchon, email: [splanchon@ctcpa.org](mailto:splanchon@ctcpa.org), Phone: +33(0)490843246

Authors' emails: [tmalleck@ctcpa.org](mailto:tmalleck@ctcpa.org); [ffekraoui@ctcpa.org](mailto:ffekraoui@ctcpa.org); [isabelle.bornard@inra.fr](mailto:isabelle.bornard@inra.fr); [eloi.haudebourg@inra.fr](mailto:eloi.haudebourg@inra.fr); [splanchon@ctcpa.org](mailto:splanchon@ctcpa.org); [veronique.broussolle@inra.fr](mailto:veronique.broussolle@inra.fr);

*To be submitted to Applied and Environmental Microbiology*



## ABSTRACT

*M. thermoacetica* spores are among the most heat-resistant spores so far retrieved in food industry. We previously showed that the resistance properties of *M. thermoacetica* ATCC 39073 spores to wet-heat and biocides were lowered when spores were produced at low-limit temperature (i.e. 45 °C) compared to spores produced at the optimal temperature (i.e. 55°C). By transmission electron microscopy, we observed that the structure of the spore coat differed according to the sporulation temperature. Indeed, spores produced at 55 °C mainly showed lamellar inner coat tightly associated to diffuse outer coat while spores produced at 45 °C exhibited an inner and outer coat separated from each other by a less electron-dense zone. Moreover, misarranged coat structures were more frequently observed when spores were produced at 45 °C than at 55°C. We analyzed by LC-MS/MS the protein composition of spore obtained at 45 °C and 55 °C and focused our data analysis on putative spore coat, exosporium proteins and proteins playing a role in spore resistance. Some putative spore coat proteins, such as CotSA and SodF, were only identified in spores produced at 55 °C while some other putative exosporium and coat proteins were significantly more abundant or more readily extracted from spores produced at 55 °C. Altogether, our results suggest that sporulation temperature impacts *M. thermoacetica* spore structure as well as their protein composition.

Keywords: TEM, SEM, *in silico* analysis, proteomics

## 1. Introduction

Endospore formation is an ancient mechanism which appeared about 2 billion years ago allowing Gram positive bacteria to adapt to harsh environmental conditions. Indeed, bacterial spores which are much more resistant than vegetative cells, are considered as dormancy forms providing sporulated bacteria the ability to persist in the environment for several years (Setlow, 2014a).

Spore structure differs greatly from that of vegetative cells, with a dehydrated core containing the chromosome, and surrounded by several concentric layers: the inner membrane, the cortex, the outer membrane, the coat layers and an exosporium for some *Bacillus* and *Clostridium* species (Leggett *et al.*, 2012). This particular structure has been shown to provide them adhesion capacities to surfaces and protection against various stresses (Leggett *et al.*, 2012, Setlow, 2014a).

The spore core dehydration is the main factor involved in the spore wet-heat resistance: spores are more resistant as the core water content decreases (Popham *et al.*, 1995b, Paredes-Sabja *et al.*, 2008c). This spore core dehydration is known to be lowered during spore formation by the accumulation of dipicolinic acid DPA which complexes with  $\text{Ca}^{2+}$  (Setlow *et al.*, 2006). The two spore maturation proteins SpmA and SpmB were also proved to play a major role in spore core dehydration as spores lacking these proteins were characterized by a higher core hydration (Popham *et al.*, 1995b, Paredes-Sabja *et al.*, 2008c). Besides, the small acid-soluble proteins  $\alpha/\beta$  SASPs which saturate and stabilize spore DNA contribute to the spore resistance to UV-C, dry-heat but also to genotoxic compounds such as nitrous acid and formaldehyde (Tennen *et al.*, 2000, Raju *et al.*, 2007, Setlow, 2007, Paredes-Sabja *et al.*, 2008b). The external layers formed by the proteinaceous coat are associated to spore protection against lysozyme and oxidizing agents (Riesenman et Nicholson, 2000, Ghosh *et al.*, 2008, Leggett *et al.*, 2015, Leggett *et al.*, 2016).

These spore resistance properties as well as the spore structure and composition depend strongly on sporulation conditions. Indeed, sporulation temperature is known to impact spore resistance to various stresses such as resistance to wet-heat and biocides (Byrer *et al.*, 2000, Melly *et al.*, 2002, Baweja *et al.*, 2008, Garcia *et al.*, 2010, Planchon *et al.*, 2011, Baril *et al.*, 2012a, Mtimet *et al.*, 2015). Moreover, sporulation temperature as well as medium impact spore structure and composition, such as the fatty acid content and protein composition

(Melly *et al.*, 2002, Rose *et al.*, 2007, Baweja *et al.*, 2008, Planchon *et al.*, 2011, Abhyankar *et al.*, 2016).

Spore resistance to process used in food industry is challenging. In canned food industry, *Moorella thermoacetica* spores are considered as the most heat-resistant so far retrieved (Byrer *et al.*, 2000, André *et al.*, 2016). *M. thermoacetica* is a strictly anaerobic and thermophilic sporeforming bacterium, formerly known as *Clostridium thermoaceticum* (Collins *et al.*, 1994). Recently, we showed that *M. thermoacetica* spores produced at the low limit temperature (45 °C) were less heat-resistant and less resistant to biocides than spores produced at the optimal temperature (i.e 55 °C) (Malleck *et al.*, 2018).

Up to now, *M. thermoacetica* spore structure is poorly described and spore protein composition remains unknown. Here, we aimed to determine if *M. thermoacetica* spores produced at two different temperatures exhibited differences in terms of structure and protein composition. To achieve this, the surface structure and ultrastructure of spores produced at two temperatures were observed by scanning electron microscopy (SEM) and transmission electron microscopy (TEM), respectively. Spore protein composition was further analyzed using an LC-MS/MS label-free approach.

Thus, this study gives insights into the features of *M. thermoacetica* spore structure and protein composition and on the effect of sporulation conditions on these features.

## 2. Material and methods

### 2.1. Strain and spore production

Study was performed with the ATCC 39073 *M. thermoacetica* strain. The strain was kept in a cryogenic preservative solution with beads (AES Chemunex, Bruz, France). Pre-cultures were performed by dropping three beads in 10 mL of modified deoxygenated DTB medium (<sub>mod</sub>DTB: 9 g/L tryptone, 4 g/L tryptose, 7 g/L soytone, 5 g/L yeast extract, 5 g/L sodium chloride, 1 g/L potato starch, 10 g/L D-glucose). All components were purchased from Biokar Diagnostics, (Allonne, France) or Thermo Fisher Diagnostics (Dardilly, France). Anaerobiosis was maintained by pouring paraffin onto the pre-cultures which were then incubated at 55°C for 4 to 6 days. A volume of 200 µL of the pre-culture was inoculated into 10-mL tubes of <sub>mod</sub>DTB previously reduced in an anaerobic chamber during 24 to 48 h (90 %

N<sub>2</sub>, 5 % H<sub>2</sub>, 5 % CO<sub>2</sub>, Whitley A35 Workstation, Don Whitley Scientific, UK). Anaerobiosis was maintained with paraffin and cultures were either incubated at 55°C for 4 to 5 days or at 45 °C for 13 days. Sporulation was performed by pouring 2 mL of cultures onto the surface of 140 mm-diameter meat liver agar plates (MLA, Biokar Diagnostics, Allonne, France). Plates were incubated under anaerobiosis (Oxoid™ AnaeroGen™ jars and sachets, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France) either at 45°C or 55°C. Sporulation was checked and stopped after 3 to 4 weeks of incubation and plates were incubated at room temperature for an additional week. Spores were then harvested with cold sterile water, centrifuged at 1, 400 g for 20 min at 4°C and resuspended in sterile water. Unless otherwise stated, the suspensions were heat-treated at 100 °C for 10 min to inactivate residual vegetative forms and germinated spores. Spore suspensions were stored at 4°C until use.

## 2.2. Spore purification

One ml-aliquots of heat-treated spore suspensions were briefly centrifuged at 200 g for 1 min at 4 °C and supernatant was removed. Spore purification protocol, adapted from Aoyama (Aoyama, 2014), was as follows: spores were resuspended in 1 mL of 10 mM Tris-HCl buffer pH 8.0 containing 1.7 µg/µL lysozyme (Sigma Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) and incubated overnight at 37 °C with continuous stirring. The lysis of remaining vegetative cells was controlled under phase-contrast microscope (Leica DM750, France). Spore suspensions were washed three times in 1 mL of cold sterile distilled water, centrifuged at 5, 000 g for 10 min at 8 °C, resuspended in 1 mL of 1 % SDS (v/v) (Sigma Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) and incubated at 37 °C for 2 h with continuous stirring. Spores were washed three times in cold sterile distilled water with centrifugation at 5, 000 g for 10 min at 20 °C. Purification was controlled under phase-contrast microscope. Spore suspensions were stored at 4°C until use.

## 2.3. Spore structure analysis

For transmission electron microscopy (TEM), freshly harvested and non-heat-treated spores were re-suspended in 40 mL of cold-sterile water, washed 4 times with centrifugation at 1, 400 g for 20 min. Spores were prepared as previously described (Bressuire-Isoard *et al.*, 2016), except that post-fixation was performed with 1 % osmium tetroxide. A total of 4

independent spore batches produced at 45 °C and 55 °C were used and up to 17 spores were observed per batch.

For scanning electron microscopy (SEM), freshly harvested and non-heat-treated spore suspensions were filtered on a 0.45 µm-porosity membrane (Nucleopore, Whatman). Spores retained on the filter were fixed for 1 h at room temperature with 2.5 % glutaraldehyde (v/v) in a 0.1 M sodium cacodylate buffer (pH 7.2) containing 1 mg/ml ruthenium red. The filter was washed 3 times in a 0.2 M sodium cacodylate solution. Spores were post-fixed for 1 h at room temperature with 1% osmium tetroxide. Filters were then washed several times with water and placed in 30% ethanol. Spores were submitted to successive agitated dehydration baths containing increasing concentrations of ethanol (50%, 70%, 90%, and 100%). Next, samples were transferred into a hexamethyldisilazane (HMDS) bath until complete evaporation. Filters were pasted on a metallic support and gold plated. Observations were performed at 10 KV (SEM; Microscope FEI –Philips XL-30). A total of 4 batches were used for spores produced at 45 °C and 55 °C and a total of up to 35 spores were observed per batch.

#### 2.4. Spore size measurement

To measure the diameter of spores produced at 45 °C and 55 °C, SEM images were analyzed using the ImageJ analysis software (v. 1.51j8, National Institutes of Health, USA). A total of 73 and 78 spores from 4 batches produced at 45 °C and 55 °C respectively, were measured. The normality of the data distribution as well as the variance homogeneity were tested using a Shapiro-Wilk test and a Fisher test, respectively. A Student's t-test was performed to compare mean diameter values. All statistical tests were conducted using XLSTAT (v. 19.7) or a utility software (Anastats Scop SARL, Rilly-sur-Vienne, France).

#### 2.5. Spore protein extraction and electrophoresis

Aliquots of 1 mL of spores (approx.  $10^7$  spores/mL, depending on the batch) were centrifuged at 5,000 g for 10 min at 4 °C. Spores were resuspended in 1 mL of extraction buffer composed of 50 mM Tris-HCl buffer pH 7.5, 1 X protease inhibiting cocktail (cOmplete™ mini Protease inhibitor cocktail EDTA-free Roche, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) and 5 mM EDTA pH 8.0 (UltraPure™ 0.5 M EDTA, ThermoFisher Scientific,

Villebon sur Yvette, France). Spores were lysed using 0.1 mm-diameter silica beads (MP biomedical, Illkirch, France) in a Fast-Prep 120 machine (FastPrep® FP120 Cell Disrupter, Thermo Savant). A series of 20 to 25 runs of 45s at the maximal speed of 6.5 were performed until complete lysis of spores, as observed under phase contrast microscope. Samples were placed on ice for 1 min between each run to prevent protein degradation by over-heating. Proteins were quantified using a colorimetric method based on the Bradford dye-binding assay (Bradford, 1976) following the manufacturer's instructions (Bio-Rad protein assay, Life Science, Marnes-la-Coquette, France). Extracted proteins were mixed with 1X Laemmli buffer (Bio-Rad, Life Science, Marnes-la-Coquette, France) in which 2.5 %  $\beta$ -mercaptoethanol was added, and heated at 100 °C for 10 min. A short migration of the proteins was carried out on a 12 %-polyacrylamide gel using the following program: 20 min at 90 V and 150 V to obtain a 5 mm-length migration. The gel was stained with imperial blue (Imperial™ Protein Stain, Thermo Fisher Scientific, Villebon sur Yvette, France), destained overnight in water and each lane was cut in 3 mm-squares for subsequent proteomic analysis.

## 2.6. LC-MS/MS analysis

To remove di-sulfide bridges, spore proteins from gel slices were reduced with 10 mM dithiothreitol at 56 °C for 30 min and were alkylated with 50 mM iodoacetamide at room temperature for 45 min in the dark. A trypsin digestion was performed overnight at 37 °C, using a trypsin ratio/protein of 1/50 (w/w). A second extraction step was performed on the gels in a 50 %-acetonitrile (ACN) / 50%-TriFluoroacetic acid (TFA). A third extraction was performed in pure acetonitrile. Finally, samples were dried using a SpeedVac device and stored at – 20 °C.

Dried samples were re-suspended in loading buffer composed of 2 %-ACN and 0.08 %-TFA. All the samples were prepared at a final concentration of 40 ng/ $\mu$ L and were analysed by LC-MS/MS analysis. A volume of 4  $\mu$ L was injected on a 25-cm C18 Q-Exactive Plus column coupled with an Exigene nano-HPLC. Two mobile phases were used: i) buffer A composed of 0.1%-formic acid in water and ii) buffer B composed of ACN and 0.1 %-TFA. Runs were 75 min-long and a 75-min blank was performed between each sample tested.

Data were converted to mzXML format using MS convert (ProteoWizard v 3.0.8934). The spectra generated were searched using two softwares developed by the PAPPSO platform (<http://pappso.inra.fr/bioinfo/>). The softwares used in this study were X!Tandem Piledriver

(v2015.04.01.1) and X!Tandem Pipeline (v 3.4.2 “Elastine Durcie”). To eliminate the spectra due to contaminants, data were confronted to a contaminant database. The identification of spectra was carried out by confronting the results with the UniprotKB *Moorella thermoacetica* ATCC 39073 database containing 2452 entries (<http://www.uniprot.org/ptomes/UP000007053>, last update on June 2017). Results were normalized using the following equation:

$$n \times \left(\frac{Ms}{Ts}\right)$$

Where n refers to the number of spectra identified per protein in the sample, Ts referring to the total number of spectra per sample and Ms referring to the mean sum of spectra number identified for all samples. To determine whether protein abundance differed significantly according to sporulation temperature, an ANOVA test was performed on normalized data obtained by spectral counting for each protein for the two tested conditions, with a *p*-value of 0.05.

## 2.7. Identification of spore-associated proteins

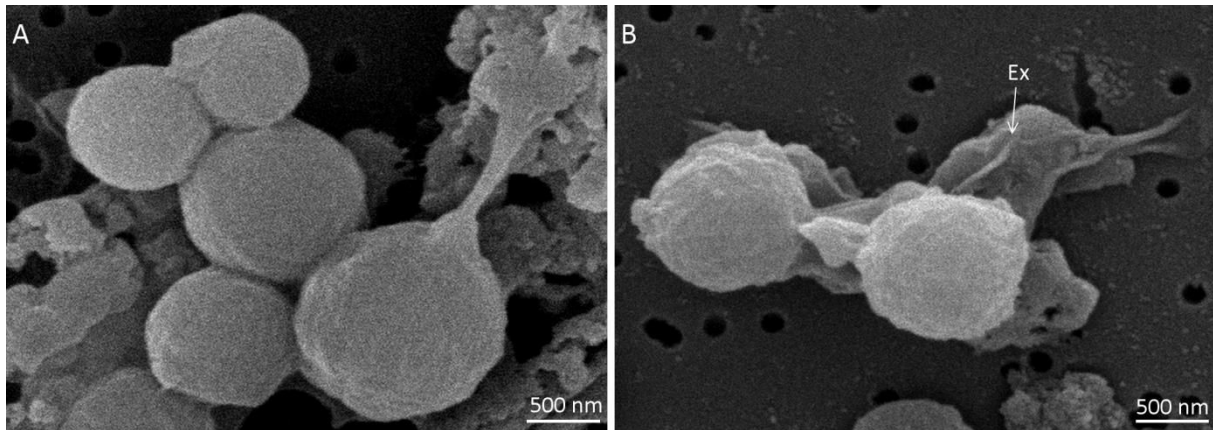
The amino acid sequences of spore-associated proteins from several spore-forming species (Abhyankar *et al.*, 2011, Abhyankar *et al.*, 2013, Díaz-González *et al.*, 2015, Stewart, 2015, Xiao *et al.*, 2015) were blasted using the Blasp-P tool (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) against *M. thermoacetica* ATCC 39073 genome. To define a “hit”, we considered several criteria i.e. % of identity or homology, % of protein cover and a minimal E-value of  $2.00 \times 10^{-6}$ .

## 3. Results

### 3.1. Spore surface structure

*M. thermoacetica* spores produced at 55 °C and 45 °C were observed by SEM (with n=78 and n=73 spores, respectively from 4 batches at each temperature).

Spores produced at the optimal growth temperature (i.e. 55 °C) appeared spherical and highly heterogeneous in terms of size (Figure 1A).



**Figure 1: *Moorella thermoacetica* strain ATCC 39073 spores observed by scanning electron microscopy.** Spores were produced on MLA plates at 55 °C. Figure 1A represents spores of different sizes which have a smooth surface; Figure 1B represents two spores which have a large and loose structure corresponding to the exosporium around their surface, as indicated by the arrow.

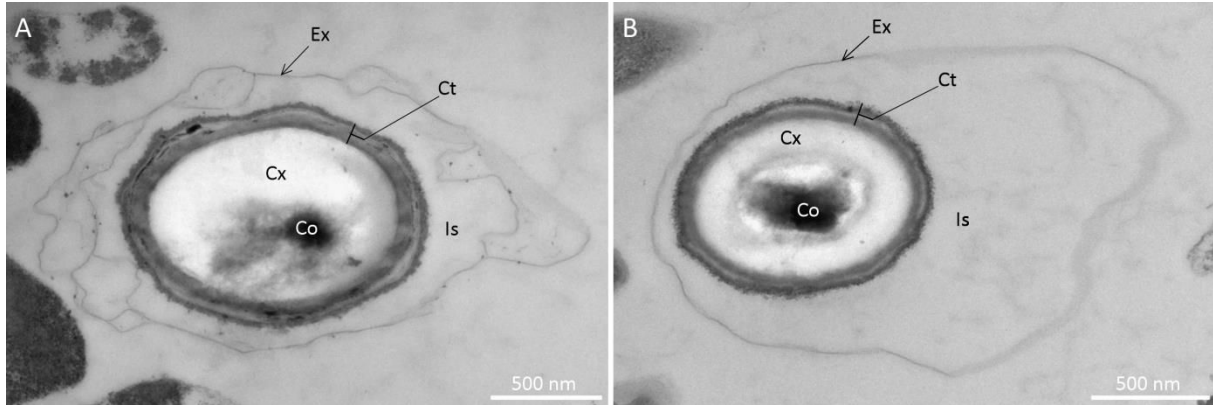
Indeed, spore diameter ranged from 0.87 to 1.65  $\mu\text{m}$  with an average size of  $1.2 \pm 0.1 \mu\text{m}$ . Spores produced at 45 °C exhibited the same morphology (data not shown). However, they were significantly smaller ( $p < 0.05$ ) with a diameter ranging from 0.85 to 1.46  $\mu\text{m}$  and an average size of  $1.1 \pm 0.1 \mu\text{m}$ . A large and loose structure was observed all around the spores (Figure 1B). This structure, which is assumed to be the exosporium, was more easily distinguished when spores were formed at 45 °C. The spore surface structure did not seem to differ according to sporulation temperature.

### 3.2. Spore ultrastructure

*M. thermoacetica* spores produced at 55 °C and 45 °C were observed by TEM (with  $n = 39$  and  $n = 45$  spores, respectively from 4 independent batches). Spores produced at 55 °C were characterized, from the inner to the outer structure, by the presence of a core, a cortex and the coat surrounded by a large and loose structure, the exosporium which appeared to be separated from the coat by an interspace (Figure 2A). The exosporium was systematically observed whatever the sporulation temperature. The global structure of spores produced at



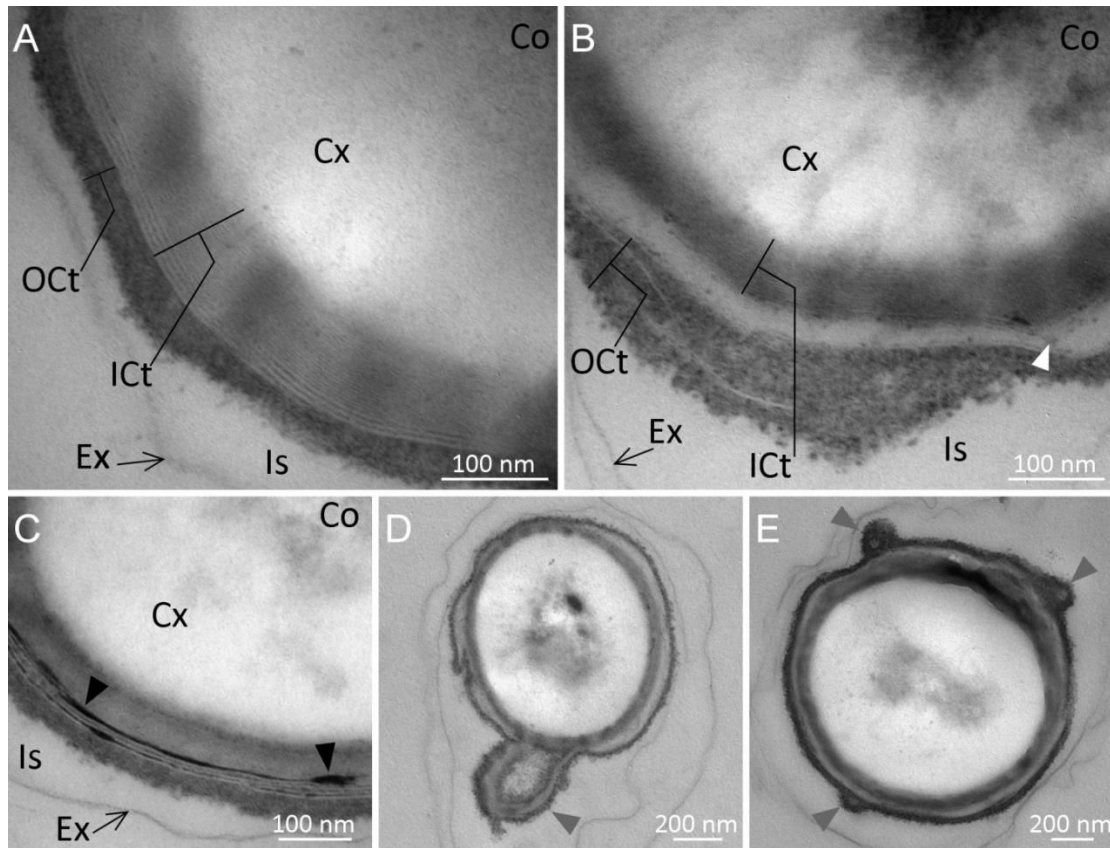
45 °C was very similar (Figure 2B), however, the limit between the core and the cortex layer was more easily observed than in spores produced at 55 °C (Figures 2A and 2B).



**Figure 2: Ultrastructure of *Moorella thermoacetica* strain ATCC 39073 spores produced at 55 °C (A) and 45 °C (B) on MLA plates, observed by transmission electron microscopy. Ex: exosporium, Is: interspace, Ct: coat, Cx: cortex, Co: core.**

Two types of spores were observed whatever the temperature: i) spores with a lamellar inner coat in direct contact with a thinner, electron-dense and diffuse outer coat layer (Figure 3A) and we mainly observed this structure in spores produced at 55 °C (30 spores out of the 45 observed); ii) spores exhibiting the same inner and outer coat layers, which seemed to be separated by a less electron-dense zone (Figure 3B), this type was mainly observed in spores produced at 45 °C (34 spores out of the 39 observed).

Moreover, we sometimes observed the presence of highly electron-dense material accumulated in the inner spore coat layer either surrounding the spore or present as small deposits (Figure 3C).



**Figure 3: Coat structure of *Moorella thermoacetica* spores produced at 45 °C (panels B, D and E) and at 55°C (panels A and C).** Two types of spores were obtained in the study whatever the sporulation temperature (panels A and B). Spore coat on panel A is made of an inner lamellar layer in direct contact with a dense and diffuse outer coat while spore inner and outer coat on panel B are separated from each other by a low less electron-dense zone (white arrow). Panel C shows electron-dense deposits often observed in the inner spore coat of spores produced at 55 °C (black arrows). Outer and inner spore coat misarrangements are shown on panels D and E (grey arrows). Ex: exosporium, IS: interspace, Ct: coat, Cx: cortex, Co: core.

These structures were more frequently observed in spores produced at 55 °C than at 45 °C (18 and 2 spores, respectively). Moreover, some spores exhibited misarranged coat, which were loosely attached to the spore surface at some points, with outer coat forming prominences (Figure 3D) or the outer coat and part of the inner coat partially detached from the spore surface (Figure 3E). These misarrangements were more frequently observed in spores produced at 45 °C than at 55 °C (17 out of the 39 observed spores and 9 out of 45 spores, respectively).

### 3.3. Identification of spore proteins in *M. thermoacetica* ATCC 39073

To identify spore proteins, amino-acid sequences of spore proteins described in *C. difficile*, *C. perfringens*, *B. subtilis*, *B. cereus* and *B. anthracis* were blasted against *M. thermoacetica* ATCC 39073 genome database. We mainly focused on proteins from the coat and exosporium layers, as well as proteins described as being involved in spore resistance properties. We searched for the presence/absence of about 200 putative spore proteins (Table 1, Table S1 and S2). A total of 62 proteins were identified as putative orthologs in *M. thermoacetica* genome (Table 1 and S1), with 53 proteins corresponding to proteins known to be localized in the coat, exosporium or spore membranes in other spore-formers.

Among proteins associated to the exosporium, we identified orthologs of two *C. difficile* rubrerythrins as well as orthologs of CD0116, CD0117, CD0118 which might play a role in oxidative stress resistance (Das *et al.*, 2001, Gil *et al.*, 2017). A putative alanine racemase encoded by moth\_2167 was found as well as two putative arginases. Among proteins associated to the coat, an ortholog of the morphogenetic protein SpoIVA which is necessary for the proper assembly of the inner coat of *B. subtilis* was encoded by the moth\_1319 gene. Among structural coat proteins, we found orthologs of the inner coat layer proteins CotJB and CotJC, a putative CotSA ortholog as well as two coatF-containing proteins. One of these proteins, encoded by moth\_1782 gene, was identified according to the genome annotation and blastP search against *Clostridium* proteins confirmed that this protein is likely to correspond to an unidentified coat protein. The second coat F-containing protein, encoded by moth\_2016 gene, is homolog to a putative uncharacterized protein YhcQ of *B. subtilis*. Besides, we found ortholog of a YabG protease associated to spore coat protein modification (Takamatsu *et al.*, 2000). Among spore coat proteins, we also identified a superoxide dismutase protein which is thought to play a potential role in spore resistance to hydrogen peroxide (Gil *et al.*, 2017). Other putative spore coat proteins were found such as the spore cortex-lytic hydrolases YaaH and YdhD but also several proteins whose role has not been described so far, such as YkvN or YhxC.

**Table 1: Spore-related proteins identified in *Moorella thermoacetica* strain ATCC 39073**

<i>M. thermoacetica</i> ATCC 39073 locus encoding the protein	Protein ID (Uniprot) <sup>a</sup>	<i>Moorella thermoacetica</i> protein identification <sup>a</sup>	Putative protein name <sup>b</sup>	Putative localization <sup>c</sup>
moth_1518	Q2RIB2	Sulfide dehydrogenase (Flavoprotein) subunit SudB	-	Exosporium
moth_1286	Q2RIY9	Rubrerythrin	Rbr	Exosporium
moth_1879	Q2RHB0	Rubrerythrin	Rbr	Exosporium
moth_0602	Q2RKV7	Uncharacterized protein	-	Exosporium
moth_1747	Q2RHP1	Uncharacterized protein	Arginase	Exosporium
moth_1815	Q2RHH4	Agmatinase	Arginase	Exosporium
moth_2167	Q2RGI3	Alanine racemase	Alr	Exosporium
moth_1405	Q2RIM1	Nucleoside recognition	FeoB	Exosporium
moth_1683	Q2RHV4	Cation diffusion facilitator family transporter	-	Exosporium
moth_0034	Q2RMG5	2-oxoglutarate synthase	-	Exosporium
moth_0033	Q2RMG6	Pyruvate flavodoxin/ferredoxin oxidoreductase-like protein	-	Exosporium
moth_0035	Q2RMG4	2-oxoacid:acceptor oxidoreductase, gamma subunit, pyruvate/2-ketoisovalerate	-	Exosporium
moth_0266	Q2RLT8	Enolase	Eno	Coat/exosporium
moth_0837	Q2RK85	Stage V sporulation protein D	SpoVD	Coat/exosporium
moth_2301	Q2RG51	Kynurenine formamidase	-	Coat/exosporium
moth_0739	Q2RKI2	Polysaccharide deacetylase	YlxY or Pda or PdaB	Coat/exosporium
moth_1414	Y1414_MOOTA	UPF0597 protein moth_1414	-	Coat/exosporium
moth_0738	Q2RKI3	Peptidase M1, membrane alanine aminopeptidase	-	Coat/exosporium
moth_1693	Q2RHU4	Protein translocase subunit YajC	YajC	Coat/exosporium
moth_1319	Q2RIV7	Stage IV sporulation protein A (Coat morphogenetic protein SpoIVA)	SpoIVA	Innermost protein of the spore coat basement
moth_1782 <sup>d</sup>	Q2RHK6	CoatF	-	Coat
moth_1059	Q2R JL6	Peptidase M16-like protein	YmxG	Coat
moth_1391	Q2RIN5	Spore coat peptide assembly protein cotJB	CotJB	Inner coat
moth_1392	Q2RIN4	Manganese containing catalase	CotJC	Inner coat
moth_0257	Q2RLU7	HAD-superfamily hydrolase subfamily IIB	YhaX	Spore coat basement
moth_1069	Q2RJK6	Ribonuclease J (RNase J)	RnjA	Coat
moth_2016	Q2RGX7	CoatF	YhcQ	Coat
moth_1365	Q2RIR1	Glycosyl transferase, group 1	CotSA	Coat
moth_1126	Q2RJE9	Amino acid ABC transporter substrate-binding protein, PAAT family	TcyA (YckK)	Coat
moth_1016	Q2RJQ9	Catalase	CotG	Coat
moth_1693	Q2RHU4	Protein translocase subunit YajC	YajC	Coat
moth_1916	Q2RH73	Superoxide dismutase	SodF	Coat
moth_0056	Q2RME4	Uncharacterized protein	YabG	Coat
moth_0373	Q2RLI2	Putative transcriptional regulator	YkvN	Coat

<i>M. thermoacetica</i> ATCC 39073 locus encoding the protein	Protein ID (Uniprot) <sup>a</sup>	<i>Moorella thermoacetica</i> protein identification <sup>a</sup>	Putative protein name <sup>b</sup>	Putative localization <sup>c</sup>
moth_0426	Q2RLD2	Short-chain dehydrogenase/reductase SDR	YhxC	Coat
moth_0517	Q2RL42	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase	-	Coat
moth_0527	Q2RL32	Trigger Factor	-	Coat
moth_0063	Q2RMD7	Glycoside hydrolase, family 18	YaaH or YdhD	Inner coat (YaaH) Coat (YdhD)
moth_0088	Q2RMB2	Uncharacterized protein	YabP	Outer membrane
moth_1357 <sup>e</sup> moth_1058	Q2RIR9 Q2RJL7	Serine-type D-Ala-D-Ala carboxypeptidase	DacB	Cortex
moth_0201	Q2RM03	Propeptide, PepSY and peptidase M4	YpeB	Inner membrane
moth_1499	Q2RID1	Serine-type D-Ala-D-Ala carboxypeptidase	DacF	Inner membrane
moth_0887	Q2RK35	ATPase, E1-E2 type	AtcL	Inner membrane
moth_0734 moth_0054 moth_0202	Q2RKI7 Q2RME6 Q2RM02	Cell wall hydrolase	SleB	Outer surface of the inner spore membrane
moth_1358	Q2RIR8	Uncharacterized protein	GerW/YtfJ	Inner membrane
moth_0926	Q2RJZ6	Germination protease (GPR endopeptidase) (Germination proteinase) (Spore protease)	Gpr	Inner membrane
moth_2417 moth_0736	Q2RFU0 Q2RKI5	Peptidase S1 and S6, chymotrypsin/Hap	YyxA	Inner membrane
moth_0925	Q2RJZ7	Small acid-soluble spore protein, alpha/beta type	SspA	Core
moth_0806 <sup>f</sup>	Q2RKB5	Small, acid-soluble spore protein, alpha/beta family	SspF	Core
moth_1875 <sup>f</sup>	Q2RHB4	Small, acid-soluble spore protein	SASP	Core
moth_2056	Q2RGT7	ND	YqiG	ND
moth_1272	Q2RJ03	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase	CwIC	ND
moth_1828	Q2RHG1	Uncharacterized protein	YckD	ND
moth_1059	Q2RJL6	Peptidase M16-like protein	YmxG	ND
moth_1356 <sup>f</sup>	Q2RIS0	Nucleoside recognition	spmA	ND
moth_1355 <sup>f</sup>	Q2RIS1	Nucleoside recognition	spmB	ND
moth_1064 <sup>f</sup>	Q2RJL1	Alanine dehydrogenase/PNT-like protein	spoVFA	ND
moth_1065 <sup>f</sup>	Q2RJL0	Flavoprotein	spoVFB	ND

<sup>a</sup> Information from UniProtKB database

<sup>b</sup> All the proteins were identified by Blast-P from spore coat and/or exosporium of *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. anthracis* and *C. difficile*.

<sup>c</sup> Data obtained from Abhyankar *et al.*, 2011 ; Abhyankar *et al.*, 2013 ; Paredes-Sabja *et al.*, 2014 ; Diaz *et al.*, 2015 ; Stewart, 2015 ; Abhyankar *et al.*, 2016 ; *Subtiwiki* (<http://subtiwiki.uni-goettingen.de/>)

<sup>d</sup> Protein annotated as CoatF-containing protein in *Moorella* genome, low homology with spore coat proteins of *B. subtilis*.

<sup>e</sup> Amino acid sequences encoded by moth\_1058 and moth\_1357 are highly similar. *dacB* is described as being in operon with *spmA* and *spmB*. Thus, the moth\_1357 locus is more likely to encode *DacB*

<sup>f</sup> Other spore-related proteins playing a role in spore resistance

ND: precise localization not determined

In this *in silico* analysis, we also identified proteins which are not described as coat or exosporium proteins but were isolated from spore coat and/or exosporium fractions in other spore-formers. Among them, we found orthologs of proteins involved in germination such as Gpr, SleB or YpeB as well as an ortholog of the DacB protein which modifies the degree of glycan strands cross-linking in the cortex (Popham *et al.*, 1995a). Finally, we also identified 6 proteins corresponding to orthologs of  $\alpha/\beta$ -SASPs described as playing a role in spore resistance, as well as the proteins SpmA, SpmB, SpoVFA and SpoVFB which are involved in the spore core hydration (Tennen *et al.*, 2000, Raju *et al.*, 2007, Paredes-Sabja *et al.*, 2008b, Paredes-Sabja *et al.*, 2008c).

