



**HAL**  
open science

# Résistance des spores de *Bacillus subtilis* face aux UV - Implication du DPA et caractérisation par microscopie photonique

Jonathan Dikec

► **To cite this version:**

Jonathan Dikec. Résistance des spores de *Bacillus subtilis* face aux UV - Implication du DPA et caractérisation par microscopie photonique. Biodiversité et Ecologie. Université Bourgogne Franche-Comté, 2022. Français. NNT : 2022UBFCK072 . tel-03985712

**HAL Id: tel-03985712**

**<https://theses.hal.science/tel-03985712>**

Submitted on 13 Feb 2023

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

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



**THESE DE DOCTORAT DE L'ETABLISSEMENT UNIVERSITE  
BOURGOGNE FRANCHE-COMTE**

PREPAREE A l'Institut Agro Dijon

UMR Procédés Alimentaires et Microbiologiques – Laboratoire Procédés Microbiologiques et  
Biotechnologiques

Ecole doctorale n°554

Ecole doctorale Environnement Santé

Doctorat en Sciences du Vivant

Spécialité : Biotechnologies agro-alimentaires

Par

**Jonathan Dikec**

---

**Résistance des spores de *Bacillus subtilis* face aux UV**

**Implication du DPA et caractérisation par  
microscopie photonique**

---

Thèse présentée et soutenue à Dijon, le 19 décembre 2022

Composition du Jury :

M. Carlin, Frédéric	Directeur de Recherche, INRAE	Président de jury / Rapporteur
M. Leguérinel, Ivan	Professeur, Université de Bretagne Occidentale	Rapporteur
Mme. Mathot, Anne-Gabrielle	Maitre de Conférences, Université de Bretagne Occidentale	Examinatrice
Mme. Junier, Pilar	Professeure, Université de Neuchâtel	Examinatrice
Mme. Dujourdy Laurence	Ingénieure de Recherche, Institut Agro Dijon	Examinatrice
M. Perrier-Cornet, Jean-Marie	Professeur, Institut Agro Dijon	Directeur de thèse
Mme. Winckler, Pascale	Ingénieure de Recherche, Institut Agro Dijon	Codirectrice de thèse



# Remerciements

Ce projet a bénéficié de l'aide directe ou indirecte de nombreuses personnes. Les occasions de dire sincèrement merci étant assez rares, il m'est important de prendre le temps de tous les remercier.

Tout d'abord merci aux membres du jury, au Pr. **Ivan Leguérinel** et au Pr. **Frédéric Carlin** d'avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse. Merci également au Pr. **Pilar Junier**, au Dr. **Anne-Gabrielle Mathot** ainsi qu'au Dr. **Laurence Dujourdy** d'avoir été les examinatrices de ce jury.

A l'origine, ce projet aurait dû être centré sur le développement du marquage des structures pour l'imagerie super résolue PALM/STORM des structures de la spore soumis à un stress. Cependant, après un déménagement du laboratoire, une pandémie mondiale et de très nombreuses tentatives infructueuses, j'ai réorienté mon projet sur l'impact du stress lumineux et continué de développer sur un second plan ce projet d'origine. En y réfléchissant, deux idées fondamentales de ce nouveau projet sont venues au cours des réunions avec mon comité de suivi de thèse. C'est pourquoi je tiens à remercier grandement les deux membres de ce comité de thèse le Dr. **Aymeric Leray** et le Dr. **Andrey Klymchenko** d'avoir pris le temps d'évaluer mon travail et de m'avoir fourni des conseils très avisés. C'est au cours de la première réunion juste après ce changement de projet que le Dr. Klymchenko m'a suggéré que le DPA devait former de nombreux photoproduits et de m'y intéresser. Quant au Dr. Leray c'est lui qui a conseillé au microbiologiste que je suis de m'intéresser à l'utilisation de la spectroscopie pour étudier le DPA. C'est également lui qui m'a formé en premier à l'utilisation de la spectroscopie Raman. C'est là, je pense, les points de départ des analyses sur les photoproduits du DPA ainsi que les analyses spectroscopiques de ce projet.

Un grand merci à mes deux encadrants, **Jean-Marie Perrier-Cornet** et **Pascale Winckler**. Vous m'avez tous les deux beaucoup appris. Vous avez su me faire confiance et me laisser tenter beaucoup de choses pendant ma thèse et surtout pour ça merci. Vous avez supporté de m'écouter raconter mes très (trop ?) nombreuses « idées de manip » notées sur un bloc note de téléphone à 2h00 du matin et m'avez toujours encouragé à chercher de nouvelles idées sans jamais me brider (tout en m'aidant à faire le tri dans ce qui était irréalisable ou non pertinent, les idées de manip trouvées dans la nuit ne sont pas toujours des idées de génie il faut croire). Merci également à vous deux d'avoir toujours eu la porte de votre bureau ouverte même dans des périodes où vous aviez peu de temps. **Jean-Marie**, lorsque j'étais stressé ou que j'avais un problème tu as toujours été calme et m'as aidé à prendre du recul. Particulièrement pendant ces derniers mois de rédaction où tout s'est enchaîné très, très vite. Il a des moments où en entrant dans ton bureau j'étais catastrophé, pensant que certains délais étaient intenable, que certaines choses étaient irréalisables. Mais à chaque fois qu'on en discutait tu me faisais prendre du recul et je ressortais de ton bureau en me disant « finalement on est large ». Avoir un directeur de thèse avec un pareil calme peut parfois s'avérer stressant quand on est très pressé et qu'on veut que



tout avance vite mais c'est également ce qui m'a beaucoup rassuré et aidé à des moments importants. **Pascale** un grand merci pour toute l'aide que tu m'as apporté. En plus de m'apprendre beaucoup de choses sur plusieurs appareils différents, tu m'as également beaucoup appris sur la psychologie humaine. Tu as même réussi à me faire aimer connaître et comprendre les trajets optiques des appareils que j'utilise et ça ce n'était pas gagné. Je garde en tête beaucoup de moments qu'on a pu passer ensemble notamment le congrès MIFOBIO. Pendant trois ans on a pu discuter de l'exobiologie à la psychologie en passant par la microscopie et tous les problèmes administratifs/humains qu'on a pu avoir. Heureusement que parfois tu étais là pour ramener Jean-Marie et moi les pieds sur terre quand nos idées de manip ou nos théories commençaient à partir trop loin. De nous trois c'est sûrement toi qui avais le plus conscience si certains délais étaient réellement tenables ou si certaines expériences valaient vraiment le coup qu'on s'y acharne. Pardon pour toutes les fautes d'orthographe que j'ai infligé à tes yeux. Au fil de tes relectures j'ai pu revoir certaines règles d'orthographe de l'école élémentaire pour mon plus grand bien.

Je suis très content d'avoir pu travailler avec vous deux et je trouve qu'on forme une bonne équipe avec des individualités très différentes et très complémentaires. On s'est bien marré et j'ai aimé le temps qu'on a partagé tous ensemble, j'espère avoir l'occasion de travailler encore avec vous !

Pendant ces trois ans j'ai pu rencontrer d'autres compagnons de galère, doctorants et post-doctorants qui sont devenues des amis :

Merci à ceux qui étaient là avant moi et qui m'ont bien accueilli, **Thibaut Terry** (tibs aka le boa), **Emilie Lang**, **Pauline Ribert**, **Jérémy Adamuz** et **Fatima Fekraoui**. Avec un merci spécial à Fatima qui en plus de faire partie de la team spore m'a beaucoup aidé en arrivant. Déjà pour tous tes protocoles soigneusement détaillés qui m'ont évité des heures de fouilles archéologiques dans des cahiers de laboratoires. Je ne compte pas le nombre de fois où en voulant commencer un test d'une idée survenue il y a deux minutes je me rends compte qu'il me manque la moitié des choses nécessaires. Dans ces moments-là tu m'as bien souvent dépanné de quelques boîtes de pétri, de spores, d'eau distillée ou encore d'une dosette de café. Encore merci ! Je suis content qu'on ait pu devenir amis et qu'on ait pu s'entraider et échanger nos connaissances. Et j'adore venir dans ton bureau pour que tu me montres une référence biblio que je ne connais pas encore et qui remet en question nos vies !

Merci à **Emilie** et **Thibaut** d'avoir fait partie des premières personnes à me proposer de venir boire des coups après les journées de labo. Enorme merci à **Emilie** pour avoir pris le temps depuis le Brésil de me donner des conseils et de me faire des remarques sur mon manuscrit. Je garde de super souvenirs de l'année où on a pu se côtoyer et j'espère qu'on pourra encore faire moult soirées ! **Thibaut**, on aura sacrément rigolé ensemble. C'est peut-être avec toi que j'ai eu le plus de fou-rires pendant ces trois ans. C'est aussi à cause de toi que j'ai mangé beaucoup trop de petits gâteaux entre les repas... *il s'agirait de grandir... il s'agirait de grandir...* Merci pour avoir relu l'anglais un peu frenchy de mes articles et posters

et de m'avoir proposé ton aide dans beaucoup de situations. Comme Fatima tu m'as aidé en me dépannant plusieurs fois pas mal de matos, mais je sais (surtout avec toi) que j'ai largement payé ma dette en t'en dépannant pas mal aussi haha. Merci également pour tes protocoles simplifiés à la Tibo. On eut l'occasion de travailler ensemble à pas mal de reprises finalement, pour tester, disons, « des trucs divers et variés ». Bon ça n'a pas été la collab la plus riche en résultats mais c'était très marrant et on a quand même appris quelques petites choses. La faute à des protocoles peut être trop exploratoires ou trop simplifiés à la Tibo, je ne sais pas.

Petite pensée à **Laetitia** qui est toujours prête à relever les manches pour filer un coup de main même si elle un bras et une jambe dans le plâtre ainsi qu'une main brûlée. J'espère cependant ne plus jamais avoir à t'aider pour un déménagement.

La période du déménagement du labo n'était pas la plus agréable mais grâce à cela j'ai pu rencontrer de super doctorantes à l'étage du dessous qui sont devenues de très bonnes amies :

**Aurore Bodzen** (bozboz de bretonie) c'est forcément par toi que je dois commencer. J'ai trouvé qu'on avait souvent une vision des choses assez proches sur beaucoup de sujets et j'avais parfois l'impression d'avoir rencontré mon double, notamment au niveau du penchant pour les muffins du colombois et du rangement. On s'est vraiment bien marré et je sais que je peux toujours compter sur toi s'il me prend l'envie de sortir. On en aura descendu des godets ! Je suis content de compter parmi mes amis et j'ai adoré arpenter les rues de Dijon en ta compagnie. Qui sait, on se retrouvera peut-être de nouveau pas loin en Bretagne ou un peu plus au nord !

**Axelle Collinet** (AxuPhD mon influenceuse préférée). Merci pour tous les moments qu'on a pu partager malgré ton emploi du temps de ministre, un jour à Paris, l'autre à Bordeaux et le lendemain à Nice. Avec d'un côté ton attirance pour le soleil (que je ne comprendrai sans doute jamais), ta (sur)positivité et d'un autre côté mon attrait pour le froid et la pluie, mes moments de stress où je ne voulais rien entendre de positif, on n'était pas forcément destinés à bien s'entendre. Et pourtant tu fais partie des meilleures rencontres que j'ai pu faire au pays de la moutarde. Il faut dire que tu es quelqu'un de peu orthodoxe et ça fait du bien de rencontrer des gens comme ça.

**Alicia Froidurot** (rose et pain au chocolat). Premièrement, merci pour m'avoir emmené aux labos en voiture quand il faisait froid ou quand il pleuvait trop, ça fait plaisir. Merci de m'avoir accueilli dans ton bureau pour faire des pauses bienvenues pendant cette dernière année pas toujours simple. Je savais que je pouvais toujours venir te voir pour retrouver un peu le moral et avoir du chocolat (et un chargeur de téléphone).

**Audrey Raise** (la malchance incarnée). Déjà merci de pas avoir fait exploser le labo ou mis le feu à notre étage. Merci de m'avoir montré par tes actions qu'il pouvait toujours m'arriver pire ! Tu m'as beaucoup fait rire, parfois à tes dépens, pendant ces trois ans. Je garde un souvenir amusé de nos

discussions sur qui a la plus grande poisse en manip (toi incontestablement). Merci aussi de m'avoir prêté quelques-uns de tes précieux mangas qui parfois étaient retenus en otage chez moi.

**Marylou Baraille** (passion petit dej'). Et enfin Marylou que j'ai pu apprendre à connaître cette dernière année (quand madame était présente sur site et pas dans son second bureau). Je te souhaite de faire une super thèse comme tes quatre prédécesseuses que j'ai cité plus haut. Et surtout de t'amuser en la faisant, même si je suis plus là !

**Merci plus généralement à tous les membres de l'équipe PMB pour leur accueil et leurs conseils.** De manière générale, je n'ai jamais trouvé aucune porte close quand j'avais besoin d'un conseil ou juste l'envie de discuter et ceux dans n'importe quel bureau (je pense surtout à **Ambroise, Sylvie, Sébastien, Stéphane, Laurent**). Merci donc à tous ses membres que j'ai pu côtoyer de près ou de loin. Mention spéciale à **Emmanuel Jacotot** (dit Manu le sportif et l'expérimentateur de haute voltige) qui en plus d'être marrant est d'une gentillesse à toute épreuve. On n'a pas eu l'occasion de bosser ensemble mais on a beaucoup rigolé. J'aimais beaucoup descendre faire une petite pause dans ton bureau ou te regarder bosser pendant que moi je discutais. Note qu'un jour je gagnerai au ping pong, encore 10 ans à attendre et tu tiendras plus debout, à ce moment-là j'aurai ma revanche !

Evidemment il y a un membre de l'équipe à qui je dois des remerciements un peu spéciaux, le brillant **Maxime Pacheco**. Comme tu l'as dit dans ton propre manuscrit, j'ai moi aussi la chance d'avoir pu travailler avec un ami proche pendant ces trois ans. Le mélange de nos idées, parfois contradictoires, nous ont permis de nous débloquent dans nos projets respectifs. Merci d'avoir eu la patience de me répéter environ 500 fois le couple excitation-émission du DPA et du CaDPA jusqu'à me l'inscrire sur le tableau en face de moi pour que finalement ça rentre (340-430 nm/ 300-400 nm). Je trouve qu'au cours de ces trois ans tu es devenu un brillant docteur qui est devenu confiant en ses capacités et a su m'intéresser un peu au monde étrange de la chimie. Même si sur certains points je considère encore les chimistes comme des mages noirs qui mélangent des choses dangereuses. J'espère qu'en te côtoyant aussi bien au labo qu'en dehors, j'ai pris pour moi un peu de ta légendaire organisation qui parfois me fait défaut !

Pendant mon projet j'ai également pu côtoyer des personnes d'autres laboratoires. Je pense notamment à mes autres collègues doctorants/post-doctorants **Maxime Haure, Edouard Munier, Estelle Fischer, Pierre Fouilloux Mehrsa Emkani, Thierry Tran** et **Laura Carbadillo**.

**Max**, je garde en souvenir nos parties de fléchettes où j'ai depuis appris que je n'étais pas aussi bon que je le pensais (encore pardon pour tes côtes). Merci de m'avoir donné des conseils sur la thèse en général à mon arrivée et de m'avoir accompagné dans mes balades nocturnes de fin de soirée.

**Estelle**, merci pour l'organisation de tes super soirées et pour tes récits de nos aventures de « la Brigade des 5 roses » au début de chaque session donjons et dragons.

**Laura**, on a pu visiter quasiment tous les musées de la ville ensemble à notre arrivé. C'est grâce à toi que j'ai pu occuper la plupart de mes premiers week-ends en arrivant à Dijon !

Je pense également à **Cosette Grandvalet** et **Laurence Dujourdy** avec qui j'ai pu collaborer. **Cosette**, on s'est cassé le nez pendant 2 ans sur la mise au point de nos mutants pour qu'au final ils ne marchent pas comme on voulait mais bon, c'est la science. J'espère que quelqu'un prendra la relève pour achever avec toi ce travail déjà bien entamé. Merci pour ton aide et ta pédagogie, j'ai beaucoup appris à tes côtés, de l'élaboration d'une amorce à la transformation d'une souche. C'était très agréable de venir travailler avec toi et au risque de me répéter, là aussi, on a bien rigolé. **Laurence**, encore merci mais cette fois pour m'avoir initié à l'analyse des spectres qu'on a pu acquérir en partie ensemble au synchrotron soleil. Ta bonne humeur et ta gentillesse m'ont été d'un grand réconfort lors de la 2ème session au synchrotron. Tu as su être toi aussi très pédagogue pour m'expliquer dans le détail en quoi consistaient les tests statistiques que je faisais. Merci également à **Christophe Sandt** du synchrotron soleil pour son aide et son expertise lors des deux sessions de travail que nous avons pu mener ensemble.

J'ai également une petite pensée particulière pour **Nahel Bechoua** et **Matéo Lavaud**. J'ai eu la chance de vous encadrer pendant quelques mois en stage et les beaux résultats de ce manuscrit sont en partie le fruit de votre travail. Vous avez été brillants et je suis fier d'avoir pu publier un article avec chacun de vous. Je vous souhaite de réussir dans la voie que vous estimerez le mieux pour vous et vu vos capacités respectives je ne me fais pas de soucis que vous arriverez à accomplir vos objectifs.

Bon courage aux nouvelles arrivantes **Chloé**, **Perrine** et **Léa** et je vous souhaite toute les trois de vous amuser pendant vos 3 années de thèse (ça passe très vite vous verrez) et d'avoir plein de choses sympas à nous raconter lors de vos soutenances respectives. Merci aussi de m'avoir aidé à répéter.

Merci à ceux que je considère comme mes frères et sœurs : **Théo**, **Quentin**, **Julien**, **Léa**, **Tom**, **Lulu**, **Lolo**, **Cloé**, **Jordane**, **Camille**, **Tanguy**, **Mathias**, **Marc**, **Rémy**, **Anto**, **Benjamin**, **Stephy**, **Matthieu**, **Lich** et **Etienne**. Pour certains d'entre vous ça fait 24 ans qu'on se connaît et je me sens comme faisant partie d'une grande famille lorsqu'on se retrouve tous ensemble quelques fois dans l'année ou pour partir en vacances l'été. Merci d'avoir été là depuis tout ce temps, vous m'avez aidé à grandir, à garder les pieds sur terre et à conserver une ouverture d'esprit tant on mène tous des vies très différentes désormais. Merci également aux copains du discord **Vivien**, **Auriane**, **Jerem**, **Esteban** et particulièrement aux frères **Chocat**, **Tanguy** et **Mathis** (pti civ' de 23h là ?) qui m'ont permis de décompresser et de beaucoup rire certains soirs.

Merci à ma famille de m'avoir soutenue aussi bien émotionnellement que financièrement pendant mes études. Merci à mes parents **Sandrine** et **Mustafa** qui ont fait des sacrifices pour que leurs enfants puissent avoir une vie confortable et puisse choisir leur voie. Merci de m'avoir poussé à tester plein de choses différentes étant enfant et de toujours m'avoir laissé beaucoup d'autonomie pour gérer mes études. Vous m'avez appris à travailler pour moi-même et pas pour les autres. Ma mère qui m'a

appris à faire preuve d'empathie et à être reconnaissant des gens qui parfois nous aident en chemin (c'est du coup de sa faute si ces remerciements sont si longs), mon père qui m'a appris qu'il faut parfois faire des choses qu'on n'a pas envie de faire pour avancer et qu'on peut toujours rebondir. Merci à mes grands-parents d'avoir toujours été là pour moi. Mon grand-père **Roger** qui m'a toujours poussé à faire des études qu'il regrette de ne pas avoir pu faire et qui adore discuter science et philosophie avec moi. Je me souviens encore faire mes premières « expériences » de science avec toi en créant « des nuages » dans un bocal. Ma grand-mère **Marie-Thérèse** qui a toujours été un exemple de résilience. Tu aurais parfois toutes les raisons de baisser les bras ou de te décourager mais je ne t'ai jamais vraiment entendu te plaindre. Au moment où j'écrivais ce manuscrit tu t'es battu contre un cancer et encore une fois tu n'as pas baissé les bras et tu as gagné. C'est peut-être toi la forme de vie la plus résistante et pas les spores finalement ? Enfin, merci à ma sœur **Charlotte** qui m'a parfois montré qu'une autre façon de penser était possible.

Je finis ces remerciements par la personne qui m'a le plus aidé et soutenue **Laura Carballo** qui a partagé ma vie pendant cette thèse. Même si j'ai voulu faire en sorte que ma thèse n'impacte pas trop notre vie, force est de constater que je n'y suis pas toujours arrivé. Merci d'avoir été infiniment compréhensive. Tu ne m'as jamais reproché de trop travailler (à croire que je n'ai pas tant bossé finalement ?), de finir tard ou de te parler de mes idées de manips dont tu ne comprends pas forcément toujours les tenants et aboutissants. Je suis si heureux de partager ma vie avec toi. Comme tu le dis si bien, on est de super partenaires. Tu m'impressionnes tous les jours, tu as notamment une force de caractère et une confiance en toi dont j'essaie de m'inspirer. Ne pas me dégonfler pour aller à ta rencontre a probablement été l'une des meilleures décisions que j'ai prises dans ma vie. Je suis fier de ce qu'on commence à construire ensemble et je n'aurais sûrement pas pu en faire autant dans mon projet de thèse si tu n'avais pas été là ces dernières années. J'en profite pour faire un coucou à ta mamie **Jacqueline** qui est devenue par la force des choses ma mamie d'adoption. Et j'ai une dernière petite pensée pour **Misty** qui m'a accompagné une grande partie de ma rédaction en ronronnant sur mes jambes et m'a parfois obligé à faire des pauses pour ramasser ses bêtises.

Sans toute ces personnes, ce manuscrit serait différent. Il était donc important de les mentionner.

# Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique

CaDPA : Dипicolinate de calcium

CaDPAp : Photoproduits du CaDPA

DPA : Acide dipicolinique

DPAp : Photoproduits du DPA

FLIM : Imagerie par durée de vie de fluorescence (Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy)

FTIR : Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier

MAL : Acide muramique

NAG : N-acétylglucosamine

NAM : N-acétylmuramique

PALM : microscopie par localisation photoactivée (photo-activated localization microscopy)

PG : Peptidoglycanes

pH : Potentiel hydrogène

pKa : constante d'acidité

ROI : Région d'intérêt (region of interest)

SASPs : Small Acid-Soluble Proteins

SP : Spore photoproducts

STORM : Microscopie à reconstruction optique stochastique (Stochastic Optical Reconstruction Microscopy)

TSCPC : Time-Correlated Single Photon Counting

UFC : Unités Formant Colonie

UV : Ultraviolet

## Liste des figures (hors articles)

<b>Figure 1</b> : Représentation schématique des différentes couches composant une spore bactérienne .....	9
<b>Figure 2</b> : Structure chimique de la molécule d'acide dipicolinique (DPA) .....	12
<b>Figure 3</b> : Schéma des sept étapes du processus de sporulation et du cycle végétatif .....	13
<b>Figure 4</b> : Représentation des différentes étapes de germination de la spore .....	17
<b>Figure 5</b> : Représentation du spectre de la lumière .....	21
<b>Figure 6</b> : Formules chimiques des photoproduits de l'ADN CPD ; 6-4PP et SP. Les radicaux R représentent le reste du brin de l'ADN .....	25
<b>Figure 7</b> : Diagramme de Perrin-Jablonski illustrant <b>A</b> : une absorption un photon trouvé en microscopie de fluorescence conventionnelle <b>B</b> : une absorption multiphotons avec en orange une absorption deux photons ou biphotonique et en rouge une absorption trois photons ou triphotonique en comparaison d'une absorption un photon de même niveau d'énergie en violet .....	34
<b>Figure 8</b> : <b>A</b> : Illustration du principe de TCSPC. <b>B</b> : Image FLIM de spore de la souche sauvage de <i>B. subtilis</i> . Plusieurs régions avec des temps de vie différents peuvent être observées .....	37
<b>Figure 9</b> : Cycle absorption-réémission d'énergie de molécules photoconvertibles/photoactivables ....	38
<b>Figure 10</b> : Principe de la technique de microscopie haute résolution PALM/STORM appliquée à la spore .....	39
<b>Figure 11</b> : Formules chimiques du DPA (A), de l'acide picolinique (B) et des deux DPAP identifiés en 2021 nommés DPAP1 et DPAP2 .....	45
<b>Figure 12</b> : Spectres d'émission de fluorescence du DPA (10 mM) et du CaDPA (50 mM), $\lambda_{ex}$ = 300 nm.....	48
<b>Figure 13</b> : Intensité de fluorescence des spores bactériennes (N=10) avant et après irradiation pour les souches PS533 (type sauvage) (A), PS4150 (sans manteau) (B), FB122 (sans CaDPA) (C). Augmentation des valeurs d'intensité de fluorescence après irradiation pour chaque souche (D) .....	53
<b>Figure 14</b> : (A) Projection phasor plot avant exposition aux UVc (ligne pleine) et après exposition aux UVc (ligne pointillée) pour chaque souche : PS533 (rouge), PS4150 (bleu) et FB122 (vert). (B) Tableau : Temps de vie de fluorescence moyens ( $\tau_{moyen}$ ) obtenus par projection phasor pour toutes les souches utilisées avant et après irradiation (0,120 J/cm <sup>2</sup> pendant 2 min) .....	55
<b>Figure 15</b> : Intensité de fluorescence des spores bactériennes (N=12) avant et après irradiation UVb (312 nm) 10 min à 0.120 J/cm <sup>2</sup> , pour la souche PS533 (type sauvage) .....	83

<b>Figure 16</b> : Spectres Raman (A), FTIR (B) et O-PTIR (C) du CaDPA et du DPA après 2min d'exposition aux UVc (0,120 J/cm <sup>2</sup> ) .....	91
<b>Figure 17</b> : Spectres de spores PS533 (rouge), PS4150 (bleu) et FB122 (verts) obtenus en spectroscopie Raman (A), FTIR (B) et O-PTIR (C) .....	125
<b>Figure 18</b> : Suivi de l'autofluorescence d'une dizaine de spores PS533 exposées à un rayonnement NIR pulsé à 750 nm de 5,49 mW, durant 5 min .....	154
<b>Figure 19</b> : Signal de fluorescence généré par excitation multiphotonique à 750 nm .....	157
<b>Figure 20</b> : Taux de destruction de spores FB122, enrichies en DPA ou en DPAP et soumises à un laser IR pulsé .....	159
<b>Figure 21</b> : Protocole d'immobilisation sur lame à dépression .....	165
<b>Figure 22</b> : Protocole de marquage pendant la sporulation .....	165
<b>Figure 23</b> : Images de spores reconstruites grâce à la technique PALM obtenues à partir des souches recombinantes de <i>B. subtilis</i> portant les fusions protéiques.....	171

## Liste des tableaux (hors articles)

<b>Tableau 1</b> : Liste des composés trouvés par spectrométrie de masse, par injection directe de la solution de DPA après une heure de traitement UVc en condition sèche .....	46-47
<b>Tableau 2</b> : Sondes utilisées et structures ciblées .....	164
<b>Tableau 3</b> : Liste et séquences de amorces utilisées pour la construction des mutants.....	168





# Sommaire

<b>Introduction</b> .....	1
<b>Etat de l'art : Synthèse bibliographique sur les spores et leur résistance à la lumière</b> .....	7
<b>1. Généralités sur la spore</b> .....	8
1.1 <u>Structure de la spore</u> .....	9
1.1.1. <i>Le protoplaste</i> .....	9
1.1.2. <i>La membrane interne</i> .....	10
1.1.3. <i>Le cortex</i> .....	10
1.1.4. <i>La membrane externe</i> .....	10
1.1.5. <i>Le manteau</i> .....	11
1.1.6. <i>L'exosporium</i> .....	11
1.2. <u>Le DPA</u> .....	11
1.3. <u>Processus de sporulation</u> .....	12
1.4. <u>Processus de germination</u> .....	15
<b>2. Tour d'horizon des propriétés de résistance des spores face à des stress physiques</b> .....	18
2.1. <u>Pression</u> .....	18
2.1.1. <i>Haute pression</i> .....	18
2.1.2. <i>Vide</i> .....	19
2.2. <u>Température</u> .....	19
2.2.1. <i>Haute température</i> .....	19
2.2.2. <i>Basse température</i> .....	20
<b>3. Résistance des spores face à la lumière (de l'UV à l'IR)</b> .....	20
3.1. <u>Impact du rayonnement UV sur les spores</u> .....	22
3.1.1. <i>Généralités sur les UV</i> .....	22
3.1.2. <i>Effets des UVc sur la spore bactérienne</i> .....	23
3.1.3. <i>Effets des UVb et UVa sur la spore bactérienne</i> .....	27

3.2. <u>Gamme du visible : Effet de la lumière bleue et de la lumière pulsée sur les spores bactériennes</u> .....	28
3.3. <u>Effets du rayonnement infrarouge continu et pulsé sur les spores bactériennes</u> .....	29
<b>4. Point sur les techniques de spectroscopies et de microscopie utilisées</b> .....	<b>30</b>
4.1. <u>Spectroscopie Raman</u> .....	30
4.2. <u>Spectroscopie Infrarouge (IR) et spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF)</u> .....	31
4.3. <u>Spectroscopie O-PTIR</u> .....	32
4.4. <u>Principe de la microscopie de fluorescence et de la microscopie multiphotonique</u> .....	33
4.4.1. <i>Principe de la microscopie de fluorescence</i> .....	33
4.4.2. <i>Principe de la microscopie multiphotonique</i> .....	34
4.5. <u>Principe de la mesure de temps de vie de fluorescence, acquisition FLIM</u> .....	35
4.6. <u>Principe de la microscopie super résolue STORM/PALM</u> .....	37
4.6.1. <i>STORM</i> .....	39
4.6.2. <i>PALM</i> .....	40

## **Chapitre 1 : Les photoproduits du DPA (DPAp) – Identification, suivi de leur formation et effets biologiques** .....

<b>I.1. Introduction</b> .....	<b>44</b>
<b>I.2. <u>Etude 1*</u> : Identification des DPAP <i>in vitro</i> et caractérisation de leur fluorescence <i>in vivo</i></b> .....	<b>45</b>
I.2.1. <u>Introduction : identification des DPAP <i>in vitro</i></u> .....	45
I.2.2. <u>Matériel et méthodes</u> .....	48
I.2.2.1. <i>Souches bactériennes et conditions de culture</i> .....	48

I.2.2.2. <i>Protocole d'exposition aux UVc</i> .....	49
I.2.2.3. <i>Vérification de la non perméabilisation des spores par dosage du DPA in vivo</i> .....	49
I.2.2.4. <i>Fluorescence Lifetime Imaging (FLIM)</i> .....	50
I.2.2.5. <i>Analyse de la fluorescence résolue dans le temps</i> .....	50
I.2.2.6. <i>Représentation phasor plot</i> .....	50
I.2.2.7. <i>Analyse statistique</i> .....	51
I.2.3. <u>Résultats et discussion</u> .....	51
I.2.4 <u>Conclusions de la première étude</u> .....	55
<b>I.3. <u>Etude 2*</u>: Caractérisation des effets biologiques des DPAP dans la spore bactérienne</b> .....	<b>57</b>
<b>Article</b> : Uptake of UVc induced photoproducts of Dipicolinic Acide by <i>Bacillus subtilis</i> spore – effects on the germination and UVc resistance of the spores .....	58-82
<b>I.4. Résultats complémentaires et conclusions du chapitre 1</b> .....	<b>83</b>
<b>Chapitre 2 : Influence de l'état d'hydratation sur la photochimie du CaDPA et lors d'une exposition aux UV</b> .....	<b>87</b>
<b>II.1. Introduction</b> .....	<b>88</b>
<b>II.2. Comparaison entre DPAP et CaDPAP</b> .....	<b>89</b>
II.2.1. <u>Protocole</u> .....	89
II.2.2. <u>Résultats et discussion</u> .....	89
<b>II.3. <u>Etude 3*</u> : Influence de l'hydratation sur la photochimie du CaDPA</b> .....	<b>92</b>
<b>Article</b> : Influence of hydration on calcium dipicolinate (CaDPA) during UVb and UVc exposure studied via Raman, FTIR and O-PTIR spectroscopy.....	93-121
<b>II.4. Apport de l'O-PTIR à l'étude des spores bactériennes : comparaison avec la spectroscopie Raman et FTIR</b> .....	<b>123</b>

<b>II.5. Discussion et perspectives .....</b>	<b>126</b>
<b>Chapitre 3 : Effet d'un laser infrarouge pulsé sur la spore de B. subtilis ...</b>	<b>129</b>
<b>III.1. Caractérisation de l'inactivation des spores par un laser NIR pulsé .....</b>	<b>130</b>
<b>III.1.1. Introduction.....</b>	<b>130</b>
<b>III.1.2. <u>Etude 4*</u> : Effet d'un laser pulsé proche infrarouge sur les spores de B. subtilis .....</b>	<b>130</b>
<b>Article : Effects of pulsed near infrared light (NIR) on Bacillus subtilis spores .....</b>	<b>131-150</b>
<b>III.2. Résultats complémentaires - Rôle du manteau et du CaDPA dans l'inactivation des spores par un laser NIR pulsé .....</b>	<b>151</b>
<b>III.2.1. <u>Introduction</u> .....</b>	<b>151</b>
<b>III.2.2. <u>Matériels et méthodes</u> .....</b>	<b>151</b>
<b>III.2.2.1. Souches utilisées .....</b>	<b>151</b>
<b>III.2.2.2. Production des spores .....</b>	<b>152</b>
<b>III.2.2.3. Microscopie .....</b>	<b>152</b>
<b>III.2.2.4. Exposition au laser NIR pulsé et suivi de germination sous microscope .....</b>	<b>152</b>
<b>III.2.2.5. Mesure de l'autofluorescence des spores .....</b>	<b>153</b>
<b>III.2.2.6. Enrichissement des spores de la souche FBI22 en DPAP ....</b>	<b>153</b>
<b>III.2.2.7. Mesure de viabilité par UFC .....</b>	<b>153</b>
<b>III.2.3. <u>Résultats et discussion</u> .....</b>	<b>153</b>
<b>III.2.3.1. Effet de l'illumination NIR pulsée sur la fluorescence endogène des spores .....</b>	<b>153</b>
<b>III.2.3.2. Nature de l'absorption multiphotonique des composés fluorescents endogènes de la spore .....</b>	<b>155</b>

III.2.3.3. Effets des photoproduits du DPA sur la résistance à une irradiation NIR pulsée .....	158
---	-----

III.2.4 Conclusion sur les effets d'une irradiation laser NIR pulsée sur les spores de <i>B. subtilis</i> .....	160
---	-----

## **Chapitre 4 : Mise au point d'un marquage pour l'imagerie super résolue (STORM/PALM) des structures de la spore bactérienne de *B. subtilis* .....161**

<b>IV.1. Introduction .....</b>	<b>162</b>
---------------------------------	------------

<b>IV.2. Marquage pour l'imagerie STORM .....</b>	<b>163</b>
---	------------

IV.2.1. <u>Matériel et méthode/Mise au point</u> .....	163
--	-----

IV.2.1.1. <i>Souches utilisées et conditions de culture</i> .....	163
---	-----

IV.2.1.2. <i>Sondes externes et mise au point du tampon utilisé</i> .....	164
---	-----

IV.2.1.3. <i>Mise au point du protocole d'immobilisation</i> .....	164
--	-----

IV.2.1.4. <i>Mise au point du protocole de marquage</i> .....	165
---	-----

IV.2.1.5. <i>Imagerie super résolue</i> .....	166
---	-----

IV.2.2. <u>Résultats &amp; discussion</u> .....	166
---	-----

<b>IV.3. Marquage pour la microscopie PALM .....</b>	<b>167</b>
--	------------

IV.3.1. <u>Matériel et méthodes</u> .....	167
---	-----

IV.3.1.1. <i>Souches utilisées</i> .....	167
--	-----

IV.3.1.2. <i>Amorces et vecteurs utilisés</i> .....	168
---	-----

IV.3.1.3. <i>Construction des vecteurs portant les fusions <i>SleB-mEos2</i> et <i>GerPa-mEos2</i></i> .....	169
--	-----

IV.3.1.4. <i>Construction des souches recombinantes de <i>E. coli</i> et <i>B. subtilis</i></i> .....	169
---	-----