### 3.4. Proteomic analysis

A proteomic analysis was performed on total protein extracts of *M. thermoacetica* ATCC 39073 spores produced at 45 °C and 55 °C, allowing the identification of a total of 1018 proteins, with 128 proteins annotated as uncharacterized proteins (Table S3).

Among the 62 proteins identified by our *in silico* analysis as sporal proteins, 24 proteins were identified by LC-MS/MS and their relative abundance between the two sporulation conditions was determined (Table 2). Based on the localization reported for other spore-forming bacteria, we found 7 proteins corresponding to putative exosporium-related proteins, 14 putative coat proteins while 3 proteins were putatively localized in the core, the inner membrane or had no assigned localization, respectively (Table 2).

Nineteen proteins were identified in both spores produced at 45 °C and 55 °C. Three out of 19 were significantly more abundant when spores were produced at 55 °C: an exosporium protein (UniProt ID: Q2RIB2) as well as three coat proteins Q2RHK6, Q2RIN4 and Q2RJL6 corresponding to one coat-F containing protein, CotJC and YmxG, respectively (Table 2). Indeed, an average of  $53 \pm 4.6$  and  $32 \pm 4.6$  spectra was detected for the protein Q2RIB2 for spores produced at 55 °C and 45 °C, respectively. Besides,  $8.3 \pm 4.7$  and  $1.7 \pm 1.5$  spectra allowed the identification of the CotJC protein for spores produced at 55 °C and 45 °C, respectively. Moreover, an average of  $9.7 \pm 3.2$  and  $2.3 \pm 2.1$  spectra were detected for Q2RHK6 protein when spores were produced at 55 °C and 45 °C, respectively while  $8.3 \pm 1.2$  and  $2.3 \pm 0.6$  spectra corresponding to a putative YmxG protein were detected in spores produced at 55 °C and 45 °C, respectively.

**Table 2: Spore proteins identified in *Moorella thermoacetica* ATCC 39073 proteome of spores produced at 55 °C and 45 °C.**

Locus encoding the protein	Protein ID (UniProt) <sup>a</sup>	Putative protein <sup>b</sup>	Hypothetical function <sup>c</sup>	Putative localization <sup>c</sup>	Mean normalized spectral counting 55 °C (n = 3)	Mean normalized spectral counting 45 °C (n = 3)	p-value
moth_1518	Q2RIB2	-	-	Exosporium	53 ± 4.6	32 ± 4.6	0.002
moth_1815	Q2RHH4	Arginase	-	Exosporium	1.3 ± 1.2	2.7 ± 1.2	0.01
moth_0266	Q2RLT8	Eno	-	Coat/exosporium ?	46 ± 6.5	53 ± 7.2	0.49
moth_2167	Q2RGI3	Alr	Spore coat alanine racemase, protection of the spore	Coat/Exosporium?	8.0 ± 1.0	4.0 ± 1.0	0.19
moth_1286	Q2RIY9	Rbr	Likely to play a role in spore resistance	Exosporium	30 ± 4.5	41 ± 3.0	0.11
moth_1879	Q2RHB0	Rbr	Likely to play a role in spore resistance	Exosporium	20 ± 3.2	21 ± 2.3	0.91
moth_0602	Q2RKV7	-	-	Exosporium	2.7 ± 1.2	3.3 ± 1.5	0.84
moth_1693	Q2RHU4	YajC	-	Coat/exosporium	0.7 ± 0.6	2.3 ± 2.3	0.28
moth_1782	Q2RHK6	-	-	Coat	9.7 ± 3.2	2.3 ± 2.1	0.004
moth_1059	Q2RJL6	YmxG	-	Coat	8.3 ± 1.2	2.3 ± 0.6	0.02
moth_1016	Q2RJQ9	CotG	-	Coat	2.3 ± 0.6	0.7 ± 1.2	0.28
moth_1916	Q2RH73	SodF	Detoxication of oxygen radicals	Coat	2.3 ± 2.1	0 ± 0	0.03
moth_1319	Q2RIV7 <sup>d</sup>	SpoIVA	Anchors the spore coat to the spore surface via SpoVM	Innermost protein of the spore coat basement	41 ± 6.6	21 ± 12	0.0007 <sup>d</sup>
moth_1391	Q2RIN5	CotJB	-	Inner coat	0.7 ± 1.2	0 ± 0	0.29
moth_1392	Q2RIN4	CotJC	May protect against oxydative stress	Inner coat	8.3 ± 4.7	1.7 ± 1.5	0.004
moth_0257	Q2RLU7	YhaX	Protection of the spore	Spore coat basement	5.7 ± 1.2	6.3 ± 1.2	0.87
moth_1069	Q2RJK6	RnjA	RNA processing	Coat	3.0 ± 0.0	3.3 ± 0.6	0.92
moth_2016	Q2RGX7	YhcQ	-	Coat	6.0 ± 1.7	2.0 ± 2.0	0.09
moth_1365	Q2RIR1	CotSA	Resistance of the spore	Coat	5.3 ± 2.9	0.0 ± 0.0	0.0002
moth_1126	Q2RJE9	TcyA (YckK)	Cystine uptake	Coat	4.0 ± 1.0	1.7 ± 1.5	0.28
moth_0034	Q2RMG5	-	ND	Coat	1 ± 1	0 ± 0	0.18
moth_0201	Q2RM03	YpeB	Germination protein, essential for SleB assembly in spores	Inner membrane	3.3 ± 3.1	0 ± 0	0.006
moth_0925	Q2RJZ7	SspA	Protection of spore DNA	Core	5.0 ± 1.0	2.7 ± 1.2	0.38
moth_2056	Q2RGT7 <sup>d</sup>	YqiG	ND	ND	11 ± 7.6	2.7 ± 3.1	0.002


<sup>a</sup> Data obtained at UniProtKB (<http://www.uniprot.org>)

<sup>b</sup> All the proteins were identified by Blast-P from spore coat and/or exosporium of *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. anthracis* and *C. difficile*

<sup>c</sup> Data obtained from Abhyankar *et al.*, 2011 ; Abhyankar *et al.*, 2013 ; Paredes-Sabja *et al.*, 2014 ; Diaz *et al.*, 2015 ; Stewart, 2015 ; Abhyankar *et al.*, 2016 ; Subtiwiki

<sup>d</sup> Proteins that did not pass the Goodness of fit of the ANOVA statistical test

ND: protein precise localization and/or function not determined

 Proteins whose abundance varies significantly between spores produced at 45 °C and 55 °C

Five proteins were only identified for one of the sporulation temperature condition: indeed, the proteins CotSA, SodF, YpeB, CotJB as well as the protein Q2RMG5 were only identified in *M. thermoacetica* spores produced at 55 °C, with however, the difference in the relative abundance being only significant for SodF and CotSA proteins ( $p$ -value = 0.03 and 0.0002,

respectively). Although CotJB and Q2RMG5 were identified in spores produced at 55 °C, they were not abundant at 55 °C with an average of  $0.7 \pm 1.2$  and  $1 \pm 1$  spectra, respectively. Indeed, CotJB and Q2RMG5 were identified only in one and two biological replicates from spores produced at 55 °C, respectively.

The protein Q2RHH4, corresponding to a potential exosporium-related arginase, was found to be slightly more abundant for spores produced at 45 °C with  $2.7 \pm 1.2$  spectra identified while  $1.3 \pm 1.2$  spectra were detected in spores produced at 55 °C.

We also noticed a high variability of the relative abundance of some proteins, such as YpeB and the superoxide dismutase for instance, which was due (i) that the low number of spectral counting data of these proteins and (ii) the variability of spectral counting according to the protein extract considered.

## 4. Discussion

### 4.1. *M. thermoacetica* coat layers differ according to sporulation temperature

We previously showed that *M. thermoacetica* strain ATCC 39073 spores produced on solid medium at 55 °C were more resistant to wet-heat and to peracetic acid (PAA) than spores produced at 45 °C (Malleck *et al.*, 2018). Thus, we investigated if differences in spore structure and/or sporal protein composition were observed between spores formed at the two sporulation temperatures.

We observed spores formed at two temperatures using SEM and TEM microscopy to characterize the surface and ultrastructure of *M. thermoacetica* spores. To our knowledge, we showed the first SEM images to describe *M. thermoacetica* spore surface features. These SEM observations showed that the spores were spherical and had a similar shape when produced at 45 °C and 55 °C. Nonetheless, spores produced at the optimal temperature were significantly bigger than spores produced at 45 °C as also reported for *B. weihenstephanensis* (Garcia *et al.*, 2010). Besides, we observed a loose structure at their surface, whatever the sporulation temperature. We assumed this structure to be an exosporium layer.

Observations using TEM showed that *M. thermoacetica* spores exhibited layers classically described in bacterial endospores, i.e. the cortex, the coat and a large exosporium surrounding the spores. The presence of an exosporium is a feature that has already been described for



spores of another *M. thermoacetica* strain (Byrer *et al.*, 2000). The exosporium of *M. thermoacetica* ATCC 39073 spores did not appear tightly associated to the coat, which is different from *M. thermoacetica* JW/DB-2 or from *C. difficile* spores where coat and exosporium are in contact (Byrer *et al.*, 2000, Paredes-Sabja *et al.*, 2014). Indeed, the exosporium seemed loose and separated from the coat layers by an interspace, as observed in *B. cereus* and *B. anthracis* spores (Driks et Eichenberger, 2016). Moreover, no “hair-like” projections were discernable at the exosporium surface of *Moorella* spores, in contrast to some *C. difficile*, *C. sporogenes*, *B. cereus* and *B. anthracis* spores (Henriques et Moran Jr, 2007, Fazzini *et al.*, 2010, Paredes-Sabja *et al.*, 2014, Díaz-González *et al.*, 2015, Janganan *et al.*, 2016).

While the structure of the exosporium did not seem to differ according to the sporulation temperature, we observed that the coat structure was different. Indeed, most of the spores produced at 55 °C exhibited a coat composed of a lamellar inner coat in direct contact with a thinner and more diffuse electron-dense outer coat, while the inner and outer coat were more frequently separated by a less electron-dense intermediate layer for spores produced at 45 °C. Moreover, spore coat misarrangements were more frequently observed for spores produced at 45 °C than at 55°C. We hypothesized that the coat may be less organized when spores are produced at the low limit sporulation temperature. In line with this, we also noticed that the spore core and cortex were more easily observed for spores produced at 45 °C. This observation might be due to a better permeation of staining inside spores produced at 45 °C and thus, to some differences in terms of structure.

These observations might be correlated to the lower resistance properties we previously reported for *M. thermoacetica* spores produced at 45 °C (Malleck *et al.*, 2018). Indeed, it was reported that *B. subtilis cotE* spores lacking most of the coat proteins were more sensitive to glutaraldehyde, lysozyme and oxidizing agents (Riesenman et Nicholson, 2000, Ghosh *et al.*, 2008, Leggett *et al.*, 2015, Leggett *et al.*, 2016). A recent study also showed that *B. cereus* spores lacking CotE exhibited coat defects and were also less resistant to lysozyme and oxidizing agent, however they were also more heat-resistant (Bressuire-Isoard *et al.*, 2016).

#### 4.2. Identification of spore protein orthologs in *M. thermoacetica* ATCC 39073

As some differences were noticed in this study in terms of coat structure, we analysed and compared the protein composition of *M. thermoacetica* spores produced at 55 °C and 45°C. We chose to focus our data analysis on spore coat and exosporium proteins described in other species and on proteins linked to spore resistance properties.

As *M. thermoacetica* ATCC 39073 genome is poorly annotated concerning these proteins, we first searched for orthologs for about 200 proteins previously retrieved from coat or exosporium fractions in other spore-formers and identified about 25 % of them in *M. thermoacetica* (Abhyankar *et al.*, 2011, Abhyankar *et al.*, 2013, Díaz-González *et al.*, 2015, Stewart, 2015).

None of the morphogenetic proteins described as components of *B. cereus* or *B. anthracis* exosporium, such as ExsA, ExsY, CotY, BxpB, ExsM and ExsFB were identified in *M. thermoacetica* genome (Johnson *et al.*, 2006, Henriques et Moran Jr, 2007, Fazzini *et al.*, 2010, Stewart, 2015). Even though we identified putative orthologs of several *C. difficile* exosporium proteins, the exosporium morphogenetic CdeC, CdeM or BclA proteins (see also Table S2) were not identified (Díaz-González *et al.*, 2015, Stewart, 2015). As TEM images clearly showed the presence of a large exosporium surrounding *M. thermoacetica* spores, we hypothesize that *Moorella* exosporium proteins are different from other spore-formers, including the more closely related *Clostridium* species. Indeed, the spore surface proteins are thought to undergo the greatest evolutionary adaptation according to the ecological niches in which bacteria thrive (Henriques et Moran Jr, 2007).

The *in silico* analysis allowed to identify an ortholog of the well-conserved inner coat morphogenetic SpoIVA (de Hoon *et al.*, 2010, Galperin *et al.*, 2012, Abecasis *et al.*, 2013). However, it also showed that no sequences matched those of the morphogenetic coat proteins SafA and CotE which are essential for the assembly of the coat basement layer and the outer coat layer respectively in *B. subtilis* and *B. cereus* spores (Henriques et Moran Jr, 2007, Bressuire-Isoard *et al.*, 2016). This observation is consistent with the fact that these proteins are not conserved in Clostridia (Henriques et Moran Jr, 2007, de Hoon *et al.*, 2010, Galperin *et al.*, 2012). Besides, the recently described spore coat morphogenetic protein SipL interacting with SpoIVA in *C. difficile* was not identified either (Putnam *et al.*, 2013). This SipL protein is thought to be a homolog of the *B. subtilis* spore coat morphogenetic protein

SpoVID which does not seem to be conserved in *M. thermoacetica* as reported for Clostridia (Henriques et Moran Jr, 2007, Galperin *et al.*, 2012). Recently, it was hypothesized that the *C. difficile* CotA protein could play a role similar to *Bacillus* CotE protein in the outer spore coat assembly (Permpoonpattana *et al.*, 2013), yet the *in silico* analysis did not allow the identification of a CotA ortholog either.

Apart from spore coat morphogenetic proteins, few coat proteins were identified by the *in silico* analysis. Among the proteins known to be associated to the inner coat, we identified CotJB and CotJC. Interestingly, the CotJA protein could not be identified whereas these 3 proteins are described as encoded by the tricistronic operon *cotJA-cotJB-cotJC* in *Bacillus*. However, a genome comparative study tended to show that CotJA, CotJB and CotJC orthologs are not always found together (de Hoon *et al.*, 2010). A YhaX ortholog corresponding to a spore-coat basement protein was also identified as well as a *C. difficile* CotG catalase ortholog (Permpoonpattana *et al.*, 2013). However, we found no ortholog in *M. thermoacetica* genome of the *B. subtilis* CotG which exerts a negative role on CotU, CotC and CotS assembly (Saggese *et al.*, 2016). These 3 coat proteins were also absent in the genome.

Several genes encoding orthologs of inner membrane proteins were present in *M. thermoacetica* such as 3 putative spore cortex lytic enzymes SleB and an YpeB protein essential for SleB assembly. We also identified orthologs of two other widely conserved germination proteins Gpr and YtfJ/GerW (Abecasis *et al.*, 2013). Moreover, we found two serine-type D-Ala-D-Ala carboxypeptidases corresponding to putative orthologs of DacB which is involved in peptidoglycan cross-linking (Popham *et al.*, 1995a, Paredes-Sabja *et al.*, 2008c, Zhang *et al.*, 2012). Indeed, the first and second hits found by BlastP correspond to Q2RIR9 (moth\_1058) and Q2RJL7 (moth\_1357), respectively. It has been reported that the *B. subtilis* *dacB* gene is organized in operon with *spmA* and *spmB* while *dacB* is monocistronic in *C. perfringens* (Paredes-Sabja *et al.*, 2008c). In *M. thermoacetica*, *SpmA* and *SpmB* are encoded by moth\_1356 and moth\_1355 respectively. As the two proteins Q2RIR9 and Q2RJL7 were similar, we considered them as two potential DacB. Interestingly, we identified several orthologs encoding proteins thought to play a role in the spore resistance such as an alanine racemase Alr, the coat protein SodF which is associated to a potential resistance to oxidizing agents and two potential exosporium-related rubrerythrins. Nonetheless, the CotA protein, associated to resistance to oxidizing chemicals in *B. subtilis* was not identified in *Clostridia* as already mentioned (Henriques et Moran Jr, 2007).

We also identified orthologs for all the spore resistance-associated proteins localized in the inner spore layers. Indeed, we identified 2 proteins corresponding to  $\alpha/\beta$ -type SASPs SspA and SspF. Indeed, several studies have shown that  $\alpha/\beta$ -type SASPs play a major role in spore DNA protection against UV-C and genotoxic chemicals in Bacilli and Clostridia (Raju *et al.*, 2007, Paredes-Sabja *et al.*, 2008b, Setlow, 2014a). We also found orthologs of the two conserved proteins SpmA and SpmB, which play an essential role in spore core hydration level (Popham *et al.*, 1995a, Popham *et al.*, 1995b, Paredes-Sabja *et al.*, 2008c, Abecasis *et al.*, 2013, Setlow, 2014a). We identified SpoVFA and SpoVFB orthologs essential for DPA production and thus involved in spore resistance. Indeed, DPA chelates with  $\text{Ca}^{2+}$  to form Ca-DPA which is imported into the forespore core thus lowering the spore water content (Leggett *et al.*, 2012). Ca-DPA was shown to play a role in spore resistance to heat but also to chemicals (Setlow *et al.*, 2006, Paredes-Sabja *et al.*, 2008d, Gil *et al.*, 2017).

#### 4.3. Proteins extracted from *Moorella thermoacetica* ATCC 39073 spores differ according to sporulation temperature

We showed that *M. thermoacetica* spore structure, and more precisely coat layers arrangement, seemed to be modified according to sporulation temperature. We investigated if the differences we observed in the coat structure could be due to a difference in terms of protein composition.

A proteomic analysis allowed the identification of 1, 018 proteins, which were not only spore proteins. Indeed, *Moorella* spore suspensions also contained debris from vegetative cells, because of a quite low sporulation efficiency, as already reported for another *M. thermoacetica* strain, with only 5 % of the cells forming spores (Aoyama, 2014), and despite purification steps after spore harvesting. Thus, we focused on the data related to the putative spore structural proteins which we previously identified *in silico*.

Among the 62 spore proteins identified in *M. thermoacetica* ATCC 39073 genome, 24 were detected by LC-MS/MS analysis. We found 7 proteins potentially associated to the exosporium layer, such as the two rubrerythrins Rbr encoded by the moth\_1286 and moth\_1279 loci (Gil *et al.*, 2017), as well a putative arginase (Weaver *et al.*, 2007) and an enolase. The ortholog of the uncharacterized exosporium protein encoded by the moth\_1518 locus was significantly more abundant in protein extracts from spores produced at 55 °C,

while the putative arginase encoded by the *moth\_1815* locus was significantly less abundant in protein extracts from spores produced at 55 °C.

Among the 14 putative coat proteins retrieved, the coat morphogenetic protein SpoIVA appeared to be more abundant in protein extracts from spores produced at 55 °C than at 45°C ( $p$ -value < 0.05). Here, we reported that spores produced at 45 °C exhibited more coat misarrangement as observed by TEM. As SpoIVA is essential for coat formation (Henriques et Moran Jr, 2007), it is tempting to hypothesize that SpoIVA might be more abundant in spores produced at 55 °C thus allowing a better cohesion of the spore coat. However, we cannot rule out the possibility that SpoIVA is as abundant in spores produced at 55 °C and 45 °C but is more readily extracted from spores produced at 55 °C. Moreover, we cannot conclude for this protein abundance as the distribution of the data did not fit a normal distribution. Thus, it would be interesting to perform further analysis of *M. thermoacetica* spore protein composition at both temperatures to check if more SpoIVA is indeed extracted from spores produced at 55 °C.

Four spore coat proteins were more abundant in protein extracts from spores produced at the optimal temperature, such as the coat-F containing protein encoded by the *moth\_1782* locus. The inner coat protein CotJC was also more abundant in the samples obtained from spores produced at the optimal temperature while CotSA and SodF were only detected in spores produced at 55 °C. It was hypothesized that the superoxide dismutase SodF likely plays a role in polymerizing spore coat protein monomers by oxidative cross-linking in the presence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in *C. difficile*, while CotJC might also play a role in resistance to oxidative stress, however, their protective role remains to be elucidated (Henriques et Moran Jr, 2007, Permpoonpattana *et al.*, 2013). As SpoIVA, these proteins could be more readily extracted in spores produced at 55 °C. If SodF and CotJC indeed play a protective role and are more abundant, this might explain at least partially the higher resistance of *M. thermoacetica* spores to peracetic acid when they are produced at 55 °C compared to spores produced at 45 °C.

Altogether, we reported that some proteins were relatively more abundant in spores produced at 55 °C than at 45°C, suggesting that these proteins are indeed more produced in spores formed at optimal temperature and/or that a different structuration of spores allow them to be more readily extracted. Even though our results do not allow us to determine which hypothesis is valid, they tend to show that *M. thermoacetica* spore coat composition and/or structure undergo modifications according to sporulation temperature. Our results are in agreement with recent studies which showed that the amount of extracted *B. subtilis* outer

spore coat proteins, such as CotA, CotU, CotG or CotQ as well as crust proteins, such as CotX, CotY and CotZ varied according to the sporulation conditions (Abhyankar *et al.*, 2016). It was also shown that in *B. subtilis* spores, less CotA and CotS proteins were extracted when spores were produced at high temperature (Melly *et al.*, 2002).

## 5. Conclusion

In this study, we investigated the structure and the protein composition of *M. thermoacetica* spores produced at optimal and low-limit growth temperature. Using electron microscopy, we showed that spores produced at 45 °C were smaller than those formed at 55 °C. Moreover, spores exhibited some differences observed in the inner coat structure depending on the sporulation temperature.

We showed that spore protein composition varied according to sporulation temperature and more precisely more spore coat proteins were extracted from spores produced at 55 °C. One can hypothesize that the morphological differences observed between spores produced at 55 °C and 45 °C could be due to (i) a lower abundance of structural proteins in spores produced at 45 °C leading to a more loosely arranged coat aspect and/or (ii) differences in protein cross-linking between spores produced at 45 °C and 55 °C. The differences observed in terms of protein composition and more precisely the higher abundance of SodF and some structural coat proteins in spores produced at 55 °C might be involved in the contrasted resistance properties of these spores to wet-heat and biocides. However, more work is needed to improve spore purification as well as spore insoluble protein extraction to (i) describe precisely the protein composition of *M. thermoacetica* spores and specific layers (i.e coat and exosporium for example) and (ii) see if the differences we noticed in terms of spore protein composition can be confirmed and other differences highlighted.

Besides, several parameters play a role in spore resistance to chemicals and wet-heat, such as DPA content, spore core dehydration as well as the inner membrane fatty acid content (Rose *et al.*, 2007, Planchon *et al.*, 2011, Jamroskovic *et al.*, 2016). Thus, it would be interesting to further characterize *M. thermoacetica* spores to better understand how sporulation temperature impacts *Moorella* spore resistance and also figure out why these spores exhibit such high resistance properties.

## **Acknowledgments**

This work is a part of Tiffany Malleck's PhD thesis with a financial support from the Association Nationale de la Recherche et de la Technologie (ANRT), France and FranceAgriMer (FAM). The authors thank Pr Isabelle Martin-Verstraete, Pr Mohammed Jebbar and Dr Frédéric Carlin for helpful advices. We also thank Bénédicte Doublet for providing help with protein extraction.

## Supplementary data

**Table S1: Spore coat and exosporium proteins identified in *Moorella thermoacetica* strain ATCC 39073 by *in silico* analysis.** All the amino acid sequences encoded by the loci listed in the table were blasted against *M. thermoacetica* ATCC 39073 genome.

<i>M. thermoacetica</i> locus encoding the protein <sup>a</sup>	Protein ID <sup>b</sup>	Locus <i>B. subtilis</i> <sup>c</sup>	Locus <i>B. cereus</i> <sup>c</sup>	Locus <i>C. difficile</i> <sup>c</sup>	Locus <i>B. anthracis</i> <sup>c</sup>	Locus <i>C. perfringens</i>	Protein name	Protein identification <sup>b</sup>	Protein function <sup>c</sup>	Protein localization <sup>c</sup>
moth_1518	Q2RIB2			CD1536				Ferredoxin--NADP(+) reductase subunit alpha		Exosporium
moth_1286	Q2RIY9			CD0825			Rbr	Rubrerhythrin	Likely to play a role in spore resistance	Exosporium
moth_1879	Q2RHB0			CD1524			Rbr	Putative rubrerhythrin	Likely to play a role in spore resistance	Exosporium
moth_0602	Q2RKV7			CD2434				Uncharacterized protein	ND	Exosporium
moth_1815 moth_1747	Q2RHH4 Q2RHP1				BAS0155 BAS2260		Arginase		ND	Exosporium
moth_2167	Q2RGI3	BSU17640			BAS0238		Alanine racemase	Alanine racemase 2	Spore coat alanine racemase, protection of the spore	Exosporium
moth_1405	Q2RIM1			CD1517			FeoB	Ferrous iron transport protein B	ND	Exosporium
moth_1683	Q2RHV4_ MOOTA			CD0902				Putative cation efflux protein	ND	Exosporium
moth_0034	Q2RMG5			CD0117				Putative ferredoxin/flavodoxin oxidoreductase,beta subunit	ND	Exosporium
moth_0033	Q2RMG6			CD0116				Putative ferredoxin/flavodoxin oxidoreductase,alpha subunit	ND	Exosporium



<i>M. thermoacetica</i> locus encoding the protein <sup>a</sup>	Protein ID <sup>b</sup>	Locus <i>B.</i> <i>subtilis</i> <sup>c</sup>	Locus <i>B. cereus</i> <sub>c</sub>	Locus <i>C. difficile</i> <sup>c</sup>	Locus <i>B. anthracis</i> <sub>c</sub>	Locus <i>C.</i> <i>perfringens</i>	Protein name	Protein identification <sup>b</sup>	Protein function <sup>c</sup>	Protein localization <sup>c</sup>
moth_0035	Q2RMG4			CD0118				Putative ferredoxin/ flavodoxin oxidoreductase, gamma subunit	ND	Exosporium
moth_0266	Q2RLT8			CD3170			Eno	Enolase	ND	Coat/exosporium
moth_0837	Q2RK85		BC_3915				SpoVD	Stage V sporulation protein D / Sporulation specific D,D- transpeptidase	mother-cell specific penicillin-binding protein (spore cortex)	Coat/exosporium
moth_2301	Q2RG51		BC_0395				ND	Metal-dependent hydrolase	ND	Coat/exosporium
moth_0739	Q2RKI2	BSU16700 (ylxY) BSU07980 (pdaA) BSU01570 (pdaB)		CD2598			Similar to deacetylases YlxY, PdaA, PdaB	Uncharacterized protein YlxY Peptidoglycan-N-acetylmuramic acid deacetylase PdaA Probable polysaccharide deacetylase PdaB	YlxY : similar to deacetylase PdaA : N- acetylmuramic acid deacetylase, spore cortex peptidoglycan synthesis PdaB : polysaccharide deacetylase, spore cortex formation	Coat/exosporium
moth_1414	Y1414_M OOTA			CD3232				UPF0597 protein CD630_32320	ND	Coat/exosporium
moth_0738	Q2RKI3			CD3652				Putative peptidase, M1 family	ND	Coat/exosporium

<i>M. thermoacetica</i> locus encoding the protein <sup>a</sup>	Protein ID <sup>b</sup>	Locus <i>B.</i> <i>subtilis</i> <sup>c</sup>	Locus <i>B. cereus</i> <sub>c</sub>	Locus <i>C. difficile</i> <sup>c</sup>	Locus <i>B. anthracis</i> <sub>c</sub>	Locus <i>C.</i> <i>perfringens</i>	Protein name	Protein identification <sup>b</sup>	Protein function <sup>c</sup>	Protein localization <sup>c</sup>	
moth_1693	Q2RHU4		BC_4410				YajC	Protein translocase subunit YajC	ND	Coat/exosporium	
moth_1319	Q2RIV7	BSU22800	BC_1509	CD2629			SpoIVA	Stage IV sporulation protein A (Coat morphogenesis protein SpoIVA)	Anchors the spore coat to the spore surface via SpoVM	Innermost protein of the spore coat basement	
moth_1782 <sup>d</sup>	Q2RHK6	-									Coat
moth_1059	Q2R JL6		BC_3786				ND	Zinc protease	ND	Coat	
moth_1391	Q2RIN5	BSU06900	BC_0822	CD630_05970			CotJB	Protein CotJB	ND	Inner coat	
moth_1392	Q2RIN4	BSU06910	BC_0821	CotJC1/CotCB (CD0598) CotJC2/CotD (CD2401)		CPR_0934	CotJC1	Protein CotJC	May protect against oxidative stress	Inner coat	
moth_0257	Q2RLU7	BSU09830					YhaX	Stress response protein YhaX	Protection of the spore	Spore coat basement	
moth_1069	Q2RJK6		BC_3977				RnjA	Zn dependent hydrolase RnjA	ND	Coat	
moth_2016	Q2RGX7	BSU09180					YhcQ	Spore coat protein F-like protein YhcQ	ND	Coat	
moth_1365	Q2RIR1	BSU30910					CotSA	Spore coat protein SA	Resistance of the spore	Coat	
moth_1126	Q2RJE9	BSU03610					TcyA (YckK)	L-cystine-binding protein TcyA	Cystine uptake	Coat	
moth_1016	Q2RJQ9			CD1567			CotG	Spore coat protein-manganese catalase	ND	Coat	
moth_1693	Q2RHU4	BSU27700					YrbF	Sec translocon accessory subunit YrbF	Unknown	Inner membrane	

<i>M. thermoacetica</i> locus encoding the protein <sup>a</sup>	Protein ID <sup>b</sup>	Locus <i>B.</i> <i>subtilis</i> <sup>c</sup>	Locus <i>B. cereus</i> <sub>c</sub>	Locus <i>C. difficile</i> <sup>c</sup>	Locus <i>B. anthracis</i> <sub>c</sub>	Locus <i>C.</i> <i>perfringens</i>	Protein name	Protein identification <sup>b</sup>	Protein function <sup>c</sup>	Protein localization <sup>c</sup>
moth_1916	Q2RH73	BSU19330 (SodA)	BC_1468 (SodF)	CD1631 (SodA)			SodF SodA (SodF paralogous protein)	Superoxide dismutase	Destoxication of oxygen radicals	Coat
moth_0056	Q2RME4	BSU00430	BC_0047	CD3569		CPR_2191	YabG	Sporulation-specific protease YabG	Modification of spore coat proteins	Coat
moth_0373	Q2RLI2	BSU13760					YkvN	Uncharacterized UTH-type transcriptional regulator YkvN	MarR/DUF24 family transcription regulator	Coat
moth_0426	Q2RLD2	BSU10400					YhxC	Uncharacterized protein YhxC	Similar to alcohol dehydrogenase	Coat
moth_0517	Q2RL42		BC_2207				ND	Sporulation-specific N- acetylmuramoyl_L-alanine amidase	Involved in germination	Coat
moth_0527	TIG_MO OTA		BC_4480				ND	Trigger factor	ND	Coat
moth_0063	Q2RMD7	BSU00160 (YaaH) BSU05710 (YdhD)	BC_3607 (YaaH)				YaaH or YdhD	Spore germination protein YaaH Putative sporulation-specific glycosylase YdhD (YaaH paralogous protein)	YaaH: general stress protein, survival of ethanol stress, SafA- dependent protein of the inner spore coat, spore cortex lytic enzyme YdhD: spore coat peptidoglycan hydrolase	Inner coat (YaaH) Coat (YdhD)
moth_0088	Q2RMB2	BSU00600	BC_0063			CPR_2486	YabP	Spore protein YabP	Required for sporulation at a late stage	Outer membrane

<i>M. thermoacetica</i> locus encoding the protein <sup>a</sup>	Protein ID <sup>b</sup>	Locus <i>B.</i> <i>subtilis</i> <sup>c</sup>	Locus <i>B. cereus</i> <sub>c</sub>	Locus <i>C. difficile</i> <sup>c</sup>	Locus <i>B. anthracis</i> <sub>c</sub>	Locus <i>C.</i> <i>perfringens</i>	Protein name	Protein identification <sup>b</sup>	Protein function <sup>c</sup>	Protein localization <sup>c</sup>
moth_1357* moth_1058	Q2RIR9 Q2RIL7	[BSU23190]				CPR_1770	DacB	D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase DacB (DD- carboxypeptidase) (Penicillin- binding protein 5*)	Sporulation-specific carboxypeptidase  Modifies degree of cross-linking of glycans strands in peptidoglycan	Cortex
moth_0201	Q2RM03	BSU22920	BC_2752				YpeB	Sporulation protein YpeB	Germination protein, essential for SleB assembly in spores	Inner membrane
moth_1499	Q2RID1	BSU23480	BC_4075	CD1291		CPR_1775	DacF	D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase DacF	Penicillin-binding protein I	Inner membrane
moth_0887	Q2RK35	BSU15650					AtcL	Calcium-transporting ATPase	Similar to the <i>E. coli</i> magnesium transporter	Inner membrane
moth_0734 moth_0054 moth_0202	Q2RKI7 Q2RME6 Q2RM02	BSU13930	BC_2753				SleB	Spore photoproduct lyase	Spore cortex-lytic enzyme involved in germination	Outer surface of the inner spore membrane
moth_1358	Q2RIR8	BSU29500	BC_4640 BC_2095				GerW/YtfJ	Uncharacterized protein YtfJ	Germination protein	Inner membrane
moth_0926	Q2RJZ6	BSU25540	BC_4319			CPR_2013	Gpr	Germination protease	Degradation of SASPs	Inner membrane
moth_2417 moth_0736	Q2RFU0 Q2RKI5	BSU40360					YyxA	Uncharacterized serine protease YyxA	Similar to quality control membrane serine protease HtrA	Inner membrane
moth_0925	Q2RJZ7	BSU29570		CD2688			SspA	Small, acid-soluble spore protein A	Protection of spore DNA	Core
moth_0806 <sup>f</sup>	Q2RKB5	BSU00450					SspF	Small, acid-soluble spore protein, alpha/beta family	Protection of the spore DNA	Core
moth_1875 <sup>f</sup>	Q2RHB4			CD630_322 01		CPR_1870	SASP	Small, acid-soluble spore protein		Core

<i>M. thermoacetica</i> locus encoding the protein <sup>a</sup>	Protein ID <sup>b</sup>	Locus <i>B. subtilis</i> <sup>c</sup>	Locus <i>B. cereus</i> <sup>c</sup>	Locus <i>C. difficile</i> <sup>c</sup>	Locus <i>B. anthracis</i> <sup>c</sup>	Locus <i>C. perfringens</i>	Protein name	Protein identification <sup>b</sup>	Protein function <sup>c</sup>	Protein localization <sup>c</sup>
moth_2056	Q2RGT7	BSU24210					YqiG	Probable NADH-dependent flavin oxidoreductase YqiG	ND	ND
moth_1272	Q2RJ03	BSU17410					CwIC	Sporulation-specific N-acetylmuramoyl_L-alanine amidase (Autolysin) (Cell wall hydrolase)	mother cell lysis	ND
moth_1828	Q2RHG1	BSU03400					YckD	Uncharacterized protein YckD	ND	ND
moth_1059	Q2R JL6	BSU16710					YmxG	GTP-sensing transcriptional pleiotropic repressor CodY	Control of proteolytic activity	ND
moth_1356 <sup>f</sup>	Q2RIS0	BSU23180	BC_1470				SpmA	Spore maturation protein A	Spore maturation protein, spore core dehydration, involved in germination	ND
moth_1355 <sup>f</sup>	Q2RIS1	BSU23170	BC_1471				SspmB	Spore maturation protein B	Spore maturation protein, spore core dehydration, involved in germination	ND
moth_1064 <sup>f</sup>	Q2R JL1	BSU16730	BC_3801				SpoVFA	Dipicolinate synthase subunit A (Stage V sporulation protein FA)	Dipicolinate synthase (subunit A), dipicolinic acid production	ND
moth_1065 <sup>f</sup>	Q2R JL0	BSU16740	BC_3800				SpoVFB	Dipicolinate synthase subunit A (Stage V sporulation protein FB)	Dipicolinate synthase (subunit B), dipicolinic acid production	ND

<sup>a</sup> *M. thermoacetica* ATCC 39073 database

<sup>b</sup> Informations from UniProtKB database (<http://www.uniprot.org>)

<sup>c</sup> Data from Abhyankar *et al.*, 2011 ; Abhyankar *et al.*, 2013 ; Paredes-Sabja *et al.*, 2014 ; Diaz *et al.*, 2015 ; Stewart, 2015 ; Abhyankar *et al.*, 2016 ; Subtiwiki (<http://subtiwiki.uni-goettingen.de/>)

<sup>d</sup> Protein annotated as Coat F-containing protein in *Moorella* genome, low homology with spore coat proteins of *B. subtilis*.