IV.3.1.5. <i>Imagerie super résolue</i> .....	170
---	-----

IV.3.2 <u>Résultats &amp; discussion</u> .....	170
--	-----

IV.3.2.1. <i>Observations des structures de la spore</i> .....	170
<b>IV.4. Conclusion</b> .....	<b>173</b>
<b>Conclusion générale et perspectives</b> .....	<b>175</b>
<b>V.1. Résumé des apports du projet</b> .....	<b>176</b>
V.1.1. <u>Première partie : Photochimie du CaDPA/DPA</u> .....	176
V.1.2. <u>Deuxième partie : Observation en microscopie photonique de la spore soumise à un stress lumineux</u> .....	178
<b>V.2. Questions annexes et perspectives d'études</b> .....	<b>179</b>
<b>Références bibliographiques**</b> .....	<b>183</b>

\* Les « Etudes » désignent les résultats ayant fait l'objet d'une publication ou en cours de publication

\*\* Les références bibliographiques des études sont référencés à la fin de l'étude en question

# **Introduction**



## Introduction

On estime que l'apparition du vivant date d'environ 3,8 milliards d'années, soit quelques millions d'années seulement après la formation de la Terre, elle-même datée à 4,5 milliards d'années (Rosing, 1999; Ohtomo *et al.*, 2014). Une récente étude soutient même l'hypothèse que la vie aurait pu apparaître moins de 3 millions d'années après la formation de la Terre aux alentours de 4,28 milliards d'années (Dodd *et al.*, 2017). Les stromatolithes âgés d'au moins 3,4 milliards d'années sont connus pour être parmi les premiers témoins fossiles du vivant. Ces structures laminaires ont été formées à l'époque par des cyanobactéries (Schopf *et al.*, 2007; Bosak, Knoll and Petroff, 2013). Le règne des bactéries dure donc depuis plus de 3,4 milliards d'années, ce qui est proche des débuts de l'émergence du vivant sur la Terre. Pour se maintenir aussi longtemps, ces micro-organismes disposent de nombreuses stratégies d'adaptation à l'environnement, sélectionnées au cours de l'évolution. Une stratégie de survie répandue chez ces organismes procaryotes est le processus de sporulation, qui semble être apparu très tôt dans l'Histoire de l'évolution, à une époque assez proche de l'origine du vivant (Tocheva, Ortega and Jensen, 2016). Ce processus consiste à entrer en dormance en encapsulant le matériel génétique dans des structures spécialisées. Sous cette forme, l'organisme peut résister à des conditions environnementales très difficiles. La bactérie sporulée peut ensuite redevenir active, lorsque les conditions sont plus favorables, *via* le processus de germination. Elle colonise alors l'environnement par la multiplication de la cellule végétative nouvellement formée. Les spores bactériennes peuvent rester ainsi en dormance dans l'environnement plusieurs décennies, voire plusieurs siècles. Plusieurs études ont rapporté des cas de germination de spores restées des milliers d'années dans leur environnement en état de dormance (Christner *et al.*, 2003; Miteva and Brenchley, 2005). On distingue principalement deux types de spores bactériennes : les exospores et les endospores, formées par des bactéries Gram positives du phylum des Actinobacteria (anciennement désignées comme Actinomycètes) et du phylum des Firmicutes. Les bactéries firmicutes formant des endospores appartiennent essentiellement à la classe des Bacilli et des Clostridia. Ces spores bactériennes sont connues pour être plus résistantes que de simples cellules végétatives et leurs structures sont assez similaires. La principale différence entre exospore et endospore vient du mode de sporulation. Celle-ci se produit par division à l'extérieur de cellule mère pour les exospores, pouvant produire plusieurs spores. Pour les endospores au contraire, la sporulation se passe au sein de la cellule mère qui ne peut produire qu'une seule spore. Les endospores bactériennes sont plus résistantes face à des stress physiques comme l'exposition au rayonnement ultraviolet (UV) (Beskrovnaya *et al.*, 2021). Dans le cadre de cette étude nous nous intéresserons uniquement aux endospores bactériennes et le mot « spore » sera employé pour les désigner.

## Introduction

Les spores sont connues pour faire partie des formes de vie les plus résistantes face à des stress extrêmes. En effet, on sait par exemple que les spores bactériennes sont capables de résister à des chocs de pressions de l'ordre de plusieurs dizaines de GPa (Horneck *et al.*, 2001, 2008; Burchell, Mann and Bunch, 2004), à des températures de plus de 100°C pendant plusieurs heures (Kempf, Schubert and Beaudet, 2008; Schubert and Beaudet, 2011), au vide spatial (Horneck, 1993; Horneck, Bücker and Reitz, 1994) ou encore aux rayonnements électromagnétiques comme l'UV et les rayons gamma (Nicholson *et al.*, 2002; Setlow, 2006; Panitz *et al.*, 2015). Elles sont en outre capables de germer même après de longues périodes de dormance (Vreeland, Rosenzweig and Powers, 2000; Christner *et al.*, 2003; Miteva and Brenchley, 2005). Cette grande résistance leur vient de leur structure unique dans le monde vivant. C'est cette résistance hors du commun qui en fait un problème dans certains domaines d'activités principalement l'industrie agroalimentaire et le milieu médical. En effet, certaines bactéries sporulantes sont pathogènes et peuvent véhiculer des maladies potentiellement mortelles pour l'Homme comme le botulisme (causé par *Clostridium botulinum*), le tétanos (causé par *Clostridium tetani*) ou encore des intoxications alimentaires (comme *Bacillus cereus*). Les spores de bactéries responsables de maladies peuvent être retrouvées dans des aliments contaminés. Les spores sont très résistantes aux procédés de décontamination et les barèmes nécessaires pour les détruire sont parfois incompatibles avec la préservation des propriétés organoleptiques de certains aliments. Le domaine du médical est également confronté au même problème ; c'est pour cela que les instruments et les plans de travail utilisés lors d'opérations doivent être correctement préparés en amont pour détruire d'éventuelles spores bactérienne présentes en surface. Enfin, un autre exemple de domaine concerné par la problématique de décontamination des spores est celui de l'aérospatiale. Les rovers et autres atterrisseurs envoyés sur d'autres corps célestes peuvent être une source de contamination environnementale de ces nouveaux mondes par des spores. Cette forme de dormance peut en effet largement résister à un nettoyage de surface avec des produits biocides. Ces spores pourraient éventuellement résister aux conditions extrêmes dans l'espace et peuvent être également source d'une contamination des échantillons à analyser une fois sur place. Dans un contexte de recherche de traces de vie et de molécules organiques sur d'autres planètes il faut absolument s'assurer que des micro-organismes terrestres ne fassent pas partie du voyage. Cela soulève également des questions sur la responsabilité de l'Homme si une planète venait à être contaminée par des organismes terrestres.

## Introduction

C'est en partie grâce à la structure multicouche de la spore et surtout à certaines molécules au sein du protoplaste, tel que l'acide dipicolinique (DPA), que les spores sont 10 à 50 fois plus résistantes aux UVc que leurs cellules végétatives (Nicholson *et al.*, 2000). Dans les spores, le DPA est majoritairement chélaté avec des ions calcium  $\text{Ca}^{2+}$ , à hauteur d'un ratio 1 :1. On estime sa concentration aux alentours de 1 M, bien au-delà de sa limite de solubilité (Huang *et al.*, 2007). Cette molécule joue un rôle dans divers mécanismes de résistance de la spore, notamment face à l'exposition des spores aux UV. Le CaDPA est connu pour jouer à la fois un rôle photoprotecteur et photosensibilisateur selon les conditions d'hydratation de la spore lors de son exposition aux UVc. Ce double rôle du CaDPA est encore mal compris aujourd'hui. Lorsqu'elle est exposée aux UV cette molécule va également former des photoproduits (CaDPAp ou DPAP en fonction de la forme irradiée) qui semblent en partie jouer un rôle dans la survie des spores face aux UVc. Seuls deux de ces photoproduits ont été récemment formellement identifiés et il y a un réel manque de connaissances sur leur diversité ainsi que leur impact sur la survie des spores face aux UV (Nardi *et al.*, 2021). Certaines espèces de bactéries sporulantes, comme *Bacillus atrophaeus*, produisent des spores dont le manteau peut contenir des pigments tels que des caroténoïdes, améliorant leur résistance face à certains domaines de la lumière comme l'UVa. Lors d'une exposition aux UVc, il semble que le manteau puisse être affecté, ce qui a pour conséquence de réduire les propriétés hydrophobiques des spores (Elegbeleye *et al.*, 2021). Peu d'études recensent des altérations de la structure des spores à la suite d'une exposition aux UV, notamment à cause de la très petite taille (1  $\mu\text{m}$ ) de cette forme bactérienne, proche de la limite de résolution en microscopie photonique (250 nm), ainsi que de son imperméabilité aux sondes fluorescentes exogènes.

C'est dans ce contexte que s'inscrivent les travaux présentés dans ce manuscrit. L'objectif de cette thèse est d'apporter de nouvelles connaissances sur le phénomène de résistance des spores bactériennes face aux UV, plus particulièrement face à l'UVc. Cela pourrait permettre, par exemple, d'améliorer certains procédés d'inactivation utilisés notamment en agroalimentaire pour stériliser des surfaces ou des liquides. Pour ces travaux, deux parties ont été menées en parallèle. D'une part il a été décidé d'analyser l'impact du CaDPA et de ses photoproduits sur la résistance aux UVc des spores. La seconde partie avait pour objectif de mettre au point un protocole d'inactivation directement sous microscope, pour observer en temps réel et dans des conditions *in vivo* l'impact d'un rayonnement sur les spores. Dans ce but, un laser pulsé infrarouge entraînant une absorption multiphoton a été utilisé. Cette absorption est supposée provoquer des effets similaires aux UV mais qui n'ont jusqu'à présent jamais été

caractérisés sur les spores. Pour compléter ces travaux, une étude consistant à mettre au point pour la première fois un marquage de différentes structures de la spore compatible avec les techniques de super résolution STORM et PALM a été amorcée. Ces marquages de différentes structures des spores pour la microscopie super-résolue n'ont à notre connaissance jamais été réalisés et pourraient permettre de visualiser les effets d'une exposition aux stress physiques tels que les UV. De plus, d'autres procédés de destruction utilisés au laboratoire comme les hautes pressions ou les stress thermiques pourraient bénéficier de ce travail. L'organisme choisi pour cette étude est la bactérie sporulante Gram positive *Bacillus subtilis*, appartenant au phylum des Firmicutes. Cette bactérie est non pathogène et est couramment utilisée comme organisme modèle dans différents domaines. Sa mise en culture et son processus de sporulation sont bien connus et son génome a été entièrement séquencé ce qui en fait un choix de premier ordre pour la fabrication de nouveaux mutants compatibles avec la technique de super résolution PALM. *B. subtilis* a également fait l'objet de nombreuses études concernant sa résistance aux UV.

Ce mémoire est composé de quatre chapitres séparés en deux parties. La première partie composée des chapitres 1 et 2 est centrée sur l'influence du CaDPA et de ses photoproduits dans la résistance aux UVc des spores. La seconde partie constituée des chapitres 3 et 4 se concentre sur l'observation en microscopie photonique, en conditions *in vivo*, des dégâts engendrés par un stress lumineux.

Une étude bibliographique présente dans un premier temps un état de l'art concernant les connaissances sur les structures des spores bactériennes ainsi que sur la résistance de ces dernières à une exposition à différents types de lumière, de l'UV à l'infrarouge en passant par le visible. Cet état de l'art se finira par un point sur les techniques de spectroscopie Raman, Infrarouge et O-PTIR qui sont utilisées dans le chapitre 2 ainsi que sur la microscopie super-résolue, indispensable pour observer en détail les structures de la spore *in vivo* en microscopie photonique.

Le premier chapitre se focalise sur la photochimie du DPA lors d'une exposition aux UVc, et en particulier l'identification des photoproduits générés. Ce chapitre est composé de deux parties. La première partie porte sur l'identification des photoproduits du DPA générés *in vitro* et de la mise en place d'un protocole de suivi de la formation des DPAP *in vivo*. La seconde partie présentée sous forme d'un article porte sur l'effet de certains de ces photoproduits sur la physiologie de la spore, ainsi que sur sa résistance aux UVc.

## Introduction

Le deuxième chapitre est dédié à l'impact de l'hydratation sur la photochimie du CaDPA *in vitro* exposé à un rayonnement UVb ou UVc. Une publication précédée d'un contexte d'étude présente là aussi les résultats obtenus. Des résultats complémentaires concernant la caractérisation spectrale des spores de *B. subtilis* avec l'O-PTIR, une technique de microspectroscopie infrarouge récente, sont présentés à la suite de l'article.

Le troisième chapitre fait le point sur l'impact de la lumière pulsée infrarouge sur l'inactivation des spores, à travers la présentation d'un article suivi de résultats complémentaires. Cette inactivation est comparée à celle obtenue par l'exposition aux UV. Cette comparaison est nécessaire pour savoir si la lumière pulsée infrarouge pourrait servir à provoquer des effets similaires aux UV sur les spores.

Le quatrième chapitre est consacré à la mise au point de marquages des structures des spores compatibles avec les techniques de super-résolution STORM et PALM. Une première partie présente les tentatives de mise au point d'un marquage par l'utilisation de sondes exogènes pour l'observation des structures des spores en STORM. La seconde partie est consacrée à la création de mutants fluorescents compatibles avec la techniques PALM.

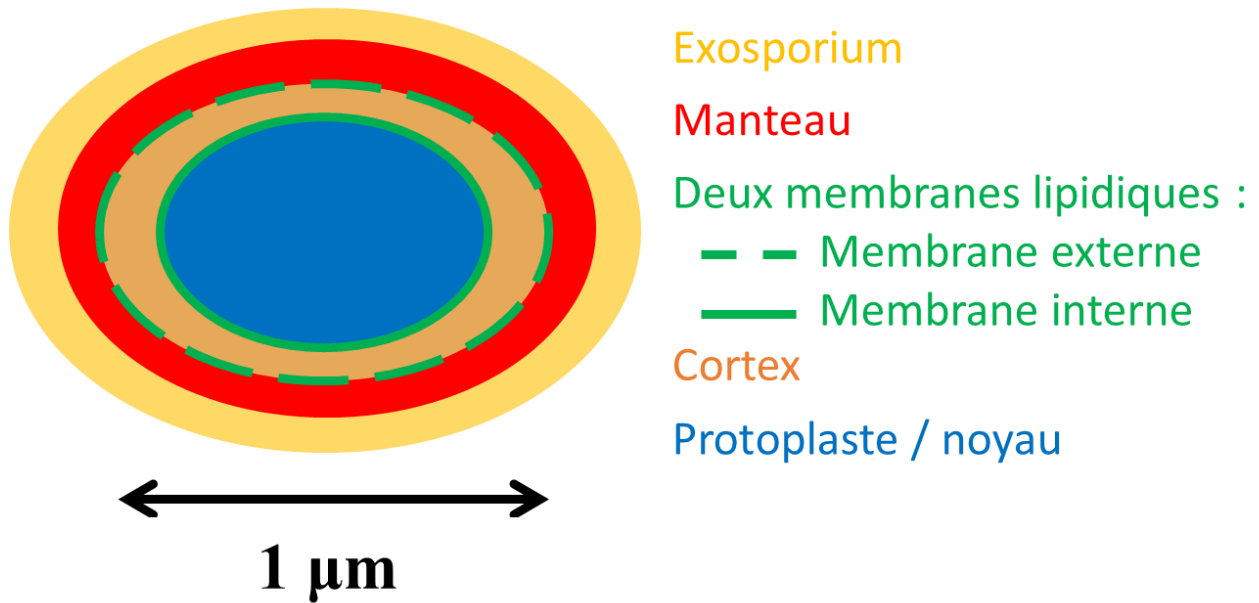
Ce manuscrit se termine par une conclusion générale évoquant les questions et perspectives que soulèvent les résultats obtenus vis-à-vis de la compréhension des mécanismes de résistance des spores à des rayonnements UV.

# **Etat de l'art**

## **Synthèse bibliographique sur les spores et leur résistance à la lumière**

### 1. Généralités sur la spore

On retrouve des spores bactériennes dans beaucoup d'environnements différents, des profondeurs océaniques, aux déserts en passant par le sol et l'air (Benardini *et al.*, 2003; Griffin, 2004; Earl, Losick and Kolter, 2008; Paulino-Lima *et al.*, 2013; Müller *et al.*, 2014). On retrouve même des spores viables dans des glaces vieilles de plusieurs milliers d'années ou encore dans de l'ambre datant de plusieurs millions d'années (Cano and Borucki, 1995; Christner *et al.*, 2003; Miteva and Brenchley, 2005). Ces micro-organismes ont en commun d'être capables de produire des spores, une forme leur permettant de résister à de nombreuses contraintes. Certaines de ces bactéries sont pathogènes pour l'humain, et la mise en place de procédés de destruction est un enjeu majeur dans divers domaines comme la médecine, l'industrie spatiale et l'agroalimentaire. Mieux comprendre la physiologie et la résistance de ces spores peut également permettre de cerner les limites de la vie ainsi que d'avoir une meilleure idée de la potentialité du développement d'une vie ailleurs que sur Terre. La spore bactérienne peut aussi être envisagée comme vecteur d'une diffusion de la vie dans l'Univers, que cela soit intentionnel, via d'éventuels futurs programmes de dissémination de la vie, ou involontaire, par la contamination de véhicules spatiaux autonomes et autres sondes envoyés sur d'autres corps du système solaire (Meot-Ner and Matloff, 1979; Link *et al.*, 2004; Zammuto *et al.*, 2018), ou encore passif, avec notamment la théorie de la lithopanspermie (Horneck, 2001; Fajardo-Cavazos *et al.*, 2005, 2009; Horneck *et al.*, 2008; Panitz *et al.*, 2015). En effet, comme cela a été dit en introduction, la spore bactérienne est une des formes du vivant les plus résistantes face aux conditions environnementales extrêmes, comme par exemple celles trouvées dans l'espace. Cette grande résistance leur vient notamment d'une structure en feuillet multicouches mise en place pendant le processus de sporulation (Fig.1).