<sup>e</sup> Amino acid sequences encoded by moth\_1058 and moth\_1357 are highly similar. *dacB* is described as being in operon with *spmA* and *spmB*. Thus, the moth\_1357 locus is more likely to encode DacB

<sup>f</sup> Other spore-related proteins playing a role in spore resistance

ND: protein precise localization and/or function not determined

**Table S2: Spore coat and exosporium proteins not identified in *Moorella thermoacetica* strain ATCC 39073**

Locus encoding the protein	Protein	Protein identification <sup>a</sup>	Protein localization <sup>b</sup>	Protein function <sup>c</sup>
BSU11760	CotX	Spore coat protein X	Crust	Morphogenetic protein (insoluble fraction), spore crust assembly
BSU11750	CotY	Spore coat protein Y	Crust	Morphogenetic protein (insoluble fraction), spore crust assembly
BSU11740	CotZ	Spore coat protein Z	Crust	Morphogenetic protein (insoluble fraction), spore crust assembly
BSU06300	CotA	Spore coat protein A	Outer coat	Laccase, resistance of the spore
BSU36050	CotB	Spore coat protein B	Outer coat	Resistance of the spore
BSU17700	CotC	Spore coat protein C	Outer coat	Resistance of the spore
BSU36070	CotG	Spore coat protein G	Outer coat	Resistance of the spore
BSU34520	CotQ	Uncharacterized FAD-linked oxidoreductase YvdP (Spore coat protein YvdP)	Outer coat	Protection of the spore
BSU30900	CotS	Spore coat protein S	Outer coat	Resistance of the spore
BSU17670	CotU (YnzH)	Uncharacterized protein YnzH	Outer coat	Resistance of the spore
BSU13789	YkzQ	Uncharacterized protein YkzQ	Outer coat	Unknown
BSU17030	CotE	Spore coat protein E	Outer coat	Morphogenetic protein essential for the proper assembly of the outer spore coat
BSU24620	CotN	Spore coat-associated protein N	Coat-associated	Biofilm formation
BSU34530	CotR	Putative sporulation hydrolase CotR	Coat-associated	Hydrolysis of lysophospholipids
BSU30920	CotI (YtaA)	Spore coat protein I	Coat-associated	Spore envelope
BSU12050	YjdH	Uncharacterized protein YjdH	Coat-associated	Unknown
CAA74525	YhfD	ND	Coat-associated	ND
BSU10400	YhxC	Uncharacterized oxidoreductase YhxC	Coat-associated	Unknown
BSU26560	YrkC	Uncharacterized protein YrkC	Coat-associated	Protection of CotU and CotC in the mother cell, required for the assembly of several outer coat proteins
BSU08920	YhbB	Uncharacterized protein YhbB	Coat-associated	Unknown
BSU06890	CotJA	Protein CotJA	Inner coat	Polypeptide composition of the spore coat
BSU37920	GerQ (YwdL)	Spore coat protein GerQ	Inner coat	Involved in germination
BSU04110	LipC (YcsK)	Spore germination lipase LipC	Inner coat	Involved in germination
BSU18670	OxdD	Oxalate decarboxylase OxdD	Inner coat	Protection of the spore
BSU27840	SafA	SpoIVD-associated factor A	Inner coat	Morphogenetic protein, major organizer of the inner spore coat
BSU31270	Tgl	Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase	Inner coat	Introduction of crosslinks in the spore coat protein GerQ
BSU10900	YisY	AB hydrolase superfamily protein YisY	Inner coat	Protection of the spore
BSU39580	YxeE	Uncharacterized protein YxeE	Inner coat	Protection of the spore
BSU36060	CotH	Inner spore coat protein H	Inner coat	Protection of CotU and CotC in the mother cell, required for the assembly of several outer coat proteins
BSU12490	YjqC	Uncharacterized protein YjqC	Inner coat	Protection of the spore and potentially involved in coat cross-linking
BSU02600	CwIJ	Cell wall hydrolase CwIJ	Outer edge of spore cortex/inner spore coat	Involved in germination
BSU19610	YodI	Uncharacterized protein YodI	Outer membrane	Unknown

Locus encoding the protein	Protein	Protein identification <sup>a</sup>	Protein localization <sup>b</sup>	Protein function <sup>c</sup>
BSU04630	YdcC	Sporulation protein YdcC	Outer membrane	Unknown
BSU08800	YgaK	Uncharacterized FAD-linked oxidoreductase YgaK	Outer membrane	Unknown
BSU11430	OppA	Oligopeptide-binding protein OppA (Stage 0 sporulation protein KA)	Inner membrane	Initiation of sporulation, competence development
BSU09150	YhcN	Lipoprotein YhcN	Inner membrane	Involved in germination
BSU10390	YhfW	Putative Rieske 2Fe-2S iron-sulfur protein YhfW	Inner membrane	Unknown
BSU38630	KatX	Catalase X	Inner membrane	Detoxification (degradation) of hydrogen peroxide and potentially involved in coat cross-linking
BSU40360	HtrC (YyxA)	Uncharacterized serine protease YyxA	Inner membrane	Unknown
BSU32640	SspG	Small, acid-soluble spore protein G (SASP G)	Core	Protection of spore DNA
BSU25380	YqfA	UPF0365 protein YqfA	Core	Resistance against sublethal
BSU40600	YybL	Uncharacterized protein YybL	ND	Unknown
BSU27830	CoxA (YrbR)	Sporulation cortex protein CoxA	ND	Resistance of the spore
BSU02310	YbfO	Putative hydrolase YbfO	ND	Unknown
BSU09140	YhcM	Uncharacterized protein YhcM	ND	Unknown
BSU25080	YqfX	Uncharacterized protein YqfX	ND	Unknown
BSU32650	YurS	Uncharacterized protein YurS	ND	Unknown
BSU00290	YaaQ	Uncharacterized protein YaaQ	ND	Unknown
BSU07930	YfkD	Uncharacterized protein YfkD	ND	Unknown
BSU16710	YmxG	Uncharacterized zinc protease YmxG	ND	Control of proteolytic activity
BSU16845	YmfF	Probable inactive metalloprotease YmfF	ND	Unknown
BSU14100	YkuJ	Uncharacterized protein YkuJ	ND	Unknown
BSU27468	YrzQ	Uncharacterized protein YrzQ	ND	Unknown
BSU07830	YfkO (HypO)	Putative NAD(P)H nitroreductase YfkO	ND	Protein against NaOCl stress
BSU29490	Tpx	Thiol peroxidase	ND	Unknown
BSU14220	AhpA (YkuU)	Putative peroxiredoxin YkuU	ND	Protection against peroxide stress
BSU24210	YqiG	Probable NADH-dependent flavin oxidoreductase YqiG	ND	Unknown
BSU28820	ysdC	Putative aminopeptidase YsdC	ND	Unknown
BSU32720	YurZ	Uncharacterized protein YurZ	ND	Unknown
BSU09020	YhcB	Uncharacterized protein YhcB	ND	Unknown
BC_1218	ExsY	Paralogue of spore coat protein Y, CotZ orthologue	Exosporium	Exosporium morphogenetic protein, likely to be involved in spore attachment to surfaces
BC_2493	ExsK	Putative hypothetical protein	Exosporium	Likely to be involved in spore attachment to surfaces
BC_3712	BeIC	Hypothetical membrane spanning protein	Exosporium	Likely to be involved in spore attachment to surfaces
BC_1221	BxpB	Exosporium basal layer protein	Exosporium	Likely to be involved in spore attachment to surfaces
BC_3547	ND	Cell surface protein	Exosporium	Likely to be involved in spore attachment to surfaces
BC_2374	ExsFB	Hypothetical membrane spanning protein	Exosporium	Likely to be involved in spore attachment to surfaces

Locus encoding the protein	Protein	Protein identification <sup>a</sup>	Protein localization <sup>b</sup>	Protein function <sup>c</sup>
BC_2382	BcIB	Putative uncharacterized protein	Exosporium	Likely to be involved in spore attachment to surfaces
BC_2639	ND	Cell surface protein	Exosporium	Likely to be involved in spore attachment to surfaces
BC_3345	ND	Collagen-like triple helix repeat protein	Exosporium	Likely to be involved in spore attachment to surfaces
BC_2569	ND	Collagen triple helix repeat protein	Exosporium	Likely to be involved in spore attachment to surfaces
BC_2149	BxpA	Putative uncharacterized protein	Exosporium	Likely to be involved in spore attachment to surfaces
BC_1284	InA	Immune inhibitor A	Exosporium	Possibly involved in pathogenicity
BC_2267	ND	Putative uncharacterized protein	Exosporium	Possibly involved in pathogenicity
BC_2266	ND	Putative uncharacterized protein	Exosporium	Possibly involved in pathogenicity
BC_1281	CalY	Cell envelope-bound metalloprotease (camelysin)	Exosporium	Possibly involved in pathogenicity
BC_0987	ND	Putative uncharacterized protein	Coat/exosporium	ND
BC_0996	ND	Putative uncharacterized protein	Coat/exosporium	ND
BC_2858	ND	Putative uncharacterized protein	Coat/exosporium	ND
BC_2426	ND	Putative uncharacterized protein	Coat/exosporium	ND
BC_2026	OppA	Oligopeptide-binding protein	Coat/exosporium	Initiation of sporulation, competence development
BC_1613	RnjA	Zn-dependent hydrolase Ribonuclease J	Coat/exosporium	ND
BC_0337	ND	Hypothetical membrane spanning protein	Coat/exosporium	ND
BC_3195	ND	Hypothetical cytosolic protein	Coat/exosporium	ND
BC_3787	ND	Zinc protease	Coat/exosporium	ND
BC_3586	OppA	Oligopeptide-binding protein	Coat/exosporium	Initiation of sporulation, competence development
BC_3133	ND	Putative hydrolase	Coat/exosporium	ND
BC_1424	ND	Ferredoxin-nitrite reductase	Coat/exosporium	ND
BC_0344	RocA	l-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase	Coat/exosporium	ND
BC_2375	ND	Putative uncharacterized protein	Coat/exosporium	ND
BC_0825	ND	Putative uncharacterized protein	Coat/exosporium	ND
BC_2745	ND	Putative uncharacterized protein	Coat/exosporium	ND
BC_1029	ND	IG hypothetical 18063	Coat/exosporium	ND
BC_3090	ND	Putative uncharacterized protein	Coat/exosporium	ND
BC_5181	ND	UPF0145 protein	Coat/exosporium	ND
BC_3992	ND	Putative uncharacterized protein	Coat/exosporium	ND
BC_2969	ND	Putative uncharacterized protein	Coat/exosporium	ND
BC_2481	ND	Putative uncharacterized protein	Coat/exosporium	ND
BC_1456	ND	Putative uncharacterized protein	Coat/exosporium	ND
BC_1708	ND	Putative uncharacterized protein	Coat/exosporium	ND
BC_3784	ND	IG hypothetical 16623	Coat/exosporium	ND
BC_4387	ND	Putative uncharacterized protein	Coat/exosporium	ND
BC_3582	ND	Putative uncharacterized protein	Coat/exosporium	ND
BC_1334	ND	Hypothetical exported protein	Coat/exosporium	ND



Locus encoding the protein	Protein	Protein identification <sup>a</sup>	Protein localization <sup>b</sup>	Protein function <sup>c</sup>
BC_2878	ND	Putative uncharacterized protein	Coat/exosporium	ND
BC_0263	ND	Putative uncharacterized protein	Coat/exosporium	ND
BC_0944	ND	Putative uncharacterized protein	Coat/exosporium	ND
BC_2237	ND	Putative uncharacterized protein	Coat/exosporium	ND
BC_2427	ND	Putative uncharacterized protein	Coat/exosporium	ND
BC_4420	SafA	SpoVID-dependent spore coat assembly factor SafA	Coat	Involved in spore coat morphogenesis
BC_2872	CotX	Spore coat protein X	Coat	Involved in spore coat morphogenesis
BC_2030	CotG	Spore coat protein G	Coat	Involved in spore coat morphogenesis
BC_0389	CotB	Spore coat protein B	Coat	Involved in spore coat morphogenesis
BC_3770	CotE	Spore coat protein E	Coat	Anchoring of the spore coat to the exosporium
BC_0390	CotB	Spore coat protein B	Coat	Involved in spore coat morphogenesis
BC_4419	YhcN	Uncharacterized protein	Coat	Involved in spore coat morphogenesis
BC_1222	CotY	Spore coat protein Y	Coat	Involved in spore coat morphogenesis
BC_5056	ND	Collagen adhesion protein	Coat	Involved in spore coat morphogenesis
BC_2874	CotX	Spore coat protein X	Coat	Involved in spore coat morphogenesis
BC_1560	CotD	Spore coat protein D	Coat	Involved in spore coat morphogenesis
BC_0212	YusW	Putative uncharacterized protein	Coat	Involved in spore coat morphogenesis
BC_1279	CotN	Spore coat-associated protein N	Coat	Involved in spore coat morphogenesis
BC_1245	ND	Putative uncharacterized protein	Coat	Involved in spore coat morphogenesis
BC_0823	CotJA	CotJA protein	Coat	Involved in spore coat morphogenesis
BC_3534	YxeE	Hypothetical protein	Coat	Involved in spore coat morphogenesis
BC_2677	ND	L-alanyl D-glutamate peptidase	Coat	Involved in spore coat morphogenesis
BC_1559	YppG	Spore coat protein	Coat	Involved in spore coat morphogenesis
BC_4047	Cota	Putative uncharacterized protein	Coat	Likely to play a role in spore resistance
BC_4639	ND	Thiol peroxidase	Coat	Likely to play a role in spore resistance
BC_1391	ND	Putative uncharacterized protein	Coat	Likely to play a role in spore resistance
BC_2099	ND	Putative uncharacterized protein	Coat	Likely to play a role in spore resistance
BC_4774	ND	Nonheme chloroperoxidase	Coat	Likely to play a role in spore resistance
BC_5391	GerQ	Putative uncharacterized protein	Coat	Involved in germination and potentially in coat cross-linking
BC_2889	IunH	Inosine-uridine preferring nucleoside hydrolase	Coat	Involved in germination
BC_5390	CwlJ	Cell wall hyfrolase CwlJ	Coat	Involved in germination
BC_1591	ND	Putative uncharacterized protein	Coat	Involved in germination
BC_3552	IunH	Inosine-uridine preferring nucleoside hydrolase	Coat	Involved in germination
BAS2377	ExsK		Beneath the exosporium BclA nap + beneath the exosporium basal layer	ND
BAS1130	BclA		Exosporium	Contributes to spore hydrophobicity
BAS52281	BclB		Exosporium	ND
BAS3290	BetA (BclF)		Exosporium	ND
BAS1144	BxpB (ExsFA)		Exosporium	Exosporium basal layer assembly, acts as an anchor for BclA protein into the exosporium
BAS1898	ExsB	CotG analogue	Exosporium	ND
BAS2697	ExsC		Exosporium	ND
BAS1141	ExsY		Exosporium	Exosporium basal layer assembly
BAS5242	GerQ (YwdL)		Exosporium	ND

Locus encoding the protein	Protein	Protein identification <sup>a</sup>	Protein localization <sup>b</sup>	Protein function <sup>c</sup>
BAS2693	IunA		Exosporium	ND
BAS2693	IunH		Exosporium	ND
BAS1145	CotY (CotZ)		Exosporium	Exosporium basal layer assembly
BAS5303	ND		Exosporium	ND
BAS2303	ExsFB		Interspace?	Exosporium basal layer assembly
BAS3619	CotE		Exosporium/coat	Anchoring of the spore coat to the exosporium
BAS5053	BxpC		Outer coat/interspace?	ND
BAS4324	ExsA	SafA orthologue	Inner coat?	Involved in proper exosporium assembly
BAS2008	BxpA		Cortex	ND
BAS2174	ExsM		ND	Involved in the assembly of the exosporium
CD1433	CotE*	Peroxiredoxin	Exosporium	Peroxiredoxin reductase
CD2375	CdeA	Uncharacterized protein	Exosporium	ND
CD2752	CdeB	Uncharacterized protein	Exosporium	ND
CD1067	CdeC	Exosporium cysteine rich protein	Exosporium	<i>C. difficile</i> -specific morphogenetic factor required for the proper assembly of the coat and exosporium
CD1581	CdeM	Uncharacterized protein	Exosporium	Putative exosporium morphogenetic protein
CD0311		Putative spore coat assembly asparagine-rich protein	Exosporium	ND
CD0564	ND	Endopeptidase La	Exosporium	ND
CD1518	FeoA	Ferrous ion transport protein	Exosporium	ND
CD1880	ND	Uncharacterized protein	Exosporium	ND
CD2245A	ND	Uncharacterized protein	Exosporium	ND
CD3522	ND	Uncharacterized protein	Exosporium	ND
CD3613	ND	Uncharacterized protein	Exosporium	ND
CD0032	BclA1	Putative beta-glucosidase	Exosporium/coat	Likely involved in spore attachment to surfaces
CD3230	BclA2	Putative exosporium glycoprotein	Exosporium/coat	ND
CD3349	BclA3	Exosporium glycoprotein BclA3	Exosporium/coat	ND
CD1613	CotA	Putative uncharacterized protein	Exosporium/coat	Essential for coat and exosporium formation; required for lysozyme, ethanol and heat resistance
CD1511	CotB	Putative uncharacterized protein	Exosporium/coat	ND
CD2401	CotD	Spore coat protein, manganese catalase	Exosporium/coat	ND
CD3032	ND	Putative aminotransferase	Exosporium/coat	ND
CD3620	ND	Putative uncharacterized protein	Exosporium/coat	ND
CD3580	ND	Putative uncharacterized protein	Exosporium/coat	ND
CD0855	OppA	ABC-type transport system, oligopeptide-family extracellular solute-binding protein	Exosporium/coat	ND
CD3664	ND	Putative aminotransferase	Exosporium/coat	ND
CD2808	ND	Uncharacterized protein	Exosporium/coat	ND
CD1463	ND	Uncharacterized protein	Exosporium/coat	ND
CD3652	ND	Putative peptidase, M1 family	Exosporium/coat	ND
CD0587	ND	Putative uncharacterized protein	Exosporium/coat	ND
CD2865	ND	Putative bacterioferritin	Exosporium/coat	ND
CD2431	ND	Putative nitrite/sulfite reductase	Exosporium/coat	ND
CD0115	ND	Putative 4Fe-4S ferredoxin, iron-sulfur binding domain protein, delta subunit	Exosporium/coat	ND
CD1622	ND	Putative uncharacterized protein	Exosporium/coat	ND
CD3457	ND	Putative uncharacterized	Exosporium/coat	ND

Locus encoding the protein	Protein	Protein identification <sup>a</sup>	Protein localization <sup>b</sup>	Protein function <sup>c</sup>
		protein		
CD1063.1	ND	Putative uncharacterized protein	Exosporium/coat	ND
CD0894	ND	Putative iron-dependent hydrogenase	Exosporium/coat	ND
CD0279	ND	Pyridoxamine 5'-phosphate oxidase family protein	Exosporium/coat	ND
CD2477	ND	Uncharacterized protein	Exosporium/coat	ND
CD0596	CotF	Uncharacterized protein	Coat	ND
CD2399	ND	Putative spore coat protein	Coat	ND
CD2598	ND	Putative oligosaccharide deacetylase	Coat	ND
CD2845	Rbr	Rubrerythrin	Coat	Likely to play a role in spore resistance
CD2864	YisY	Putative hydrolase	Coat	Likely to play a role in spore resistance
CD1524	ND	Putative rubrerythrin	Coat	Likely to play a role in spore resistance
CD1623	ND	Putative oxidoreductase	Coat	Likely to play a role in spore resistance
CD3102	ND	Putative oligosaccharide deacetylase	Coat	Involved in germination
CD0551	SleC	Spore cortex-lytic enzyme pre-pro-form	Coat	Essential for spore peptidoglycan cortex degradation and germination in response to taurocholate
CD3567	SipL	Spore coat protein	Coat	Spore coat morphogenetic protein essential for coat localization around the forespore and functional spore formation
CD2247	CspBA	Subtilisin-like serine germination related protease	ND	Essential for processing of pro-SleC into mature SleC + spore germination
CD2246	CspC	Subtilisin-like serine germination related protease	ND	Bile acid germinant receptor

BSU = *B. subtilis* strain 168

BC = *B. cereus* strain ATCC 14579

BAS = *B. anthracis* strain Sterne

CD = *C. difficile* strain 630

<sup>a</sup> Obtained from the UniProtKB database (<http://www.uniprot.org>), Henriques and Moran, 2007

<sup>b</sup> Information from Abhyankar *et al.*, 2011, Abhyankar *et al.*, 2013, Paredes-Sabja *et al.*, 2014, Diaz *et al.*, 2015, Stewart, 2015, Abhyankar *et al.*, 2016, *Subtiwiki* (<http://subtiwiki.uni-goettingen.de/>)

<sup>c</sup> Information from Abhyankar *et al.*, 2013, Paredes-Sabja *et al.*, 2014, Diaz *et al.*, 2015, Janganan *et al.*, 2016, *Subtiwiki* (<http://subtiwiki.uni-goettingen.de/>)

\* *C. difficile* CotE does not play the same role as the outer spore coat morphogenetic CotE protein of *Bacillus*

ND: protein precise localization and/or function not determined

**Table S3: Raw LC-MS/MS spectral counting results (provided as an Excel file)**



***Chapitre 4 : Mécanismes moléculaires impliqués  
dans la sporulation chez *Mycobacterium thermoacetica****



## 1. Problématique

Les mécanismes moléculaires mis en place au cours de la sporulation ont été particulièrement bien décrits chez l'espèce modèle *B. subtilis*. L'étude de ces mécanismes s'est progressivement étendue à d'autres espèces et notamment aux Clostridies dont *C. difficile*, *C. perfringens* et *C. acetobutylicum*.

L'étude de la sporulation chez diverses espèces a permis de mettre en évidence la conservation des principaux acteurs de la sporulation, à savoir le régulateur majeur Spo0A ainsi que les facteurs  $\sigma^F$ ,  $\sigma^G$ ,  $\sigma^E$  et  $\sigma^K$ . Cependant, des différences concernant l'initiation de la sporulation ont pu être constatées. En effet, le phosphorelais à l'origine de l'activation de Spo0A chez les Bacilli est absent chez les Clostridies où Spo0A est activée directement par des histidines kinases (HK) orphelines. De plus, contrairement à *B. subtilis* et *C. difficile*, il apparaît que  $\sigma^K$  de *C. acetobutylicum* est le premier facteur sigma spécifique de la sporulation à être activé, celui-ci jouant ainsi un double rôle à la fois précoce et tardif.

Récemment, des études *in silico* ont été menées sur de nombreuses espèces sporulées dont *M. thermoacetica* afin d'évaluer la conservation des gènes de sporulation (de Hoon *et al.*, 2010, Galperin *et al.*, 2012, Abecasis *et al.*, 2013) et une quarantaine de gènes ont ainsi été décrits comme gènes signatures de la sporulation (Abecasis *et al.*, 2013).

Cependant, aucune donnée expérimentale concernant les mécanismes mis en place pendant la sporulation de *M. thermoacetica* n'est actuellement disponible dans la littérature. De ce fait, nous nous sommes focalisés sur l'expression des gènes impliqués dans la sporulation.

## 2. Objectifs et stratégie

Dans cette étude, nous avons décrit la cinétique d'expression des gènes au cours de la sporulation de la souche ATCC 39073 de *M. thermoacetica* afin d'identifier les mécanismes de sporulation de cette bactérie anaérobie thermophile et déterminer s'ils sont similaires ou différents de ceux décrits chez *B. subtilis* ou chez les Clostridies.

Des cinétiques de croissance et sporulation ont été réalisées en fermenteur en conditions optimales régulées, i.e. à 55 °C et pH 7, sous agitation. Dans un premier temps des essais ont été menés en inoculant le fermenteur avec une culture de *M. thermoacetica* comme décrit dans la littérature (Schwartz et Keller, 1982a, Xue *et al.*, 2014). Cependant, cette approche a été écartée et nous avons fait le choix d'inoculer le fermenteur avec des spores activées



thermiquement afin d'obtenir une population initiale plus homogène et une meilleure reproductibilité des cinétiques.

Afin d'étudier la cinétique d'expression des gènes de sporulation, nous avons effectué plusieurs prélèvements : le premier a été réalisé avant apparition de cellules en sporulation (point de référence), puis les autres prélèvements ont été réalisés à des stades plus ou moins avancés dans la sporulation. Les ARN ont été extraits pour chaque échantillon. Nous avons constaté que les ARN de *M. thermoacetica* sont particulièrement fragiles et rapidement dégradés, bien que ces ARN aient été extraits selon un protocole appliqué avec succès à *Moorella* (Mock *et al.*, 2014). De ce fait, une étape de conservation des échantillons à extraire dans une solution stabilisatrice RNAlater™ a été ajoutée avant l'extraction des ARN (Mutter *et al.*, 2004, Moeller *et al.*, 2006, Oppert *et al.*, 2012, Edelheit *et al.*, 2013, Kohl *et al.*, 2017). Cette étape supplémentaire a permis d'obtenir des ARN intègres ensuite soumis à une analyse de séquençage des ARN (RNAseq en paired-end) par la technologie Illumina

Les gènes de sporulation du génome de *M. thermoacetica* étant peu annotés, une étude *in silico* a été effectuée afin d'identifier les gènes principaux impliqués dans ce processus de différenciation cellulaire. Les gènes ont été identifiés en blastant les séquences d'acides aminés de protéines sporales identifiées chez *B. subtilis*, *C. perfringens*, *C. difficile*, *B. anthracis* et *B. cereus* contre le génome de la souche ATCC 39073 de *M. thermoacetica*. L'analyse des données de RNAseq a ainsi été effectuée en déterminant la variation d'expression des gènes de sporulation par rapport au point de référence. Elle a également été déterminée entre chaque point de prélèvement afin d'observer les variations d'expression des gènes au cours de la cinétique.

### 3. Principaux résultats

La cinétique de croissance et sporulation de *M. thermoacetica* montre que les spores inoculées dans le fermenteur ont germé rapidement et que la phase de croissance exponentielle a déjà débuté après 16 h de culture et s'est poursuivie jusqu'à 40 h, qui correspond au premier point de la cinétique (point de référence T1). Les cellules ne présentaient pas de signe visible de sporulation à 40 h, tandis qu'à 45 h, une fraction de la population cellulaire présentait un léger renflement à l'un des pôles, indiquant que la sporulation avait débuté. Lors de la cinétique, l'observation des cellules en culture après 64,5 h a mis en évidence la présence d'endospores réfringentes, en accord avec l'augmentation importante de la concentration en spores

thermorésistantes en ce point de la cinétique. Les points 45 h, 49 h et 64,5 h ont été considérés comme les points T2, T3 et T4 de la cinétique, respectivement.

L'analyse *in silico* effectuée en amont de l'analyse des données transcriptomiques a permis d'identifier 168 gènes potentiellement impliqués dans la sporulation incluant des gènes très conservés chez les Clostridies et Bacilli, tels que *spo0A*, *sigF*, *sigG*, *sigE*, *sigK* ou encore les opérons *spoIII*A et *spoVA*.

L'analyse des données de RNAseq montre que les gènes impliqués dans l'initiation de la sporulation, à savoir les gènes de division cellulaire ainsi que les gènes *spo0A*, *sigH* et *sigF* ne sont pas différentiellement exprimés au cours de la cinétique. Ces résultats indiquent que l'étape d'initiation de la sporulation a probablement eu lieu avant le premier point de prélèvement, c'est-à-dire avant 40 h. De ce fait, il n'est pas possible de déterminer si l'initiation de la sporulation débute par une augmentation de la transcription via  $\sigma^K$  comme décrit chez *C. acetobutylicum* ou si  $\sigma^F$  est le premier facteur sigma spécifique de la sporulation activé, comme décrit chez *B. subtilis* ou *C. difficile*.

D'autre part, les gènes *sigE* et *sigG* codant les autres facteurs  $\sigma^E$  et  $\sigma^G$  sont surexprimés à T2 et T3 au cours de la sporulation de *M. thermoacetica*, tandis que *sigK*, qui code pour  $\sigma^K$ , est le dernier facteur sigma transcrit. Par ailleurs, nous avons montré qu'il est très peu probable que l'activation de  $\sigma^K$  soit dépendante de l'excision d'un élément *skin*. Cependant, nous constatons que les gènes associés à la machinerie d'excision du pro-peptide inhibiteur chez *B. subtilis* sont surexprimés plus tôt que *sigK* dans le cas de *spoIVB* et *spoIVFAB* ou selon la même cinétique que *sigK* dans le cas de *bofA*. De ce fait, nous avons émis l'hypothèse que le mécanisme de régulation de  $\sigma^K$  ferait intervenir un mécanisme de type clivage protéolytique, comme observé chez *B. subtilis* et certaines Clostridies telles que *C. perfringens*, *C. acetobutylicum* ou *C. botulinum*.

Par ailleurs, les mécanismes moléculaires associés à l'étape d'enkystement de la pré-spore dans la cellule mère semblent conservés chez *M. thermoacetica* puisque tous les gènes jouant un rôle dans cette étape dont les gènes de la machinerie DMP (*spoIID*, *spoIIM*, *spoIIP*) et l'opéron *spoIII*A sont activés relativement tôt pendant la sporulation, avant l'apparition d'endospores réfringentes. De même, les gènes impliqués dans l'entrée de Ca-DPA dans la spore sont surexprimés, indiquant que le mécanisme est probablement conservé.

De plus, nous avons identifié des groupes de gènes organisés en clusters de 3 gènes qui pourraient correspondre à des orthologues des 3 opérons *gerA*, *gerB* et *gerC*, qui codent pour des récepteurs de germination. Enfin, l'expression de gènes impliqués dans la formation des tuniques, tel que *spoIVA*, et dans leur structure, tels que *cotJA*, *cotJC* ou encore *yabG*, sont surexprimés au cours de la sporulation de *Moorella*. Cependant, il est intéressant de noter que la majorité des gènes codant pour des protéines de tuniques ou d'exosporium ne montrent aucune variation d'expression au cours de la cinétique, ce qui suggère que ces gènes ne sont pas différenciellement exprimés chez *Moorella* ou qu'une différence potentielle de l'expression n'a pas pu être observée dans les conditions testées.

Cette étude a permis de décrire pour la première fois les mécanismes moléculaires mis en place par *M. thermoacetica* pendant la sporulation. De futurs travaux seront nécessaires afin de i) valider les données d'expression de certains gènes par RT-qPCR et de ii) caractériser plus finement l'expression des gènes de l'étape d'initiation de la sporulation.

#### 4. Article 3: Transcriptional profiling during sporulation of the thermophilic anaerobe *Moorella thermoacetica*

Tiffany Malleck<sup>1,2</sup>, Véronique Broussolle<sup>2\*</sup> and Stella Planchon<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Unité d'Expertise dans la Maîtrise du Risque Industriel en Thermorésistants Sporulés (EMaiRIT'S), Centre Technique pour la Conservation des Produits Agricoles (CTCPA), 449 Avenue Clément Ader, 84911 Avignon, France

<sup>2</sup> UMR408 SQPOV Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale, INRA, Université d'Avignon et des Pays du Vaucluse, 84000 Avignon, France

\*Corresponding authors. Address correspondence to:

Stella Planchon, email: [splanchon@ctcpa.org](mailto:splanchon@ctcpa.org), Phone: +33(0)490843246

Véronique Broussolle, email: [veronique.broussolle@inra.fr](mailto:veronique.broussolle@inra.fr), Phone: +33(0)432722518

Authors' emails:

[tmalleck@ctcpa.org](mailto:tmalleck@ctcpa.org); [veronique.broussolle@inra.fr](mailto:veronique.broussolle@inra.fr); [splanchon@ctcpa.org](mailto:splanchon@ctcpa.org)

**Keywords:** *in silico* analysis, RNA sequencing, ATCC 39073 strain

*Manuscript in preparation*

## ABSTRACT

*Moorella thermoacetica* is a thermophilic anaerobe producing highly resistant spores. Few studies described the spore properties of *Moorella thermoacetica* but the mechanisms involved in sporulation still remain unknown.

We performed a culture *M. thermoacetica* ATCC 39073 strain in regulated conditions at optimal pH and temperature and studied the sporulation kinetics. Results showed that sporulation was triggered only for a fraction of the population after 40 h of culture at the end of exponential growth, and that heat-resistant phase-bright endospores appeared at 64.5 h.

To characterize the mechanisms underlying *M. thermoacetica* sporulation, we analyzed RNA expression at several time points of the culture. We focused the analysis on the expression profile of 168 sporulation genes identified by an *in silico* analysis. We observed that *sigG* and *sigE* were up-regulated before the apparition of phase-bright endospores while *sigK* was expressed later, at 64.5 h of culture. No variation of *spo0A*, *sigH* and *sigF*, involved in the earliest sporulation steps, was observed suggesting that sporulation was initiated before 40 h of culture. Besides, we showed that the genes involved in the engulfment process were conserved and were up-regulated during sporulation in *M. thermoacetica*. Genes involved in Ca-DPA entry into the forespore and cortex synthesis were also up-regulated, as well as most of the germination-related genes. Interestingly, genes involved in the spore coat and exosporium formation or structure are poorly conserved and were not differently expressed during the kinetics in the tested conditions.

Altogether, our findings provide the first insights into the mechanisms involved in the sporulation of the thermophilic anaerobe *M. thermoacetica*.

## 1. Introduction

Endospore formation is an adaptive mechanism only found in some bacterial species belonging to the Firmicutes, allowing them to face harsh environmental conditions. When conditions become unfavorable to cell survival, cells differentiate into a dormant spore which is able to persist in the environment for long period of time (Vreeland *et al.*, 2000). The sporulation mechanism is characterized by an asymmetric division leading to the formation of two compartments, the large one corresponding to the mother cell and the smaller one to the future endospore. During sporulation, the smaller compartment is engulfed by the mother cell to form the forespore which matures inside the mother cell, acquires its resistance properties and is finally liberated in the environment by mother cell lysis (Leggett *et al.*, 2012, Al-Hinai *et al.*, 2015, Talukdar *et al.*, 2015).

The mechanisms underlying spore formation have been extensively studied in the model *B. subtilis*. However, more recent studies have also focused on the identification of the molecular program of sporulation in Clostridia, such as *C. difficile*, *C. acetobutylicum* or *C. perfringens* (Dürre et Hollergschwandner, 2004, Alsaker et Papoutsakis, 2005, Jones *et al.*, 2008, Saujet *et al.*, 2013, Xiao *et al.*, 2015). These studies showed that the sporulation mechanisms observed in Bacilli and Clostridia share similarities. In both genera, sporulation is controlled by the master regulator Spo0A, which allows the subsequent activation of the sporulation-specific sigma factors  $\sigma^F$ ,  $\sigma^G$ ,  $\sigma^E$  and  $\sigma^K$  regulating sporulation gene expression at a transcriptional level (Al-Hinai *et al.*, 2015). The sigma factors' expression is spatially and temporally controlled with  $\sigma^F$  and  $\sigma^G$  being specifically activated in the forespore compartment during early and late sporulation, respectively, while  $\sigma^E$  and  $\sigma^K$  are specifically activated early and late, respectively in the mother cell (Higgins et Dworkin, 2012, Tan et Ramamurthi, 2014, Al-Hinai *et al.*, 2015).