**Figure 1** : Représentation schématique des différentes couches composant une spore bactérienne.

### 1.1. Structure de la spore

#### 1.1.1. *Le protoplaste*

La structure la plus interne de la spore est appelée le protoplaste, ou noyau, et contient l'ADN, des ribosomes, des enzymes et des molécules spécifiques qui jouent un rôle important dans ses propriétés de résistance. Le protoplaste possède certaines propriétés biochimiques particulières. Premièrement, le pH du protoplaste des spores est plus acide que celui du cytoplasme des cellules végétatives, environ 6,5 contre 7,5-8 pour les cellules végétatives (Setlow and Setlow, 1980; Magill *et al.*, 1994). La seconde propriété importante du protoplaste est qu'il est faiblement hydraté, 27 à 50% du poids humide selon l'espèce et les conditions de sporulation, contre 75 à 80% pour une cellule végétative (Lindsay, Beaman and Gerhardt, 1985; Nakashio and Gerhardt, 1985). Cet état déshydraté est en partie dû à la présence d'une molécule spécifique des spores, appelée acide pyridine-2,6-dicarboxylique ou acide dipicolinique (DPA). Le protoplaste contient également un autre groupe de molécules importantes et spécifiques des spores, appelées les " Small Acid Soluble Proteins " (SASP), représentant 5 à 10% des protéines totales des spores des genres *Bacillus* et *Clostridium*. Les types  $\alpha$  et  $\beta$  sont les plus abondants. Ces protéines spécifiques des spores saturent l'ADN, lui conférant une structure en anneau comprimé (Ragkousi *et al.*, 2000). Les SASP sont des facteurs majeurs de la stabilité et de la résistance des spores à la chaleur, aux rayons UV ou aux produits chimiques (Nicholson, Setlow and Setlow, 1991; Setlow, 2007).



### 1.1.2. *La membrane interne*

La membrane interne de la spore est la future membrane de la cellule végétative. Même s'il y a généralement plus de cardiolipides dans cette membrane, sa composition phospholipidique est proche de celle de la membrane d'une cellule végétative (Griffiths and Setlow, 2009). Sa composition protéique est en revanche très différente en raison de la présence de protéines spécifiques des spores, principalement des transporteurs et des récepteurs de germination (Paidhungat and Setlow, 2001). Une autre différence importante est son état physique très compact et donc beaucoup moins fluide que la membrane de la cellule végétative. C'est d'ailleurs en raison de cet état que la membrane interne de la spore constitue une importante barrière de perméabilité à la plupart des molécules (l'eau traverse cette membrane mais beaucoup plus lentement que pour une membrane de cellule végétative) et en particulier aux molécules biocides comme des antibiotiques (Cowan *et al.*, 2004; Loison *et al.*, 2013).

### 1.1.3. *Le cortex*

Le cortex est une couche d'environ 150 nm composée de peptidoglycanes (PG) comme ceux présents dans la paroi cellulaire des cellules végétatives des bactéries, mais avec une structure spécifique. Le PG des cellules végétatives de *Bacillus subtilis* est un polymère composé d'une alternance de N-acétylglucosamine (NAG) et d'acide N-acétylmuramique (NAM) qui forme des chaînes de glycanes. Deux différences majeures sont présentes dans le PG du cortex des spores. Premièrement, environ 50 % des NAM sont cyclisés en acide muramique (MAL). La deuxième différence est que seulement 3% des résidus NAM dans le PG du cortex portent une chaîne latérale peptidique, soit onze fois moins que dans le PG d'une cellule végétative (Atrih *et al.*, 1996). Cela diminue la réticulation du PG du cortex par rapport au PG de la paroi cellulaire végétative (Popham, 2002). Cette composition spécifique et la réticulation plus faible qui en découle pourraient être un mécanisme impliqué dans le maintien de l'état déshydraté du protoplaste de la spore, le cortex permettant de résister à la pression osmotique résultant de la déshydratation. Certaines enzymes inactivées sont présentes dans le cortex, comme les enzymes SleB et CwIJ qui permettent l'hydrolyse du cortex pendant la germination. Après le processus de germination, une partie du cortex située au-dessus de la membrane interne et ne possédant pas de MAL ne sera pas dégradée et deviendra la paroi de la future cellule végétative.

### 1.1.4. *La membrane externe*

La seconde membrane lipidique de la spore est appelée membrane externe. Cette membrane résiduelle de la cellule mère est supposée ne plus être intègre (Setlow, 2006). Il semble toutefois que cette membrane puisse être impliquée dans la résistance de la spore face à certains agents chimiques tels que des enzymes pouvant lyser le cortex de la spore ou de plus petites molécules comme le glutaraldéhyde (Nicholson *et al.*, 2000). Néanmoins, cette structure est essentielle pour la formation du manteau de la spore au cours du processus de sporulation, qui est détaillé plus loin dans ce manuscrit (Piggot and Hilbert, 2004).

### 1.1.5. *Le manteau*

Cette couche épaisse (d'environ 77 nm) et dense comprend 30 à 80 protéines spécifiques. On peut distinguer deux parties, la couche externe et la couche interne (Leggett *et al.*, 2012). La couche externe est d'une épaisseur de 40 à 90 nm contre 20 à 30 nm pour la couche interne (Henriques and Moran, 2007). Le manteau est impliqué dans la résistance chimique des spores contre les composés pouvant dégrader le cortex, comme le lysozyme, et sert de protection mécanique contre la prédation par les protozoaires que l'on retrouve dans le sol (Klobutcher, Ragkousi and Setlow, 2006). Cette structure, plus précisément la couche interne, semble être impliquée dans la résistance à une exposition aux UV (Riesenman and Nicholson, 2000).

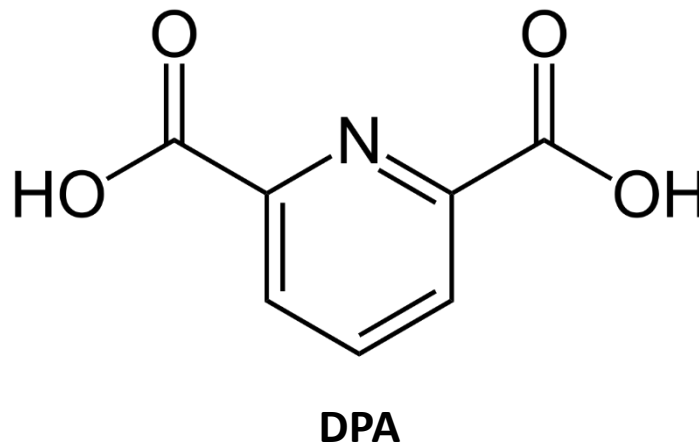
### 1.1.6. *L'exosporium*

L'exosporium est principalement constitué de protéines ainsi que de polysaccharides et de lipides. Cette structure n'est pas présente chez toutes les espèces, elle est par exemple absente de l'espèce *B. subtilis*. Cette couche externe semble être impliquée dans la fixation des spores aux surfaces en raison de ses propriétés hydrophobes. Elle pourrait également jouer un rôle dans la protection des spores face à certains agents chimiques ou enzymatiques (Takumi, Kinouchi and Kawata, 1979; Kozuka and Tochikubo, 1985).

## 1.2. Le DPA

Le DPA est un composant abondant représentant 30 à 50% du poids sec du protoplaste ou encore 5 à 15% du poids sec de la spore (Huang *et al.*, 2007). Cette molécule est synthétisée par la cellule mère lors du processus de sporulation et est accumulée par la préspore au sein de la spore en formation. Sa concentration est estimée à environ 800 mM dans le protoplaste. Cependant cette concentration peut varier en fonction des espèces et des conditions de culture

(Huang *et al.*, 2007). Le DPA est synthétisé grâce à une enzyme appelé DPA synthétase encodée dans l'opéron *spoVF*. Il a été observé que les spores de mutants dépourvues de DPA ont une densité plus faible et que leur protoplaste est plus hydraté (Paidhungat *et al.*, 2000). Cette molécule se compose d'une pyridine associée à deux groupes carboxyles -COOH (Fig. 2). A cette molécule acide sont associés trois pKa 0,49, 2,2 et 4,6 respectivement pour le noyau pyridine et pour les groupes carboxyles. Dans le protoplaste de la spore, le pH étant d'environ 6,5, le DPA se trouve sous forme déprotonée (DPA<sup>2-</sup>). De ce fait, le DPA peut se lier à des ions tels que le calcium ou le magnésium. Il a été montré que la grande majorité du DPA est chélatée avec des ions Ca<sup>2+</sup>. Cette forme chélatée à l'ion calcium est ainsi appelée dipicolinate de calcium (CaDPA).

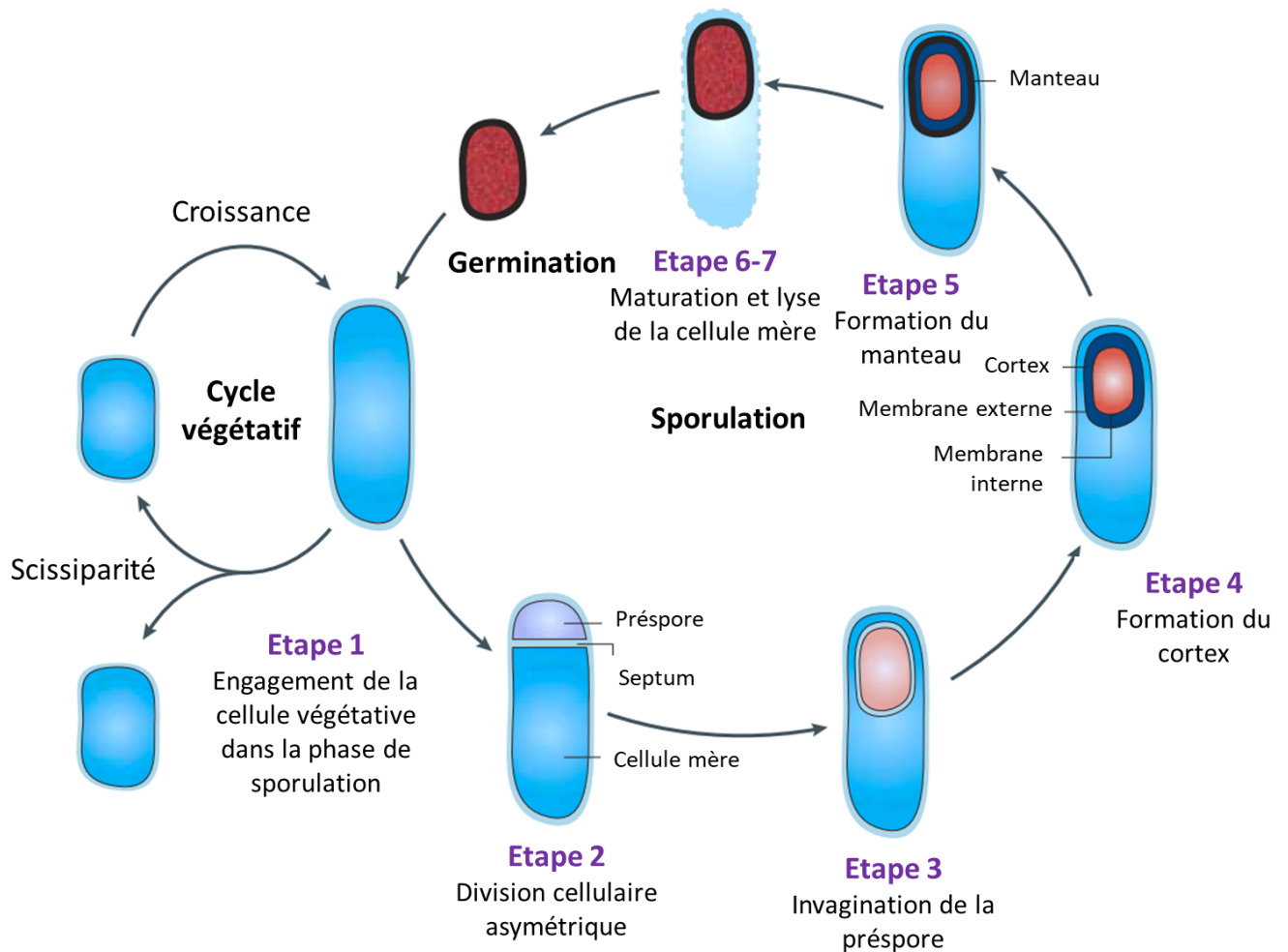


**Figure 2** : Structure chimique de la molécule d'acide dipicolinique (DPA).

### 1.3. Processus de sporulation

La sporulation est le mécanisme menant une cellule végétative à former une endospore. Dans le sol, qui est considéré comme étant l'environnement naturel d'une grande partie des bactéries sporulantes, l'accès aux nutriments peut être sujet à des variations au cours du temps. C'est par exemple le cas lorsque la pluie lessive le sol et engendre un appauvrissement en éléments nutritifs plus ou moins localisé (Gauvry *et al.*, 2017). La sporulation va avoir lieu pour faire face à ces changements environnementaux. Grâce à ce mécanisme la cellule va pouvoir mettre son métabolisme en veille, le temps que les conditions soient plus favorables à sa croissance. L'entrée d'une cellule végétative dans la phase de sporulation répond généralement à un stress nutritif, surtout chez les bactéries du genre *Bacillus*. Les bactéries du genre *Clostridium* peuvent avoir d'autres mécanismes entrant en jeu pour induire la sporulation. Il ne sera décrit ici que le mécanisme général de sporulation de *B. subtilis* lors d'un stress nutritif.

La durée du processus de ce sporulation pour cette espèce est estimée être approximativement de 8h à 10h dans des conditions de sporulation de laboratoire à 37°C. Il est généralement découpé en sept étapes (Fig. 3) (Errington, 2003; Higgins and Dworkin, 2012; Gauvry *et al.*, 2017).



**Figure 3 :** Schéma des sept étapes du processus de sporulation et du cycle végétatif. Modifié et traduit de Errington, 2003.

### Etape 1

La première étape est considérée comme étant l'engagement de la cellule végétative dans le processus de sporulation. Deux facteurs principaux régissent l'induction de la sporulation. Le premier est le manque d'éléments nutritifs dans l'environnement de la cellule. Le second est la densité cellulaire autour de la cellule. Ces deux facteurs vont jouer sur l'activation d'un facteur de transcription appelé Spo0A via sa phosphorylation par des enzymes kinases intramembranaires. Il existe plusieurs kinases différentes sur la membrane lipidique de la cellule mère, chacune répondant probablement à des stimuli différents. Cette toute première

étape reste cependant encore en partie non élucidée. C'est le degré de phosphorylation de Spo0A par les kinases qui décidera si la cellule entre dans le processus de sporulation ou dans d'autres stratégies de survie annexes, comme la formation de biofilms ou le cannibalisme (Errington, 2003; López *et al.*, 2009; Gauvry *et al.*, 2017). La sporulation est en effet un ultime recours de la cellule pour faire face aux conditions défavorables et assurer la pérennité de ses gènes. C'est un processus très coûteux en énergie qui se déroule dans un environnement où le manque d'éléments nutritifs commence à poindre. Il faut donc que la cellule puisse aller au bout de ce processus, car une fois celui-ci enclenché, il n'y a plus d'autre alternative de division cellulaire... Un autre facteur de transcription appelé  $\sigma^H$  est également impliqué dans l'entrée en sporulation. Ce facteur sigma semble lié à Spo0A et est nécessaire pour initier la division asymétrique de l'étape 2 de la sporulation.

### Etape 2

C'est lors de cette étape que la sporulation à proprement parler débute. L'étape 2 se caractérise par une division asymétrique. A la suite de cette division la cellule est composée de deux compartiments séparés par un septum. Ce septum est propre à la sporulation car bien que similaire à un septum de division cellulaire classique, il contient une fine couche de peptidoglycane séparant les deux compartiments (Higgins and Dworkin, 2012). Le plus grand des compartiments est appelé « cellule mère » et le plus petit « préspore ».

### Etape 3

Les deux compartiments vont alors se différencier par l'intervention de différents facteurs de transcription,  $\sigma^E$  dans la cellule mère et  $\sigma^F$  dans la préspore. C'est grâce à ce facteur de transcription  $\sigma^F$  que la préspore va synthétiser certaines molécules essentielles à la future spore comme par exemple les récepteurs de germination (GR) (Piggot and Hilbert, 2004; Leggett *et al.*, 2012). Dans cette étape 3, le septum va également s'incurver pour finir par entourer complètement la préspore. La préspore ainsi invaginée par la cellule mère par un processus proche d'une phagocytose va être entourée de deux membranes : la membrane interne, issue de la division asymétrique, et la membrane externe, issue de cette pseudo-phagocytose. A ce stade le processus de sporulation devient irréversible pour la cellule (Higgins and Dworkin, 2012; Mckenney, Driks and Eichenberger, 2013).

### Etape 4

L'étape 4 se caractérise par la synthèse du cortex entre les deux membranes de la préspore. Deux couches de peptidoglycanes différentes vont être mises en place, une couche épaisse correspondant au cortex et une couche distincte au-dessus de la membrane interne qui deviendra la paroi de la future cellule végétative. Les peptidoglycanes sont synthétisés par la cellule mère et transportés à travers la membrane externe de la préspore. C'est aussi à cette étape que le pH de la spore commence à diminuer d'une unité, qu'un début de déshydratation de la préspore est observé, que l'ADN de la préspore se condense et que les enzymes de lyse du cortex (CLE) sont synthétisées (Setlow *et al.*, 1991; Vasudevan *et al.*, 2007; McKenney and Eichenberger, 2012).

### Etape 5-6

C'est lors de ces étapes que la synthèse du manteau protéique de la spore, qui avait commencé dès l'invagination de la préspore à l'étape 3, se termine. Cette synthèse d'environ 70 protéines a été effectuée dans le compartiment de la cellule mère. C'est dans ces dernières étapes de fin de sporulation que le DPA est synthétisé dans le compartiment de la cellule mère. Cette molécule est accumulée dans la préspore par un système de transport actif composé de deux transporteurs intra-membranaires, SpoVV et SpoVA, localisés respectivement dans la membrane externe et la membrane interne (Li *et al.*, 2012; Ramírez-Guadiana *et al.*, 2017). C'est dans la préspore alors déshydratée que le DPA va se complexer avec les ions calcium pour former du CaDPA. La concentration de CaDPA au sein de la préspore est telle (800 mM) qu'elle excède largement son seuil de solubilité (environ 30 mM dans l'eau). Le CaDPA n'est cependant pas présent sous forme de cristaux mais doit plutôt se trouver dans une phase amorphe (Huang *et al.*, 2007).