Even though the molecular mechanisms involved in Bacilli and Clostridia sporulation share similarities, some differences were highlighted in terms of regulation. Indeed, the activation of Spo0A in Bacilli depends on a phosphorelay which is absent in Clostridia (Dürre, 2014, Al-Hinai *et al.*, 2015, Gil *et al.*, 2017). Besides, it appears that the regulation of sigma factors's activation differs between Bacilli and Clostridia. Indeed,  $\sigma^F$  is the first sigma factor active in the *B. subtilis* forespore compartment whose expression is essential for  $\sigma^E$  activation in the mother-cell. In turn,  $\sigma^E$  activates  $\sigma^G$  in the forespore after completion of the engulfment step.

Finally,  $\sigma^G$  allows the activation of the late mother-cell  $\sigma^K$  (Higgins et Dworkin, 2012). It has been reported in *C. difficile* that the activation of sigma factors is less strictly regulated as : (i)  $\sigma^E$  activation was shown to be partially independent of  $\sigma^F$  , (ii)  $\sigma^G$  activity is independent of both engulfment completion and  $\sigma^E$  and (iii)  $\sigma^K$  activity does not depend on  $\sigma^G$  (Pereira *et al.*, 2013). Moreover, studies reported that  $\sigma^K$  plays a dual role during sporulation in *C. acetobutylicum* as it activates Spo0A early during sporulation and it is also involved in late stages of spore formation (Al-Hinai *et al.*, 2013, Fimlaid et Shen, 2015). This dual role is thought to be conserved in some Clostridia as a *sigK* mutant was reported to stop sporulation earlier than a *sigE* mutant in *C. perfringens* (Fimlaid et Shen, 2015).

*M. thermoacetica*, formerly known as *Clostridium thermoaceticum* (Collins *et al.*, 1994), is a thermophilic anaerobe spore-former, mainly studied because of its ability to produce acetic acid and solvents for industrial applications (Xue *et al.*, 2014). *M. thermoacetica* is also responsible for spoilage of low acid canned food products and produces among the most highly heat-resistant spores isolated so far in industry (André *et al.*, 2013, André *et al.*, 2016). However, little is known about its sporulation process. Indeed, some genome-wide comparative studies reported the conservation of some sporulation genes (de Hoon *et al.*, 2010, Galperin *et al.*, 2012, Abecasis *et al.*, 2013), but no experimental data have been reported so far.

In this study, we aimed at characterizing the molecular mechanisms underlying sporulation in *M. thermoacetica* to provide new insights into the sporulation program of this thermophilic anaerobe of industrial interest.

## 2. Material and methods

### 2.1. Bacterial strain and spore production

The study was lead on *Moorella thermoacetica* strain ATCC 39073 (Pierce *et al.*, 2008). The strain was kept in a cryopreservative solution with beads at -80 °C. Spores were produced at 55 °C on Meat Liver Agar plates and stored as previously described (Malleck *et al.*, 2018).

## 2.2. Culture conditions

A volume of 1.7 L of modified Dextrose Tryptone Broth medium ( $_{\text{modDTB}}$ : 9 g/L tryptone, 4 g/L tryptose, 7 g/L soytone, 5 g/L yeast extract, 5 g/L sodium chloride, 1 g/L potato starch, 10 g/L D-glucose) was poured in a 5 L-BioFlo 310 benchtop bioreactor (New Brunswick BioFlo 310, Eppendorf). After sterilization and prior to inoculation, all the parameters were regulated at their setpoint. Agitation was regulated at 100 rpm, temperature was set at 55 °C, pH was brought to 7.0 and anaerobic conditions were obtained by sparging CO<sub>2</sub> at 1 Standard Liter Per Minute inside the bioreactor. A freshly autoclaved sodium thioglycollate solution was added at a final concentration of 0.5 g/L to lower the initial oxidation reduction potential (ORP) to approx. – 300 mV (Schwartz et Keller, 1982b). Temperature, pH, ORP and dissolved oxygen (DO) were monitored using temperature, pH, ORP and polarographic DO probes (Mettler-Toledo). When all parameters were stable, the spore suspension was activated at 100 °C for 10 min in an oil bath and the bioreactor was inoculated at a final concentration of 10<sup>4</sup> spores/mL. Temperature, pH and DO were automatically measured every minute except ORP which was followed manually and pH was maintained at 7.0 throughout growth with a 3 M KOH solution. Growth and sporulation were followed by determining the total cell and spore concentration on MLA medium (Biokar Diagnostics, Allonne, France) according to French standards (AFNOR, 2011). Optical density was followed at 600 nm (OD<sub>600 nm</sub>) using a spectrophotometer (BioPhotometer, Eppendorf), cell morphology and spore production were observed using a phase contrast microscope (Leica, DM750, France).

## 2.3. RNA preparation

During growth at determined time points, 10 to 20 mL were sampled and centrifuged at 8, 600 g for 5 min at 4 °C. The supernatant was removed and pellet was resuspended in 2 mL of RNALater™ (Ambion, ThermoFisher Scientific, France). Samples were immediately frozen and stored at -80°C until use. Samples were thawed on ice and centrifuged at 2, 300 g for 5 min at 4 °C. Supernatant was removed and the pellet was resuspended in 1.5 mL of TriReagent™ (Invitrogen™, ThermoFisher Scientific, France). Samples were transferred into tubes containing 300 mg of 0.1 mm silica beads. Cells were lysed in a Fast-Prep 120 machine (FastPrep® FP120 Cell Disrupter, Thermo Electron) by 3 runs of 45 s at the maximal speed of 6.5 with 1 min-incubation on ice between each run to prevent nucleic acid degradation.



Extraction was performed following TriReagent™ manufacturer's instructions, followed by a DNase treatment using TURBO™ DNase (Invitrogen™, ThermoFisher Scientific, France) according to the manufacturer's instructions. RNA concentration was determined using a TECAN device. RNA quality was controlled on a RNA 6000 nano chip with a 2100 Bioanalyzer device (Agilent Technologies, Les Ulis, France) following the manufacturer's instructions.

#### 2.4. RNA sequencing

RNA sequencing was performed at the MGX platform in Montpellier, France. The rRNA were depleted using an Illumina Ribo-Zero rRNA Removal Kit. RNA libraries were constructed using the TruSeq Stranded mRNA Sample Preparation kit from Illumina. A 100 bp paired-end sequencing was performed on an Illumina HiSeq 2500 device using the Sequence By Synthesis technique SBS (TrueSeq Rapid SBS kit, Illumina). Images generated by the sequencing step were analyzed with HiSeq Control Software and a real time base calling step with RTA software was performed. Sequencing quality was controlled with FastQC. Reads were aligned to different genomes using Bowtie2 with FastQ Screen to check for contaminants. Reads were aligned to *M. thermoacetica* genome (version NC\_007644.1) using the BWA-MEM algorithm. A MAPQ alignment score was generated and only reads with a score of at least 3 corresponding to a probability of 50 % that the alignment was correct, were further considered in the analysis. Reads aligned to *M. thermoacetica* CDS were counted with HTSeq-count (v. 0.6.1p1) using the "union" mode. Data were normalized using the DESeq software available in edgeR as Relative Log Expression. Gene expression variation was expressed as log<sub>2</sub> fold change. Gene expression at time points T2, T3 and T4 was compared to gene expression at the reference time point T1. Gene expression comparison was also assessed for time point T3 vs T2 and T4 vs T3. The significance of log<sub>2</sub> fold change between two conditions was assessed using different and complementary statistical tests, ie DESeq (v. 1.16.0), DESeq2 (v. 1.4.5) and EdgeR (v. 3.6.7) available in R (v.3.1.0). Here, we considered that genes were differentially expressed when the p-value was below 0.05 at least with DESeq and DESeq2.

## 2.5. *In silico* analysis

An *in silico* analysis was performed by blasting the amino acid sequences encoded by sporulation-associated genes identified in several spore-forming species' genome (de Hoon *et al.*, 2010, Abhyankar *et al.*, 2011, Galperin *et al.*, 2012, Abecasis *et al.*, 2013, Abhyankar *et al.*, 2013, Díaz-González *et al.*, 2015, Stewart, 2015, Xiao *et al.*, 2015) against the genome of *M. thermoacetica* strain ATCC 39073. We used the Blasp-P tool with default parameters (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) and considered several criteria ie, % of identity or homology, % of protein cover and a minimal E-value of  $2.00 \times 10^{-6}$ .

## 3. Results

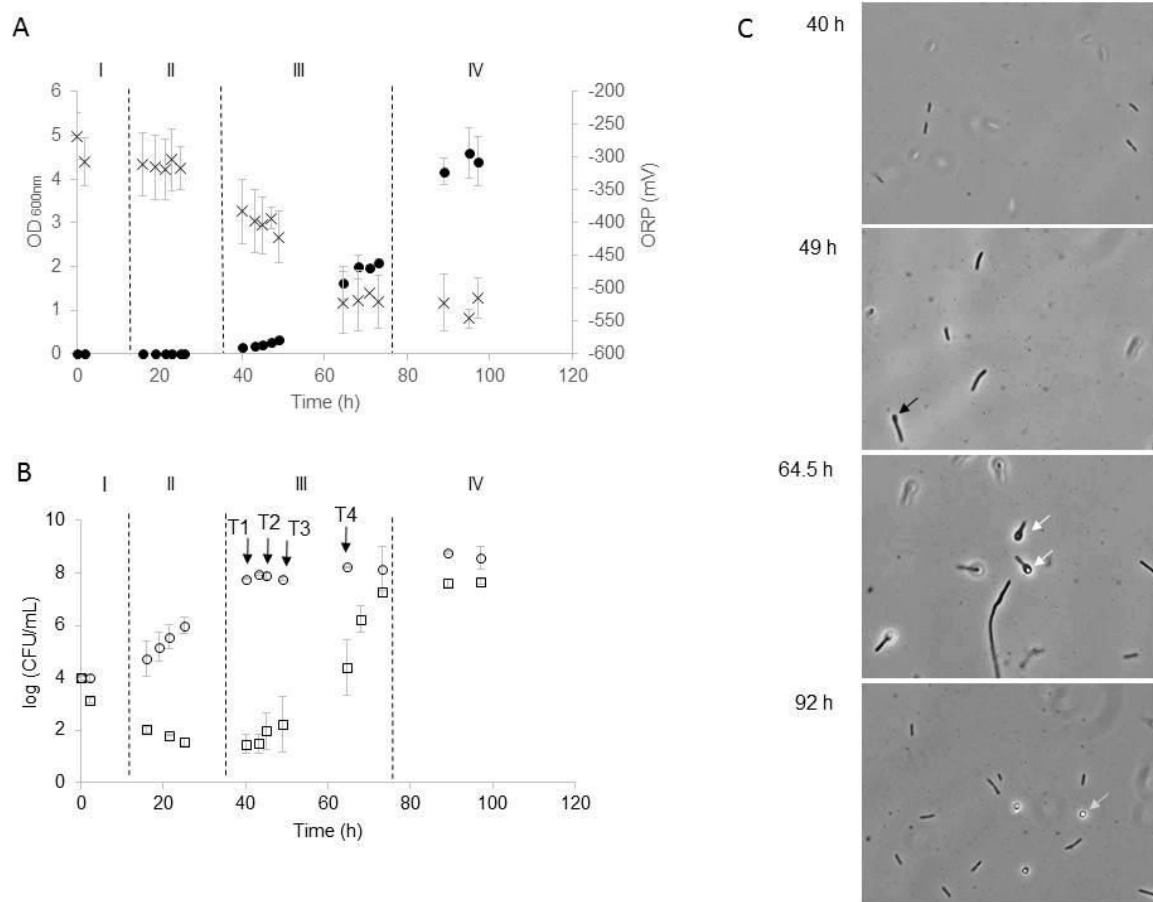
### 3.1. Growth and sporulation of *Moorella thermoacetica* strain ATCC 39073

Growth and sporulation of *M. thermoacetica* strain ATCC 39073 was performed in regulated conditions (55°C, pH 7.0) in a bioreactor after inoculation with heat-activated spores to obtain an initial concentration of  $10^4$  spores/mL. During growth and sporulation, OD<sub>600 nm</sub>, ORP, total cells and heat-resistant spore populations were measured and cell morphology observed (Figure 1).

We observed a decrease from 4 to 3 log/mL of *M. thermoacetica* heat-resistant spore counts 2 h after the inoculation, indicating that approximately 90 % of the inoculated spores had germinated. Spore germination still occurred while bacterial growth started after 16 h of incubation (Figure 1B). Cells grew exponentially between 16 h and 40 h of culture. Indeed, we observed few small cells at 16 h and dividing cells from 25 h (data not shown). During this period, the average total cell population increased from  $4.7 \pm 0.7$  log/mL to  $7.8 \pm 0.0$  log/mL (Figure 1B).

At 40 h, only vegetative cells were observed while a fraction of the cells was characterized by one slightly swollen pole, indicating an initiation of sporulation at 45 h. At 49 h, 10 to 30 % of the cells exhibited this slightly swollen shape, however no phase-bright endospores were observable yet (Figure 1C). We observed 50 % to 75 % of sporulating cells with a more visible swollen shape at 64.5 h, while vegetative cells were longer and heterogeneous in size. Only around 50 % of the sporulating cells were characterized by the presence of a phase-

bright endospore (Figure 1C). From 73 h, we observed 30 % to 50 % of cells still sporulating and less than 10 % of free bright phase spores. Heat-resistant spore concentration rose from  $1.5 \pm 0.4$  log/mL at 43 h, corresponding to the end of the exponential phase, to  $7.3 \pm 0.2$  log/mL after 73 h and until the end of the kinetics, while the total cell count was  $8.2 \pm 0.8$  log/mL at the end of the kinetics.



**Figure 1: Growth and sporulation of *Moorella thermoacetica* strain ATCC 39073 at 55 °C in regulated conditions.** Several parameters were measured: (A) OD<sub>600</sub> (●) and ORP (X), (B) total cells (○) and heat-resistant spores counts (□), (C) cell morphology under phase contrast microscopy. Growth and sporulation phases I, II, III and IV (A and B) were determined according to these parameters. Sampling time points for RNA expression analysis are shown by black arrows (B). On panel C, black arrow points a vegetative cell in an early sporulation state exhibiting a slightly swollen pole (49h) and white arrows point sporulating cells with phase-dark or phase-bright endospore (64.5h) and grey arrow point phase-bright spores (92h).

According to these observations, we determined four developmental phases (Figure 1A and B): i) phase I, from 0 to 15 h corresponding to germination of inoculated spores and consequently decrease of heat-resistant spore counts; ii) phase II, from 15 h to 35 h, corresponding to the exponential growth phase with an increase of total cell counts; iii) phase

III, from 40 h to 75 h, corresponding to the sporulation phase with an increase of heat-resistant spores and a steady-state of total cell concentration; iv) phase IV, corresponding to the end of sporulation with a steady-state of total cell and spore concentrations.

The phase III could be subdivided in an early stage characterized by the presence of early sporulating cells with no phase-bright endospores and in a late stage between 49 h and 64.5 h of incubation with a fraction of phase-bright endospores.

We observed that ORP and OD<sub>600nm</sub> remained stable until 40 h of incubation. Indeed, OD<sub>600nm</sub> increased after 40 h to reach its maximum of  $4.6 \pm 0.6$  at 95 h, while ORP declined from -250 to -528 mV after 116 h of incubation.

### 3.2. *In silico* identification of sporulation-related genes

By an *in silico* analysis, we identified 168 genes related to sporulation and classified them into 7 groups (A to G) (Table 2): (A) sporulation-associated sigma factors and genes controlling sigma factors' maturation, (B) involved in pre-septation and septation, (C) involved in engulfment, (D) encoding inner membrane/germination proteins, (E) involved in core and cortex composition, (F) encoding known or putative coat and exosporium proteins and (G) other genes whose function was not described or which could not be put in any group listed.

The group A is composed of 15 genes among which the 5 sigma factor-encoding genes *sigH* (moth\_2479), *sigF* (moth\_1496), *sigG* (moth\_0853), *sigE* (moth\_0852) and *sigK* (moth\_1582). We identified orthologs of *spoIIAA* (moth\_1498) and *spoIIAB* (moth\_1497) genes involved in  $\sigma^F$  activation, a *spoIIIGA* ortholog encoding a protein essential for  $\sigma^E$  maturation, as well as a *spoIIR* ortholog. Orthologs of genes essential for  $\sigma^K$  activation were also found, such as *spoIVCA*, *bofA*, *spoIVFA* and *spoIVFB*. The group B is composed of 12 genes playing a role in the pre-septation and septation steps such as *abrB* (moth\_0087), the master regulator *spo0A* (moth\_1505) and genes involved in chromosome partitioning, such as *parA-parB*. The group C is made of 18 genes involved in the engulfment step, among which the 8 genes of the *spoIIIA* operon. The group D gathers 16 genes encoding inner membrane proteins associated to germination and 9 genes encoding germination proteins, organized in 3 operonic units, such as moth\_1012, moth\_1013 and moth\_1014. The group E gathers 23 genes involved in the core and cortex composition, such as genes involved in small acid soluble sporulation proteins SASPs, in spore cortex synthesis or dipicolinic acid (DPA)

synthesis. Finally, groups F and G containing 43 and 41 genes, respectively correspond to genes encoding well-described or putative spore coat and/or exosporium proteins, such as *spoIVA* and *cotJB-cotJC* for group F while group G contains genes whose function is not described or which could not be gathered in the other groups we defined.

### 3.3. Expression patterns of *M. thermoacetica* sporulation genes

The expression profile of the 168 genes previously identified *in silico* was followed during sporulation. RNAs were extracted from samples at 40 h, 45 h, 49 h and 64,5 h corresponding to time points 1 (T1), 2 (T2), 3 (T3) and 4 (T4), respectively (Figure 1B).

To characterize the expression pattern, T1 was taken as a reference to compare RNA expression profiles at T2, T3 and T4. We also compared profiles obtained at T3 to T2 and T4 to T3 to observe any possible variations along the kinetics. We defined 12 profiles of gene expression as described in Table 1.

**Table 1: Gene expression patterns during sporulation kinetics of *M. thermoacetica***

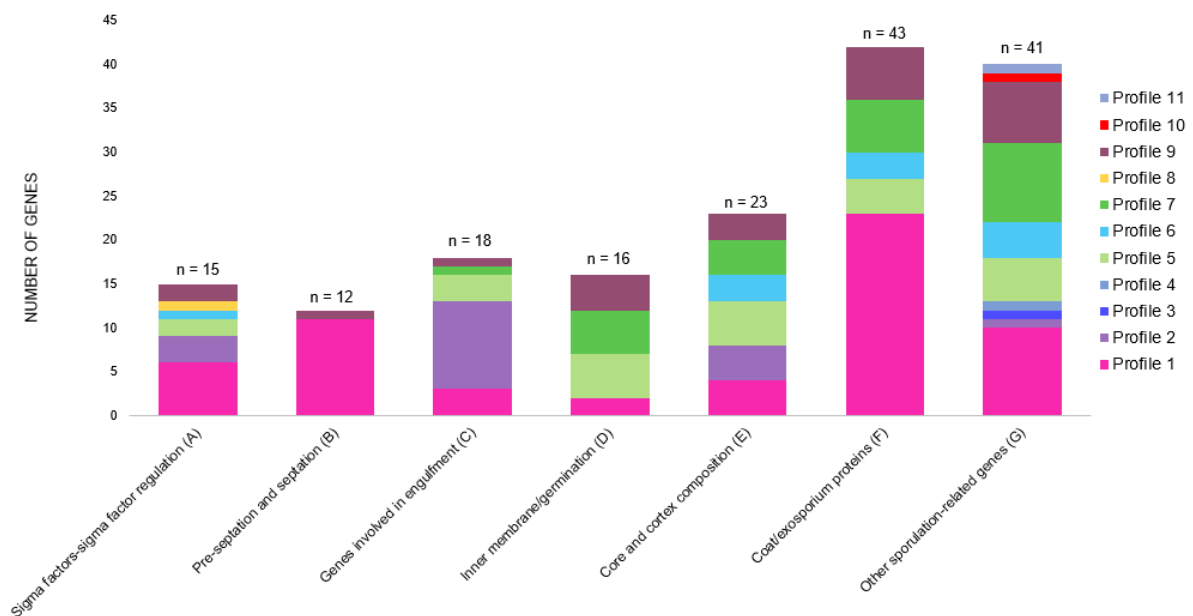
Profile	T2 vs T1 (45 h vs 40 h)	T3 vs T1 (49 h vs 40 h)	T4 vs T1 (64.5 h vs 40 h)	Number of genes	Profile correspondance <sup>a</sup>
1	Steady	Steady	Steady	59	No variation of expression
2	Up	Max Up	Up	18	Up-regulation at T2, T3 and T4 with a maximum expression at T3
3	Up	Max Up	Max Up	1	Up-regulation at T2, T3 and T4 with a maximum expression at T3 and T4
4	Up	Up	Max Up	1	Up-regulation at T2, T3 and T4 with a maximum expression at T4
5	Steady	Max Up	Up	24	Up-regulation at T3 and T4 with a maximum expression at T3
6	Steady	Up	Max Up	11	Up-regulation at T3 and T4 with a maximum expression at T4
7	Steady	Up	Up	25	Up-regulation at T3 and T4, expression level is similar at T3 and T4
8	Steady	Up	Steady	1	Up-regulation at T3 and no variation at T4
9	Steady	Steady	Up	24	Up-regulation at T4
10	Down	Steady	Steady	1	Down-regulation at T2
11	Steady	Down	Steady	1	Down-regulation at T3
12	Steady	Steady	Down	2	Down-regulation at T4

:

Gene expression: Down Steady Up Max Up

<sup>a</sup> expression pattern relative to T1

Among the 168 genes, 105 genes were up-regulated during sporulation, while 59 genes showed no variation and 4 were down-regulated. Profiles 1, 2, 5, 7 and 9 gathered most of the genes with 150 genes out of the 168 considered. Profile 1 contains 59 genes, showing no variation of expression during sporulation and among them, we mainly identified genes putatively encoding coat or exosporium proteins (23 genes), genes playing a role in septation (11 genes) or encoding other sporulation-related genes (10 genes) (Figure 2). Profile 6 contains 11 genes and mainly gathers genes playing a role in core and cortex composition (3 genes), coat and exosporium composition (4 genes) and other sporulation-related genes (4 genes). Profiles 3, 4, 8, 10, 11 and 12 only contains 1 or 2 genes.



**Figure 2: Gene groups and associated expression profiles during sporulation kinetics of *M. thermoacetica*.** n corresponds to the total number of genes per group.

Genes encoding sigma factors and sigma factor regulators (Group A) belonged to 6 distinct profiles of expression. The *sigH* gene, encoding  $\sigma^H$ , did not exhibit any expression variation throughout sporulation kinetics (profile 1) as also observed for *spoIIAA*, *spoIIAB*, *sigF* and *spoIIE*. However, all these genes, except *sigH*, tended to be down-regulated only at T4 with a -0.9 to -1.3  $\log_2$  fold change decrease when T3 and T4 were compared (Table 2).

**Table 2: Sporulation-related genes expression of *Moorella thermoacetica* strain ATCC 39073 at 55 °C in regulated conditions**

	Gene name <sup>a</sup>	Locus ATCC 39073 (access number :CP000232.1) <sup>b</sup>	T2 VS T1 Log2 Fold change	T3 VS T2 Log2 Fold change	T4 VS T3 Log2 Fold change	T3 VS T1 Log2 Fold change	T4 VS T1 Log2 Fold change	Profile	T2 vs T1 <sup>c</sup>	T3 vs T1 <sup>c</sup>	T4 vs T1 <sup>c</sup>
A Sporulation-associated sigma factors and genes controlling sigma factor maturation	<i>sigH (spo0H)</i>	moth_2479	-	-	-	-	-	1			
	<i>sigF (spoIIAC)</i>	moth_1496	-	-	-1,2	-	-	1			
	<i>spoIIAA</i>	moth_1498	-	-	-1,3	-	-	1			
	<i>spoIIAB</i>	moth_1497	-	-	-1,3	-	-	1			
	<i>spoIIE</i>	moth_0103	-	-	-0,9	-	-	1			
	<i>sigG (spoIIIG)</i>	moth_0853	5,2	2,2	-1,6	7,4	5,8	2			
	<i>sigE (spoIIGB)</i>	moth_0852	2,4	1	-0,9	3,4	2,5	2			
	<i>spoIIGA</i>	moth_0851	-	-	-0,9	2,9	-	8			
	<i>spoIIR</i>	moth_0854	4,5	2,2	-1,4	6,7	5,3	2			
	<i>sigK</i>	moth_1582	-	-	4,2	-	4,7	9			
	<i>bofA</i>	moth_0031	-	-	-	-	1,3	9			
	<i>spoIVCA</i>	moth_1561	-	-	1	-	-	1			
	<i>spoIVB</i>	moth_1506	-	1,7	4,4	2,3	6,7	6			
	<i>spoIVFA</i>	moth_0548	-	2	-0,9	3,3	2,5	5			
<i>spoIVFB</i>	moth_0549	-	1,7	-1,2	3	1,8	5				
B Genes involved in pre-septation and septation	<i>abrB</i>	moth_0047	-	0,8	0,9	-	0,9	9			
	<i>spo0A</i>	moth_1505	-	-	-1,1	-	-	1			
	<i>parA</i>	moth_2516	-	-	-	-	-	1			
	<i>spo0J (parB)</i>	moth_2515	-	-	-	-	-	1			
	<i>spoIIIE</i>	moth_1072	-	0,7	-	-	-	1			
	<i>ricT/yaaT</i>	moth_0044	-	-	-	-	-	1			
	<i>ftsX</i>	moth_0245	-	-	1,1	-	-	1			
	<i>divIVA</i>	moth_0862	-	-	-	-	-	1			
	<i>obgE</i>	moth_0561	-	-	-	-	-	1			
	<i>ftsA</i>	moth_0849	-	-	-	-	-	1			
<i>ftsZ</i>	moth_0850	-	-	-	-	-	1				
<i>ftsY</i>	moth_0962	-	-	-	-	-	1				
C Genes involved in engulfment	<i>spoIIQ</i>	moth_2373	5,2	-	-3	6,3	3,3	2			
	<i>spoIID</i>	moth_2374	-	2,2	-2,8	5	2,2	5			
	<i>spoIIM</i>	moth_1503	2	1,6	-	3,6	2,9	2			
	<i>spoIIP</i>	moth_0578	6,9	2,8	-1,6	9,8	8,2	2			
		moth_1326	-	3,2	-	3,9	3,5	7			
	<i>spoIIIAA</i>	moth_1536	6,2	-	-2,5	8	5,4	2			
	<i>spoIIIAB</i>	moth_1535	-	-	-2,6	7,7	5	5			
	<i>spoIIIAC</i>	moth_1534	-	-	-2,2	7,1	5	5			
	<i>spoIIIDAD</i>	moth_1533	5,9	-	-2,6	7,6	5	2			
	<i>spoIIIAE</i>	moth_1532	6,1	-	-2,7	8	5,2	2			
<i>spoIIIAF</i>	moth_1531	6,1	-	-2,4	7,9	5,5	2				

	<i>spoIIAG</i>	moth_1530	6	-	-2,7	7,8	5,1	2			
	<i>spoIIAH</i>	moth_1529	6,3	-	-2,6	8,2	5,6	2			
	<i>spoIIID</i>	moth_2372	5,4	-	-	7,4	6,8	2			
	<i>spoIIJ</i>	moth_2521	-	-	-	-	-	1			
	<i>gerM</i>	moth_2506	-	-	-	-	-	1			
	<i>jag</i>	moth_2520	-	-	-	-	-	1			
	<i>ytaF</i>	moth_1839	-	-	1,1	-	1,7	9			
D Inner membrane/ germination	<i>sleB</i> family	moth_0734	-	-	-	-	-	1			
		moth_0054	-	-	2,7	-	2,5	9			
		moth_0202	-	4,3	-	8,8	8,2	5			
	<i>gerA</i> family and genes encoding germination proteins	moth_1012	-	-	-	2,4	2,7	7			
		moth_1013	-	3,7	-	4,4	4,9	7			
		moth_1014	-	3,2	-	6,5	6,6	7			
		moth_1460	-	3,1	-	-	1,9	9			
		moth_1461	-	2,9	-	3,5	3,6	7			
		moth_1462	-	2,2	-	-	1,3	9			
		moth_2040	-	3,1	-	3,6	3,1	7			
		moth_2041 ( <i>ykfT</i> )	-	2,3	-	3,3	2,2	5			
	moth_2042	-	-	-	-	1,6	9				
	<i>ypeB</i>	moth_0201	-	4,9	-	8,9	7,9	5			
	<i>tepA</i>	moth_1071	-	3,8	-	6,1	5,5	5			
<i>prkC</i>	moth_0912	-	-	-	-	-	1				
<i>gpr</i>	moth_0926	-	3,8	-	6,4	4,8	5				
E Spore core and cortex composition	<i>spoVAC</i>	moth_1376	2,8	2,3	-1,2	5,1	3,9	2			
	<i>spoVAD</i>	moth_1375	2,7	2,6	-	5,2	4,6	2			
	<i>spoVAE</i>	moth_1374	-	2,6	-	5,4	4,2	5			
	<i>spoVAF</i>	moth_1373	-	2,8	-	5,2	4,1	5			
	<i>ylbJ</i>	moth_0938	-	-	-1,9	6	4,1	5			
	<i>yabQ</i>	moth_0089	-	2,6	-	8,8	8,8	7			
	<i>splB</i>	moth_1928	-	-	-	-	-	1			
	<i>dpaA</i> ( <i>spoVFA</i> )	moth_1064	-	-	2,6	-	2	9			
	<i>dpaB</i> ( <i>spoVFB</i> )	moth_1065	-	-	2,6	-	1,7	9			
	Genes encoding alpha/bêta-type SASPs	moth_1875	-	1,6	2,1	-	1,6	9			
		moth_0806	-	3,8	5	8	13	6			
		moth_0925	-	1,9	5,9	2,5	8,4	6			
	<i>cwlD</i>	moth_2296	-	2,1	-	3	4,9	6			
	<i>dacB</i>	moth_1357	-	-	-	-	-	1			
		moth_1058	-	1,7	-	2,1	1,8	7			
	<i>spmA</i>	moth_1356	-	2,1	-2,7	4,4	1,7	5			
	<i>spmB</i>	moth_1355	-	-	-2,5	4,8	2,3	5			
	<i>spoVB</i>	moth_1143	4,5	-	-1,3	6,6	5,3	2			
	<i>spoVD</i>	moth_0837	-	0,9	-0,8	-	-	1			
	<i>spoVR</i>	moth_0512	-	2,6	-	5,2	4,7	7			
<i>ylxY</i> or <i>pdaA</i>	moth_1057	-	1,7	-	2,2	1,9	7				
	moth_0040	6,5	3	-	9,5	8,8	2				



F Genes encoding known or putative coat/exosporium proteins	<i>or pdaB</i>	moth_0739	-	-	-	-	-	1				
	<i>spoIVA</i>	moth_1319	-	3,1	-	8,3	7,1	5				
	<i>spoVS</i>	moth_0952	-	-	-	-	-	-	1			
		moth_1084	-	-	-	-	-	-	1			
	<i>cotJB</i>	moth_1391	-	-	2,1	5,1	7,2	6				
	<i>cotJC</i>	moth_1392	-	2,2	2,3	5	7,3	6				
	<i>cotG</i>	moth_1016	-	3,5	-	6,6	6,6	7				
	<i>yticC (cotSA paralog)</i>	moth_1853	-	1,7	-2,2	4,3	2,1	5				
	<i>spsL</i>	moth_0165	-	-	-	-	-	1				
	<i>cotSA</i>	moth_1365	-	-	-	-	-	1				
	<i>yhaX</i>	moth_0257	-	-	-	-	-	1				
	<i>Sodf</i>	moth_1916	-	-	2,8	-	2,8	9				
	<i>yabG</i>	moth_0056	-	-	6,7	-	8,3	9				
	ND	moth_1782	-	2,8	-	-	2,9	9				
	<i>yhcQ</i>	moth_2016	-	1,4	-	-	-	1				
	<i>cwlC</i>	moth_1272	-	-	0,8	-	-	1				
	<i>ykvN</i>	moth_0373	-	-	-	-	-	1				
	<i>atcL (yloB)</i>	moth_0887	-	-	-2,2	7,5	5,3	5				
	<i>tcyA (yckK)</i>	moth_1126	-	-	-	-	-	1				
	<i>ymxG</i>	moth_1059	-	1,4	-	1,2	1	7				
	<i>yrbF</i>	moth_1693	-	-	-	-	-	1				
	ND	moth_0527	-	-	-	-	-	1				
	<i>rnjA</i>	moth_1069	-	-	-	-	-	1				
	<i>yyxA</i>	moth_2417	-	-	-	-	-	1				
		moth_0736	-	-	-	-	-	1				
	ND	moth_0517	-	-	-	-	-	1				
	ND	moth_0033	-	3,4	-	4,6	4,6	7				
	ND	moth_0034	-	3,5	-	4,3	4,1	7				
	ND	moth_0035	-	3,3	-	4,3	4,1	7				
	ND ( <i>yaaH</i> or <i>ydhD</i> or <i>yzkR</i> )	moth_0063	-	-	5,4	-	7,4	9				
	<i>dacF</i>	moth_1499	-	1,8	-	2,7	1,9	5				
	<i>Alr</i>	moth_2167	-	-	-	-	-	1				
	Genes encoding a putative arginase	moth_1815	-	-	-	-	-	1				
	Genes encoding a putative arginase	moth_1747	-	-	-	-	-	1				
<i>rbr</i>	moth_1286	-	-0,7	-	-	-	1					
<i>rbr</i>	moth_1879	-	-	-	-	-	1					
ND	moth_1518	-	-	-	-	-	1					
ND	moth_0602	-	-	-	-	-	1					
ND	moth_1414	-	-	-	-	1,6	9					
ND	moth_1683	-	-	0,9	-	1,2	9					
<i>feoB</i>	moth_1405	-	-	7,1	4,1	11	6					
ND	moth_0738	-	-	-	-	-	1					

	<i>Eno</i>	moth_0266	-	-	-	-	-1	12			
	ND	moth_2301	-	2,2	-	3,1	2,9	7			
	<i>spoVT</i>	moth_0083	1,9	3,1	-	4,9	4,8	3			
	<i>spoVK</i>	moth_1118	-	2,3	-	2,6	3,4	6			
	<i>prkA</i>	moth_0510	-	2,8	-	8,1	8	7			
	ND	moth_0711	-	2,8	-	4	4,2	7			
	<i>yyaC</i>	moth_2508	6,5	-	-0,9	8,6	7,7	2			
	<i>yqfC</i> ( <i>yabP</i> family)	moth_0591	-	2,2	-1,6	6	4,4	5			
	<i>yqfD</i>	moth_0592	-	1,3	-1,5	2,6	1	5			
	<i>yunB</i>	moth_1708	-	-	1,2	-	1,4	9			
	ND	moth_0794	-	-	0,9	-2,4	-	11			
	<i>yhbH</i>	moth_0511	-	2,8	-	7,2	6,9	7			
	<i>ylmC</i> or <i>ymxH</i> paralog	moth_0855	-	2,5	-	5,3	4,9	7			
	<i>ylmC</i> or <i>ymxH</i> paralog	moth_1062	-	1,8	-	2,3	1,9	7			
	<i>lonC</i>	moth_0133	-	-	-	-	-	1			
	<i>lonB</i>	moth_0530	-	1,7	-	2,7	1,8	5			
	<i>yqhQ</i>	moth_2398	-	-	-	-	-	1			
	<i>cspR</i>	moth_1880	-	-	-	-	-	1			
	<i>murB</i>	moth_0845	-	1	3,3	-	4,4	9			
	<i>murG</i>	moth_0843	-	0,9	-	-	-	1			
	<i>nfo</i>	moth_1124	-	-	-	-	-	1			
	<i>yqfU</i>	moth_0235	-	-	-	-	-	1			
	<i>ytlA</i>	moth_1981	-	-	5,5	-	6,5	9			
	<i>yfnG</i>	moth_0751	-	-	-	-	-	1			
	<i>yfnH</i>	moth_0762	-	-	-	-	-1,4	12			
	<i>ydfs</i>	moth_0220	-	-	-	-	0,9	9			
	<i>yitG</i>	moth_0116	-	2,2	-	5	5	7			
	<i>yoaR</i>	moth_1638	-	1,3	2,4	1,8	4,1	6			
	<i>yveA</i>	moth_0737	-	-	-	-	1,6	9			
	<i>yyaD</i>	moth_2507	-	2,4	-	5	4,3	5			
	<i>yitD</i>	moth_0118	-	2,2	5	6	11	6			
	<i>ykvI</i>	moth_1876	-2,7	-	-	-	-	10			
	<i>yhxC</i>	moth_0426	-	-	-	-	-	1			
	<i>ytxC</i>	moth_1761	-	1,1	1	1,8	2,8	6			
	<i>ytlI</i>	moth_1040	-	-	-	-	-	1			
	<i>yckD</i>	moth_1828	-	1,8	-	2	2,3	7			
	<i>dapG</i>	moth_1067	-	-	2,8	-	2,1	9			
	<i>ytrH</i>	moth_1873	-	2,8	-	8,4	7,8	5			
	<i>gerE</i>	moth_0975	-	-	-	-	-	1			
	<i>ytfI</i>	moth_1359	-	-	-	-	1,6	9			
	<i>ytfJ/gerW</i>	moth_1358	-	1,8	-	1,7	1,8	7			
	<i>ykuD</i>	moth_0101	-	1,9	-	2,8	2,6	7			
	<i>yabP</i>	moth_0088	5,6	3,4	-	8,9	9,4	4			

G  
Other sporulation-associated genes

<sup>a</sup> Gene identified by BlastP

<sup>b</sup> NCBI, access number : CP000232.1

<sup>c</sup>Gene expression : Down Steady Up Max up

NS: Not significant fold change value. These genes were identified by the RNAseq analysis but variation of their expression was not significant ( $p$ -value  $>0.05$ )

ND: Not determined

The *sigG* gene showed an early up-regulation with a fold change of 5.2 log<sub>2</sub> and 7.4 log<sub>2</sub> at T2 and T3 followed by a slight down-regulation (Profile 2). The  $\sigma^E$ -encoding gene *sigE* and *spoIIR* also showed this pattern while the *spoIIGA* gene, encoding a factor involved in  $\sigma^E$  maturation was up-regulated later (profile 8).