### Etape 7

Cette dernière étape, appelée aussi « maturation », n'implique pas de changement apparent prononcé. Le manteau devient cependant plus dense et c'est à ce moment que les propriétés de résistance des spores s'amplifient. S'en suit l'ultime étape de la sporulation : la libération de la spore dans l'environnement, par la lyse de la cellule mère (Errington, 1993, 2003; Leggett *et al.*, 2012). La spore ainsi libérée est considérée comme métaboliquement inactive. Il est important de noter que la maturation de la spore n'est alors pas entièrement terminée. Certaines propriétés de résistance vont s'accroître au cours des heures/jours suivant sa libération, comme la résistance à la chaleur ou à l'exposition aux UV. A l'inverse, certaines

propriétés de résistance des spores peuvent diminuer au bout d'un certain temps. C'est pour ces raisons que pour réaliser des expérimentations reproductibles en laboratoire testant la résistance des spores à certains stress, on considère uniquement des spores âgées de plus d'une semaine mais de moins d'un mois (Sanchez-Salas *et al.*, 2011).

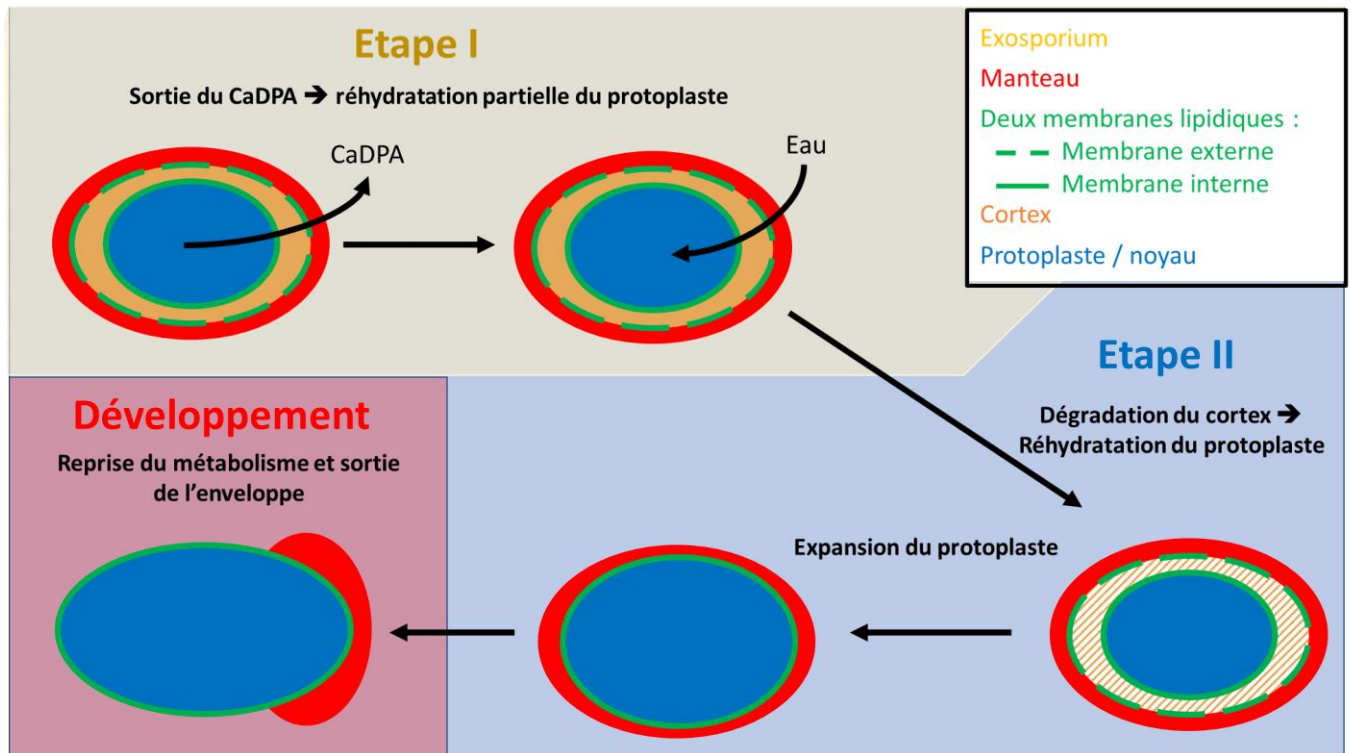
La bactérie ainsi sporulée achèvera sa phase de dormance par le processus de germination, qui entrera en œuvre lorsque les conditions seront de nouveau favorables à la croissance végétative.

### 1.4. Processus de germination

Dans son environnement naturel, la germination d'une spore a lieu lorsque de l'eau et quelques nutriments sont présent autour de la spore, ces conditions traduisant que les conditions environnementales permettent potentiellement le développement du cycle végétatif de l'organisme. De nombreux stimuli différents peuvent induire la germination tels que la présence de nucléosides, de sucres ou encore d'acides aminés. Cette sortie de l'état de dormance peut également être induite par des éléments non métabolisables, appelés parfois inducteurs de germination, comme des surfactants cationiques, des ions et également le DPA. Certains traitements physiques utilisés dans des processus de décontamination peuvent également forcer mécaniquement la germination des spores, comme l'utilisation de hautes pressions par exemple (Setlow, 2014; Fekraoui *et al.*, 2021). Certains germinants comme le DPA sont universels dans le sens où le DPA est connu pour activer le processus de germination des spores peu importe l'espèce. Au contraire, l'activation de la germination par des éléments nutritifs est espèce-dépendante. On estime cependant que dans l'environnement naturel, les éléments métabolisables jouent un rôle prédominant par rapport à d'autres germinants non métabolisables, comme le DPA (Setlow, 2014).

Le processus de germination induit par des éléments nutritifs commence par la reconnaissance des nutriments par des récepteurs de germination (GRs) situés sur la membrane interne des spores. Il a récemment été montré que ces GRs ne sont pas répartis sur toute la membrane interne mais sont groupés au sein d'ensembles appelés « germinosomes » (Griffiths *et al.*, 2011; Wen *et al.*, 2019). Pour *B. subtilis*, ces GRs sont composés de trois sous unités appelées GerA, GerB et GerK. La sous-unité GerA est activée par la L-alanine tandis que GerB et GerK sont activés par la L-asparagine, le D-glucose, le D-fructose ou encore le potassium. Lorsque les GRs sont activés, une période de transition variant de quelques minutes à 24h est observée avant la première étape de germination. Ce qui se passe durant cette période n'est

cependant par encore bien compris (Setlow, 2014). Après l'activation de GRs, on segmente généralement le processus de germination en deux étapes (Fig. 4).



**Figure 4** : Représentation des différentes étapes de germination de la spore

Au cours de la première étape de germination, une sortie de cations  $H^+$ ,  $Na^+$  et  $K^+$ , suivie peu de temps après d'une ouverture des canaux SpoVA, situés sur la membrane interne, entraîne la sortie du CaDPA. Ces mouvements de molécules à travers la membrane interne ont deux conséquences. La première est une réhydratation partielle du protoplaste de la spore. La seconde est une activation des enzymes de lyse du cortex - Cortex Lytic Enzymes (CLE). Les deux CLE majoritaires sont les enzymes CwIJ et SleB. CwIJ est localisée dans le manteau et est activée par la sortie de CaDPA. SleB quant à elle encadre le cortex en étant localisée dans la membrane interne et dans le manteau de la spore. L'activation de cette enzyme n'est cependant encore pas entièrement comprise (Chirakkal *et al.*, 2002; Setlow, 2014; Xing and Harper, 2020).

Cette activation des enzymes CLE initie la seconde étape de la germination avec la dégradation du cortex par ces enzymes. Ces deux enzymes hydrolysent les résidus  $\delta$ -lactam muramiques (MAL) des peptidoglycanes du cortex. C'est pour cette raison que la future paroi de peptidoglycanes de la cellule végétative, juxtaposée à la membrane interne, n'est pas dégradée lors de cette étape car elle ne contient pas de résidus MAL. C'est lors de cette seconde



étape que le protoplaste se réhydrate complètement. La spore perd sa biréfringence observée lors de son état de dormance en microscopie à contraste de phase, apparaissant alors noire avec cette technique. A ce stade la spore a perdu la plupart de ses propriétés de résistance. La dégradation du cortex de la spore ainsi que sa réhydratation entraînent une expansion du protoplaste de 2 à 3 fois son volume initial. Toutes ces étapes sont purement mécaniques et aucune activité métabolique n'est détectable à ce niveau. L'hydratation va permettre l'hydrolyse des protéines SASPs saturant l'ADN de la spore, ainsi qu'une reprise progressive de l'activité métabolique. Finalement, la nouvelle cellule ayant fini sa germination, elle va reprendre sa croissance. Cela se traduit en premier lieu par une phase d'élongation et de dégradation du manteau protéique de la spore, pour sortir de son enveloppe.

## **2. Tour d'horizon des propriétés de résistance des spores face à des stress physiques**

La structure et la composition particulière des spores leur confère de grandes propriétés de résistance face à divers stress physiques et chimiques. Cette partie a pour but de donner une brève description de ce que les spores bactériennes peuvent endurer, pour mieux appréhender les implications qu'entraîne cette résistance. Seules les propriétés de résistance à la pression, aux températures extrêmes et aux stress chimiques seront abordées dans cette partie. Une partie dédiée sera consacrée à la résistance de la spore à la lumière.

### 2.1. Pression

#### *2.1.1. Haute pression*

L'application de hautes pressions de plusieurs dizaines de MPa sur un organisme unicellulaire a pour principale conséquence de diminuer la fluidité de sa membrane plasmique et de bloquer son métabolisme. Cela peut aller jusqu'à sa perméabilisation, causant la perte des gradients actifs maintenus par la cellule et précédant l'inactivation de l'organisme. Certaines protéines cellulaires essentielles peuvent également être impactées au niveau de leur structure secondaire, tertiaires et quaternaire, conduisant à leur dénaturation réversible puis irréversible en fonction du temps et du niveau de pression. Les micro-organismes ont une résistance à la pression en général de quelques centaines de MPa pendant quelques minutes. A titre de comparaison l'atmosphère terrestre au niveau du sol est de 0,1 MPa. Les spores bactériennes, quant à elles, ont une résistance aux pressions bien plus importante que ces cellules végétatives.

De nombreuses publications ont étudié la résistance des spores bactérienne à des pressions extrêmes. Les spores réagissent très différemment à l'application de pression,

comparativement aux cellules végétatives. Une pression comprise entre 100 et 400 MPa à une température modérée (20-50°C) va en effet provoquer la germination des spores et non leur destruction comme pour les cellules végétatives. On attribue cette germination à un changement de conformation des récepteurs de germination (GRs) de la membrane interne des spores, ce qui induit une cascade de réactions déclenchées en temps normal par la liaison des GRs à leurs ligands (Wuytack, Boven and Michiels, 1998; Reineke *et al.*, 2013; Doona *et al.*, 2014). Dans le cas d'une exposition à des pressions plus élevées dépassant 550 MPa, une germination des spores est également observée, mais sans que les GRs ne soient impliqués. Ce sont alors les canaux SpoVA qui s'ouvrent sous l'effet de la pression, ce qui provoque une sortie de CaDPA comme cela est normalement le cas lors de la germination dite physiologique. Cette sortie de CaDPA va provoquer une réhydratation partielle du protoplaste conduisant la spore dans le processus de germination (Doona *et al.*, 2014; Reineke and Mathys, 2020). Pour détruire des spores à température ambiante sans les faire germer, des pressions bien plus importantes doivent être appliquées sous forme de choc, de pression. Il a ainsi été montré que des spores de *B. subtilis* exposées à un choc de pression de 78 GPa présentent un taux d'inactivation de l'ordre de 5 log, certaines d'entre elles étant donc encore en état de germer et de se développer (Burchell, Mann and Bunch, 2004). De plus, des chocs de pression allant de 5 à 50 GPa n'induisent pas la germination comme lors de pression hydrostatique et ne permettent d'atteindre qu'un taux de destruction d'environ 4 log (Horneck *et al.*, 2001, 2008). En comparaison, la pression exercée par l'impact de l'astéroïde ayant formé le cratère du Chicxulub au large du Mexique il y a environ 66 millions d'années, constituant un des événements majeurs menant à l'extinction des dinosaures, a été estimé entre 17 et 25 GPa dans les roches aux alentours du point d'impact (Timms *et al.*, 2019; Feignon *et al.*, 2020; Wittmann *et al.*, 2021).

### 2.1.2. Vide

Les spores sont également capables de résister à des pressions très faibles, proches de zéro. Des études ont montrées qu'exposées au vide spatial (environ  $10^{-14}$  Pa), les spores bactériennes peuvent survivre plusieurs jours voire plusieurs années avec un taux de mortalité avoisinant 30% et 98% pour respectivement 10 jours et 6 ans d'exposition (Horneck, 1993; Horneck, Bücker and Reitz, 1994; He, Wang, *et al.*, 2018). Bien que le protoplaste des spores soit déjà très déshydraté, l'exposition à des faibles pressions semble accentuer cette déshydratation. Cela semble induire des dégâts au niveau de l'ADN des spores par des cassures doubles et simples brins.

### 2.2. Température

#### 2.2.1. Haute température

La température est un des processus de stérilisation des plus utilisés dans divers domaines, dont l'agroalimentaire. Etant donné que certaines bactéries sporulantes peuvent être pathogènes pour l'humain, la résistance au stress thermique des spores a été très étudiée. Les spores bactériennes sont en effet très résistantes face à des hautes températures, en comparaison des cellules végétatives. Une étude a par exemple montré que des spores de *Bacillus amyloliquefaciens* peuvent survivre environ une heure à plus de 300°C, avec un pic à 420°C dans des conditions sèches (Beladjal *et al.*, 2018). En comparaison les spores de *B. subtilis* ne résiste qu'environ 30 min à une température de 140 °C, ce qui reste tout de même conséquent en comparaison des cellules végétatives (He, Chen, *et al.*, 2018). La résistance des spores à la chaleur est donc très variable d'une espèce à une autre. Cette grande résistance provient de plusieurs facteurs. En condition de chaleur sèche, ce sont les SASPs saturant l'ADN des spores qui sont le principal facteur de résistance thermique (Setlow and Setlow, 1995). Pour la chaleur humide, les principaux facteurs de résistance sont le protoplaste de la spore très peu hydraté, et certains éléments génétiques comme le transposon spoVA<sup>2mob</sup>, ainsi que les SASPs (Berendsen *et al.*, 2016; Setlow and Christie, 2021).

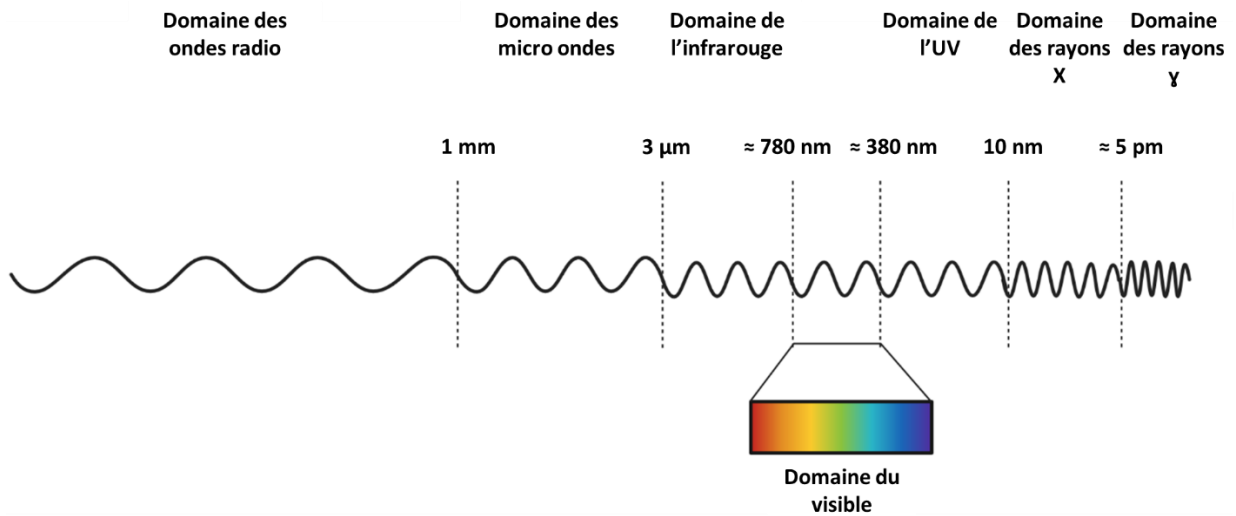
#### 2.2.2. Basse température

L'inactivation d'un microorganisme par diminution de température est principalement causée par une rupture de la membrane plasmique due à la formation de cristaux de glace à proximité ou dans le protoplasme des cellules, ainsi qu'à la dessiccation. Les spores sont connues pour être très résistantes à de multiples cycles de congélation-décongélation. Là aussi, les protéines SASPs semblent participer à cette résistance (Setlow and Setlow, 1994; Nicholson *et al.*, 2000).

### **3. Résistance des spores face à la lumière (de l'UV à l'IR)**

La lumière se comporte à la fois comme une onde électromagnétique et comme un ensemble de particules élémentaires, que l'on nomme photons. Elle peut être décomposée en un spectre de plusieurs domaines de rayonnements électromagnétiques en fonction de sa longueur d'onde  $\lambda$ , quand elle est considérée comme une onde. L'énergie des photons correspondante est donné par  $E = hc/\lambda$ , avec  $c$  la vitesse de la lumière et  $h$  la constante de Planck.

Le découpage du spectre de la lumière en plusieurs domaines en fonction de la longueur d'onde est représenté Fig. 5.



**Figure 5 :** Représentation du spectre de la lumière.

Certains des domaines représentés dans ce spectre sont couramment utilisés dans diverses industries. C'est notamment le cas du domaine des ondes radio utilisées en télécommunications par exemple, ou encore celui des rayons X utilisés en imagerie médicale. La longueur d'onde est inversement proportionnelle à la fréquence et à l'énergie des photons. Ainsi les photons composant les rayons X possèdent une énergie bien plus importante que ceux composant les ondes radio. Certains de ces domaines de la lumière peuvent engendrer des dégâts sur les organismes et entraîner leur inactivation. C'est notamment le cas des domaines de faible longueur d'onde, donc avec une énergie importante, se trouvant en dessous du domaine du visible ( $\lambda < 380 \text{ nm}$ ) comme l'UV ( $\lambda \approx 380 \text{ nm} - 10 \text{ nm}$ ), les rayons X ( $\lambda \approx 10 \text{ nm} - 5 \text{ pm}$ ) ou encore les rayons gamma ( $\lambda < 5 \text{ pm}$ ). La partie UV du spectre de la lumière, invisible à nos yeux, présente un potentiel de décontamination utilisé dans l'industrie comme dans la stérilisation de l'eau ou des emballages des produits alimentaires par exemple. Les domaines du spectre électromagnétique très énergétiques (rayon X et gamma) peuvent cependant présenter trop de risques quant à leur utilisation. Ce sont de plus des rayonnements ionisants et doivent être indiqués sur l'emballage des produits traités, comme le stipule la réglementation. Cet aspect reste actuellement rédhibitoire pour la plupart des produits. Le rayonnement UV, qui constitue une source de rayonnement moins énergétique, reste simple de production et d'utilisation et est couramment utilisé dans des processus de décontamination de surface. Sa relativement faible pénétration dans la matière fait qu'il est assez simple de s'en protéger, contrairement aux rayons X et gamma qui possèdent une bien plus grande pénétration.

L'interaction du vivant avec les UV est également étudiée d'un point de vue environnemental. En effet, une partie des rayonnements UV est naturellement présente sur Terre et les êtres vivants ont évolué pour se protéger de ses effets néfastes via notamment la production de pigments tel que la mélanine. Certaines espèces de bactéries sporulantes produisent de la mélanine dans leur manteau ainsi que des pigments de la famille des caroténoïdes, ce qui a pour conséquence d'améliorer leur résistance face à ce type de rayonnement. Si la spore de *B. subtilis* ne possède pas de pigment de ce type, le CaDPA contenu dans son protoplaste joue le rôle de pigment en absorbant une partie des UV. Il protège ainsi en partie l'ADN, en limitant une exposition directe pouvant engendrer des dégâts sur sa structure (Moeller *et al.*, 2005). L'interaction entre le vivant et certaines parties du spectre de la lumière moins énergétique que les UV a également été étudiée ces dernières années, dans le but de développer de nouvelles méthodes de décontamination par la lumière. C'est par exemple le cas de la lumière visible ( $\lambda \approx 380-750$  nm) ou encore de la lumière infrarouge ( $\lambda \approx 700$  nm - 1mm). Les spores étant un enjeu majeur dans les processus de décontamination, des études ont éprouvé leur résistance face à l'utilisation de ce type de lumière peu énergétique. La suite de cette partie a pour objectif de faire un tour d'horizon des domaines de la lumière les plus utilisés dans les processus de décontamination, en partant du domaine des UV jusqu'à l'IR en passant par le domaine du visible.

### 3.1. Impact du rayonnement UV sur les spores

#### 3.1.1. *Généralités sur les UV*

On considère qu'environ 7% de l'énergie électromagnétique émise par le soleil appartient à la gamme de l'UV (Nicholson, Schuerger and Setlow, 2005). Le domaine de l'UV est composé de 3 sous domaines principaux : l'UVA avec les longueurs d'onde comprises entre 400 et 320 nm, l'UVB pour la gamme de 320 à 290/280 nm et enfin l'UVC s'étendant de 290/280 à 100 nm. Il est également défini un 4<sup>ème</sup> domaine, l'UVE, pour des longueurs d'onde de 100 à 10 nm, parfois appelé « UV vacuum » pour caractériser le fait que cette partie du rayonnement solaire n'est retrouvé que dans le vide spatial. L'UVE n'est souvent pas distingué de l'UVC par souci de simplification, ce qui sera également le cas dans ce manuscrit (Nicholson, Schuerger and Setlow, 2005; Coohill and Sagripanti, 2009; Santos *et al.*, 2013; Williamson *et al.*, 2014). Une grande partie de ces rayonnements UV émis par le soleil est filtrée par la couche d'ozone. Les UV dont la longueur d'onde est inférieure à 290 nm, correspondant à l'UVC, sont complètement filtrés par la couche d'ozone de l'atmosphère terrestre. En conséquence, 95% de l'UV reçu sur Terre au niveau du sol appartient à la gamme de l'UVA, l'UVB représentant le

reste des UV solaires perçus. Cette proportion entre UVa et UVb peut cependant varier avec l'altitude (Diffey, 1991; Coohill and Sagripanti, 2009; Santos *et al.*, 2013; Williamson *et al.*, 2014).

On considère généralement que l'UVc représente la gamme la plus létale pour le vivant, à cause des dégâts directs engendrés sur l'ADN. Ces dégâts consistent en la formation de cassures doubles (DSB) et simples brins (SB) de l'ADN, à cause de la bande d'absorption des bases des acides nucléiques qui se situe autour de 254 nm. Les UVa engendrent des dégâts dits « indirects » sur l'ADN, ce qui explique en partie leur propension à produire plus d'effet sub-létaux que l'UVc. Ces dégâts indirects de l'UVa sont induits par la création d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). Les ROS une fois formées dans une cellule peuvent également provoquer des dégâts sur l'ADN, comme des cassures des brins. Les effets de l'UVb sont quant à eux intermédiaires entre des effets directs et indirects sur l'ADN, avec la formation là aussi de ROS. Les UV solaires composés de l'UVa et de l'UVb peuvent ainsi engendrer des dégâts aux êtres vivants. On peut notamment prendre comme exemple les cancers de la peau, directement liés à l'exposition aux UV solaires (Svobodova, Walterova and Vostalova, 2006). Certains effets des UV peuvent être observés de manière invariante sur tous les êtres vivants, en fonction de la gamme d'UV étudiée. C'est par exemple le cas des cassures des brins d'ADN créées par les UVc. Les dégâts engendrés par les UV peuvent également dépendre de l'espèce étudiée. Il a été montré que pour une même gamme d'UV, la cause responsable de l'inactivation de micro-organismes tels que les bactéries varie d'une espèce à l'autre. Ces variations inter-espèces s'expliquent par les différences de structures et de métabolisme entre les organismes (Santos *et al.*, 2013). C'est également cette spécificité de structures et de métabolisme qui explique pourquoi les spores bactériennes sont beaucoup plus résistantes aux UV que les cellules végétatives et pourquoi certains effets engendrés par les UV ne sont décrits que dans les spores.

### 3.1.2. Effets des UVc sur la spore bactérienne

#### *Résistance des spores de B. subtilis à une exposition aux UVc*

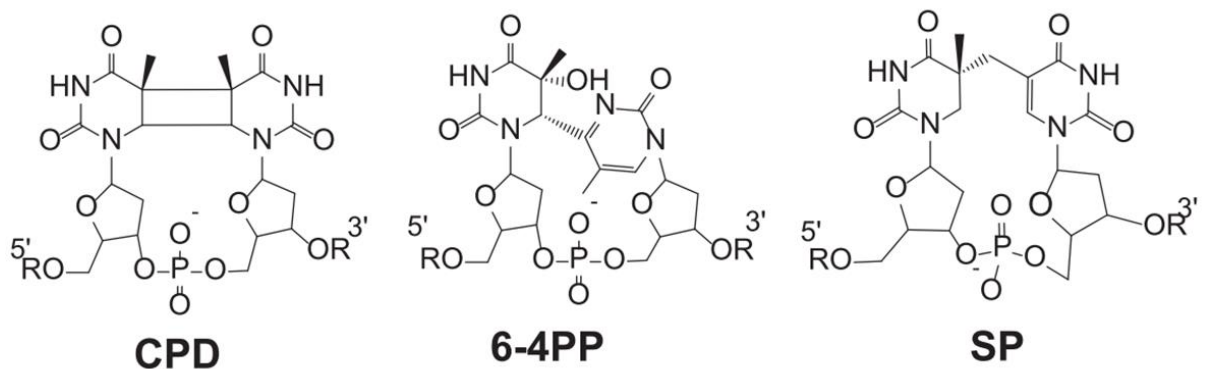
Lorsque l'on parle d'exposition des spores aux UVc, on parle généralement de la longueur d'onde 254 nm. Cette longueur d'onde est considérée comme optimale pour la destruction de spores et autres organismes par les UVc. Les spores bactériennes sont considérées 20 à 50 fois plus résistantes à l'exposition aux UVc que les cellules végétatives (Setlow, 2006). Bien que la résistance des spores face aux UVc soit étudiée depuis des décennies, la littérature peine à exprimer une valeur concrète de dose létal 90 (DL<sub>90</sub>). Cette

DL<sub>90</sub> correspond à la dose d'UVc nécessaire pour tuer 90% ou 1 log des spores irradiées. La DL<sub>90</sub> varie grandement d'une publication à l'autre, allant de 31 J/m<sup>2</sup> à 300 J/m<sup>2</sup> (Setlow, 2001; Slieman and Nicholson, 2001a; Moeller *et al.*, 2005). A titre de comparaison, avec le système utilisé dans le laboratoire de l'équipe PMB, la DL<sub>90</sub> a été mesurée à environ 90 J/m<sup>2</sup> pour les spores de *B. subtilis* de la souche PS533. Ce grand écart entre les valeurs peut s'expliquer par plusieurs facteurs. Un effet d'ombrage ou de « shielding » doit être considéré pour les travaux où les spores ont été irradiées en solution à une concentration supérieure à 10<sup>7</sup> spores/ml. En effet, au-dessus de cette concentration, il est considéré que certaines spores seront cachées « dans l'ombre » d'autres spores de l'exposition UVc. Cela a pour effet de surévaluer la DL<sub>90</sub> (Reidmiller *et al.*, 2003). De plus, certains systèmes d'irradiation produisent une exposition aux UVc seulement sur un côté de l'échantillon (généralement au-dessus). Les spores sont alors exposées dans un contenant ouvert, ou laissant passer les UVc sur le côté exposé au rayonnement. Dans ce cas, si les spores sont exposées dans un contenant n'ayant pas une bonne transmission des UVc, alors l'échantillon pourrait ne pas être exposé de façon homogène. C'est pourquoi des contenants en quartz doivent être utilisés, sans quoi cela amènerait là aussi à une surestimation de la DL<sub>90</sub>. Enfin, le facteur probablement le plus important et le moins contrôlable sur la résistance des spores aux UVc sont les conditions de culture et de sporulation (Nicholson, Schuerger and Setlow, 2005). Or même en conditions de culture standardisées, il peut y avoir de légères différences d'un laboratoire à l'autre dans les conditions environnementales de culture et de sporulation.

### *Type de dégâts générés par les UVc sur les spores de B. subtilis*

Lorsque des spores bactériennes sont exposées à des UVc, les principaux dégâts causant l'inactivation de ces spores sont trouvés sur l'ADN, comme c'est le cas pour des cellules végétatives. Cependant, la photochimie de l'ADN des spores est différente de celle des cellules végétatives, avec pour conséquences la formation de lésions particulières sur l'ADN des spores. Les rayonnements UVc sont connus pour former des lésions simples ou doubles brins sur l'ADN, ainsi que des photoproduits directement sur les brins à travers la formation de liaisons covalentes entre deux bases pyrimidiques adjacentes (Thymine ou Cytosine). Les deux photoproduits de l'ADN retrouvés majoritairement dans tous type de cellules végétatives sont appelés « Cyclobutane pyrimidine dimers » (CPD) et « 6-4 pyrimidine-pyrimidone photoproducts » (6-4PP) (Fig. 6). Ils fragilisent l'ADN, ce qui a pour conséquence de provoquer des cassures ainsi que de créer des erreurs de réplication de l'ADN. Néanmoins, ces deux types de photoproduits de l'ADN ne sont que très minoritairement rencontrés chez les spores

exposées aux UVc. En effet, du fait de la photochimie particulière de leur ADN, un autre photoproduit spécifique des spores est formé et vient remplacer les CPD et 6-4PP. Ce photoproduit se nomme « 5-thyminyl-5,6-dihydrothymine » ou « Spore Photoproduit » (SP) (Fig. 6). Il représente 98% des dégâts retrouvés sur l'ADN des spores irradiées aux UVc, en prenant en compte les photoproduits de l'ADN et les lésions simples et doubles brins (Desnous, Guillaume and Clivio, 2010). Les SP ne se forment qu'entre deux thymines adjacentes, à la différence des CPD et 6-4PP pouvant se former entre deux thymines, deux cytosines ou une thymine et une cytosine.



**Figure 6 :** Formules chimiques des photoproduits de l'ADN CPD ; 6-4PP et SP. Les radicaux R représentent le reste du brin de l'ADN. Extrait de Setlow and Li, 2015.

### *Formation des SP*

La formation des SP et la photochimie particulière de la spore bactérienne sont dues à l'environnement régnant au sein du protoplaste de la spore. L'ADN de la spore, en plus d'être dans une conformation spécifique à cause des protéines SASPs qui le saturent, est dans un environnement pauvre en eau et riche en CaDPA. C'est cette saturation de l'ADN par les protéines SASPs, couplée à la forte déshydratation du protoplaste, qui semble expliquer en partie la photochimie particulière de l'ADN et la formation des SP (Desnous, Guillaume and Clivio, 2010). Il a en effet été montré que des souches mutantes ne produisant plus les deux SASPs principales (les  $\alpha$  et  $\beta$  SASPs) voient leur formation de SP réduite de 50% lorsque exposées aux UVc (Setlow and Setlow, 1987). De plus, l'hydratation des spores lors de leur exposition aux UVc joue un rôle important dans la formation des SP. En conditions sèches, la quantité de SP formés sur l'ADN est largement réduite (Douki, Setlow and Setlow, 2005). Le CaDPA semble également être impliqué dans la formation des lésions sur l'ADN. Le mécanisme par lequel le CaDPA est impliqué dans la création des SP est encore étudié, mais un faisceau d'indices laisse à penser que le mécanisme à l'œuvre serait un transfert d'énergie triplet-triplet où le CaDPA



excité serait la molécule « donneuse » et l'ADN serait la molécule « acceptrice » (Douki, Setlow and Setlow, 2005). Le CaDPA agirait donc comme photosensibilisateur, rendant l'ADN des spores plus sujet à la formation de SP. Des spores mutantes ne possédant pas de CaDPA voient leur quantité de SP diminuer d'un facteur 10 et leur taux de survie augmenter par comparaison à la souche sauvage, après exposition aux UVc (Slieman and Nicholson, 2001a; Douki, Setlow and Setlow, 2005). Néanmoins, ce rôle de photosensibilisateur n'est observé que lorsque les spores sont exposées aux UVc dans des conditions hydratées. En condition d'exposition peu hydraté, la quantité de SP formés diminue elle aussi d'un facteur 10 pour les spores mutantes n'ayant pas de CaDPA, comme c'est le cas en conditions hydratées. Cependant leur viabilité diminue, à l'inverse de la conditions hydraté, conférant ici un rôle photoprotecteur du CaDPA (Slieman and Nicholson, 2001a; Douki, Setlow and Setlow, 2005). Ce double rôle du CaDPA sera plus détaillé et étudié dans les deux premiers chapitres de ce manuscrit.

Des paramètres physiques régissant les conditions extérieures autres que l'hydratation peuvent également influencer la formation des SP sur l'ADN. Il a été montré que des spores de *B. subtilis* exposé aux UVc dans un vide modéré de 1-2 Pa et un ultra vide de  $2 \cdot 10^{-6}$  Pa voient leur quantité de SP diminuer d'environ 30% en comparaison à des spores exposées à une pression atmosphérique normale (101 325 Pa) (Lindberg and Horneck, 1991; Nicholson, Setlow and Setlow, 2002). L'hypothèse émise à la suite de ces publications est qu'il est probable que exposées au vide, les spores perdent encore le peu d'eau qui leur reste, diminuant ainsi la quantité de SP formés comme vu précédemment (Desnous, Guillaume and Clivio, 2010). Enfin, la température lors de l'irradiation de spores peut également influencer le taux de formation de SP. On considère que l'optimum de température pour la formation de SP est de l'ordre de -80°C. En comparaison, deux fois moins de SP sont formés sur l'ADN des spores exposées aux UVc à température ambiante ( $\approx 22^\circ\text{C}$ ) (Donnellan *et al.*, 1968).

### *Réparation des SP*

Deux systèmes de réparation des SP sont retrouvés au sein de la spore dormante. Le premier de ces systèmes de réparation est appelé NER pour « nucleotide excision repair pathway » et répare les dommages sur l'ADN tels que les CPD, les 6-4PP mais aussi les SP. Ce système peut être retrouvé chez tous les organismes vivants, aussi bien eucaryotes que procaryotes, avec toutefois quelques différences dans les enzymes impliquées dans ce système (Sancar and Tang, 1993; Desnous, Guillaume and Clivio, 2010). Le mécanisme d'action du système NER repose sur plusieurs enzymes et consiste à exciser les nucléotides encadrant une lésion sur un brin de l'ADN, excisant de ce fait la lésion elle-même. Une ADN polymérase

synthétise ensuite le brin excisé à partir du brin complémentaire intact, puis une ADN ligase fusionne le segment néosynthétisé au reste du brin d'ADN. Les spores possèdent cependant un second mécanisme de réparation de l'ADN, qui est spécifique aux SP. Ces dimères de thymine sont en effet clivés par une enzyme appelée la SP lyase. Cette enzyme est spécifique des SP et ne cible pas, par exemple, les CPD qui ont pourtant une structure proche (Slieman, Rebeil and Nicholson, 2000). Ce système n'a pas besoin d'exciser un segment entier d'ADN pour le resynthétiser ensuite, comme c'est le cas pour le système NER (Yang and Li, 2015; Berreau and Benjdia, 2016). Il a été montré que des mutants déficients à la fois dans le système NER et SP lyase sont 30 fois moins résistants à une exposition aux UVc en comparaison de spores sauvages (Xue and Nicholson, 1996). Ces deux systèmes marchent de concert et il est à noter qu'ils sont actifs pour réparer l'ADN au moment de la germination, et non pendant la phase de dormance de la spore. Cependant, comme il le sera décrit plus tard dans ce manuscrit, le système NER est plus largement impliqué dans la réparation des dégâts induits par d'autres gamme d'UV, comme l'UVb et l'UVa.