The *sigK* gene (profile 9) encoding  $\sigma^K$ , was the later expressed among the sigma factor-encoding genes. Indeed, *sigK* expression underwent a 4.7 log<sub>2</sub> up-regulation at T4 and *bofA* also showed a 1.3 log<sub>2</sub> up-regulation. Genes *spoIVFA* and *spoIVFB* were up-regulated earlier at T3 and slightly down-regulated at T4 (profile 5).

Genes involved in the pre-septation and septation steps (Group B) such as *spo0A*, *parA-parB* and *ftsA*, *ftsY*, *ftsZ*, showed no variation of expression (profile 1). On the contrary, *abrB* was slightly upregulated at T4 (profile 9).

Genes involved in the engulfment step (Group C) were mainly grouped in profile 2 (10 genes out of 18) gathering genes showing an up-regulation at T2 and a maximum expression at T3, followed by a down-regulation. Indeed, *spoIIQ* and most of the genes of the *spoIIIA* operon exhibited an expression of about 6 and 8 log<sub>2</sub> fold higher at T2 and T3 respectively, when compared to T1. Three other genes *spoIID*, *spoIIIAB* and *spoIIIAC* were up-regulated at T3 and down-regulated at T4 (profile 5). However, *spoIIJ*, *gerM* and *jag* showed no variation and *ytaF* was up-regulated at T4. Interestingly, we found two genes thought to encode SpoIIP: moth\_1326 and moth\_0578. Indeed, moth\_1326 is annotated as *spoIIQ* in *M. thermoacetica* genome and matched *B. subtilis spoIIQ* in our *in silico* analysis. However, it was previously reported that moth\_0578 corresponded to *spoIIQ* (de Hoon *et al.*, 2010) and matched *C. difficile spoIIQ* in our *in silico* analysis. This suggests that these 2 genes may encode SpoIIP as supported by the RNAseq data. Indeed, moth\_1326 and moth\_0578 genes were up-regulated and grouped in profiles 7 and 2, respectively. Here, moth\_1326 was 3.9 log<sub>2</sub> up-regulated at T3 while moth\_0578 was highly up-regulated (6.9 log<sub>2</sub>) earlier at T2 and peaked at T3 (9.8 log<sub>2</sub>). Thus, these results suggest that the transcription of these genes is up-regulated during sporulation and consequently play a role in *M. thermoacetica* sporulation.

Genes encoding inner membrane proteins involved in germination (Group D) tended to be over-expressed later than genes involved in engulfment, at T3 and/or T4 (10 genes out of 16 genes in profiles 5 and 7). Genes identified as encoding GerA family as well as *gpr* and *sleB* family genes belonged to profiles 5, 7 or 9. All these genes exhibited a maximum log<sub>2</sub> fold

change ranging from 1.3 to 8.2 for *moth\_1462* and *moth\_0202*, respectively. Genes encoding SleB family and *prkC* showed no variation.

The 23 genes involved in core and cortex composition (Group E) were almost equally grouped in profiles 2, 5, 6, 7 and 9 i.e gathering genes up-regulated at T3 and/or T4. Genes encoding DPA (profile 9) and SASPs (profiles 6 or 9) reached a maximum log<sub>2</sub> fold change at T4, from 1.6 to 13 for *dpaB* and the SASP-encoding gene *moth\_0806*, respectively. The *moth\_1058* gene encoding a putative DacB protein, as well as *yabQ* or *spoVR* belonged to profile 7 and were up-regulated at T3 and T4. Genes such as *spoVAC* and *spoVAD* showed an early up-regulation at T2 and T3, while the other *spoVA* genes and *ylbJ* were only up-regulated at T2. Besides, four genes showed no variation of expression among which *splB* and *spoVD*.

About half of the genes encoding putative coat and exosporium proteins (Group F) showed no variation of expression. However, the other genes were grouped in profiles up-regulated at T3 and/or T4 (profiles 5, 6, 7 and 9). For instance, *spoIVA*, *dacF* (profile 5) and *cotG* (profile 7) showed a 2.7 to 8.3 log<sub>2</sub> fold expression increase at T3 compared to T1 while *cotJB-cotJC* (profile 6) showed an approx. 7 log<sub>2</sub> fold increase at T4 and *CotSA* (profile 5) showed a 4.3 log<sub>2</sub> fold increase at T3.

Finally, the Group G gathered other sporulation-related genes including 9 genes showing no variation of expression during the sporulation kinetics (profile 1) while 18 genes were up-regulated at T3 and T4 (profiles 5 to 7) and 7 genes were up-regulated at T4 only (profile 9).

## 4. Discussion

### ***Moorella thermoacetica* sporulates in regulated conditions**

In the present work, we studied growth and sporulation of *M. thermoacetica* strain ATCC 39073 in regulated conditions at optimal temperature and pH (55 °C, pH 7.0) and chose to inoculate the bioreactor with a heat-activated spore suspension for better reproducibility of the experiments. Here, we observed that germination of inoculated spores occurred rapidly after inoculation and that growth had already started after 16 h of culture. Exponential growth phase appeared to last until 20 h as the stationary phase was already reached at 40 h, and we noticed that the first endospore-forming cells were observed after 45 h of culture. We observed

the absence of increase in OD<sub>600nm</sub> before 40 h, which probably results from the low spore concentration inoculum and OD<sub>600nm</sub> which was below the detection threshold at the beginning of the experiment. Moreover, spore germination is associated to a decrease of OD<sub>600nm</sub> thus lowering even more the OD<sub>600nm</sub> of the culture. The dramatic ORP decrease observed has already been reported for another *M. thermoacetica* strains grown in regulated conditions once exponential growth phase had begun (Schwartz et Keller, 1982b, Xue *et al.*, 2014).

After 45 h of culture, only a small fraction of cells were sporulating and even in later stages. Only around 10 % of free spores were obtained at the end of sporulation, cells showing no sign of entry into sporulation being mainly observed. Thus, in our study, sporulation of *M. thermoacetica* was not homogeneous, as observed in other Clostridia (Xiao *et al.*, 2015).

Besides, while the sporulation was occurring, some cells kept on multiplying or elongated dramatically. At the end of sporulation, we observed that the highly dense culture contained approximately 10 % of free spores and a large majority of vegetative cells. This could be due to part of the cells which have not sporulated that still grew and/or to germination of a small fraction of spores occurring in the bioreactor at the end of the kinetics. Thus, the OD<sub>600nm</sub> increase at the end of the exponential phase might be due to growth of a fraction of vegetative cells still present in the medium and/or to cell elongation.

Sporulation might have been triggered by nutrient starvation or a high cell density, as generally described for *Bacillus* (de Hoon *et al.*, 2010, Abecasis *et al.*, 2013, Edwards *et al.*, 2014). However, nutrient starvation might not be a major factor triggering sporulation of *Clostridium* species. Indeed, it was reported that cells of the solventogenic *C. acetobutylicum* produce acids during growth which results in a pH decrease, leading to re-uptake of acids by cells to produce solvents thus triggering sporulation (Steiner *et al.*, 2011, Al-Hinai *et al.*, 2015). Indeed, *M. thermoacetica* is a former *Clostridium* and an acetogenic bacterium strongly acidifying the medium as indicated by the volume of KOH (approx. 70 ml) added from the end of exponential growth to the end of the sporulation kinetics. Thus, we think that there might be other factors involved in *M. thermoacetica* sporulation.

## **Conservation of sporulation genes and expression patterns during sporulation of *M. thermoacetica***

We focused our study on the analysis of the expression kinetics of sporulation-related genes in *M. thermoacetica*. Even though *M. thermoacetica* genome has recently been sequenced, it remains poorly annotated. Some studies have reported the existence of sporulation-related genes orthologs in *M. thermoacetica* genome based on a BlastP approach (de Hoon *et al.*, 2010, Abecasis *et al.*, 2013). We searched in *M. thermoacetica* strain ATCC 39073 genome orthologs of genes known to be involved in the sporulation process in other spore-formers. This *in silico* analysis lead to the identification of 168 genes either associated to spore structure or directly involved in the sporulation process. We performed a transcriptomic analysis on RNA extracted at four time points selected according to changes in cell morphology and spore formation during the kinetics: time point 1 (T1, 40h) was characterized by the absence of cells showing a swollen shape at one pole which is characteristic of *M. thermoacetica* sporulating cells. The first slightly swollen-shaped cells were observed after 45 h (T2), this shape being more marked at T3 (49 h) while after 64.5 h (T4), dark or bright endospores could be observed. We compared gene expression at different times vs T1, and also between each time point to detect variation of expression throughout the sporulation kinetics.

Among the 168 genes identified *in silico*, 109 showed expression variations during growth and sporulation while 59 genes did not vary when compared to T1, including 23 coat protein or exosporium-encoding genes, 10 genes involved in septation and 9 genes in the category “Other sporulation-related genes”. A total of 20 genes started to be overexpressed at T2, 61 at T3 and 24 at T4. One gene was down regulated at T2 and T3, while 2 genes were down-regulated at T4.

### **Genes responsible for sporulation initiation and sigma factor genes**

The sporulation specific sigma factors-encoding genes *sigH*, *sigF*, *sigE*, *sigG* and *sigK* which are conserved in spore-formers, were identified in this study and their expression varied during growth, except for *sigH* and *sigF*. Expression of these two sigma factors is mainly regulated by Spo0A and AbrB, encoded by *spo0A* and *abrB*, whose expression did not vary in our study. Both *sigH* and *sigF* are expressed earlier than *sigE*, *sigG* and *sigK* during

sporulation of both Bacilli and Clostridia. In our study, time point 1(T1) corresponded to cells showing no sign of sporulation, while at T2 some cells had a slightly swollen shape indicating that sporulation had already started. However, T1 is in the stationary phase and we do not know if it had just begun or had started hours ago. We first chose 25 h as T1 but were unable to extract sufficient quantity of RNA of high quality, probably because of a too low concentration of cells. Thus, if *sigH* and *sigF* are expressed early during the onset of sporulation i.e. between late exponential growth phase and stationary phase and before the asymmetric septation, as described in *B. subtilis* (Al-Hinai *et al.*, 2015) or in *C. acetobutylicum* (Jones *et al.*, 2008), we probably missed their peak of expression.

The alternative sigma factor  $\sigma^H$  controls the expression of *spo0A* and genes encoding HKs responsible for Spo0A activation by phosphorylation in Bacilli. This phosphorylation is performed in several steps via a phosphorelay and implies the phosphorylation of the phosphotransferases Spo0F and Spo0B prior to Spo0A activation (Galperin *et al.*, 2012, Dürre, 2014, Al-Hinai *et al.*, 2015). Interestingly, we did not find any orthologs of Spo0B while Spo0F sequence matched several regulators in *M. thermoacetica* among which the Spo0A sequence. Thus, several response-regulators seemed closely related and we could not conclude on the presence of a Spo0F ortholog even though *M. thermoacetica* is thought not to encode this protein (de Hoon *et al.*, 2010). According to our observations, we could hypothesize that, as *Clostridium* spore-formers, the initiation of sporulation may be independent of a phosphorelay in *M. thermoacetica* (Saujet *et al.*, 2013, Dürre, 2014, Al-Hinai *et al.*, 2015).

Then, activated Spo0A~P turns down the *sigH*-repressor AbrB thus increasing  $\sigma^H$  and Spo0A~P production. Once a certain Spo0A~P threshold is reached, the sporulation is triggered (Al-Hinai *et al.*, 2015). The same early expression pattern of *sigH* and *spo0A* has been confirmed for some Clostridial species, such as *C. difficile*. Indeed, *sigH* and *spo0A* mutants had an asporogenous phenotype thus confirming their major role in sporulation initiation (Saujet *et al.*, 2011, Fimlaid et Shen, 2015). In *C. acetobutylicum*, *spo0A* and *sigH* show a similar pattern although *sigH* seems to be expressed at the onset of sporulation simultaneously to *spo0A* and not before (Alsaker et Papoutsakis, 2005, Jones *et al.*, 2008). In *C. perfringens*, *spo0A* and *sigH* were not up-regulated during sporulation, however, an early up-regulation of *sigF* was noticed (Xiao *et al.*, 2015). The transcription of the *sigF* operon is controlled by both  $\sigma^H$  and Spo0A factors (Alsaker et Papoutsakis, 2005, Edwards et McBride, 2014, Al-Hinai *et al.*, 2015, Talukdar *et al.*, 2015). As observed in other species, *sigF* in



*Moorella* genome seemed to be organized in a tricistronic operonic structure *spoIIAA-spoIIAB-sigF*. In our transcriptomic analysis, none of these genes were up-regulated at any time point. In *B. subtilis*, the transcription of *spoIIAA-spoIIAB-sigF* also begins before the septation and  $\sigma^F$  is maintained inactive until septation is completed (Talukdar *et al.*, 2015). Thus, we cannot state if *sigH*, *spo0A* and *sigF* are up-regulated very early during *M. thermoacetica* sporulation.

We showed that *sigE* expression was upregulated at T2 and its expression still increased at T3 when cells showed a swollen pole. In *B. subtilis*, *sigE* transcription is initiated early in the mother cell before septation and  $\sigma^E$  is expressed as an inactive pro-form (Talukdar *et al.*, 2015). Its activation requires the two proteins encoded by *spoIIGA* and *spoIIR* which started to be expressed at T3 and T2, respectively. SpoIIR is a secreted protein whose gene is expressed in the forespore and, upon interaction with the mother cell membrane protein SpoIIGA in the intermembrane space, SpoIIGA cleaves pro- $\sigma^E$  and activates  $\sigma^E$ , in *Bacillus* and *Clostridium* (Talukdar *et al.*, 2015). Thus, their expression pattern is quite similar to *sigE* as observed in *C. acetobutylicum* (Jones *et al.*, 2008). As observed for *sigE*, *sigG* shared the same expression pattern in our analysis. The results obtained in our study tended to show that such a proteolytic activation of  $\sigma^E$  might be active in *M. thermoacetica* and that *spoIIGA*, *sigE* and *sigG* genes might also be part of a tricistronic operon, as described in *B. subtilis*, even though *spoIIGA* transcripts seemed to be expressed after *sigE* and *sigG*.

Finally, a 4.7 log<sub>2</sub> fold up-regulation of *sigK* was observed at T4 compared to T1, when a mix of dark and phase-bright endospores was observed. Thus, *sigK* was the last sigma factor-encoding gene up-regulated during *M. thermoacetica* sporulation, which is consistent with data reported for *B. subtilis* but differs from the absence of induction observed in *C. acetobutylicum* (Jones *et al.*, 2008) and the early up-regulation reported for *C. perfringens* (Xiao *et al.*, 2015). Indeed, this gene is expressed in the mother cell and regulates the late stages of sporulation as also suggested by *C. difficile sigK* mutant phenotypes (Saujet *et al.*, 2011). However, as we probably missed the earliest molecular events of the sporulation program, we cannot rule out a potential expression of *sigK* in the earliest steps of *M. thermoacetica* sporulation, as observed for *C. perfringens* (Talukdar *et al.*, 2015).

In our study, we also observed that the 3 genes encoding putative BofA, SpoIVFA and SpoIVFB proteins, essential for the activation of  $\sigma^K$  by a proteolytic cleavage, were up-regulated during sporulation. In *M. thermoacetica* genome, *bofA* and *spoIVFB* orthologs were

found while no *spoIVFA* ortholog was identified by blasting the *B. subtilis* sequence against *Moorella* genome. In *C. perfringens*, *bofA* and *spoIVFB* were either not up-regulated or up-regulated early, respectively (Xiao *et al.*, 2015). In our study, *bofA* was slightly up-regulated at T4 while *spoIVFA* and *spoIVFB* were up-regulated earlier at T3. Indeed,  $\sigma^K$  is expressed as an inactive pro-form in *B. subtilis* and its activation requires a proteolytic activation. The *bofA*, *spoIVFA* and *spoIVFB* genes encode proteins involved in the excision machinery. Thus, our data showed (i) that *bofA*, *spoIVFA* and *spoIVFB* are up-regulated during *M. thermoacetica* sporulation, strongly suggesting that the encoded proteins could be involved in the  $\sigma^K$  pro-peptide excision and (ii) that  $\sigma^K$  may probably be produced as an inactive proform that is further activated by the cleavage of the pro-peptide part. In agreement with these hypothesis, the alignment of *M. thermoacetica*  $\sigma^K$  amino acid sequence with that of several Bacilli and Clostridia revealed the presence of a pro-peptide sequence in *M. thermoacetica*'s  $\sigma^K$ . Moreover, in *B. subtilis* *spoIVFB* is organized as a *spoIVFA-spoIVFB* operon. As *moth\_0548* is separated from *spoIVFB* (*moth\_0549*) by only 4 bp, we hypothesized that *moth\_0548* and *moth\_0549* are organized in operon and encode for the proteases SpoIVFA and SpoIVFB.

The *sigK* open reading frame contains a sigma K intervening element also referred to as “*skin* element” in *B. subtilis* and in some *C. difficile* and *C. tetani* strains (Saujet *et al.*, 2013, Dürre, 2014, Al-Hinai *et al.*, 2015). In *B. subtilis*, this element separates *spoIVCB* and *spoIIIC* which encode the N-terminal half and the C-terminal half of *sigK*, respectively. Thus, this element is excised by the SpoIVCA recombinase to allow the expression of *sigK*. The gene encoding SpoIVCA DNA recombinase responsible for *skin* excision in *B. subtilis* was identified in the *in silico* analysis but its expression did not vary in our study.

In *B. subtilis* and *C. difficile*, the *sigK* gene is approx. 48 kb and 15 kb-long respectively, and contains a *skin* element. In our study, blasting the amino-acid sequence of SpoIVCB and SpoIIIC against *M. thermoacetica* genome lead to the identification of a single 681 bp-gene *moth\_1582*, similar to the functional *sigK* gene in *C. difficile*. Even though we identified a potential *spoIVCA* ortholog, it seems unlikely that *sigK* of *M. thermoacetica* contains a *skin* element as (i) the putative *spoIVCA* locus is distant from the *sigK* locus contrary to the gene encoding the *skin* recombinase found in *B. subtilis* and *C. difficile* and (ii) this gene showed no variation of expression through time. Thus, the proper  $\sigma^K$  expression would not depend on the excision of this element in *M. thermoacetica*, unlike what was reported for *C. difficile* and *B. subtilis* (Talukdar *et al.*, 2015, Serrano *et al.*, 2016b).

## Genes involved in the engulfment steps are expressed during *M. thermoacetica* sporulation

As described in *B. subtilis*, the next step taking place after asymmetric division is a morphological transition called engulfment, after which  $\sigma^G$  is activated. Several proteins are involved in this step, such as SpoIIM, SpoIID and SpoIIP localized at the mother cell engulfing membrane. They form a complex that allows the dissolution of the septal cell wall before engulfment and are required for the membrane movement to happen during engulfment (Higgins et Dworkin, 2012, Dworkin, 2014, Tan et Ramamurthi, 2014). They are also necessary for the recruitment of the forespore SpoIIQ protein to the forespore membrane which interacts with SpoIIIA proteins localized at the mother cell membrane. These proteins interact and complex together in the space separating the inner membrane from the outer membrane, to form a channel called « feeding tube » that ensures the communication between the forespore and the mother cell once engulfment is over (de Hoon *et al.*, 2010, Galperin *et al.*, 2012, McKenney et Eichenberger, 2012, Serrano *et al.*, 2016a), allowing the activation of the late forespore-specific  $\sigma^G$  (Dworkin, 2014, Serrano *et al.*, 2016a).

According to Galperin *et al.* (2012), no *spoIIQ* ortholog is present in *M. thermoacetica* genome. However, by blasting the amino-acid sequence encoded by *spoIIQ* gene of *C. difficile* (Dembek *et al.*, 2015), we found a potential ortholog which did not correspond to the moth\_0548 gene, and differed from previously reported data (de Hoon *et al.*, 2010).

Our *in silico* analysis revealed that *spoIIM*, *spoIIP*, *spoIID*, *spoIIR*, *spoIIQ* were up-regulated during *M. thermoacetica* sporulation. These genes started to be up-regulated at T2 and T3 as most of *spoIIIA* genes whose peak of expression was detected at T3 with an 8 log<sub>2</sub> fold up-regulation. The other genes, as *spoIIAB* and *spoIIAC*, were up-regulated at T3 only. However, they probably shared the same expression pattern as other *spoIIIA* genes as they showed a similar expression at T3 (Table 2). These results are consistent with the cell morphology at these time points as a small fraction of cells only exhibited one slightly swollen pole, which may indicate that engulfment had begun. In all, this strongly suggests that the main molecular events governing the engulfment step are conserved in *M. thermoacetica*. In *B. subtilis*, the *spoIIM*, *spoIID*, *spoIIP* and the *spoIIIA* operon are also expressed early in the mother cell under the control of  $\sigma^E$  while *spoIIQ* is expressed early in the forespore under the control of  $\sigma^F$  (SubtiWiki). This is in line with the role of *spoIIIAH* and *spoIIQ* in

*C. difficile* but also with the early up-regulation of most of these genes in *C. perfringens* (Xiao *et al.*, 2015, Serrano *et al.*, 2016a).

### **Genes associated to spore core and cortex features**

In our analysis, we also considered genes essential to the dehydration of the spore core, genes involved in DPA synthesis and transport and genes involved in DNA protection such as genes encoding SASP proteins.

Orthologs of *spmA* and *spmB* which encode proteins associated with spore core hydration were found in *M. thermoacetica* genome as well as a *dacB* ortholog, encoding a sporulation-specific penicillin-binding protein involved in cortex peptidoglycan cross-linking (Popham *et al.*, 1995b, Paredes-Sabja *et al.*, 2008c). We reported two putative *dacB* genes. Indeed, blasting the amino sequence encoded by *B. subtilis dacB* gene and *C. perfringens dacB* gene lead to the identification of 3 genes encoding closely-related penicillin-binding proteins. The first and second hits were encoded by moth\_1058 and moth\_1357, respectively. However, it was reported that *dacB* gene is organized in operon with *spmA* and *spmB* in *B. subtilis*. As SpmA and SpmB are encoded by moth\_1356 and moth\_1355 respectively, it seems more likely that DacB is encoded by moth\_1357. However, the transcriptome analysis revealed that moth\_1358 gene expression was up-regulated at T2, like *spmA* and *spmB* while moth\_1357 did not show any variation of expression. We can hypothesize that moth\_1357 could be a *dacB* ortholog which is not differentially expressed in our conditions or that moth\_1358 is the true *dacB*, as suggested by the *in silico* analysis, but not organized in operon with *spmA* and *spmB*, as showed in *C. perfringens* (Paredes-Sabja *et al.*, 2008c).

Furthermore, we identified orthologs of various genes involved in the spore cortex synthesis such as *yabQ*, *cwlD*, *spoVB*, *spoVD* and *spoVR*. Among these genes, we identified putative orthologs of *ylxY*, *pdaA* and *pdaB* but we could not define precisely each locus, as Blast-P results gave several common hits for these genes. In our transcriptomic analysis, we showed that all these genes associated to the spore cortex formation were up-regulated during *M. thermoacetica* sporulation. Most of them started to be up-regulated at T3, except a potential *pda* or *ylxY* gene ortholog that started to be up-regulated at T2. Interestingly, *yabQ* as well as moth\_0040 (putative *pda* gene or *ylxY*) showed a 9 log<sub>2</sub> fold up-regulation at T3.

Genes involved in DPA synthesis were identified in this study, with *dpaA* (*spoVFA*), *dpaB* (*spoVFB*). We also identified *spoVV* (*ylbJ*) and SpoVA-encoding genes including *spoVAC*, *spoVAD*, *spoVAE* and *spoVAF*, which are essential to DPA and calcium uptake into the forespore core (Tovar-Rojo *et al.*, 2002, Paredes-Sabja *et al.*, 2008d, Li *et al.*, 2012).

We showed that *dpaA* and *dpaB*, responsible for DPA synthesis, shared the same expression pattern as they showed a 2 log<sub>2</sub> up-regulation only at T4. This expression pattern is in line with the late expression of these genes regulated by  $\sigma^K$  with *sigK* being also up-regulated only at T4 in our analysis. Indeed, DPA is synthesized in the mother cell in the late stages under the control of  $\sigma^K$  in *B. subtilis* but also in *C. difficile* (Saujet *et al.*, 2013). Moreover, our analysis revealed that *spoVAC*, *spoVAD* showed a 2.7-2.8 log<sub>2</sub> fold up-regulation at T2 with a peak of expression of about 5 log<sub>2</sub> fold at T3. We noticed that *spoVAE* and *spoVAF* showed a similar up-regulation as *spoVAC* and *spoVAD* at T3, thus suggesting they shared a same global expression pattern. The *ylbJ* gene also showed an up-regulation at T3. Thus, it seems likely that these genes have the same function in *M. thermoacetica*. Expression pattern of *spoVA* is similar to *C. perfringens* in which the genes were expressed before the apparition of endospores (Xiao *et al.*, 2015). In *B. subtilis*, *spoVA* genes are organized as an operon *spoVAA-spoVAB-spoVAC-spoVAD-spoVAEB-spoVAEA-spoVAF* encoding 7 proteins. We did not find any *spoVAA* nor *spoVAB* orthologs in *M. thermoacetica* genome as previously reported (de Hoon *et al.*, 2010, Galperin *et al.*, 2012). This observation is consistent with the fact that only *spoVAC*, *spoVAD*, *spoVAE* and *spoVAF* are well conserved in *Bacillus* and *Clostridium* (Tovar-Rojo *et al.*, 2002, Ramírez-Guadiana *et al.*, 2017). Indeed, it was shown that *C. perfringens* tricistronic *spoVA* operon played a role in Ca-DPA uptake thus suggesting that not all the *spoVA*-encoded proteins are essential to Ca-DPA movement across the inner membrane (Paredes-Sabja *et al.*, 2008d).

Three genes encoding  $\alpha/\beta$ -type SASPs, were identified in our *in silico* analysis, moth\_1875, moth\_0806 and moth\_0925. The putative SASPs-encoding genes moth\_1875 and moth\_0806 were up-regulated at T3 with a peak at T4 and moth\_0925 was only up-regulated at T4. This up-regulation in later stages of sporulation is in agreement with that of *B. subtilis* SASPs-encoding genes expressed late either in the forespore or in the mother cell, while SASPs-encoding genes in *C. acetobutylicum* were globally expressed late (Jones *et al.*, 2008). These proteins are found in the spore core and play a major role in DNA protection against UV and genotoxic compounds by saturating the DNA molecule (Popham *et al.*, 1995b, Raju *et al.*, 2007, Paredes-Sabja *et al.*, 2008b, Setlow, 2014a).

## Expression pattern of genes associated to membrane

All the genes we reported as being part of the inner membrane are associated to germination. Among these, orthologs of the well conserved *gpr*, *ypeB* or *prkC* were found. In *M. thermoacetica* genome, we found 9 genes likely to form 3 operons, annotated as encoding GerA-family proteins and germination proteins. Indeed, germinant receptors of the GerA family i.e. GerA, GerB and GerK composed of subunits A, B and C have been reported in *B. subtilis* (Moir et Cooper, 2015). These subunits are encoded by tricistronic operons in *B. subtilis* but some variations can be observed as reported for *C. perfringens* in which *gerKA* and *gerKC* are co-transcribed but not *gerKB* (Paredes-Sabja *et al.*, 2011). Three genes *moth\_1012*, *moth\_1013* and *moth\_1014* shared the exact same profile of expression suggesting the existence of an operon as for *B. subtilis* *gerA*, *gerB* and *gerK* genes. If we consider the comparison between T3 and T2 instead of T3 vs T1, we noticed that *moth\_1460*, *moth\_1461* and *moth\_1462* genes were up-regulated in the same way (Table 2). Besides, *moth\_2040* and *moth\_2041* genes were up-regulated at T3 whereas *moth\_2042* gene was up-regulated at T4 but all three genes were similarly up-regulated at T4. Altogether, these observations showed that the genes we identified as encoding potential GerA, GerB and/or GerK orthologs are expressed during *Moorella* sporulation. These genes were also up-regulated before the apparition of phase-bright endospores, in *C. perfringens* (Xiao *et al.*, 2015). However, the expression profiles of *ger* genes in *M. thermoacetica* seemed to differ from that of *C. acetobutylicum* which are expressed very early during the initiation of sporulation (Jones *et al.*, 2008).

All genes encoding putative inner membrane proteins involved in the germination process, except a *prkC* and a putative *sleB* orthologs, seemed to be expressed during *M. thermoacetica* sporulation. Indeed, *gpr*, *tepA*, *ypeB* as well as 2 *sleB* orthologs started to be up-regulated either at T3 or T4. Besides, we stated earlier that we identified 3 groups of genes described as associated to germination.

## Genes putatively associated to coat and exosporium and other sporulation-related genes

In a previous study, we identified genes encoding putative spore coat and/or exosporium proteins (Malleck *et al.*, To be submitted). The *spoIVA* gene encoding a spore coat morphogenetic protein was up-regulated with a peak of 8.3 log<sub>2</sub> at T3. The two well

conserved *cotJB* and *cotJC* genes which are expressed early in *B. subtilis* and before the apparition of phase-bright endospores in *C. perfringens* (Xiao *et al.*, 2015), were also similarly up-regulated at T3. The *yabG* gene which plays a role in spore coat modification was also up-regulated at T4, while this gene was found to be up-regulated before the apparition of phase-bright endospores in *C. perfringens* and when endospores were already observed in *C. acetobutylicum* (Jones *et al.*, 2008, Xiao *et al.*, 2015). However, among the 43 genes identified, only 20 showed an up-regulation during *M. thermoacetica* sporulation. This suggests that these genes were expressed at a low level or that the sampling points chosen did not allow to detect variation of expression.

Finally, among sporulation-related genes classified as « other sporulation genes » in Table 2, 29 out of the 41 genes were up-regulated at some point. Among these, the *spoVT* gene encodes a regulator of forespore gene expression whose deletion was proved to cause severe defects in *B. cereus* late stages of sporulation (Eijlander *et al.*, 2016). In our study, *spoVT* started to be overexpressed early at T2 and peaked at T3, as reported for *C. perfringens* (Xiao *et al.*, 2015). This suggests that this gene could also be expected to play an important regulatory role in *M. thermoacetica* sporulation. Besides, the *yabP* gene described as essential in late stages of sporulation was expressed early at T2 with a peak of up-regulation of 8.4 log<sub>2</sub> fold at T3, highlighting a strong expression of this gene during sporulation as reported for *C. perfringens* (Xiao *et al.*, 2015). Even though a large majority of the genes of this class had no function assigned, we showed here that most of them seemed to play a role in *M. thermoacetica* sporulation.

## 5. Conclusion

In this study, we followed growth and sporulation of *M. thermoacetica* strain ATCC 39073 in regulated optimal conditions. An *in silico* analysis allowed the identification of 168 sporulation-related gene orthologs with most of them being up-regulated during sporulation, as revealed by RNA sequencing data. We showed that genes encoding sigma factors as well as genes involved in engulfment and spore maturation were well conserved in *M. thermoacetica* genome contrary to coat and exosporium-encoding genes.

All our results tended to show that the global sporulation mechanism was conserved in *Moorella*. We noticed that the genes encoding the 4 well-conserved sporulation-specific sigma factors  $\sigma^F$ ,  $\sigma^G$ ,  $\sigma^E$  and  $\sigma^K$  were expressed during sporulation. However, we did not

observe any expression variation of genes known to be involved in the very first steps of sporulation such as *sigH*, *sigF*, *spo0A* and genes involved in septation. In *B. subtilis*, these genes are expressed during the transition between exponential growth phase and stationary phase, thus we thought the first steps of sporulation were missed as our reference time point was already in the stationary phase. Thus, even if *sigG*, *sigE* and *sigK* tended to follow an expression pattern similar to the one described in *B. subtilis*, our data did not allow the description of the early event of *Moorella* sporulation. This study establishes for the first time the basis of molecular mechanisms underlying sporulation of the thermophilic anaerobe *M. thermoacetica*.

To better characterize *M. thermoacetica* sporulation mechanisms, it would be interesting to perform an analysis with more time points before the stationary phase and between T3 and T4. These findings are of importance to understand the evolution of sporulation mechanisms and expand the global knowledge to endospore-forming species exhibiting different metabolic features.

### **Acknowledgments**

This work is a part of T. Malleck's PhD thesis given financial support from the Association Nationale de la Recherche et de la Technologie (ANRt), France and FranceAgriMer (FAM). The authors thank Pr I. Martin-Verstraete for helpful discussions. We also thank S. Chamot and R. Duboscq for help with RNA preparation and for advice.

### **Supplementary data**

**Table S1: Sporulation genes expression and sporulation genes details** (provided as an Excel file)





## *Discussion générale*



En conditions de stress, certaines bactéries à Gram positif appartenant aux *Bacilli* et *Clostridia* enclenchent un mécanisme de différenciation cellulaire appelé sporulation, aboutissant à la formation et à la libération d'une spore bactérienne dans l'environnement. Celles-ci sont ubiquitaires et principalement retrouvées dans les sols (Carlin, 2011). De ce fait, les matières premières végétales sont contaminées par ces spores qui se retrouvent alors au niveau des lignes de production des produits alimentaires (Sevenier *et al.*, 2012, Durand *et al.*, 2015). Les spores ont une structure particulière, différente de celles des cellules végétatives dont elles sont issues, qui leur confère des propriétés de résistance nettement supérieures à celles de la forme végétative (Gould, 2006, Setlow, 2014a). Les bactéries sporulées sont de ce fait la principale problématique pour les aliments traités thermiquement. Dans le domaine de la conserve alimentaire, les espèces thermophiles, non pathogènes, représentent le principal risque d'altération microbiologique.