Le fait que la photochimie de la spore conduit à une prédominance beaucoup plus importante des SP par rapport aux autres lésions typiquement retrouvées chez la cellule végétative peut constituer une stratégie évolutive et conférer un avantage aux spores pour résister aux UVc. Il a en effet été montré que les SP sont plus efficacement réparés que les autres lésions de l'ADN, telles que les CPD et les 6-4PP (Moeller *et al.*, 2007). Ainsi, la spore pourrait tirer avantage en favorisant ce type de lésion en les réparant de manière très efficace. L'atmosphère filtrant désormais les rayonnement UVc, il reste cependant curieux que ce système particulier se soit maintenu au cours du temps. Comme il le sera détaillé dans la prochaine partie, le fait que les rayonnements UVb solaires forment également des SP, bien que de manière beaucoup moins importante que l'UVc, pourrait peut-être permettre de maintenir une pression sélective suffisante sur cette stratégie de formation préférentielle des SP. Une question intéressante reste en suspens : comment cette stratégie est-elle apparue ? L'UVb solaire aurait-il suffi à sélectionner cette stratégie ou la formation préférentielle de SP date-elle d'une époque plus reculée, où l'atmosphère terrestre ne filtrait pas les UVc ?

### 3.1.3. Effets des UVb et UVa sur la spore bactérienne

L'exposition des spores aux UVb va là aussi avoir pour conséquences la formation de photoproduits sur l'ADN. Bien que des SP soit également les photoproduits de l'ADN majoritairement formés lors d'une exposition des spores aux UVb, la quantité de SP retrouvée sur l'ADN est réduite de  $10^3$  par rapport à une exposition aux UVc (Tyrrell, 1978; Slieman and

Nicholson, 2000; Desnous, Guillaume and Clivio, 2010; Setlow and Li, 2015). En contrepartie, des CPD sont retrouvés comme étant les seconds photoproduits majoritairement formés sur l'ADN. Dans le cas de l'exposition des spores aux UVa, aucun CPD ou SP n'est détecté sur l'ADN des spores. Il semble que les UVa induisent plutôt des dégâts indirects sur l'ADN, par le biais de photosensibilisateurs tels que des ROS. Ces dégâts se traduisent par des cassures doubles et simples brins de l'ADN (Slieman and Nicholson, 2000; Desnous, Guillaume and Clivio, 2010). Comme il l'a été dit précédemment, dans leur environnement naturel, les spores sont principalement confrontées à un mélange de rayonnements UVa et UVb, les UVc étant filtrés aujourd'hui par l'atmosphère. Une exposition simultanée à ces deux domaines de l'UV conduit alors à l'observation d'un mélange de dégâts induit par l'UVa et l'UVb, et en particulier à la formation de SP. Il a récemment été prédit que les rayonnements UVb devraient voir leur intensité diminuer de 5 à 20% pour les moyennes et hautes latitudes et augmenter de 2 à 3% dans les faibles latitudes d'ici 2100 à cause du changement climatique (Larin, 2021). Ce changement d'intensité d'UVb solaire, outre le fait qu'il pourrait devenir un enjeu de santé publique futur, pourrait impacter les micro-organismes dans l'environnement et notamment la formation de SP chez les spores. Dans le cas où les rayonnements UVb seraient affaiblis, la formation de SP pourrait être ainsi réduite.

### 3.2. Gamme du visible : Effet de la lumière bleue et de la lumière pulsée sur les spores bactériennes

La lumière bleue dont les longueurs d'ondes sont proches de celle de l'UVa est également décrite comme ayant un effet létal sur les micro-organismes. Cet effet létal est cependant moins important que celui de l'UV. La gamme considérée comme étant de la lumière bleue est comprise entre 400 et 470 nm. Cependant seules les longueurs d'ondes comprises entre 400 et 425 nm, avec un optimum à 405 nm, sont utilisées dans les processus de décontamination à la lumière bleue. Cette létalité est principalement due à la création de ROS et peut mettre en jeu des molécules photosensibilisatrices, telles que des porphyrines dans certains organismes comme les levures (Dai *et al.*, 2013; Murdoch *et al.*, 2013; Halstead *et al.*, 2016; Gwynne and Gallagher, 2018). Certaines études se sont intéressées à l'impact de ce type de lumière sur les spores bactériennes. Les résultats de ces études semblent démontrer que, comme pour la plupart des stress physiques, une plus grande résistance est observée pour les spores bactériennes que pour les cellules végétatives. Les dégâts sur l'ADN semblent être le principal facteur d'inactivation des spores par la lumière bleue, probablement du fait de la création de ROS (Denis, Dai and Hamblin, 2013; MacLean *et al.*, 2013; Djouiaï *et al.*, 2018).

Une de ces études semble montrer qu'en inactivant le système de réparation spécifique des SP, les spores sont plus sensibles à ce type de stress. Les SP n'étant pas retrouvés après une exposition aux UVa, ce résultat est intéressant mais pour le moment mal compris. Par ailleurs, ces études montrent également que la pigmentation du manteau des spores semble jouer un rôle important en tant que facteur de résistance à la lumière bleue. Ces résultats sont assez similaires à ceux ayant montrés que la pigmentation du manteau de certaines espèces de spores, avec des pigments tel que des caroténoïdes ou de la mélanine, est un facteur important dans la résistance des spores aux UV (Moeller *et al.*, 2005; Khaneja *et al.*, 2010).

L'inactivation de micro-organismes et même de spores bactériennes est également possible avec l'utilisation à haute intensité de plus grandes longueurs d'ondes faisant parties du spectre du visible couplées au domaine du l'UV. Généralement les longueurs d'ondes utilisées sont alors comprises entre 200 et 1100 nm. La lumière est délivrée par des pulses de quelques microsecondes de haute intensité. Cette technique appelée « lumière blanche pulsée » ou « lumière pulsée » montre que des structures de la spore telles que le manteau peuvent être impactées durant ce stress (Clair *et al.*, 2020). Comme dans le cas de la lumière bleue et des UV, la pigmentation du manteau semble jouer un effet protecteur en absorbant une partie de la lumière. La cause d'inactivation majeure semble là encore être les dégâts retrouvés sur l'ADN des spores. L'efficacité de ce genre de traitement repose essentiellement sur la partie du spectre inférieure à 300-400 nm, appartenant aux UV. Si cette partie du spectre est masquée, l'efficacité du traitement est réduite sur les spores bactériennes (Levy *et al.*, 2012; Ramos-Villaruel *et al.*, 2012; Nicorescu *et al.*, 2013; Esbelin *et al.*, 2016).

### 3.3. Effets du rayonnement infrarouge continu et pulsé sur les spores bactériennes

Les longueurs d'ondes infrarouges (>700 nm) peuvent également être utilisées pour inactiver et détruire les micro-organismes. Cette destruction n'est alors pas photochimique, mais thermique. Les rayonnements infrarouges peuvent en effet être absorbés par le milieu contenant les micro-organismes et augmenter sa température. Le chauffage par rayonnement infrarouge peut être utilisé pour effectuer des stérilisations ou pasteurisation par exemple. Il est plus économe qu'un traitement thermique conventionnel mais est limité par l'épaisseur de pénétration des IR. Ce type de traitement a déjà montré son efficacité pour inactiver des spores en suspension dans un liquide ou dans des poudres (Molin and Östlund, 1975; Hamanaka *et al.*, 2006).

Une autre méthode pouvant induire l'inactivation de micro-organismes consiste en l'utilisation d'un laser infrarouge pulsé (IR pulsé) ou proche infrarouge pulsé (NIR pulsé pour la gamme de 700 à 1000 nm) avec de hautes puissances crêtes de l'ordre de quelques TW/cm<sup>2</sup>. Ce genre de laser est généralement utilisé dans diverses méthodes de spectroscopie, comme l'imagerie multiphotons par exemple, et est généralement considéré comme non destructif de l'échantillon observé. Cependant, des études ont montré que l'exposition de micro-organismes à ce genre de laser peut conduire à des dégâts photochimiques sur l'ADN. Des études réalisées sur des cellules eucaryotes montrent qu'à certaines puissances couramment utilisées dans diverses techniques de spectroscopie et microscopie, des CPD et 6-4PP peuvent être formés sur l'ADN (König, 2006; Nadiarnykh *et al.*, 2012; Kong, Wakida and Yokomori, 2021). Ces dégâts semblent être issus d'une absorption multiphotonique dans la gamme du proche infrarouge conduisant à des dégâts en partie similaires aux UV. Le chapitre 3 de ce manuscrit est consacré à étudier l'impact de ce genre de rayonnement NIR pulsé sur les spores de *B. subtilis* en comparaison de l'inactivation des spores causée par une exposition aux UV.

#### 4. Point sur les techniques de spectroscopies et de microscopie utilisées

##### 4.1. Spectroscopie Raman

Lorsque la lumière interagit avec des molécules, certains photons peuvent diffuser sans gain ni perte d'énergie. Dans ce cas on parle de diffusion élastique et le photon diffusé conserve la même longueur d'onde. C'est ce qui arrive dans le cas de la diffusion de Rayleigh. Dans de rares cas (1/10 millions), certains photons interagissant avec la matière voient leur fréquence se modifier à cause d'un échange d'énergie entre le photon et les électrons des atomes composant la molécule. On parle alors de diffusion inélastique. C'est ce décalage de fréquence qui est nommé « diffusion Raman » ou « effet Raman » et sa mesure constitue le fondement de la méthode de spectroscopie Raman. Ce décalage de fréquence renseigne sur les propriétés moléculaires de l'échantillon observé. La méthode en elle-même consiste à exposer un échantillon à une lumière monochromatique émise par un laser. La lumière diffusée par l'échantillon est collectée et filtrée pour ne laisser passer que les photons issus d'une diffusion inélastique. Les photons collectés vont ensuite être déviés en fonction de leurs longueurs d'ondes à l'aide d'un spectrographe, puis envoyés vers un détecteur. Chaque molécule a sa propre empreinte Raman avec des bandes d'absorption caractérisant les modes de vibration des liaisons chimiques au sein de la molécule. Cette technique a été largement utilisée pour étudier la composition moléculaire de micro-organismes (Edwards *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2018; Almasoud *et al.*, 2021). Les spectres Raman acquis sur une spore bactérienne sont dominés par

l'empreinte spectrale de la molécule de DPA (Kong *et al.*, 2011; Kong, Setlow and Li, 2012; Elegbeleye *et al.*, 2021). La spectroscopie Raman peut être couplée à l'utilisation d'un microscope (microspectroscopie Raman). Le laser est alors focalisé sur une petite partie de l'échantillon de quelques  $\mu\text{m}^3$ .

Cette technique est encore largement considérée comme non destructive de l'échantillon observé. Cependant, une étude récente sur des spores bactériennes met en garde sur l'utilisation des lasers infrarouges utilisés en spectroscopie Raman. En effet, les spores pourtant connues pour leur grande résistance face à des stress physiques intenses semblent pouvoir être détruites par ce genre de laser, pour des puissances supérieures à 5 mW durant plusieurs minutes d'exposition (Malyshev *et al.*, 2021). Un inconvénient de l'utilisation de la spectroscopie Raman réside dans sa sensibilité à la fluorescence de l'échantillon (d'où l'utilisation d'excitation Raman dans le proche IR bien que l'efficacité y soit moindre), qui peut masquer la diffusion Raman et rendre ainsi l'acquisition impossible, contrairement à la spectroscopie infrarouge.

#### 4.2. Spectroscopie Infrarouge (IR) et spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF)

A la différence de la spectroscopie Raman, la technique de spectroscopie IR est qualifiée de spectroscopie d'absorption. Le principe de cette technique est d'irradier un échantillon avec un faisceau de lumière infrarouge et de collecter la lumière étant passée à travers l'échantillon. De cette lumière transmise sont déduites les longueurs d'ondes absorbées (d'où le qualificatif de spectroscopie d'absorption) et transmises par l'échantillon. Ainsi des spectres d'absorption ou de transmittance peuvent être acquis. L'absorption de l'échantillon est caractéristique comme la spectroscopie Raman des modes de vibration des liaisons moléculaires covalentes. Cette technique renseigne sur la composition moléculaire d'un échantillon. On peut soit utiliser un faisceau monochromatique à une longueur d'onde donnée, soit balayer en longueur d'onde au cours du temps pour couvrir une gamme spectrale définie. Dans ce cas, on parle de spectroscopie infrarouge. Il est aussi possible de sélectionner en ensemble de longueur d'onde d'une source IR à bande large grâce à un interféromètre que l'on peut accorder en faisant varier la position du miroir ou du prisme. L'excitation obtenue est un interférogramme, il faut utiliser un traitement mathématique pour obtenir le spectre d'absorption (ou de réflexion) par longueur d'onde (transformée de Fourier). Dans ce cas on parle alors de spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF ou FTIR en anglais).

La spectroscopie infrarouge est souvent utilisée en complément de la spectroscopie Raman car certaines liaisons covalentes peuvent n'être détectées que par l'une ou l'autre de ces techniques. Par exemple, les liaisons hydroxyles sont moins détectables par spectroscopie Raman que par infrarouge. Un aspect limitant de la spectroscopie infrarouge est la forte absorption IR de l'eau sur ses bandes de vibration qui masque une bonne partie du spectre de l'échantillon. Bien que des solutions existent pour corriger en partie ce problème, l'acquisition de spectres dans un échantillon hydraté peut être problématique, contrairement à la spectroscopie Raman où l'eau ne pose pas de problème.

### 4.3. Spectroscopie O-PTIR

La spectroscopie O-PTIR (Optical Photothermal Infrared Spectroscopy) a vu le jour récemment et très peu d'études l'ont utilisée sur des échantillons biologiques, encore moins sur des bactéries. Son principe consiste à utiliser un laser pulsé infrarouge accordable, appelé laser de pompe et un second laser, appelé laser de lecture, dans la gamme du visible (généralement à 532 nm). Le laser infrarouge, lorsqu'il est absorbé par l'échantillon, induit une dilatation thermique sur les vibrations des liaisons covalentes des molécules absorbantes. Cette dilatation thermique change la diffusion élastique des photons (diffusion de Rayleigh) par effet photothermique modulé ou effet mirage du laser de lecture(vert). Les modulations du faisceau de lecture sont ensuite traitées pour générer un spectre d'absorption ou de réflexion infrarouge. Cette technique à l'avantage de permettre une meilleure résolution spatiale que les techniques infrarouges classiques, car le laser de lecture a une longueur d'onde plus courte (532 nm contre plus de 700 nm). Or, plus la longueur d'onde utilisée est courte, meilleure est la résolution optique, du fait que le critère de résolution est directement corrélé à la longueur d'onde utilisée (critère de Rayleigh).

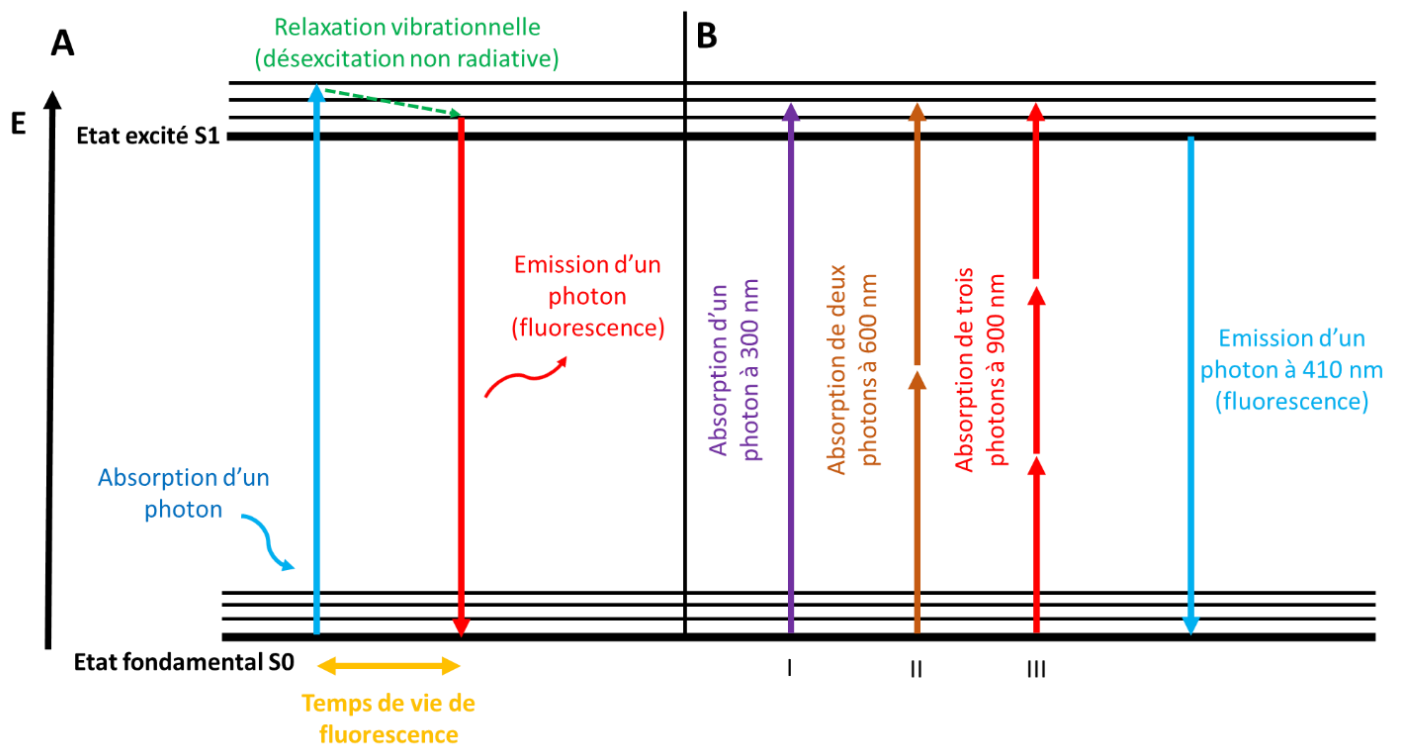
La meilleure résolution fournie par la spectroscopie O-PTIR permet de pouvoir imager plus précisément certains petits échantillons. Dans le cas de l'étude de spores bactériennes, il est possible d'acquérir un spectre provenant du protoplaste de la spore en étant moins gêné par le spectre de molécules provenant d'autres structures, comme par exemple le manteau protéique. Un avantage de la spectroscopie O-PTIR est que les photons provenant du laser de lecture et diffusés de manière inélastique par effet Raman peuvent également être collectés en parallèle du spectre infrarouge de l'échantillon. Un dernier avantage est l'atténuation de l'impact de l'absorption IR de l'eau du fait de sa forte capacité thermique.