*M. thermoacetica* fait partie des bactéries anaérobies thermophiles et produit des spores parmi les plus thermorésistantes isolées à ce jour en industrie agroalimentaire (André *et al.*, 2013), le  $D_{121\text{ °C}}$  des spores de cette espèce pouvant atteindre 111 min (Matsuda *et al.*, 1982, Byrer *et al.*, 2000, André *et al.*, 2013, Durand, 2014, André *et al.*, 2016) *M. thermoacetica* est responsable de 36 % des cas d'altération de produits appertisés peu acides, principalement de légumes, après incubation à haute température, i.e. 55 °C (André *et al.*, 2013). Les industriels de la conserve sont donc confrontés à des pertes économiques importantes dues à la survie et à la germination des spores de *Moorella*. En effet, les exports vers les pays chauds sont alors à éviter lorsque des cas de non-stabilités à haute température sont constatés à l'issue de tests de stabilité.

Une augmentation des barèmes de stérilisation n'étant pas compatible avec la préservation des qualités organoleptiques des produits, d'autres solutions doivent être envisagées pour parvenir à maîtriser la présence des spores de *M. thermoacetica* sur les lignes de production. Cela implique de mieux connaître la physiologie de cette bactérie, de comprendre les mécanismes aboutissant à la production de spores hautement résistantes mais aussi de déterminer comment leur résistance pourrait être limitée.

En conserverie de légumes, les températures rencontrées sont très variables, notamment en zone chaude (41 -69 °C) s'étendant du blancheur à la mise en conserve (Durand *et al.*, 2015). De ce fait, nous avons étudié dans un premier temps l'impact de la température sur les propriétés des spores de *M. thermoacetica*. Ce travail a été réalisé sur 8 souches provenant de collections internationales, ou isolées de conserves alimentaires

altérées. La sporulation a été réalisée sur milieu riche à température optimale de croissance (55 °C) et aux températures limites (45 et 65 °C). Nous avons constaté que toutes les souches de l'étude sporulent à 55 °C, tandis qu'aux températures limites, la concentration en spores est généralement faible, comme rapporté pour *G. stearothermophilus* et *B. weihenstephanensis* (Baweja *et al.*, 2008, Baril *et al.*, 2012b, Mtimet *et al.*, 2015). De plus, les spores produites à la limite basse de température (45 °C) sont moins thermorésistantes que les spores produites à la température optimale (55 °C). Cette observation est en accord avec des études menées sur les spores d'autres espèces bactériennes sporulées, qu'elles soient thermophiles, mésophiles ou psychrotrophes (Baweja *et al.*, 2008, Planchon *et al.*, 2011, Baril *et al.*, 2012b, Mtimet *et al.*, 2015). D'autre part, la thermorésistance des spores de *M. thermoacetica* est semblable pour des spores produites à 55 °C et 65 °C. Contrairement à ce que nous observons dans notre étude, il est rapporté dans la littérature que la thermorésistance des spores augmente avec la température de sporulation mais diminue lorsque la sporulation est effectuée à la température limite haute de croissance (Baril *et al.*, 2012b, Mtimet *et al.*, 2015). D'après les différents travaux publiés, la température optimale de croissance des souches de *M. thermoacetica* varie entre 55 °C et 65 °C (Wiegel *et al.*, 1981, Byrer *et al.*, 2000, Durand, 2014). De plus, des travaux précédents menés au laboratoire ont montré que la limite haute de certaines des souches étudiées est de 68 °C (Durand, 2014). Cependant, seules quelques souches peuvent se développer à cette température. Ainsi, 65 °C représente probablement une température proche de la température optimale de croissance de certaines souches étudiées.

Dans la littérature, il est rapporté que la résistance des spores vis-à-vis de la chaleur humide est principalement liée au contenu en eau du cœur : plus le cœur est hydraté, moins les spores sont thermorésistantes (Popham *et al.*, 1995a, Paredes-Sabja *et al.*, 2008c, Setlow, 2014a, Jamroskovic *et al.*, 2016). L'hydratation du cœur est également liée à sa minéralisation et notamment à la quantité de DPA, qui est inversement corrélée au contenu en eau (Paredes-Sabja *et al.*, 2008d, Setlow, 2014a). Nous pouvons donc émettre l'hypothèse que les spores produites à 45 °C pourraient avoir un cœur plus hydraté et/ou un contenu en DPA plus faible que celui des spores produites à 55 °C.

D'autre part, nous avons caractérisé plus en détail les propriétés des spores de la souche de collection *M. thermoacetica* ATCC 39073 en étudiant ses capacités de résistance aux UV-C et à divers biocides (APA à 250 ppm, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 5 %, hypochlorite de sodium à 3000 ppm, NaOH à 4 M, glutaraldéhyde à 4 %). Les courbes de survie des spores aux différents traitements ont été modélisées en utilisant le modèle de Weibull modifié. Le «  $\delta$  »,

correspondant au temps nécessaire pour détruire un log de la population de spores a été déterminé de façon à prendre en compte l'allure de la destruction. Les résultats ont montré que cette souche produisait des spores nettement moins thermorésistantes à 45 °C par rapport à 55 °C. De ce fait, nous avons déterminé si la température de sporulation jouait également un rôle dans la résistance des spores à divers traitements. Nous avons montré que les spores produites à 55 °C et 45 °C ont une résistance semblable aux UV-C, ce qui est en accord avec des études montrant que la résistance aux UV-C est indépendante de la température de sporulation (Melly *et al.*, 2002, Planchon *et al.*, 2011). De même, les spores produites à 45 °C et 55 °C ont la même sensibilité au H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. En revanche, nous avons constaté que les spores produites à 45 °C sont plus sensibles à l'APA ( $\delta = 14 \pm 1.5$  min) que les spores produites à 55 °C ( $\delta = 32 \pm 1.4$  min). Il est également important de préciser que les spores produites aux deux températures ne sont pas sensibles au NaOH, ni au glutaraldéhyde ou à l'hypochlorite de sodium puisqu'aucune destruction n'a été constatée après 2 h de traitement avec ces biocides. Bien que la température de sporulation n'ait pas d'impact sur la résistance des spores pour 4 des 5 biocides dans les conditions testées, nous avons montré que les spores de *Moorella* produites à la température basse sont plus sensibles à l'APA, ce qui confirme le rôle de la température dans la résistance des spores aux biocides, comme rapporté pour d'autres espèces (Melly *et al.*, 2002, Baweja *et al.*, 2008, Planchon *et al.*, 2011, Setlow, 2014a).

Afin de mieux comprendre les différences de résistance vis-à-vis de la chaleur humide et des biocides, nous avons poursuivi la caractérisation des spores de la souche ATCC 39073 de *M. thermoacetica* en étudiant la structure de ces spores. L'observation des spores produites à 45 °C et 55 °C par MEB a montré que la surface des spores ne semble pas varier en fonction de la température de sporulation. En revanche, il apparaît que les spores produites à 45 °C sont significativement plus petites que celles produites à 55 °C. L'ultrastructure des spores a également été étudiée par MET. Les observations ont révélé que les spores de *Moorella* produites à 45 °C et 55 °C ont une structure semblable à celle des spores classiquement décrites chez d'autres bactéries sporulées (Paredes-Sabja *et al.*, 2014, Driks et Eichenberger, 2016). En effet, elles sont constituées d'un cœur central entouré, de l'intérieur vers l'extérieur, du cortex, de tuniques internes lamellaires, de tuniques externes denses et diffuses ainsi que d'un exosporium, comme décrit précédemment (Byrer *et al.*, 2000). L'exosporium des spores de *Moorella* apparaît comme une grande structure lâche entourant la spore et détachée des tuniques par un inter-espace, ce qui diffère de la structure précédemment décrite (Byrer *et al.*, 2000) mais est semblable aux spores des espèces du groupe *B. cereus sensu lato* (Driks et

Eichenberger, 2016). En revanche, la surface de l'exosporium de *Moorella* semble dépourvue de structure de type « hair-like », présentes chez *B. cereus*, *B. anthracis*, *C. difficile* et *C. perfringens* (Novak *et al.*, 2003, Henriques et Moran Jr, 2007, Fazzini *et al.*, 2010, Paredes-Sabja *et al.*, 2014, Driks et Eichenberger, 2016).

L'ultrastructure des tuniques de *M. thermoacetica* ATCC 39073 produites à 45 °C et 55 °C varie. En effet, les spores de *M. thermoacetica* produites à 55 °C présentent des tuniques internes lamellaires en contact direct avec les tuniques externes dans la grande majorité des cas, alors que celles produites à 45 °C présentent majoritairement des tuniques internes séparées des tuniques externes par une zone peu dense aux électrons. De plus, nous avons fréquemment constaté la présence de « dépôts » très denses aux électrons dans les tuniques internes pour les spores produites à 55 °C, ainsi que des problèmes d'assemblage des tuniques internes et/ou externes plus fréquemment observés pour les spores formées à 45 °C. Ainsi, il semblerait que la cohésion des tuniques soit plus faible pour les spores produites à 45 °C. D plus, nous avons observé que le cœur des spores produites à 45 °C est très souvent bien contrasté et plus facilement discernable du cortex que celui des spores produites à 55 °C. Nous pensons que cela pourrait être dû au fait que les produits de fixation et de contraste utilisés pour la microscopie pénétreraient mieux dans les spores produites à 45 °C. Les tuniques, qui constituent une barrière protéique aux produits chimiques (Setlow, 2014a), pourraient ainsi être plus perméables pour les spores produites à 45 °C.

Il apparaît donc clairement que l'organisation des tuniques est différente selon la température de sporulation. Afin de déterminer si ces différences de structure des tuniques sont liées à des différences de composition protéique, nous avons analysé le protéome total des spores produites à 55 °C et à 45 °C. Les spores de *Moorella* sont caractérisées par la présence de nombreux débris et l'obtention de spores pures reste délicate, comme observé pour certaines Clostridies (Jamroskovic *et al.*, 2016). Pour ces analyses, nous avons adapté la seule méthode décrite pour la purification des spores de *Moorella* (Aoyama, 2014). Cependant, dans nos conditions, le protocole appliqué a permis de réduire la quantité de débris mais pas de les éliminer totalement, une quantité non-négligeable de débris restant présents dans les suspensions de spores. Compte tenu de cette observation, nous avons concentrée notre analyse des données sur les protéines associées spécifiquement aux spores, selon les données bibliographiques.

Ainsi, une analyse *in silico* a été réalisée en blastant la séquence d'acides aminés de protéines de tuniques et d'exosporium identifiées chez les 4 espèces les plus étudiées

(*B. subtilis*, *B. cereus*, *B. anthracis* et *C. difficile*) contre le génome de la souche ATCC 39073 (Abhyankar *et al.*, 2011, Abhyankar *et al.*, 2013, Díaz-González *et al.*, 2015, Stewart, 2015). Cette analyse a révélé que les protéines de tuniques et exosporium sont très peu conservées chez *M. thermoacetica* ATCC 39073. Ce résultat n'est cependant pas surprenant, les protéines des couches externes étant généralement variables car en contact direct avec l'environnement (Henriques et Moran Jr, 2007). Aucune protéine morphogénétique de l'exosporium n'a été retrouvée chez *Moorella*. Seule une protéine morphogénétique des tuniques, SpoIVA, a été identifiée ainsi que 20 autres protéines de tuniques. Ceci implique que les protéines structurales des tuniques et de l'exosporium de *Moorella* sont probablement très différentes de celles décrites chez les autres espèces.

L'analyse des données protéomiques a donc été effectuée en ciblant les 62 protéines sporales identifiées par l'analyse *in silico*, afin de ne pas biaiser l'analyse par la présence de protéines provenant des cellules végétatives. Sur les 1018 protéines identifiées par l'analyse LC-MS/MS dans les deux conditions de températures testées, 24 protéines correspondaient à des protéines sporales identifiées *in silico*. Au total, une arginase, une énoïase, une alanine racémase, deux rubrérythrines ainsi que deux protéines non caractérisées et potentiellement associées à l'exosporium ont été identifiées. Parmi ces protéines, la protéine non caractérisée Q2RIB2 et une arginase pouvant être associée à une résistance à des composés toxiques (Weaver *et al.*, 2007), sont plus abondantes dans les extraits protéiques de spores obtenus à 55 °C et 45 °C, respectivement ( $p$ -value < 0,05).

Quatorze protéines de tuniques ont également été identifiées par LC-MS/MS, parmi lesquelles la protéine morphogénétique SpoIVA dont l'abondance relative semble plus importante dans les extraits de spores produites à 55 °C qu'à 45°C ( $p$ -value < 0,05). SpoIVA étant essentielle pour la formation et la structure des tuniques internes chez plusieurs espèces, une plus faible quantité de cette protéine dans les spores produites à 45 °C serait cohérent avec le fait que les tuniques de ces spores présentent une moins grande cohésion que celles des spores produites à 55 °C.

Deux protéines de tuniques, une protéine structurale potentielle annotée « coat F-containing protein » et CotJC sont significativement plus abondantes dans les extraits de spores produites à 55 °C que dans les spores produites à 45°C. De plus, la superoxyde dismutase SodF, la protéine structurale CotSA ainsi que la protéine de germination YpeB n'ont été identifiées que dans les extraits protéiques obtenus pour les spores produites à 55 °C. Les protéines CotJC et SodF sont des enzymes jouant un rôle dans la protection contre le



stress oxydatif. Plusieurs auteurs supposent que ces protéines interviendraient dans la détoxification de produits oxydants (Henriques et Moran Jr, 2007, Permpoonpattana *et al.*, 2013), cependant, leur rôle dans la protection des spores contre ce type de produits n'a pour le moment pas été démontré.

Ainsi, nous avons montré que les extraits protéiques de spores de *M. thermoacetica* produites à 55 °C présentent des différences de composition en certaines protéines structurales des tuniques et en protéines jouant un potentiel rôle de protection contre le stress oxydatif, en comparaison avec les spores produites à 45 °C. Deux hypothèses peuvent être ici formulées : (i) soit la différence d'abondance dans les extraits protéiques est liée à une réelle différence d'abondance dans les tuniques, (ii) soit les protéines des spores produites aux 2 températures de sporulation sont différenciellement extraites. En effet, lors de la maturation des spores, les protéines des tuniques subissent un « cross-linking » à l'issue duquel 30 % environ des protéines sont liées très fortement et résistantes aux procédés d'extraction, constituant ainsi la fraction insoluble des tuniques (Abhyankar *et al.*, 2015, Abhyankar *et al.*, 2016)

La plus forte abondance relative de certaines protéines structurales des tuniques et de SodF dans les spores produites à 55 °C pourrait en partie expliquer que les tuniques apparaissent mieux organisées ainsi que la plus forte résistance de ces spores à l'APA. Cependant, nous ne pouvons pas exclure l'hypothèse d'un « cross-linking » différent des protéines de tuniques dans les deux conditions, des problèmes de solubilisation des échantillons ayant été constatés pour les extraits protéiques de spores produites à 45 °C et 55 °C. Le protocole de solubilisation des protéines serait à optimiser afin de mettre en évidence d'autres protéines qui, de ce fait, n'ont pas été analysées dans notre étude.

Ainsi, il apparaît que la température de sporulation joue un rôle dans la détermination des propriétés structurales et la composition protéique des spores de *M. thermoacetica*. Ces résultats sont en accord avec des travaux menés sur *B. subtilis* et *B. cereus*, montrant que la composition du milieu, ainsi que la température de sporulation modifie l'abondance de protéines de tuniques et/ou de crust extraites (Melly *et al.*, 2002, Abhyankar *et al.*, 2016, Bressuire-Isoard *et al.*, 2016).

Les travaux menés ici ont permis de mieux comprendre l'effet de la température sur les propriétés des spores de *Moorella*. Cependant, les mécanismes menant à la formation des spores chez cette espèce demeurent largement méconnus, bien que certains gènes de sporulation aient été identifiés par analyse de comparaison de génomes (de Hoon *et al.*, 2010, Galperin *et al.*, 2012, Abecasis *et al.*, 2013).

Afin d'acquérir de nouvelles connaissances, nous avons étudié pour la première fois les mécanismes de sporulation chez *Moorella* en réalisant une cinétique de sporulation en conditions optimales régulées. Nous avons ici choisi d'inoculer le fermenteur avec des spores de la souche ATCC 39073, afin d'obtenir ensuite des populations les plus homogènes possible et une meilleure reproductibilité des expériences. Nous avons montré qu'environ 90 % des spores de *M. thermoacetica* germent au cours des 2 premières heures de culture et que la croissance bactérienne et la sporulation se déroulent selon 4 phases que nous avons définies en vue de réaliser ensuite une analyse transcriptomique au cours de la cinétique. Nous constatons également qu'en fin de cinétique, la majorité des cellules observées est sous forme végétative et ne présente pas de signe de sporulation, les spores réfringentes libres représentant environ 10 % des cellules. Cette observation pourrait être due à la division d'une fraction des cellules végétatives n'ayant pas sporulé et/ou à un phénomène de germination d'une partie des spores produites dans le milieu riche utilisé. Ainsi, seule une fraction des cellules végétatives initie la sporulation à la fin de la phase exponentielle de croissance, dans les conditions testées.

Chez *B. subtilis*, le déclenchement de la sporulation est associé à l'appauvrissement en nutriments du milieu de culture (Higgins et Dworkin, 2012). En revanche, ce facteur ne serait pas le principal déclencheur de la sporulation chez les Clostridies et notamment chez les Clostridies solvantogènes pour lesquelles l'initiation de la sporulation est principalement due à la baisse de pH du milieu, provoquant la production de solvants et la sporulation (Al-Hinai *et al.*, 2015). Dans le cas de *M. thermoacetica*, nous constatons que la sporulation est initiée à la fin de la phase exponentielle de croissance mais également que beaucoup d'acide semble synthétisé compte tenu du volume important de base ajouté au cours de la cinétique et notamment après la fin de la phase exponentielle. Dans les conditions testées, nous ne pouvons pas statuer sur le signal déclencheur de la sporulation. L'appauvrissement en nutriments du milieu ou la production de métabolites tels que des acides, pourraient être à l'origine du phénomène de sporulation. Bien que la baisse de pH au cours de la croissance ne puisse pas être responsable de la sporulation dans les conditions testées (pH régulé à 7,0),

nous pouvons émettre l'hypothèse que les métabolites produits par *Moorella* au cours de la croissance pourraient jouer un rôle dans l'initiation de la sporulation.

Une analyse de la cinétique d'expression des gènes au cours de la sporulation a été réalisée à 40 h (point de référence), 45 h, 49 h et 64,5 h de culture. Nous avons orienté l'analyse du transcriptome sur l'étude de l'expression des 168 gènes de sporulation, identifiés *in silico* et regroupés en 6 classes : A) 15 gènes codant les facteurs sigma et impliqués dans leur régulation, B) 12 gènes impliqués dans la pré-septation et septation, C) 18 gènes associés à l'enkystement, D) 16 gènes codant des protéines de membrane interne associées à la germination, E) 23 gènes impliqués dans la composition du cœur et du cortex, F) 43 gènes codant des protéines de tuniques et/ou d'exosporium et E) 41 gènes associés à la sporulation mais n'étant classifiables dans aucun des groupes.

L'analyse des profils RNAseq a montré que les gènes codant les facteurs impliqués dans l'initiation de la sporulation, *spo0A*, *sigH* et *sigF* ne varient pas au cours de la cinétique. Dans les études réalisées sur d'autres espèces sporulées, ces gènes sont exprimés tôt au moment de l'initiation de la sporulation ou pendant la phase de transition entre la phase exponentielle et la phase stationnaire et sont impliqués dans les stades de développement précoce des spores (Alsaker et Papoutsakis, 2005, Jones *et al.*, 2008, Saujet *et al.*, 2011, Al-Hinai *et al.*, 2015, Fimlaid et Shen, 2015, Talukdar *et al.*, 2015). De même, l'expression des gènes impliqués dans la septation ne varient pas au cours de la cinétique. Ces observations tendent à montrer que i) ces gènes ne sont pas sur-exprimés au moment de l'initiation de la sporulation chez *Moorella*, ou que ii) les points de prélèvements effectués ne permettent pas de visualiser de modification de leur expression. Cette dernière hypothèse est la plus probable puisque le point de référence à 40 h se situait déjà dans la phase stationnaire. De plus, les gènes *sigE* et *sigG* sont sur-exprimés avant l'apparition d'endospores réfringentes tandis que *sigK* est sur-exprimé en dernier, lorsque les endospores réfringentes sont observées. Le gène *sigF* étant classiquement exprimé en amont de la division asymétrique, avant *sigE* et *sigG* (Talukdar *et al.*, 2015), nous pourrions également attendre un différentiel d'expression chez *Moorella*. L'initiation de la sporulation ayant probablement été déclenchée avant le premier point de prélèvement, nous ne pouvons pas établir si la cinétique d'expression des gènes codant les facteurs sigma spécifiques de la sporulation chez *Moorella* est similaire à celle décrite chez *B. subtilis* et *C. perfringens* ou de *C. acetobutylicum*. En effet, chez *B. subtilis* et *C. difficile*,  $\sigma^F$  est le premier facteur sigma spécifique de la sporulation exprimé. Chez *C. acetobutylicum* ou *C. perfringens*,  $\sigma^K$  joue un double rôle en amont de  $\sigma^F$  mais également pendant les phases

tardives de la sporulation (Al-Hinai *et al.*, 2013, Paredes-Sabja *et al.*, 2014, Xiao *et al.*, 2015), ce que nous ne pouvons déterminer pour *Moorella* à partir de nos données RNAseq. Par ailleurs, le gène *sigK* de *Moorella* ne semble pas comprendre d'élément *skin*, l'activation de  $\sigma^K$  ne dépendrait donc pas de l'excision d'un tel élément, contrairement à ce qui est décrit chez *B. subtilis* et *C. difficile* (Saujet *et al.*, 2013, Fimlaid et Shen, 2015). En revanche, l'activation de  $\sigma^K$  chez *Moorella* dépendrait plutôt de l'excision d'un pro-peptide inhibiteur car les gènes *bofA*, *spoIVFA*, *spoIVFB*, impliqués dans l'excision d'un pro-peptide inhibiteur chez *B. subtilis*, sont sur-exprimés avant ou simultanément à *sigK* dans notre étude.

D'autre part, les gènes *spoIID*, *spoIIM* et *spoIIP*, formant la machinerie « DMP » permettant le mouvement de la membrane de la cellule mère lors de l'enkystement (Higgins et Dworkin, 2012, Tan et Ramamurthi, 2014), sont sur-exprimés au cours de la sporulation, comme précédemment montré pour d'autres espèces (Xiao *et al.*, 2015). De même, *spoIIQ* ainsi que tout l'opéron *spoIIIA*, impliqués dans l'enkystement et dans la formation du « feeding tube », sont également sur-exprimés avant l'apparition de spores réfringentes chez *Moorella*. Ces résultats tendent à montrer que ces gènes sont exprimés tôt au cours de la sporulation et suggère que leur rôle pourrait être conservé chez *M. thermoacetica*.

De même, les gènes impliqués dans la maturation de la spore et notamment le transport de DPA ont été identifiés et sont exprimés tôt avant l'apparition de spores réfringentes. Le gènes *ylbJ* (*spoVV*) ainsi que les gènes de l'opéron *spoVA*, impliqués dans l'import de Ca-DPA de la cellule mère vers la pré-spore, sont sur-exprimés au cours de la sporulation chez *Moorella*. Les gènes *dpaA* et *dpaB*, impliqués dans la synthèse de DPA, sont quant à eux exprimés tardivement. Les 3 gènes codant les SASPs ainsi que les gènes *spmA* et *spmB* qui jouent un rôle dans l'hydratation du cœur (Popham *et al.*, 1995a, Paredes-Sabja *et al.*, 2008c), sont également régulés positivement pendant la sporulation chez *Moorella*. Les gènes impliqués dans la formation du cortex tels que *dapB* et *spoVR* sont également régulés positivement avant l'apparition de spores réfringentes.

Nous avons également remarqué que la majorité des gènes potentiellement impliqués dans la synthèse de protéines de tuniques et d'exosporium, tels que les gènes codant pour les rubrérythrines, les arginases, l'alanine racémase, ou CotSA, ne sont pas exprimés différemment dans les conditions testées. En revanche, nous avons observé que le gène *spoIVA* codant une protéine morphogénétique des tuniques est sur-exprimé avant l'apparition des spores réfringentes. De même, les gènes codant CotJB, CoJC et SodF sont régulés

positivement au même titre que certains gènes dont la fonction n'est pas identifiée. Il est possible que les prélèvements tels qu'ils ont été effectués n'aient pas permis de voir de différence d'expression pour beaucoup de ces gènes.

En revanche, les gènes « non classés » mais liés à la sporulation sont très généralement sur-exprimés lors de la sporulation. C'est notamment le cas des gènes *yqfC* et *yqfD* ou encore de *yabP*. Le gène *spoVT*, codant un régulateur important de la sporulation chez *B. subtilis* et *B. cereus* (Eijlander *et al.*, 2016), est également régulé positivement chez *M. thermoacetica*, ce qui suggère que ce gène pourrait également jouer un rôle important dans la sporulation chez cette espèce.

Ainsi, l'analyse RNAseq a permis de montrer que les gènes clés impliqués dans la machinerie de sporulation et conservés chez *M. thermoacetica*, sont différentiellement exprimés au cours de la sporulation. Ces travaux ont ainsi permis de poser les bases de la compréhension des mécanismes moléculaires de sporulation chez *Moorella* et de montrer également que le mécanisme général est semblable à celui décrit chez les autres bactéries sporulées.





## ***Conclusion générale et perspectives***





Au cours de ces travaux de thèse, nous avons dans un premier temps démontré l'impact de la température de sporulation sur l'efficacité de la sporulation et sur les propriétés des spores de diverses souches de *M. thermoacetica*. Ainsi, nous observons, d'une façon générale, que les souches sporulent plus efficacement à 55 °C qu'aux températures limites et qu'il existe une grande variabilité dans les valeurs de thermorésistance selon la souche considérée, lorsque les spores sont produites à 55 °C. Comme évoqué dans la discussion, la thermorésistance des spores est généralement associée au contenu en eau du cœur de la spore, lui-même lié à la quantité de Ca-DPA présent. Ainsi, il serait intéressant de poursuivre la caractérisation des spores produites dans différentes conditions de températures par mesure du Ca-DPA et de la teneur en eau du cœur. Ces essais complémentaires permettraient de vérifier si la plus faible thermorésistance des spores produites à 45 °C est corrélée à une hydratation plus importante et/ou à une moindre minéralisation du cœur. De plus, afin de caractériser plus en détail l'impact de la température de sporulation sur les propriétés des spores de *M. thermoacetica*, des tests de résistance aux UV-C et aux biocides pourraient également être réalisés sur toutes les souches de l'étude. Cela permettrait en effet de vérifier si les spores produites à 45 °C sont systématiquement moins résistantes à l'APA mais également de voir le comportement de spores produites à 65 °C, ce qui n'a pas pu être réalisé pour la souche ATCC 39073, qui ne produit pas de spores à cette température.

Des essais de germination ont également été entrepris au cours de la thèse. Cependant, aucun essai n'a pour le moment été concluant (Daufouy, 2016). Pour la suite des travaux, la détermination des facteurs déclenchant la germination apporterait des connaissances supplémentaires sur la physiologie des spores. En effet, une seule étude rapporte les capacités de germination de *M. thermoacetica* (Aoyama, 2014). Or, la température de sporulation peut également affecter les propriétés de germination des spores.

La structure particulière des spores étant à l'origine de leurs caractéristiques de résistance, nous avons voulu l'étudier pour les spores de la souche ATCC 39073 produites à 45 °C et 55 °C. Nous avons pu mettre en évidence lors de ces travaux que l'ultrastructure des spores produites à 45 °C et 55 °C est semblable à la structure classiquement décrite. En effet, le cœur central est entouré du cortex, des tuniques et d'un exosporium très étendu et lâche séparé des tuniques par un espace. Bien que les spores produites à 45 °C et 55 °C aient une ultrastructure globalement semblable, nous avons observé que l'organisation des tuniques varie en fonction de la température et que les spores produites à 45 °C présentent des malformations et décollements fréquents au niveau des tuniques internes et/ou externes.

Afin de vérifier si les différences de structuration des tuniques sont corrélées à une composition protéique différente, celle-ci a été déterminée par la méthode LC-MS/MS. Pour ces travaux, une étape de purification des spores a été réalisée. Plusieurs protocoles ont été testés et le protocole retenu a permis de réduire la quantité de débris sans toutefois les éliminer complètement, permettant ainsi de détecter un certain nombre de protéines sporales. Nous avons choisi de focaliser l'analyse des données sur les protéines structurales des tuniques et/ou de l'exosporium, cette approche permettant d'éviter de considérer des protéines qui pourraient provenir de cellules végétatives. L'analyse *in silico* a révélé que les protéines d'exosporium et de tuniques sont très peu conservées entre *M. thermoacetica* et les autres espèces sporulées décrites. Par analyse protéomique, nous avons mis en évidence des différences d'abondance de protéines structurales des tuniques, ainsi que de protéines potentiellement associées à l'exosporium. En effet, certaines protéines de tuniques, associées à la structure des spores ou à un potentiel rôle de protection contre le stress oxydatif, sont plus abondantes dans les extraits protéiques issus des spores produites à 55 °C. Cette observation signifie que soit ces protéines sont plus abondantes dans les tuniques des spores produites à 55 °C, soit qu'elles sont plus facilement extraites car moins fortement liées entre elles. La première hypothèse semble la plus probable au vu des caractéristiques de résistance des spores mais aussi de par les observations de spores produites à 55 °C qui présentent des tuniques semblant mieux organisées. Les résultats obtenus tendent donc à montrer que la composition protéique des spores diffère en fonction de la température de sporulation.

Dans l'objectif d'une caractérisation plus complète de la composition des spores de *M. thermoacetica*, il semble nécessaire de poursuivre les travaux d'optimisation de la purification des spores. Des essais sur d'autres milieux de sporulation pourraient être effectués et nous pourrions, par exemple, tester le milieu utilisé par Aoyama sur une autre souche de *M. thermoacetica*, qui permet d'obtenir des spores propres après purification avec le protocole que nous avons appliqué (Aoyama, 2014). Le but ici serait de produire des spores de *Moorella* plus propres, thermorésistantes et en assez grande quantité pour pouvoir effectuer une purification, compléter l'analyse de la composition globale de la spore et valider les résultats obtenus au cours de mes travaux.

Par ailleurs, la faible conservation des protéines de tuniques et de l'exosporium suggère que la composition protéique de ces couches externes serait très différente chez *Moorella*. L'analyse protéomique effectuée a permis d'identifier 1018 protéines avec seulement 21 protéines potentiellement associées aux tuniques et/ou à l'exosporium. Le faible

nombre de protéines des couches externes identifiées par protéomique pourrait être dû à un problème de solubilisation des protéines observé au cours de la préparation des échantillons. Une optimisation de la solubilisation permettrait d'identifier plus de protéines présentes dans les fractions insolubles. D'autre part, la fonction de beaucoup de protéines codées par le génome de *Moorella* reste inconnue. Il serait alors intéressant de définir à partir des données du protéome si certaines de ces protéines présentent des variations d'abondance dans les spores produites à 45 °C et 55 °C. En effet, ces protéines pourraient notamment correspondre à des protéines de tuniques et/ou d'exosporium.

Nous pourrions envisager, dans le cas où la purification des spores serait optimale, de réaliser un protéome sur des fractions sporales afin d'identifier des protéines des tuniques et de l'exosporium spécifiquement retrouvées chez *Moorella* et ainsi apporter des connaissances nouvelles sur la structure des spores pour une bactérie anaérobie thermophile.

Au cours de cette thèse, nous avons également caractérisé la cinétique d'expression de gènes au cours de la sporulation de *M. thermoacetica* en conditions optimales régulées. Nous avons focalisé notre analyse sur la régulation de gènes associés à la machinerie de sporulation, identifiés par analyse *in silico*. Nous avons constaté qu'en conditions de pH et température régulés, la sporulation de *M. thermoacetica* est initiée à la fin de la phase exponentielle de croissance. Dans les conditions testées, une fraction des cellules entre en sporulation, les cellules n'étant pas synchrones. L'analyse transcriptomique n'a pas mis en évidence de différence d'expression des gènes impliqués dans l'initiation du processus de sporulation. Ce résultat montre que l'initiation de la sporulation a probablement eu lieu avant notre premier point de prélèvement. En effet, le point de référence a été prélevé en début de phase stationnaire. Notre intention initiale était de prélever le premier point de la cinétique pendant la phase exponentielle mais la qualité et la quantité des ARN extraits ont été insuffisantes pour réaliser une analyse RNAseq. Compte tenu des résultats, il est impossible de décrire les premières étapes de la sporulation. Cependant, des échantillons d'ARN ont été prélevés en début de cinétique et ont été conservés. Il serait intéressant de réaliser des quantifications en qRT-PCR afin de mettre en évidence une possible variation d'expression au cours de la cinétique. De plus, nous pourrions regarder si des kinases sont exprimées en début de sporulation afin d'identifier de potentielles HK impliquées dans la sporulation. Il serait également intéressant de caractériser plus en détail les mécanismes mis en place pendant la sporulation en réalisant des prélèvements plus tôt au cours de la cinétique mais également plus fréquemment pendant la cinétique.

Nous avons par ailleurs constaté que les gènes majeurs impliqués dans le processus d'enkystement et de maturation de la spore sont surexprimés durant la sporulation, ce qui suggère que ces gènes jouent également un rôle qui est probablement conservé chez *M. thermoacetica*.

Les résultats obtenus montrent certaines similarités avec les Clostridies, notamment l'absence apparente des régulateurs du phosphorelais présent chez *B. subtilis*. L'élément *skin* présent chez *B. subtilis* et *C. difficile*, dont l'excision permet l'expression d'un gène *sigK* fonctionnel, semble également absent chez *Moorella*. En revanche, le clivage protéolytique de  $\sigma^K$  présent chez *B. subtilis* et certaines Clostridies semble fonctionnel, puisque les gènes impliqués dans ces mécanismes sont sur-exprimés pendant la sporulation de *Moorella*. Les résultats obtenus par RNAseq seront validés par RT-qPCR, en sélectionnant des cibles sur la base de la diversité de leurs profils d'expression.

Actuellement, aucune donnée n'est disponible dans la littérature sur les facteurs déclencheurs de la sporulation chez *Moorella*. Dans l'étude, nous avons évoqué la possibilité que les métabolites produits par *M. thermoacetica* pendant la croissance puissent participer au déclenchement de la sporulation. Un élément de réponse pourrait être apporté par l'étude des molécules sécrétées dans le milieu au cours de la croissance. Au cours des cinétiques réalisées, des prélèvements ont été effectués tout au long de la croissance et de la sporulation et ont été conservés à -80 °C. Une analyse métabolomique du surnageant de culture pourrait permettre de caractériser les changements de composition du milieu de culture et de mieux comprendre si la sporulation est déclenchée par l'appauvrissement du milieu et/ou par une accumulation de produits devenant toxiques pour les cellules.

Enfin, l'analyse des gènes *a priori* sans lien avec la sporulation et exprimés différemment pendant la cinétique pourrait également permettre de mettre en évidence des changements métaboliques mis en place par *Moorella* au moment de la fin de la phase exponentielle, comme fait notamment chez *C. perfringens* et *C. acetobutylicum* (Jones *et al.*, 2008, Xiao *et al.*, 2015).





## Références bibliographiques

Abecasis, A. B., Serrano, M., Alves, R., Quintais, L., Pereira-Leal, J. B. and Henriques, A. O. (2013). A genomic signature and the identification of new sporulation genes. Journal of Bacteriology **195** (9): 2101-2115.

Abhyankar, W., Ter Beek, A., Dekker, H., Kort, R., Brul, S. and de Koster, C. G. (2011). Gel-free proteomic identification of the *Bacillus subtilis* insoluble spore coat protein fraction. Proteomics **11** (23): 4541-4550.

Abhyankar, W., Hossein, A. H., Djajasaputra, A., Permpoonpattana, P., Ter Beek, A., Dekker, H. L., Cutting, S. M., Brul, S., de Koning, L. J. and de Koster, C. G. (2013). In pursuit of protein targets: proteomic characterization of bacterial spore outer layers. Journal of Proteome Research **12** (10): 4507-4521.

Abhyankar, W., Pandey, R., Ter Beek, A., Brul, S., de Koning, L. J. and de Koster, C. G. (2015). Reinforcement of *Bacillus subtilis* spores by cross-linking of outer coat proteins during maturation. Food Microbiology **45**: 54-62.

Abhyankar, W., Kamphorst, K., Bhagyashree, N. S., van Veen, H., van der Wel, N. N., Brul, S., de Koster, C. G. and de Koning, L. J. (2016). The influence of sporulation conditions on the spore coat protein composition of *Bacillus subtilis* spores Frontiers in Microbiology **7**.

AFNOR (1997a). Microbiologie des aliments. Norme NF V 08-408 Contrôle de la stabilité des produits appertisés et assimilés

AFNOR (1997b). Microbiologie des aliments. Norme NF V 08-401 Contrôle de la stabilité des produits appertisés et assimilés

AFNOR (2011). Microbiology of food and animal feeding stuffs - enumeration of spores from food products before appertization process by colony counts.



Al-Hinai, M. A., Jones, S. W. and Papoutsakis, E. T. (2013).  $\sigma^K$  of *Clostridium acetobutylicum* is the first known sporulation-specific sigma factor with two developmentally separated roles, one early and one late in sporulation. Journal of Bacteriology **196** (2): 287–299.

Al-Hinai, M. A., Jones, S. W. and Poputsakis, E. T. (2015). The *Clostridium* sporulation programs: diversity and preservation of endospore differentiation. Microbiology and Molecular Biology Reviews **79** (1): 19-37.

Alberto, F., Broussolle, V., Mason, D. R., Carlin, F. and Peck, M. (2003). Variability in spore germination response by strains of proteolytic *Clostridium botulinum* types A, B and F. Letters in Applied Microbiology **36** (1): 41-45.

Alsaker, K. V. and Papoutsakis, E. T. (2005). Transcriptional program of early sporulation and stationary-phase events in *Clostridium acetobutylicum*. Journal of Bacteriology **187** (20): 7103-7118.

Alves, J. I., van Gelder, A. H., Alves, M. M., Sousa, D. Z. and Plugge, C. M. (2013). *Moorella stamsii* sp. nov., a new anaerobic thermophilic hydrogenogenic carboxidotroph isolated from digester sludge. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology **63** (Pt 11): 4072-4076.

André, S., Hédin, S., Remize, F. and Zuber, F. (2012). Evaluation of peracetic acid sanitizers efficiency against spores isolated from spoiled cans in suspension and on stainless steel surfaces. Journal of Food Protection **75** (2): 371-375.

André, S., Zuber, F. and Remize, F. (2013). Thermophilic spore-forming bacteria isolated from spoiled canned food and their heat resistance. Results of a French ten-year survey. International Journal of Food Microbiology **165** (2): 134-143.

André, S., Vallaëys, T. and Planchon, S. (2016). Spore-forming bacteria responsible for food spoilage. Research in Microbiology: 1-9.

Andreesen, J. R., Schaupp, A., Neurauder, C., Brown, A. and Ljungdahl, L. G. (1973). Fermentation of glucose, fructose, and xylose by *Clostridium thermoaceticum*: effect of metals on growth yield, enzymes, and the synthesis of acetate from CO<sub>2</sub>. Journal of Bacteriology **114** (2): 743-751.

Aoyama, Y. (2014). Germination behavior of *Moorella thermoacetica* spores. Tokyo, Toyo Food Research Institute. **30**: 49-54.

Appert, N. (1810). L'art de conserver, pendant plusieurs années, toutes les substances animales et végétales Published

ArdaghGroup. CAN information series : THE HISTORY OF CANNING. 01 juin 2016.

Balk, M., Wejima, J., Friedrich, M. W. and Stams, A. J. (2003). Methanol utilization by a novel thermophilic homoacetogenic bacterium, *Moorella mulderi* sp. nov., isolated from a bioreactor. Archives in Microbiology **179**: 315-320.

Balk, M., van Gelder, T., Weelink, S. A. and Stams, A. J. (2008). (Per)chlorate reduction by the thermophilic bacterium *Moorella perchloratireducens* sp. nov., isolated from underground gas storage. Applied and Environmental Microbiology **74** (2): 403-409.

Baril, E., Coroller, L., Couvert, O., El Jabri, M., Leguérinel, L., Postollec, F., Boulais, C., Carlin, F. and Mafart, P. (2012a). Sporulation boundaries and spore formation kinetics of *Bacillus* spp. as a function of temperature, pH and a<sub>w</sub>. Food Microbiology **32** (1): 79-86.

Baril, E., Coroller, L., Couvert, O., Leguérinel, L., Postollec, F., Boulais, C., Carlin, F. and Mafart, P. (2012b). Modeling heat-resistance of *Bacillus weihenstephanensis* and *Bacillus licheniformis* spores as function of sporulation temperature and pH. Food Microbiology **30** (1): 29-36.

Baweja, R. B., Zaman, M. S., Mattoo, A. R., Sharma, K., Tripathi, V., Aggarwal, A., Dubey, G. P., Kurupati, R. K., Ganguli, M., Chandhury, N. K., Sen, S., Das, T. K., Gade, W. N. and Singh, Y. (2008). Properties of *Bacillus anthracis* spores prepared under various environmental conditions. Archives in Microbiology **189** (1): 71-79.

Beaman, T. C. and Gerhardt, P. (1986). Heat resistance of bacterial spores correlated with protoplast dehydration, mineralization, and thermal adaptation. Applied and Environmental Microbiology **52** (6): 1242-1246.

Begot, C., Desnier, I., Daudin, J. D., Labadie, J. C. and Lebert, A. (1996). Recommendations for calculating growth parameters by optical density measurements. Journal of Microbiological Methods **25**: 225-232.

Bonduelle. (2015). "Légumes en conserve." Retrieved Janvier 2015, from <http://www.bonduelle.com/fr/nos-legumes/procede-de-fabrication-des-legumes-en-conserve.html>.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry **72** (1-2): 248-254.

Bressuire-Isoard, C., Bornard, I., Henriques, A. O., Carlin, F. and Broussolle, V. (2016). Sporulation temperature reveals a requirement for CotE in the assembly of both the coat and exosporium layers of *Bacillus cereus* spores. Applied and Environmental Microbiology **82** (1): 232-243.

Brunt, J., Plowman, J., Gaskin, D. J. H., Itchner, M., Carter, A. T. and Peck, M. W. (2014). Functional characterisation of germinant receptors in *Clostridium botulinum* and *Clostridium sporogenes* presents novel insights into spore germination systems. PLOS Pathogens **10** (9): 1-14.

Brunt, J., Cross, K. L. and Peck, M. (2015). Apertures in the *Clostridium sporogenes* spore coat and exosporium align to facilitate emergence of the vegetative cell. Food Microbiology **51**: 45-50.

Byrer, D. E., Rainey, F. A. and Wiegel, J. (2000). Novel strains of *Moorella thermoacetica* form unusually heat-resistant spores. Archives of Microbiology **174** (5): 334-339.

Carrier, J. P. and Bedora-Faure, M. (2006). Phenotypic and genotypic characterization of some *Moorella sp.* strains isolated from canned foods. Systematic and Applied Microbiology **29** (7): 581-588.

Carlin, F., Guinebretiere, M.-H., Choma, C., Pasqualini, R., Braconnier, A. and Nguyen-the, C. (2000). Spore-forming bacteria in commercial cooked, pasteurised and chilled vegetable purées. Food Microbiology **17** (2): 153-165.

Carlin, F. (2011). Origin of bacterial spores contaminating foods. Food Microbiology **28** (2): 177-182.

Collins, M. D., Lawson, P. A., Willems, A., Cordoba, J. J., Fernandez-Garayzabal, J., Garcia, P., Cai, J., Hippe, H. and Farrow, J. A. (1994). The phylogeny of the genus *Clostridium*: proposal of five new genera and eleven new species combinations. International Journal of Systematic Bacteriology **44** (4): 812-826.

Cortezzo, D. E., Koziol-Dube, K., Setlow, B. and Setlow, P. (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): 838-852.

Daniel, S. L., Hsu, T., Dean, S. I. and Drake, H. L. (1990). Characterization of the H<sub>2</sub>- and CO-dependent chemolithotrophic potentials of the acetogens *Clostridium thermoaceticum* and *Acetogenium kivui*. Journal of Bacteriology **172** (8): 4464-4471.

Daniel, S. L. and Drake, H. L. (1993). Oxalate-dependent and glyoxylate-dependent growth and acetogenesis by *Clostridium thermoaceticum*. Applied and Environmental Microbiology **59** (9): 3062-3069.

Das, A., Coulter, E. D., Kurtz JR, D. M. and Ljungdahl, L. G. (2001). Five-gene cluster in *Clostridium thermoaceticum* consisting of two divergent operons encoding rubredoxin oxidoreductase- rubredoxin and rubrerythrin-type A flavoprotein- high-molecular-weight rubredoxin. Journal of Bacteriology **183** (5): 1560-1567.

Daufouy, G. 2016. Rapport de stage de Master 2 : Caractérisation physiologique des souches de *Moorella thermoacetica*, une bactérie thermophile hyper-thermorésistante. U. d. B. Sud.

de Hoon, M. J. L., Eichenberger, P. and Vitkup, D. (2010). Hierarchical evolution of the bacterial sporulation network. Current Biology **20** (17).

de Vos, P., Garrity, G., Jones, D., Krieg, N. R., Ludwig, W., Rainey, F. A., Schleifer, K. H. and Whitman, W. B. (2009). Bergey's manual of systematic bacteriology Volume 3 : The Firmicutes Second Edition. Published, Springer-Verlag. ISBN 978-0-387-95041-9

Décret (1955). Décret n°55-241 du 10 février 1955 pris pour l'application en ce qui concerne le commerce des conserves et semi-conserves alimentaires de la loi du 1er août 1905 modifiée et complétée sur la répression des fraudes. Version consolidée du 4 novembre 2017. [www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000000850520](http://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000000850520).

Dembek, M., Barquist, L., Boinett, C. J., Cain, A. K., Mayho, M., Lawley, T. D., Fairweather, N. F. and Fagan, R. P. (2015). High-throughput analysis of gene essentiality and sporulation in *Clostridium difficile*. mBio **6** (2): 1-13.

DGAL (2015).Instruction technique DGAL/SDSSA/2015-364 du 06 octobre 2015. <https://info.agriculture.gouv.fr/gedei/site/bo-agri/instruction-2015-364>.

DGCCRF. (2014, 23 décembre 2014). "Conservation des aliments."

Díaz-González, F., Milano, M., Olguin-Araneda, V., Pizzaro-Cerda, J., Castro-Córdova, Tzeng, S.-C., Maier, C. S., Sarker, M. R. and Paredes-Sabja, D. (2015). Protein composition of the outermost exosporium-like layer of *Clostridium difficile* 630 spores. Journal of Proteomics **123**: 1-13.

Drake, H. L. and Daniel, S. L. (2004). Physiology of the thermophilic acetogen *Moorella thermoacetica*. Research in microbiology **155** (10): 869-883.

Drake, H. L., Gossner, A. S. and Daniel, S. L. (2008). Old acetogens, new light. Annals of the New York Academy of Sciences **1125**: 100-128.

Driks, A. and Eichenberger, P. (2016). The spore coat. Microbiology Spectrum **4** (2): TBS-0023-2016.

Durand, L. (2014). Ecologie et diversité des bactéries thermophiles formant des spores dans les conserves alimentaires. Doctorat, Université Montpellier II.

Durand, L., Planchon, S., Guinebretiere, M. H., André, S., Carlin, F. and Remize, F. (2015). Contamination pathways of spore-forming bacteria in a vegetable cannery. International Journal of Food Microbiology (202): 10-19.

Dürre, P. and Hollergschwandner, C. (2004). Initiation of endospore formation in *Clostridium acetobutylicum*. Anaerobe **10** (2): 69-74.

Dürre, P. (2014). Physiology and sporulation in *Clostridium*. Microbiology Spectrum **2** (4): TBS-0010-2012.

Dworkin, J. (2014). Protein targeting during *Bacillus subtilis* sporulation. Microbiology Spectrum **2** (1): TBS-0006-2012.

Edelheit, S., Schwartz, S., Mumbach, M. R., Wurtzel, O. and Sorek, R. (2013). Transcriptome-wide mapping of 5-methylcytidine RNA modifications in bacteria, archaea, and yeast reveals m<sup>5</sup>C within archaeal mRNAs. *Plos Genetics* **9** (6): 1-14.

Edwards, A. N. and McBride, S. M. (2014). Initiation of sporulation in *Clostridium difficile*: a twist on the classic model. *Fems Microbiology Letters* **358** (2): 1-15.

Edwards, A. N., Nawrocki, K. L. and McBride, S. M. (2014). Conserved oligopeptide permeases modulate sporulation initiation in *Clostridium difficile*. *Infection and Immunity* **82** (10): 4276–4291.

Eijlander, R. T., Holsappel, S., de Jong, A., Ghosh, A., Christie, G. and Kuipers, O. P. (2016). SpoVT: from fine-tuning regulator in *Bacillus subtilis* to essential protein in *Bacillus cereus*. *Frontiers in Microbiology* **7**: 1607.

Fazzini, M. M., Schuch, R. and Fischetti, S. (2010). A novel spore protein, ExsM, regulates formation of the exosporium in *Bacillus cereus* and *Bacillus anthracis* and affects spore size and shape. *Journal of Bacteriology* **192** (15): 4012-4021.

Fimlaid, K. A. and Shen, A. (2015). Diverse mechanisms regulate sporulation sigma factor activity in the Firmicutes. *Current Opinion in Microbiology* **24**: 88-95.

Fontaine, F. E., Peterson, W. H., McCoy, E., Johnson, M. J. and Ritter, G. J. (1942). A new type of glucose fermentation by *Clostridium thermoaceticum*. *Journal of Bacteriology* **43** (6): 701-715.

Fröstl, J. M., Seifritz, C. and Drake, H. L. (1996). Effect of nitrate on the autotrophic metabolism of the acetogens *Clostridium thermoautotrophicum* and *Clostridium thermoaceticum*. *Journal of Bacteriology* **178** (15): 4597-4603.

Galperin, M. Y., Mekhedov, S. L., Puigbo, P., Smirnov, S., Wolf, Y. L. and Rigden, D. J. (2012). Genomic determinants of sporulation in *Bacilli* and *Clostridia*: towards the minimal set of sporulation-specific genes. Environmental Microbiology **14** (11): 2870-2890.

Garcia, D., van der Voort, M. and Abee, T. (2010). Comparative analysis of *Bacillus weihenstephanensis* KBAB4 spores obtained at different temperatures. International Journal of Food Microbiology **140** (2): 146-153.

Georget, E., Kushman, A., Callanan, M., Ananta, E., Heinz, V. and Mathys, A. (2015). *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953 spore chemical germination mechanisms in model systems. Food Control **50**: 141-149.

Ghosh, S., Setlow, B., Wahome, P. G., Cowan, A. E., Plomp, M., Malkin, A. J. and Setlow, P. (2008). Characterization of spores of *Bacillus subtilis* that lack most coat layers. Journal of Bacteriology **190** (20): 6741-6748.

Gil, F., Lagos-Moraga, S., Calderón-Romero, M., Pizarro-Guajardo, M. and Paredes-Sabja, D. (2017). Updates on *Clostridium difficile* spore biology. Anaerobe **45**.

Gößsner, A. S., Devereux, R., Ohnemuller, N., Acker, G., Stackebrandt, E. and Drake, H. L. (1999). *Thermicanus aegyptius* gen. nov., sp. nov., isolated from oxic soil, a fermentative microaerophile that grows commensally with the thermophilic acetogen *Moorella thermoacetica*. Applied and Environmental Microbiology **65** (11): 5124-5133.

Gould, G. W. (1977). Recent advances in the understanding of resistance and dormancy in bacterial spores. The Journal of Applied Bacteriology **42** (3): 297-309.

Gould, G. W. (2006). History of science--spores. Journal of Applied Microbiology **101** (3): 507-513.

Hayrapetyan, H., Abee, T. and Nierop Groot, M. (2016). Sporulation dynamics and spore heat resistance in wet and dry biofilms of *Bacillus cereus*. Food Control **60**: 493-499.



Henriques, A. O. and Moran Jr, C. P. (2007). Structure, assembly, and function of the spore surface layers. Annual Review of Microbiology **61**: 555-588.

Heyndrickx, M. (2011). The importance of endospore-forming bacteria originating from soil for contamination of industrial food processing. Applied and Environmental Soil Science.

Higgins, D. and Dworkin, J. (2012). Recent progress in *Bacillus subtilis* sporulation. FEMS Microbiology Review **36** (1): 131-148.

Howerton, A., Ramirez, N. and Abel-Santos, E. (2011). Mapping interactions between germinants and *Clostridium difficile* spores. Journal of Bacteriology **193** (1): 274-282.

Hsu, T., Daniel, S. L., Lux, M. F. and Drake, H. L. (1990). Biotransformations of carboxylated aromatic compounds by the acetogen *Clostridium thermoaceticum*: generation of growth-supportive CO<sub>2</sub> equivalents under CO<sub>2</sub>-limited conditions. Journal of Bacteriology **172** (1): 212-217.

Inokuma, K., Nakashimada, Y., Akahoshi, T. and Nishio, N. (2007). Characterization of enzymes involved in the ethanol production of *Moorella* sp. HUC22-1. Archives in Microbiology **188** (1): 37-45.

Jamroskovic, J., Chromikova, Z., List, C., Bartova, B., Barak, I. and Bernier-Latmani, R. (2016). Variability in DPA and calcium content in the spores of *Clostridium* species. Frontiers in Microbiology **7**.

Janganan, T. K., Mullin, N., Tzokov, S. B., Stringer, S., Fagan, R. P., Hobbs, J. K., Moir, A. and Bullough, P. A. (2016). Characterization of the spore surface and exosporium proteins of *Clostridium sporogenes*; implications for *Clostridium botulinum* group I strains. Food Microbiology **59**: 205-212.

Jiang, M., Shao, W., Perego, M. and Hoch, J. A. (2000). Multiple histidine kinases regulate entry into stationary phase and sporulation in *Bacillus subtilis*. Molecular Microbiology **38** (3): 535-542.

Johnson, M. J., Todd, S. J., Ball, D. A., Shepherd, A. M., Sylvestre, P. and Moir, A. (2006). ExsY and CotY are required for the correct assembly of the exosporium and spore coat of *Bacillus cereus*. Journal of Bacteriology **188** (22): 7905-7913.

Jones, S. W., Paredes, C. J., Tracy, B. P., Cheng, N., Sillers, R., Senger, R. S. and Papoutsakis, E. T. (2008). The transcriptional program underlying the physiology of clostridial sporulation. Genome Biology **9** (7).

Kaksonen, A. H., Plumb, J. J., Robertson, W. J., Spring, S., Schumann, P., Franzmann, P. D. and Puhakka, J. A. (2006). Novel thermophilic sulfate-reducing bacteria from a geothermally active underground mine in Japan. Applied and Environmental Microbiology **72** (5): 3759-3762.

Kimura, Z.-I., Hoshino, T. and Murakami, K. (2016). The status of the species *Moorella thermoautotrophica* (Wiegel et al., 1981). Request for an Opinion. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology **66**: 3249-3251.

Kohl, C., Wegener, M., Nitsche, A. and Kurth, A. (2017). Use of RNALater<sup>®</sup> preservation for virome sequencing in outbreak settings. Frontiers in Microbiology **8**.

Kroos, L., Zhang, B., Ichikawa, H. and Yu, Y. T. N. (1999). Control of  $\sigma$  factor activity during *Bacillus subtilis* sporulation. Molecular Microbiology **31** (5): 1285-1294.

Leggett, M. J., McDonnell, G., Denyer, S. P. and Maillard, J.-Y. (2012). Bacterial spore structures and their protective role in biocide resistance. Journal of Applied Microbiology **113** (3): 485-498.

Leggett, M. J., Schwarz, J. S., Burke, P. A., McDonnell, G., Denyer, S. P. and Maillard, J.-Y. (2015). Resistance to and killing by the sporicidal microbicide peracetic acid. Journal of Antimicrobial Chemotherapy **70** (3): 773-779.

Leggett, M. J., Schwarz, J. S., Burke, P. A., McDonnell, G., Denyer, S. P. and Maillard, J.-Y. (2016). Mechanism of sporicidal activity for the synergistic combination of peracetic acid and hydrogen peroxide. Applied and Environmental Microbiology **82** (4): 1035-1039.

Li, Q., Seffernick, J., Sadowsky, M. J. and Wackett, L. P. (2009). Thermostable cyanuric acid hydrolase from *Moorella thermoacetica* ATCC 39073. Applied and Environmental Microbiology **75** (22): 6986-6991.

Li, Y., Davis, A., Korza, G., Zhang, P., Li, Y. Q., Setlow, B., Setlow, P. and Hao, B. (2012). Role of a SpoVA protein in dipicolinic acid uptake into developing spores of *Bacillus subtilis*. Journal of Bacteriology **194** (8): 1875-1884.

Lundie, L. L., Jr. and Drake, H. L. (1984). Development of a minimally defined medium for the acetogen *Clostridium thermoaceticum*. Journal of Bacteriology **159** (2): 700-703.

Luu, S., Cruz-Mora, J., Setlow, B., Feeherry, F. E., Doona, C. J. and Setlow, P. (2015). The effects of heat activation on *Bacillus* spore germination, with nutrients or under high pressure, with or without various germination proteins. Applied and Environmental Microbiology **81** (8): 2927-2938.

Mafart, P., Couvert, O., Gaillard, S. and Leguerinel, L. (2002). On calculating sterility in thermal preservation methods: application of the Weibull frequency distribution model. International Journal of Food Microbiology **72** (1-2): 107-113.

Malleck, T., Dauffouy, G., André, S., Broussolle, V. and Planchon, S. (2018). Temperature impacts the sporulation capacities and spore resistance of *Moorella thermoacetica* Food Microbiology **73**: 334-341.

Malleck, T., Fekraoui, F., Bornard, I., Haudebourg, E., Planchon, S. and Broussolle, V. (To be submitted). Insights into the structure and the composition of *Moorella thermoacetica* spores produced at different temperatures.

Matsuda, N., Masuda, H., Komaki, M. and Matsumoto, N. (1982). Thermophilic, spore-forming, strict anaerobes isolated from spoiled canned "shiruko" and coffee containing milk. Food Hygiene and Safety Science **23** (6): 480-486.

McKenney, P. T., Driks, A., Eskandarian, H. A., Grabowski, P., Guberman, J., Wang, K. H., Gitai, Z. and Eichenberger, P. (2010). A distance-weighted interaction map reveals a previously uncharacterized layer of the *B. subtilis* spore coat. Current Biology **25** (10): 934-938.

McKenney, P. T. and Eichenberger, P. (2012). Dynamics of spore coat morphogenesis in *Bacillus subtilis*. Molecular Microbiology **83** (2): 245-260.

McKenney, P. T., Driks, A. and Eichenberger, P. (2013). The *Bacillus subtilis* endospore: assembly and functions of the multilayered coat Nature Reviews Microbiology **11**: 33-44.

Melly, E., Genest, P. C., Gilmore, M. E., Little, S., Popham, D. L., Driks, A. and Setlow, P. (2002). Analysis of the properties of spores of *Bacillus subtilis* prepared at different temperatures. Journal of Applied Microbiology **92** (6): 1105-1115.

Mock, J., Wang, S., Huang, H., Kahnt, J. and Thauer, R. K. (2014). Evidence for a hexaheteromeric methylenetetrahydrofolate reductase in *Moorella thermoacetica*. Journal of Bacteriology **196** (18): 3303-3314.

Moeller, R., Horneck, G., Rettberg, P., Mollenkopf, H.-J., Stackebrandt, E. and Nicholson, W. L. (2006). A method for extracting RNA from dormant and germinating *Bacillus subtilis* strain 168 endospores. Current Microbiology **53** (3): 227-231.

Moir, A. and Cooper, G. (2015). Spore germination. Microbiology Spectrum **3** (6): TBS-0014-2012.

Mtimet, N., Trunet, C., Mathot, A.-G., Venaille, L., Leguérinel, L., Coroller, L. and Couvert, O. (2015). Modeling the behavior of *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 12980 throughout its life cycle as vegetative cells or spores using growth boundaries. Food Microbiology **48**: 153-162.

Mutter, G. L., Zahrieh, D., Liu, C., Neuberger, D., Finkelstein, D., Baker, H. E. and Warrington, J. A. (2004). Comparison of frozen and RNALater solid tissue storage methods for use in RNA expression microarrays. BMC Genomics **5**.

Nakano, M. (2015). Detection and quantification of thermophilic spore-forming *Moorella thermoacetica* in canned beverages using real-time PCR. Journal of Food Protection **28** (7): 1392-1396.

Neal, J. A., Marquez-Gonzalez, M., Cabrera-Diaz, E., Lucia, L. M., O'Bryan, C. A., Crandall, P. G., Ricke, S. C. and Castillo, A. (2012). Comparison of multiple chemical sanitizers for reducing *Salmonella* and *Escherichia coli* O157:H7 on spinach (*Spinacia oleracea*) leaves. Food Research International **45** (2): 1123-1128.

Nepomnyashchaya, Y. N., Slobodkina, G. B., Baslerov, R. V., Chernyh, N. A., Bonch-Osmolovskaya, E. A., Netrusov, A. I. and Slobodkin, A. I. (2012). *Moorella humiferrea* sp. nov., a thermophilic, anaerobic bacterium capable of growth via electron shuttling between humic acid and Fe(III). International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology **62**: 613-617.

Novak, J. S., Juneja, V. K. and McClane, B. A. (2003). An ultrastructural comparison of spores from various strains of *Clostridium perfringens* and correlations with heat resistance parameters. International Journal of Food Microbiology **86** (3): 239-247.

Olguin-Araneda, V., Banawas, S., Sarker, M. R. and Paredes-Sabja, D. (2015). Recent advances in germination of *Clostridium* spores. Research in microbiology **166** (4): 236-243.

Oppert, B., Martynoc, A. G. and Elpidina, E. N. (2012). *Bacillus thuringiensis* Cry3Aa protoxin intoxication of *Tenebrio molitor* induces widespread changes in the expression of serine peptidase transcripts. *Comparative Biochemistry and Physiology* **7** (3): 233-242.

Paidhungat, M., Setlow, B., Daniels, W. B., Hoover, D., Papafragkou, E. and Setlow, P. (2002). Mechanisms of induction of germination of *Bacillus subtilis* spores by high pressure. *Applied and Environmental Microbiology* **68** (6): 3172-3175.

Paredes-Sabja, D., Bond, C., Carman, R. J., Setlow, P. and Sarker, M. R. (2008a). Germination of spores of *Clostridium difficile* strains, including isolates from a hospital outbreak of *Clostridium difficile*-associated disease (CDAD). *Microbiology* **154** (8): 2241-2250.

Paredes-Sabja, D., Raju, D., Torres, J. A. and Sarker, M. R. (2008b). Role of small, acid-soluble spore proteins in the resistance of *Clostridium perfringens* spores to chemicals. *International Journal of Food Microbiology* **122** (3): 333-335.

Paredes-Sabja, D., Sarker, N., Setlow, B., Setlow, P. and Sarker, M. R. (2008c). Roles of DacB and Spm Proteins in *Clostridium perfringens* Spore Resistance to Moist Heat, Chemicals, and UV Radiation. *Applied and Environmental Microbiology* **74** (12): 3730-3738.

Paredes-Sabja, D., Setlow, B., Setlow, P. and Sarker, M. R. (2008d). Characterization of *Clostridium perfringens* spores that lack SpoVA proteins and dipicolinic acid. *Journal of Bacteriology* **190** (13): 4648-4659.

Paredes-Sabja, D., Udompijitkiul, P. and Sarker, M. R. (2009). Inorganic phosphate and sodium ions are cogerminants for spores of *Clostridium perfringens* type A food poisoning-related isolates. *Applied and Environmental Microbiology* **75** (19): 6299-6305.

Paredes-Sabja, D., Setlow, P. and Sarker, M. R. (2011). Germination of spores of *Bacillales* and *Clostridiales* species: mechanisms and proteins involved. *Trends in Microbiology* **19** (2): 85-94.

Paredes-Sabja, D., Shen, A. and Sorg, J. A. (2014). *Clostridium difficile* spore biology: sporulation, germination, and spore structural proteins. Trends in Microbiology **22** (7): 406-416.

Pereira, F. C., Saujet, L., Tomé, A. R., Serrano, M., Monot, M., Couture-Tosi, E., Martin-Verstraete, I., Dupuy, B. and Henriques, A. O. (2013). The spore differentiation pathway in the enteric pathogen *Clostridium difficile*. PLoS Genetics **9** (10): e1003782.

Permpoonpattana, P., Phetcharaburanin, J., Mikelsone, A., Dembek, M., Tan, S., Brisson, M.-C., La Ragione, R., Brisson, A. R., Fairweather, N., Hong, H. A. and Cutting, S. M. (2013). Functional characterization of *Clostridium difficile* spore coat proteins. Journal of Bacteriology **195** (7): 1492-1503.

Pierce, E., Xie, G., Barabote, R. D., Saunders, E., Han, C. S., Detter, J. C., Richardson, P., Brettin, T. S., Das, A., Ljungdahl, L. G. and Ragsdale, S. W. (2008). The complete genome sequence of *Moorella thermoacetica* (f. *Clostridium thermoaceticum*). Environmental Microbiology **10** (10): 2550-2573.

Pinho, S. C., Nunes, O. C., Lobo-da-Cunha, A. and Almeida, M. F. (2015). Inactivation of *Geobacillus stearothermophilus* spores by alkaline hydrolysis applied to medical waste treatment. Journal of Environmental Management **161**: 51-56.

Pishdadian, K., Fimlaid, K. A. and Shen, A. (2015). SpoIIID-mediated regulation of  $\sigma^K$  function during *Clostridium difficile* sporulation. Molecular Microbiology **95** (2): 189-208.

Planchon, S., Dargaignaratz, C., Levy, C., Ginies, C., Broussolle, V. and Carlin, F. (2011). Spores of *Bacillus cereus* strain KBAB4 produced at 10 °C and 30 °C display variations in their properties. Food Microbiology **28** (2): 291-297.

Plowman, J. and Peck, M. W. (2002). Use of a novel method to characterize the response of spores of non-proteolytic *Clostridium botulinum* types B, E and F to a wide range of germinants and conditions. Journal of Applied Microbiology **92** (4): 681-694.

Popham, D. L., Illades-Aguilar, B. and Setlow, P. (1995a). The *Bacillus subtilis* *dacB* gene, encoding penicillin-binding protein 5\*, is part of a three-gene operon required for proper spore cortex synthesis and spore core dehydration. Journal of Bacteriology **177** (16): 4721-4729.

Popham, D. L., Sengupta, S. and Setlow, P. (1995b). 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).

Putnam, E. E., Nock, A. M., Lawley, T. D. and Shen, A. (2013). SpoIVA and SipL are *Clostridium difficile* spore morphogenetic proteins. Journal of Bacteriology **195** (6): 1214-1225.

Raju, D., Setlow, P. and Sarker, M. R. (2007). Antisense-RNA-mediated decreased synthesis of small, acid-soluble spore proteins leads to decreased resistance of *Clostridium perfringens* spores to moist heat and UV radiation. Applied and Environmental Microbiology **73** (7): 2048–2053.

Ramírez-Guadiana, F. H., Meeske, A. J., Rodrigues, C. D. A., del Carmen Barajas-Ornelas, R., Kruse, A. C. and Rudner, D. Z. (2017). A two-step transport pathway allows the mother cell to nurture the developing spore in *Bacillus subtilis*. PLOS Genetics **13** (9).

Raso, J., Palop, A., Bayarte, M., Condón, S. and Sala, F. J. (1995). Influence of sporulation temperature on the heat resistance of a strain of *Bacillus licheniformis* (Spanish Type Culture Collection 4523). Food Microbiology **12**: 357-361.

Riesenman, P. J. and Nicholson, W. L. (2000). Role of spore coat layers in *Bacillus subtilis* spore resistance to hydrogen peroxide, artificial UV-C, UV-B, and solar UV radiation. Applied and Environmental Microbiology **66** (2): 620-626.

Rose, R., Setlow, B., Monroe, A., Mallozzi, M., Driks, A. and Setlow, P. (2007). Comparison of the properties of *Bacillus subtilis* spores made in liquid or on agar plates. Journal of Applied Microbiology **103** (3): 691-699.



Saggese, A., Istickato, R., Cangiano, G., Ricca, E. and Baccigalupi, L. (2016). CotG-like modular proteins are common among spore-forming Bacilli. Journal of Bacteriology **198** (10): 1513-1520.

Saujet, L., Monot, M., Dupuy, B., Soutourina, O. and Martin-Verstraete, I. (2011). The key sigma factor of transition phase, SigH, controls sporulation, metabolism, and virulence factor expression in *C. difficile*. Journal of Bacteriology **193** (13): 3186-3196.

Saujet, L., Pereira, F. C., Serrano, M., Soutourina, O., Monot, M., Shelyakin, P. V., Gelfand, M., Dupuy, B., Henriques, A. O. and Martin-Verstraete, I. (2013). Genome-wide analysis of cell type-specific gene transcription during spore formation in *Clostridium difficile*. Plos Genetics **9** (10): 1-28.

Savage, M. D., Wu, Z., Daniel, S. L., Lundie, L. L., Jr. and Drake, H. L. (1987). Carbon monoxide-dependent chemolithotrophic growth of *Clostridium thermoaceticum*. Applied and Environmental Microbiology **53** (8): 1902-1906.

Schuchmann, K. and Müller, V. (2014). Autotrophy at the thermodynamic limit of life: a model for energy conservation in acetogenic bacteria Nature Reviews Microbiology **12**: 809-821.

Schwartz, R. D. and Keller, F. A., Jr. (1982a). Isolation of a strain of *Clostridium thermoaceticum* capable of growth and acetic acid production at pH 4.5. Applied and Environmental Microbiology **43** (1): 117-123.

Schwartz, R. D. and Keller, F. A., Jr. (1982b). Acetic acid production by *Clostridium thermoaceticum* in pH-controlled batch fermentations at acidic pH. Applied and Environmental Microbiology **43** (6): 1385-1392.

Segev, E., Smith, Y. and Ben-Yehuda, S. (2012). RNA dynamics in aging bacterial spores. Cell **148** (1-2): 139-149.

Seifritz, C., Frostl, J. M., Drake, H. L. and Daniel, S. L. (1999). Glycolate as a metabolic substrate for the acetogen *Moorella thermoacetica*. Fems Microbiology Letters **170** (2): 399-405.

Seifritz, C., Frostl, J. M., Drake, H. L. and Daniel, S. L. (2002). Influence of nitrate on oxalate- and glyoxylate-dependent growth and acetogenesis by *Moorella thermoacetica*. Archives in Microbiology **178** (6): 457-464.

Seifritz, C., Drake, H. L. and Daniel, S. L. (2003). Nitrite as an energy-conserving electron sink for the acetogenic bacterium *Moorella thermoacetica*. Current Microbiology **46**: 329-333.

Serrano, M., Crawshaw, A. D., Dembek, M., Monteiro, J. M., Pereira, F. C., Pinho, M. G., Fairweather, N. F., Salgado, P. S. and Henriques, A. O. (2016a). The SpoIIQ-SpoIIAH complex of *Clostridium difficile* controls forespore engulfment and late stages of gene expression and spore morphogenesis. Molecular Microbiology **100** (1): 204-228.

Serrano, M., Kint, N., Pereira, F. C., Saujet, L., Boudry, P., Dupuy, B., Henriques, A. O. and Martin-Verstraete, I. (2016b). A recombination directionality factor controls the cell type-specific activation of  $\sigma^K$  and the fidelity of spore development in *Clostridium difficile*. PLOS Genetics **12** (9): e1006312.

Setlow, B. and Setlow, P. (1993). Dipicolinic acid greatly enhances production of spore photoproduct in bacterial spores upon UV irradiation. Applied and Environmental Microbiology **59** (2): 640-643.

Setlow, B., Atluri, S., Kitchel, R., Koziol-Dube, K. and Setlow, P. (2006). Role of dipicolinic acid in resistance and stability of spores of *Bacillus subtilis* with or without DNA-protective alpha/beta-type small acid-soluble proteins. Journal of Bacteriology **188** (11): 3740-3747.

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): 172-180.

Setlow, P. (2012). Dynamics of the assembly of a complex macromolecular structure – the coat of spores of the bacterium *Bacillus subtilis* Molecular Microbiology **83** (2): 241-244.

Setlow, B., Yu, J. and Setlow, P. (2013). Analysis of the germination kinetics of individual *Bacillus subtilis* spores treated with hydrogen peroxide or sodium hypochlorite. Letters in Applied Microbiology **57** (4): 259-265.

Setlow, P. (2014a). Spore Resistance Properties. American Society for Microbiology **2** (5). TBS-0003-2012.

Setlow, P. (2014b). Germination of spores of *Bacillus* species: what we know and do not know. Journal of Bacteriology **196** (7): 1297-1305.

Sevenier, V., Delannoy, S., André, S., Fach, P. and Remize, F. (2012). Prevalence of *Clostridium botulinum* and thermophilic heat-resistant spores in raw carrots and green beans used in French canning industry. International Journal of Food Microbiology **155** (3): 263-268.

Slobodkin, A., Reysenbach, A. L., Mayer, F. and Wiegel, J. (1997). Isolation and characterization of the homoacetogenic thermophilic bacterium *Moorella glycerini* sp. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology **47** (4).

Stecchini, M. L., Spaziani, M., Del Torre, M. and Pacor, S. (2009). *Bacillus cereus* cell and spore properties as influenced by the micro-structure of the medium. Journal of Applied Microbiology **106** (6): 1838-1848.

Steiner, E., Dago, A. E., Young, D. I., Heap, J. T., Minton, N. P., Hoch, J. A. and Young, M. (2011). Multiple orphan histidine kinases interact directly with Spo0A to control the initiation of endospore formation in *Clostridium acetobutylicum*. Molecular Microbiology **80** (3): 641-654.

Steiner, E., Scott, J., Minton, N. P. and Winzer, K. (2012). An agr quorum sensing system that regulates granulose formation and sporulation in *Clostridium acetobutylicum*. Applied and Environmental Microbiology **78** (4): 1113-1122.

Stewart, G. (2015). The exosporium layer of bacterial spores: a connection to the environment and the infected host. Microbiology and Molecular Biology Reviews **79** (4): 437-457.

SubtiWiki. Retrieved March, 13<sup>th</sup>, from <http://subtiwiki.uni-goettingen.de/bank/index.php?gene=CwIJ&action=Go>.

Takamatsu, H., Imamura, A., Kodama, T., Asai, K., Ogasawara, N. and Watabe, K. (2000). The *yabG* gene of *Bacillus subtilis* encodes a sporulation specific protease which is involved in the processing of several spore coat proteins. FEMS Microbiology Letters **192** (1): 33-38.

Talukdar, P. K., Olguin-Araneda, V., Alnoman, M., Paredes-Sabja, D. and Sarker, M. R. (2015). Updates on the sporulation process in *Clostridium* species. Research in Microbiology **166** (4): 225-235.

Tan, I. S. and Ramamurthi, K. S. (2014). Spore formation in *Bacillus subtilis*. Environmental Microbiology Reports **6** (3): 212-225.

Tennen, R., Setlow, B., Davis, K. L., Loshon, C. A. and Setlow, P. (2000). Mechanisms of killing of spores of *Bacillus subtilis* by iodine, glutaraldehyde and nitrous acid. Journal of Applied Microbiology **89** (2): 330-338.

Tovar-Rojo, F., Chander, M., Setlow, B. and Setlow, P. (2002). The products of the *spoVA* operon are involved in dipicolinic acid uptake into developing spores of *Bacillus subtilis*. Journal of Bacteriology **184** (2): 584-587.

Udompijitkul, P., Alnoman, M., Banawas, S., Paredes-Sabja, D. and Sarker, M. R. (2014). New amino acid germinants for spores of the enterotoxigenic *Clostridium perfringens* type A isolates. Food Microbiology **44**: 24-33.

Uniprot. [www.uniprot.org](http://www.uniprot.org)

UPPIA (2015). Rapport d'activité 2015.

van Rijssel, M., van der Veen, I. and Hansen, T. H. (1992). A lithotrophic *Clostridium* strain with extremely thermoresistant spores isolated from a pectin-limited continuous culture of *Clostridium thermosaccharolyticum* strain Haren. Fems Microbiology Letters **91** (2): 171-176.

Vandekinderen, I., Devlieghere, F., De Meulenaer, B., Ragaert, P. and Van Camp, J. (2009). Optimization and evaluation of a decontamination step with peroxyacetic acid for fresh-cut produce. Food Microbiology **26** (8): 882-888.

Vreeland, R. H., Rosenweig, W. D. and Powers, D. W. (2000). Isolation of a 250 million-year-old halotolerant bacterium from a primary salt crystal. Nature **407**: 897-900.

Wang, G. and Wang, D. I. C. (1984). Elucidation of growth inhibition and acetic acid production by *Clostridium thermoaceticum*. Applied and Environmental Microbiology **47** (2): 294-298.

Warda, A. K., Tempelaars, M. H., Abee, T. and Nierop Groot, M. N. (2016). Recovery of heat treated *Bacillus cereus* spores is affected by matrix composition and factors with putative functions in damage repair. Frontiers in Microbiology **7**: 1-10.

Weaver, J., Kang, T. J., Raines, K. W., Cao, G. L., Hibbs, S., Tsai, P., Baillie, L., Rosen, G. M. and Cross, A. S. (2007). Protective role of *Bacillus anthracis* exosporium in macrophage-mediated killing by nitric oxide. Infection and Immunity **75** (8): 3894-3901.

WHO. (2013). "Botulism." Retrieved 13 janvier 2015.

Wiegel, J., Braun, M. and Gottschalk, G. (1981). *Clostridium thermoautotrophicum* species novum, a thermophile producing acetate from molecular hydrogen and carbon dioxide. Current Microbiology **5**: 155-160.

Witjitra, K., Shah, M. M. and Cheryan, M. (1996). Effect of nutrient sources on growth and acetate production by *Clostridium thermoaceticum*. Enzyme and Microbial Technology **19** (5): 322-327.

Xiao, Y., Van Hijum, S. A. F. T., Abee, T. and Wells-Bennik (2015). Genome-wide transcriptional profiling of *Clostridium perfringens* SM101 during sporulation extends the core of putative sporulation genes and genes determining spore properties and germination characteristics. Plos One **10** (5): 1-19.

Xue, J., Isern, N. G., Ewing, R. J., Liyu, A. V., Knapp, H., Iversen, J., Sisk, D. R., Ahring, B. K. and Majors, P. D. (2014). New generation NMR bioreactor coupled with high-resolution NMR spectroscopy leads to novel discoveries in *Moorella thermoacetica* metabolic profiles. Applied Microbiology and Biotechnology **98**: 8367–8375.

Zhang, P., Thomas, S., Li, Y.-Q. and Setlow, P. (2012). Effects of cortex peptidoglycan structure and cortex hydrolysis on the kinetics of Ca<sup>2+</sup>-dipicolinic acid release during *Bacillus subtilis* spore germination. Journal of Bacteriology **194** (3): 646-652.

Zheng, L., Abhyankar, W., Ouwering, N., Dekker, H. L., van Veen, H., van der Wel, N. N., Roseboom, W., de Koning, L. J., Brul, S. and de Koster, C. G. (2016). *Bacillus subtilis* spore inner membrane proteome. Journal of Proteome Research **15** (2): 585-594.

Zhou, T., Dong, Z., Setlow, P. and Li, Y.-Q. (2013). Kinetics of germination of individual spores of *Geobacillus stearothermophilus* as measured by Raman spectroscopy and differential interference contrast microscopy. PLOS ONE **8** (9).







## ***Valorisation des travaux de thèse***



## Publications scientifiques

### Article accepté

---

- Tiffany Malleck, Guillaume Daufouy, Stéphane André, Véronique Broussolle and Stella Planchon (2018). **Temperature impacts the sporulation capacities and spore resistance of *Moorella thermoacetica***. *Food Microbiology*, **73** : 334-341. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.11.017>

### Articles en préparation

---

- Tiffany Malleck, Fatima Fekraoui, Isabelle Bornard, Eloi Haudebourg, Stella Planchon and Véronique Broussolle. **Insights into the structure and the composition of *Moorella thermoacetica* spores produced at different temperatures.**

*To be submitted to Applied and Environmental Microbiology*

- Tiffany Malleck, Véronique Broussolle and Stella Planchon. **Transcriptional profiling during sporulation of the thermophilic anaerobe *Moorella thermoacetica***

*Manuscript in preparation*

## Communications scientifiques

2017

---

- Communication orale : **Resistance properties and structure of *Moorella thermoacetica* spores produced at different temperatures.** Tiffany Malleck, Guillaume Daufouy, Isabelle Bornard, Stéphane André, Véronique Broussolle and Stella Planchon. Spoilers in Food, Quimper, 28-30 June 2017
- Communication orale : **Etude des mécanismes d'adaptation de *Moorella thermoacetica/thermoautotrophica* dans l'environnement de lignes de fabrication de produits alimentaires appertisés.** Journée des doctorants de l'UMR 408, Avignon, 19 Janvier 2017.

2016

---

- Poster: **Impact of temperature on growth, sporulation abilities and spore properties of *Moorella thermoacetica*.** Tiffany Malleck, Isabelle Bornard, Stella Planchon and Véronique Broussolle. 7<sup>th</sup> European Spores Conference, London, 18-20 April 2016
- Poster: **Impact of temperature on growth, sporulation abilities and spore properties of *Moorella thermoacetica*.** Tiffany Malleck, Stella Planchon and Véronique Broussolle. 2<sup>nd</sup> Euro-Mediterranean Symposium on Fruit and Vegetable Processing, Avignon, 4-6 April 2016
- Communication orale : **Etude des mécanismes d'adaptation de *Moorella thermoacetica/thermoautotrophica* dans l'environnement de lignes de fabrication de produits alimentaires appertisés.** Journée des doctorants de l'UMR 408, Avignon, 21 Janvier 2016.
- **Rapport d'activité de l'année 2016, projet MECADAPT** : Etude des mécanismes d'adaptation de *Moorella thermoacetica/thermoautotrophica* dans l'environnement de ligne de fabrication de produits alimentaires appertisés.

2015

---

- Communication orale. **MECADAPT : Etude des mécanismes d'adaptation de *Moorella thermoacetica/thermoautotrophica* (*Moo t/t*) dans l'environnement de lignes de fabrication de produits alimentaires appertisés.** Comité de programmation légumes, Avignon, 12 Septembre 2015.
- **Rapport d'activité de l'année 2015, projet MECADAPT :** Etude de des mécanismes d'adaptation de *Moorella thermoacetica/ thermoautotrophica* dans l'environnement de ligne de fabrication de produits alimentaires appertisés.

2014

---

- Communication orale : **Etude des mécanismes d'adaptation de *Moorella thermoacetica/thermoautotrophica* dans l'environnement de lignes de fabrication de produits alimentaires appertisés.** Journée des doctorants de l'UMR 408, Avignon, 15 Décembre 2014.

## Encadrements de stagiaires

- **2017** : Fatima Fekraoui. Master 2 Biologie Agrosociétés, parcours Interactions Microorganismes/Hôtes, Environnements, Université de Montpellier.

**Caractérisation de la structure et de la composition protéique des spores de *Moorella thermoacetica*, une bactérie thermophile hyperthermorésistante.**

- **2016** : Guillaume Daufouy. Master 2 Mention Environnement Marin et Biotechnologie, spécialité Biotechnologie : Biomolécule, Micro-organismes et Bioprocédés. Université de Bretagne Sud.

**Caractérisation physiologique des souches de *Moorella thermoacetica*, une bactérie thermophile hyperthermorésistante**

## Résumé de la présentation orale au congrès Spoilers in Food, Quimper, 28-30 juin 2017

### Effect of sporulation temperature on spore properties of the thermophilic *Moorella thermoacetica*

Tiffany Malleck<sup>1,2</sup>, Guillaume Daufouy<sup>1</sup>, Isabelle Bornard<sup>3</sup>, Stéphane André<sup>1</sup>, Véronique Broussolle<sup>2\*</sup> and Stella Planchon<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> CTCPA, Unité de microbiologie EMaiRIT'S, 84911 Avignon cedex 9

<sup>2</sup> UMR408 SQPOV Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale, INRA, Avignon University, F-84000 Avignon,

<sup>3</sup> UR 0407 Unité de Pathologie Végétale, INRA, F-84143 Montfavet, France

\*Corresponding authors

Email : tmalleck@ctcpa.org

Keywords: biocides, UV-C, wet-heat, spore ultrastructure, proteomic, low-acid-canned-foods

Introduction: *Moorella thermoacetica* is currently the main cause of low-acid-canned-foods spoilage at 55 °C. This thermophilic anaerobe forms the most heat-resistant spores found in food industry and grows at temperatures frequently encountered in cannery. Thus we aimed to determine the effect of temperature on spore properties to give recommendations to canners

Material and methods: Sporulation of eight strains of *M. thermoacetica* from international collections or isolated from spoiled canned foods was performed at 45 °C, 55 °C and 65 °C. Spore resistance was assessed to wet-heat at 125 or 130 °C, to UV-C light and to biocides (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, peracetic acid, NaOH, sodium hypochlorite and glutaraldehyde). Spore survival curves were fitted using modified Weibull models. The ultrastructure of *M. thermoacetica* ATCC 39073 spores formed at two temperatures was observed in transmission and scanning electron microscopy. Spore protein composition was identified by proteomic analysis.

Results: Sporulation was more efficient at optimal than at limit temperatures. Spores formed at 55 °C were more resistant to wet-heat and peracetic acid than those formed at 45 °C but temperature had no effect on resistance to other biocides or to UV-C. Spores exhibited a large exosporium while coat layers did not seem to differ with the sporulation temperature.

Significance: Food processing line temperatures should be mastered to better control the resistance of *Moorella* spores to heat and biocides.



**Impact of temperature on growth, sporulation capacities and spore properties of *Moorella thermoacetica***

Tiffany Malleck<sup>1,2,3</sup>, Stella Planchon<sup>1</sup> and Véronique Broussolle<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>CTCPA, Unité de microbiologie EMaiRIT'S, 84911 Avignon cedex 9, France

<sup>2</sup>INRA, UMR408 Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale, F-84000 Avignon, France

<sup>3</sup>Avignon Université, UMR408 Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale, F-84000 Avignon, France

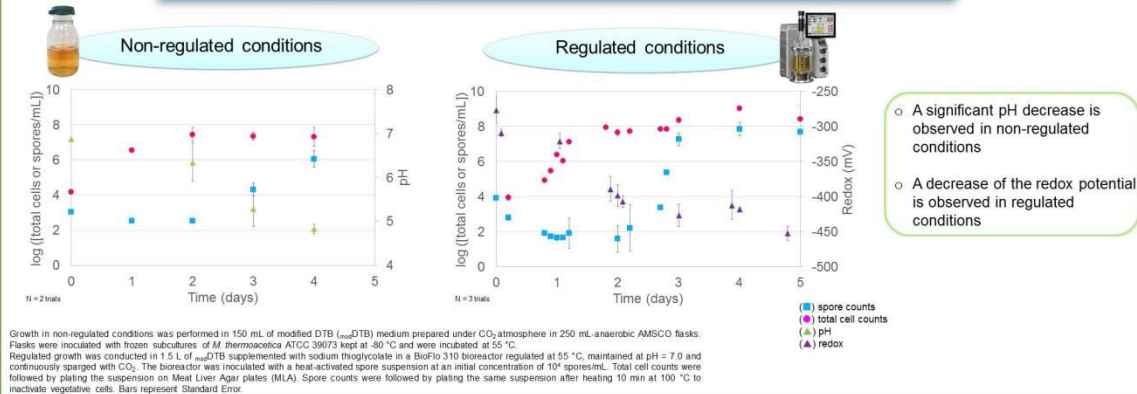
*Moorella thermoacetica* (formerly known as *Clostridium thermoaceticum*) is a thermophilic anaerobic spore-forming bacterium, frequently isolated from spoiled low acidic canned foods (LACFs) after storage at 55 °C (André *et al.*, 2013). This species forms highly heat resistant spores surviving the sterilization process at 130°C. These spores can subsequently germinate during storage and lead to food alteration. A better understanding of the growth and sporulation abilities of this bacterium according to conditions encountered during canning process would provide clues to limit non-stability occurrence without increasing sterilization temperatures. The aim of this study was to characterize the growth capacities of *M. thermoacetica* at different temperatures and we first investigated growth of the ATCC 39073 reference strain in rich liquid medium at 55°C, which is the reference incubation temperature used to detect the presence of thermophilic bacteria in LACFs. Unexpectedly, sporulating cells were observed early during the exponential growth phase, while a strong decrease of pH was noticed leading to a massive spore production. Even when growth was performed in a batch fermentor with a pH regulated at 7.0, sporulation still occurred during exponential growth phase, suggesting that the acidification of the medium is not the main parameter responsible for triggering sporulation of the strain. We hypothesize that the nature of the molecules produced during growth could play a role in the initiation of sporulation, as described for solventogenic *Clostridia*. Moreover, we investigated the effect of temperature on growth and sporulation of *M. thermoacetica* at limit and intermediate growth temperatures (*i.e.* 45 °C, 50 °C, 60 °C and 65 °C) in rich liquid medium in non-regulated conditions. Interestingly, preliminary results showed that the strain did not produce any heat-resistant spores at 45°C and 65°C, even though growth was still observed, clearly showing that temperature impacts *M. thermoacetica* sporulation capacity. The impact of temperature was also studied in terms of spore properties. Spores of *M. thermoacetica* were obtained on rich solid medium at 45 °C and 55 °C but not at 65 °C. Spores formed at 45 °C were less heat-resistant than those formed at 55 °C. The impact of temperature on resistance towards UV irradiations and chemicals will further be studied for these spores formed at different temperatures on solid medium and their structure will be investigated by transmission electron microscopy.

Tiffany MALLECK <sup>1,2</sup>, Isabelle BORNARD <sup>3</sup>, Stella PLANCHON <sup>1</sup> and Véronique BROUSSOLLE <sup>2</sup>  
1: CTCPA Unité EMaIRIT'S, Site Agroparc, 449 avenue Clément Ader, BP21203, 84911 Avignon, France (contact: tmallock@ctcpa.org)  
2: UMR 408, Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale, INRA, Avignon Université, 84000 Avignon, France  
3: UR0407, Unité de Pathologie Végétale, INRA, Avignon Université, F-84143 Montfavet, France

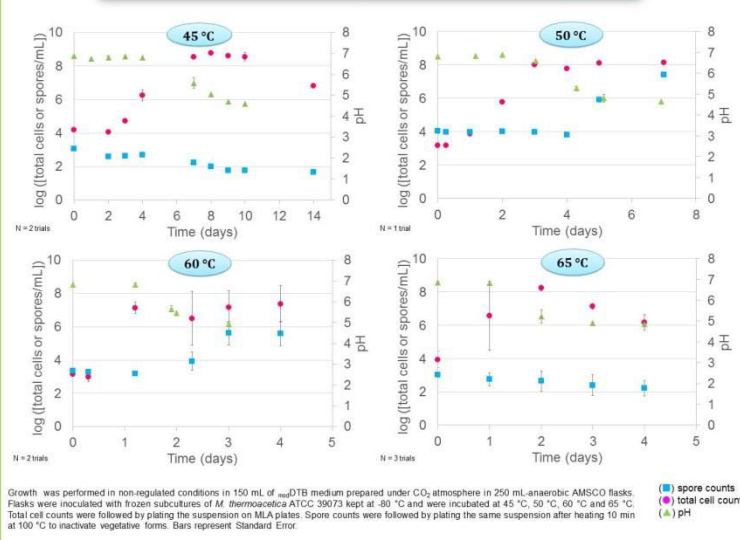
**- Introduction -**

*Moorella thermoacetica* (formerly known as *Clostridium thermoaceticum*) is a thermophilic anaerobic spore-forming bacterium, frequently isolated from spoiled low acidic canned foods (LACFs) after storage at 55 °C (André *et al.*, 2013). This species forms highly heat resistant spores surviving the sterilization process at 130 °C. These spores can subsequently germinate during storage and lead to food spoilage. The aim of our work is to provide a better understanding of the growth and sporulation abilities of *Moorella* according to conditions encountered during canning process. Therefore, it could also provide clues to limit non-stability occurrence without increasing sterilization temperatures.

**1. Impact of pH regulation on growth and sporulation abilities of *M. thermoacetica* at 55 °C**

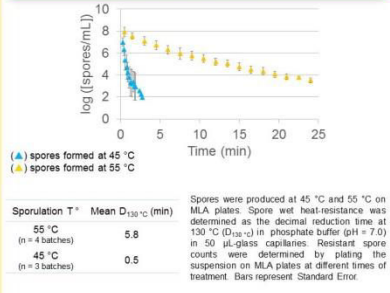


**2. Impact of temperature on growth and sporulation abilities**



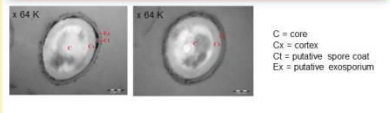
- Sporulation was observed at 50 °C and 60 °C but neither at 45 °C nor at 65 °C, even after 1 month of incubation (data not shown)
- pH strongly decreases whatever the growth temperature

**3. Impact of sporulation temperature on spore heat-resistance**



Spores formed at 45 °C are less heat-resistant than those formed at 55 °C

**4. Ultrastructure of spores formed at 55 °C**



Spores were produced at 55 °C on MLA plates and observed by Transmission Electron Microscopy. Photographs represent preliminary observations of cross sections of spores stained by ruthenium red.

Further observations are needed to identify structures of spores formed both at 55 °C and 45 °C

**- Conclusions -**

- The acidification of the medium is not the main parameter responsible for sporulation triggering of *Moorella thermoacetica* and metabolites produced during growth might act as a signal triggering sporulation
- Temperature strongly impacts both sporulation and spore heat-resistance: the higher the temperature, the more resistant spores

André, S., Zuber, F. et Remize, F. (2013). Thermophilic spore-forming bacteria isolated from spoiled canned food and their heat resistance. Results of a French ten-year survey. *International Journal of Food Microbiology* 165 (2): 134-143.

**Poster présenté au congrès 2<sup>nd</sup> Euro-Mediterranean Symposium on Fruit and Vegetable Processing, Avignon, 4-6 April 2016**

**Growth and sporulation conditions of *Moorella thermoacetica* ATCC 39073  
and spore heat-resistance**

Tiffany Malleck,<sup>\*a,b,c</sup> Stella Planchon<sup>a</sup> and Véronique Broussolle<sup>b,c</sup>

<sup>a</sup> CTCPA, Unité de microbiologie EMaiRIT'S, 84911 Avignon cedex 9, France

<sup>b</sup> INRA, UMR408 Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale, F-84000 Avignon, France - \*Corresponding author: tmalleck@ctcpa.org

<sup>c</sup> Avignon Université, UMR408 Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale, F-84000 Avignon, France

*Moorella thermoacetica*, a thermophilic anaerobic bacterium, is found in 36 % of 55°C non-stable spoiled LACF analyzed between 2001 and 2010 by CTCPA (André *et al.*, 2013). This species can form spores able to survive sterilization process and germinate, leading to food alteration. A better understanding of the growth and sporulation abilities of this bacterium according to conditions encountered during canning process would provide clues to limit non-stability occurrence without increasing sterilization temperatures.

Thus, growth and sporulation were studied for *M. thermoacetica* ATCC 39073 at optimal temperature with or without pH regulation. Heat-resistance was also determined for spores produced on rich solid medium. Non-regulated cultures were performed in AMSCO flasks at 55 °C in DTBmod medium under CO<sub>2</sub> atmosphere. Regulated growth was conducted in pH-controlled batch fermentor at 55 °C in DTBmod continuously sparged with CO<sub>2</sub>, inoculated either with a late-exponential-phase pre-culture or a heat-activated spore suspension. Growth was followed by optical density (OD) measurements, total bacterial and spores counts. Growth parameters (maximum growth rate,  $\mu_{max}$  and lag phase,  $\lambda$ ) were determined using modified Gompertz model (Begot *et al.*, 1996) applied to OD measurements. Three batches of spores of the reference strain were produced on MLA plates at 55 °C and heat resistance was determined in phosphate buffer at pH 7.0.

During growth of *M. thermoacetica* in regulated conditions, a strong decrease of pH from 7 to 4,5-5 was noticed. Surprisingly, the initiation of sporulation was triggered during early

exponential growth which could result from the pH decrease of the medium, as observed for solventogenic *Clostridium* organisms (Al-Hinai *et al.*, 2015). However, *M. thermoacetica* also sporulated under regulated optimal conditions, showing that the decrease of pH was not directly responsible for the initiation of sporulation. Moreover, a strong decrease of redox potential from about -300 mV to -500 mV was noticed during regulated growth. In regulated and non-regulated conditions, the  $\mu_{max}$  was similar. The lag time was estimated at 8.3h and 17h for regulated cultures inoculated with cells and spores respectively. Spores produced at 55°C exhibited a mean  $D_{130^\circ\text{C}}$  of 5.7 min.

Our results showed that *M. thermoacetica* ATCC 39073 was able to trigger sporulation during early exponential growth phase at optimal temperature whether pH was regulated or not. Spores of *M. thermoacetica* were shown to be highly heat-resistant. This also highlights the potential of *Moorella* to form highly resistant spores in canned food industry. Further work is running to understand high heat resistance of *M. thermoacetica*.

**Keywords:** fermentor, spores, heat-resistance, spoilage, LACF.

**Acknowledgments:** This work is part of Tiffany Malleck's PhD thesis who received a grant from the *Association Nationale de la Recherche et de la Technologie*. Project founded by FranceAgriMer.

Tiffany MALLECK<sup>1,2</sup>, Stella PLANCHON<sup>1</sup> and Véronique BROUSSOLLE<sup>2</sup>

1: CTCPA Unité EMaIRIT'S, Site Agroparc, 449 avenue Clément Ader, BP21203, 84911 Avignon, France (contact: tmalleck@ctcpa.org)  
2: UMR 408, Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale, INRA, Avignon Université, 84000 Avignon, France

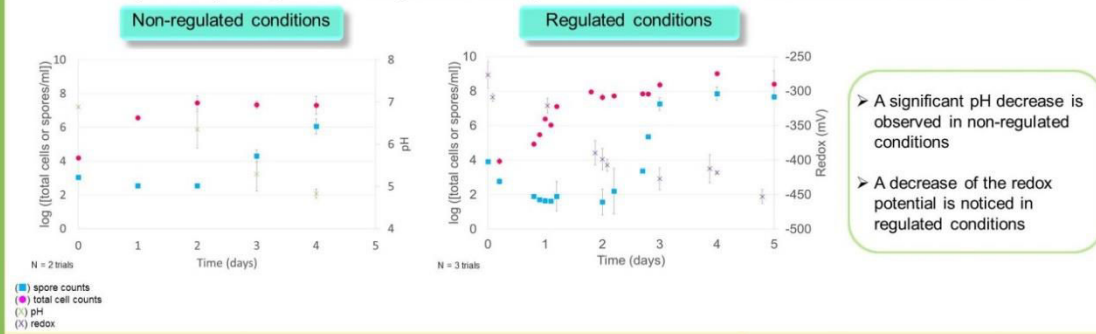
**- Introduction -**

*Moorella thermoacetica* (formerly known as *Clostridium thermoaceticum*) is a thermophilic anaerobic spore-forming bacterium, frequently isolated from spoiled low acidic canned foods (LACFs) after storage at 55 °C (André *et al.*, 2013). This species forms highly heat resistant spores surviving the sterilization process at 130 °C. These spores can subsequently germinate during storage and lead to food spoilage. The aim of our work is to provide a better understanding of the growth and sporulation abilities of *Moorella* according to conditions encountered during canning process. Therefore provide clues to limit non-stability occurrence without increasing sterilization temperatures.

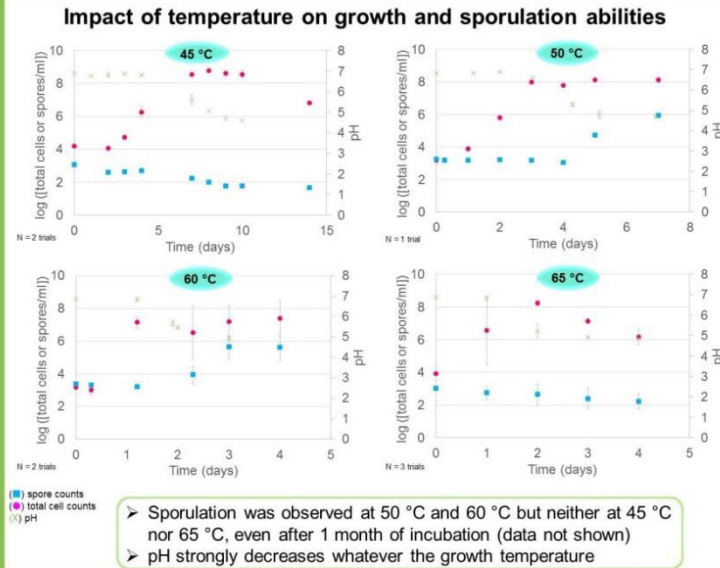
**- Material and Methods -**

Growth in non-regulated conditions were performed in 150 ml of modified DTB (<sub>mod</sub>DTB) medium prepared under CO<sub>2</sub> atmosphere in 250 ml anaerobic AMSCO flasks. Flasks were inoculated with frozen pre-cultures of *M. thermoacetica* ATCC 39073 kept at -80 °C and were incubated at 45, 50, 55, 60 or 65 °C. Regulated growth was conducted in 1.5 l of <sub>mod</sub>DTB in a BioFlo 310 bioreactor regulated at 55 °C, maintained at pH = 7.0 and continuously sparged with CO<sub>2</sub>. The bioreactor was inoculated with a heat-activated spore suspension at an initial concentration of 10<sup>7</sup> spores/ml. Total cell counts were followed by plating the suspension on Meat Liver Agar plates (MLA). Spore counts were followed by plating the same suspension after heating 10 min at 100 °C to inactivate vegetative forms. Spores of *M. thermoacetica* were produced at 45 and 55 °C on MLA plates. Spore heat-resistance was determined as the decimal reduction time at 130 °C (D<sub>130 °C</sub>) in a phosphate buffer solution (pH = 7.0) in 50 µl glass capillaries.

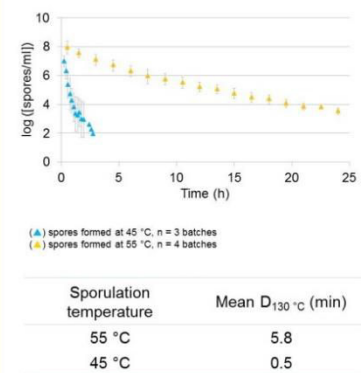
**Impact of pH regulation on growth and sporulation abilities of *M. thermoacetica* at 55 °C**



**- Results -**



**Impact of sporulation temperature on spore heat-resistance**



➤ Spores formed at 45 °C are less heat-resistant than those formed at 55 °C

**- Conclusions -**

- The acidification of the medium is not the main parameter responsible for sporulation triggering of *Moorella thermoacetica* and metabolites produced during growth might act as a signal triggering sporulation
- Temperature strongly impacts both sporulation and spore heat-resistance : the higher the temperature, the more resistant spores

André, S., Zuber, F. et Remize, F. (2013). Thermophilic spore-forming bacteria isolated from spoiled canned food and their heat resistance. Results of a French ten-year survey. *International Journal of Food Microbiology* 165 (2): 134-143.



**Résumé :** *Moorella thermoacetica* est une bactérie d'altération anaérobie thermophile sporulée produisant les spores les plus thermorésistantes isolées à ce jour en industrie agroalimentaire. Les spores de *M. thermoacetica* peuvent survivre aux traitements d'appertisation appliqués dans l'industrie de la conserve et représente la principale cause d'altération de conserves peu acides après incubation à 55 °C. Les mécanismes mis en place pendant la sporulation, ainsi que l'impact des facteurs environnementaux sur la sporulation et les propriétés des spores de *Moorella* sont largement méconnus.

L'objectif de ces travaux était donc de caractériser l'impact de la température sur les caractéristiques de sporulation et de résistance des spores ainsi que de déterminer les mécanismes moléculaires impliqués dans la sporulation. Nous avons montré que la capacité de sporulation est meilleure lorsque la sporulation est effectuée à la température optimale (55 °C) en comparaison avec les températures limites basse et haute (45 °C et 65 °C, respectivement). De plus, les spores de *M. thermoacetica* produites à 45 °C sont plus sensibles à la chaleur humide et aux biocides que les spores produites à 55 °C. La structure des spores ainsi que leur composition protéique varient en fonction de la température de sporulation. Une étude RNAseq menée au cours de la sporulation de *M. thermoacetica* en conditions optimales régulées a montré que la plupart des 167 gènes de sporulation, identifiés *in silico* dans le génome de *M. thermoacetica* ATCC39073, est sur-exprimée pendant la sporulation. Ces résultats suggèrent que les mécanismes décrits chez d'autres espèces endosporulées sont conservés chez *Moorella*.

L'ensemble des données acquises montrent que la température joue un rôle essentiel dans les caractéristiques de sporulation et de résistance des spores de *M. thermoacetica* mais également que les mécanismes moléculaires impliqués dans la sporulation semblent conservés au regard des données disponibles pour d'autres espèces.

Mots-clés : *M. thermoacetica*, sporulation, résistance, RNAseq, protéomique

**Abstract:** *Moorella thermoactica* is a spoilage anaerobic and thermophilic spore-former producing the most highly heat-resistant spores isolated so far in food industry, which enables the bacteria to survive the sterilization process applied in cannery. *M. thermoacetica* is the main cause of low acid canned food spoilage after incubation at 55 °C. Little is known about sporulation mechanisms and spore properties according to environmental conditions.

In this work, we aimed at characterizing the impact of environmental conditions on sporulation and spore resistance properties, as well as describing the molecular mechanisms underlying sporulation. We showed that sporulation capacities are higher when sporulation is performed at the optimal temperature (55 °C) than at limit temperatures (45 °C and 65 °C). Besides, spores are less resistant to wet heat and biocides when formed at 45 °C than at 55 °C. We showed that the ultrastructure and spore protein composition varied according to sporulation temperature. Moreover, the study of gene expression by RNAseq during sporulation in optimal regulated conditions showed that most of the 167 genes involved in the sporulation process and identified *in silico* in *M. thermoacetica* ATCC 39073 genome, were up-regulated during sporulation, suggesting that the mechanisms described in other endospore-formers are conserved in *Moorella*.

Altogether, our results showed that sporulation temperature strongly impacts sporulation and spore properties of *M. thermoacetica* and that sporulation mechanisms tend to be conserved in *Moorella* considering data available on other endospore-formers.

Keywords: *M. thermoacetica*, sporulation, resistance, RNAseq, proteomics