### 4.4. Principe de la microscopie de fluorescence et de la microscopie multiphotonique

#### 4.4.1. *Principe de la microscopie de fluorescence*

Avant de décrire le principe de la microscopie multiphotonique, il est nécessaire de faire un point sur le principe de la microscopie de fluorescence conventionnelle. Dans la microscopie de fluorescence classique, un photon d'une certaine longueur d'onde est absorbé par une molécule (un fluorophore) qui passe alors d'un état électronique fondamental  $S_0$  à un état excité  $S_1$  (en bleu Fig. 7A). Cet état excité étant instable, au bout d'un certain temps qu'on appelle temps de vie de fluorescence (compris en général entre  $10^{-10}$  et  $10^{-7}$  s), la molécule va redescendre à son état fondamental  $S_0$  en libérant de l'énergie sous forme d'un photon (en rouge Fig. 7A). C'est cette émission de photon qu'on appelle fluorescence. Le photon émis est généralement de plus grande longueur d'onde que le photon absorbé. La longueur d'onde étant inversement proportionnelle à l'énergie, le photon émis aura donc une énergie inférieure par rapport au photon absorbé. Cette différence d'énergie, appelée déplacement de Stokes provient d'une relaxation vibrationnelle où la molécule va perdre une partie de son énergie sans émettre de photon. On parle alors de désexcitation non radiative (en vert Fig. 7A). Cette désexcitation non radiative intervient entre deux états vibrationnels et peut se faire sous forme d'émission de chaleur ou par vibration. Une fois cette désexcitation non radiative effectuée, la molécule va effectuer une désexcitation radiative avec l'émission d'un photon d'une énergie équivalente à l'énergie du photon absorbé moins l'énergie perdue lors de la désexcitation non radiative.





**Figure 7 :** Diagramme de Perrin-Jablonski illustrant **A:** une absorption à un photon trouvé en microscopie de fluorescence conventionnelle **B:** une absorption multiphotons avec en orange une absorption deux photons (ou biphotonique) et en rouge une absorption trois photons (ou triphotonique) en comparaison d'une absorption à un photon de même niveau d'énergie en violet.

#### 4.4.2. Principe de la microscopie multiphotonique

La microscopie multiphotonique est assez proche de la microscopie de fluorescence classique. Cependant, l'excitation de la molécule ne va pas se faire en absorbant les photons un par un, mais par l'absorption simultanée de plusieurs photons de même énergie (Fig. 7B). L'énergie étant inversement proportionnelle à la longueur d'onde, deux photons de 600 nm fournissent la même énergie d'excitation qu'un photon à 300 nm, ou que trois photons de 900 nm (Fig. 7B). La désexcitation radiative se passant de la même manière pour ces trois cas d'excitation, le photon émis à la suite d'une excitation multiphotonique est d'une plus grande énergie (ou de plus courte longueur d'onde) que les photons d'excitation pris individuellement, contrairement à une excitation à un photon (Fig 7B).

Le concept d'absorption multiphotonique a été théorisé en 1931 par Goepfert-Mayer. Il a cependant fallu attendre la mise au point de lasers suffisamment puissants pour pouvoir l'observer pour la première fois en 1961 puis en 1962 respectivement par Wolfgang Kaiser et Isaac Abella. En effet, l'absorption multiphotonique est un phénomène naturel extrêmement

rare. On peut cependant, en utilisant des lasers assez puissants, augmenter la densité de photon suffisamment pour que ce phénomène puisse se produire de manière significative au niveau du point focal. Ainsi, une absorption de deux photons a plus de chances de se produire qu'une absorption de trois photons qui a elle-même plus de chance de se produire qu'une absorption de quatre photons etc... Des lasers pulsés, appelés également lasers femtosecondes, sont employés pour générer ce type d'absorption. Ils délivrent de courtes impulsions de quelques femtosecondes espacées de quelques nanosecondes. Les puissances des pics d'excitation (appelées aussi puissance crêtes) peuvent atteindre plusieurs centaines de Watts (W) voir plusieurs Gigawatts (GW). L'excitation des fluorophores ce faisant en général dans le domaine du visible, les longueurs d'ondes des lasers utilisés pour une absorption multiphotonique sont généralement dans la gamme de l'infrarouge ou du proche infrarouge. Cette utilisation de l'infrarouge limite la phototoxicité et les dégâts créés aux échantillons observés, malgré des puissances crêtes élevées. Cependant, des dégâts peuvent malgré tout être engendrés lorsqu'un certain seuil de puissance est dépassé. Cela est expliqué dans la section 3.3. de cet état de l'art, qui traite de l'impact des infrarouges sur les spores. Le chapitre 3 de ce manuscrit détaille également plus en profondeur l'impact de ce genre de laser sur le vivant.

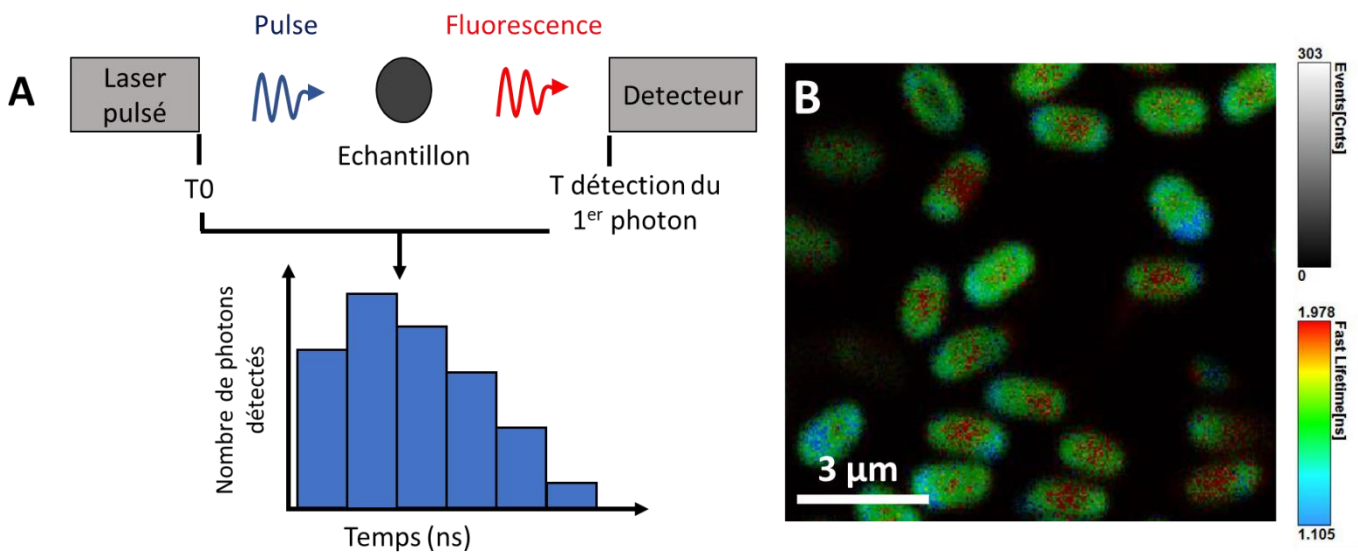
Ces techniques d'imagerie multiphotonique ont l'avantage d'être peu phototoxiques à une puissance laser raisonnable pour l'échantillon et les sondes fluorescentes. Ainsi, l'imagerie multiphotonique permet d'imager des échantillons plus longtemps qu'en microscopie de fluorescence conventionnelle. De plus, l'utilisation de lasers infrarouges permet une plus grande pénétration dans des échantillons épais du fait de la plus grande longueur d'onde. L'absorption multiphotons demandant une grande concentration de photons, elle ne se produit qu'au plan focal du laser, ainsi l'échantillon n'est excité que dans un volume focal de quelques femtolitres. Cette excitation très localisée participe également à limiter la dégradation de l'échantillon observé ainsi que des sondes fluorescentes appelée photoblanchiment. Couplé à la pénétration des infrarouges dans les tissus, l'excitation localisée permet de pouvoir faire de l'imagerie en 3 dimensions dans des tissus réalisant des sections optiques à différentes profondeurs.

### 4.5. Principe de la mesure de temps de vie de fluorescence et acquisition FLIM

Le temps de vie de fluorescence d'une molécule est défini comme étant la durée de vie moyenne de l'état excité d'une molécule (Fig. 7A en orange). Ce temps de vie peut être influencé par divers facteurs tels que la température, le pH ou encore la viscosité du milieu dans lequel est placé la molécule. Le principe général de sa mesure est d'exciter un échantillon avec

une source lumineuse pulsée, comme un laser femtoseconde par exemple et d'observer quand arrive le 1<sup>er</sup> photon issu de la fluorescence de l'échantillon excité (Fig. 8A). Lors de l'excitation, un compteur électronique est déclenché au temps zéro (T<sub>0</sub>), moment de l'émission d'un pulse. Le premier photon émis par l'échantillon est ensuite détecté à l'aide de photodiode et le compteur mesure le délai entre l'émission du pulse et la détection du premier photon. L'opération est répétée à la fréquence de répétition du laser jusqu'à l'obtention d'un histogramme appelé aussi histogramme de déclin de fluorescence où chaque barre représente le nombre de photon arrivé dans un intervalle de temps donné après le pulse d'excitation (Fig. 8A). Cette technique est appelée « Time-correlated single photon counting » (TCSPC). L'exploitation des données de cet histogramme pour obtenir le temps de vie de fluorescence moyen peut se faire soit par un ajustement mathématique utilisant des fonctions exponentielles soit par une représentation graphique appelée "phasor plot" qui sera détaillée dans le chapitre 1 de ce manuscrit.

Dans ce projet, la technique de « Fluorescence-Lifetime Imaging Microscopy » (FLIM) a été utilisée pour acquérir les temps de vie des spores de *B. subtilis*. Cette technique de microscopie permet l'acquisition de temps de vie de l'échantillon observé en couplant excitation par un laser pulsé et TCSPC. Une excitation multiphotons a été utilisé comme décrit précédemment pour exciter l'échantillon. Le système ainsi que les appareils et filtres utilisés sont détaillés dans la section matériels et méthodes de la première partie du chapitre 1. En plus d'obtenir un histogramme de déclin de fluorescence, cette technique permet d'obtenir des images où les différents temps de vie sont représentés par différentes couleurs (Fig. 8B). La Figure 8B donne un exemple des images pouvant être obtenues sur des spores de *B. subtilis*. L'avantage du temps de vie c'est qu'il est indépendant de la concentration. On peut observer avec la même sonde fluorescente (ou de l'autofluorescence) des temps de vie différents sur un même échantillon traduisant plusieurs structures, tissus ou micro-environnements en fonction de la structure de l'échantillon observé. Dans le cas de la spore avec sa fluorescence naturelle, on observe par exemple un allongement des temps de vie au niveau du protoplaste au centre de la spore en comparaison des contours dont les temps de vie de fluorescence plus courts sont majoritairement ceux du manteau.

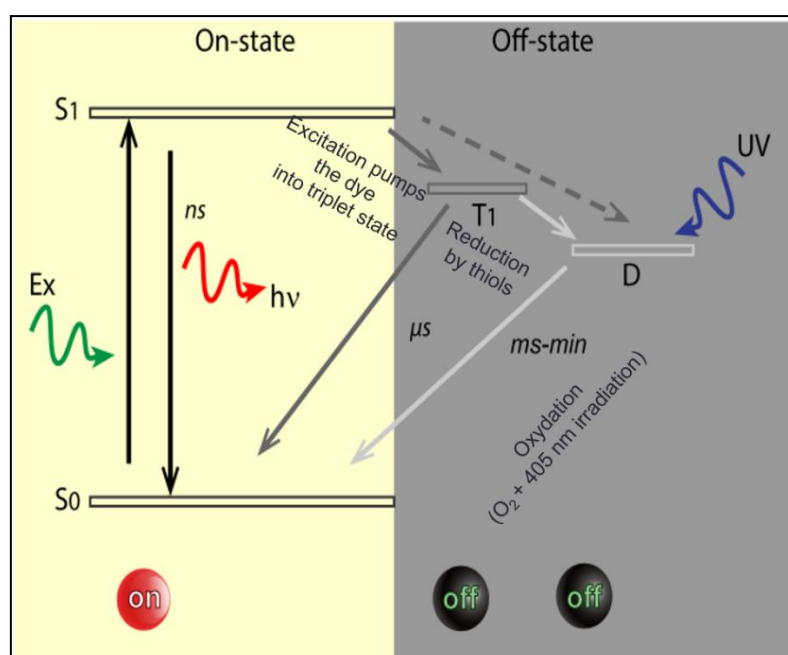


**Figure 8** : **A** : Illustration du principe de TCSPC. **B** : Image FLIM de spore de la souche sauvage de *B. subtilis*. Plusieurs régions avec des temps de vie différents peuvent être observées.

#### 4.6. Principe de la microscopie super résolution STORM/PALM

La microscopie photonique conventionnelle est limitée à une résolution maximale d'environ 250 nm. Cette limite, correspondant à la distance limite pour laquelle deux points peuvent être distingués l'un de l'autre, est due au fait que lorsqu'un objet ponctuel, comme une sonde fluorescente par exemple, émet une lumière, cette lumière va subir une diffraction lors de son passage dans l'objectif du microscope. Un point va alors donner une image diffractée que l'on appelle une tâche d'Airy. Le principe des techniques dites « pointillistes » repose sur la localisation individuelle des marqueurs fluorescents utilisés et donc de repérer dans ce cas le centre de la tâche d'Airy si elle est isolée. Pour cela, il est nécessaire d'employer des sondes fluorescentes particulières ayant la propriété de clignoter afin qu'elles ne soient pas toutes "allumées" en même temps. Ce sont généralement des molécules organiques de synthèse (STORM) ou des protéines fluorescentes photoactivables ou photoswitchables (PALM) (Hell *et al.*, 2015). La figure 9 décrit ce phénomène. Lors d'une excitation par un laser de longueur d'onde adaptée, les sondes fluorescentes vont recevoir suffisamment d'énergie pour passer de leur état basal ( $S_0$ ), état d'énergie minimum, à un état excité ( $S_1$ ) comme expliqué précédemment Fig. 7. Elles vont au bout de quelques nanosecondes réémettre de l'énergie sous forme de radiation et ainsi produire de la fluorescence, pour retourner à leur état basal ( $S_0$ ). Certaines d'entre elles, au lieu de revenir dans leur état fondamental par désexcitation radiative, passent dans un niveau d'énergie intermédiaire dit état triplet  $T_1$ . Cet état peut subir une réduction par le milieu et se transformer en état sombre (D - Dark), dans lequel les molécules

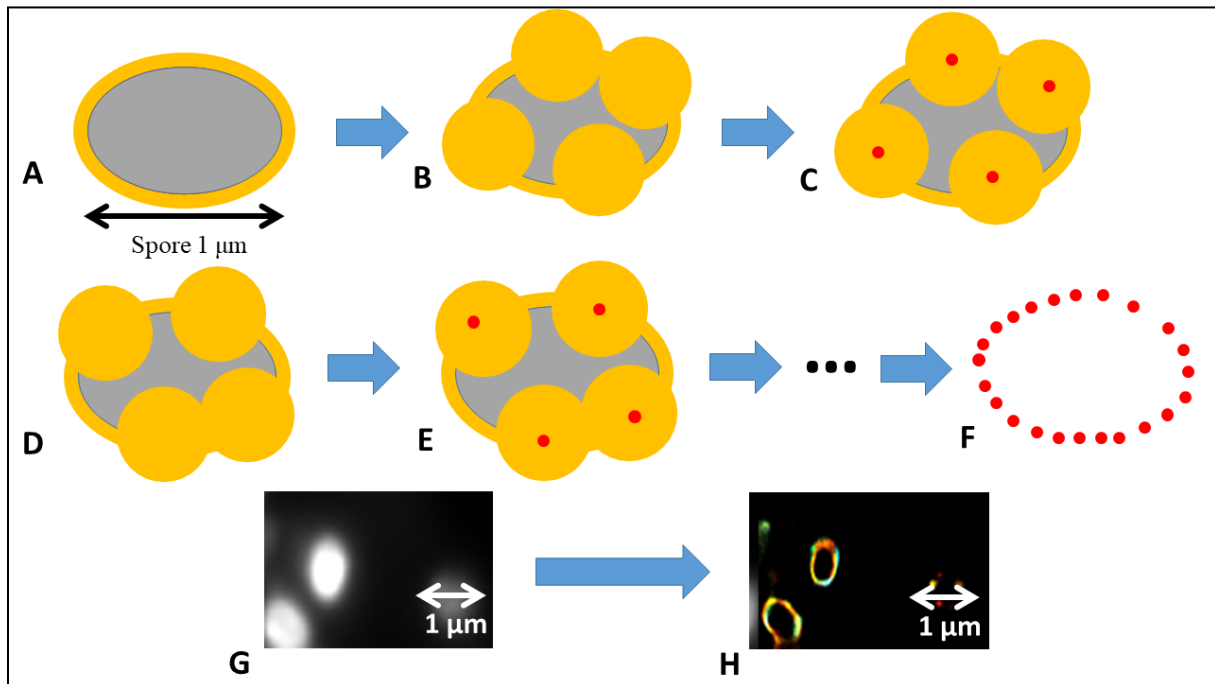
se retrouvent bloquées et ne peuvent fluorescer. La sortie de ces molécules de l'état sombre se fait de façon stochastique. Ainsi, seule une petite fraction des molécules émettra de la fluorescence à un moment donné, permettant leur détection individualisée. Ce phénomène est facilité par l'utilisation d'une solution tampon à pH 9 contenant peu d'oxygène. Pour provoquer le retour de ces molécules vers l'état basal, à partir duquel elles pourront à nouveau suivre le cycle d'excitation/déexcitation radiative (fluorescence), un laser à 405 nm est nécessaire pour provoquer l'oxydation de l'état sombre D (Nahidiazar *et al.*, 2016).



**Figure 9 : Cycle absorption-réémission d'énergie de molécules photoconvertibles/photoactivables (modifié d'après Nahidiazar, 2016)** S0 : état basal ; S1 : état excité ; Ex : excitation ; hv : émission radiative par la molécule ; T1 : état d'énergie intermédiaire dû à la formation d'un état triplet de la molécule ; D : état sombre dû à la réduction de la molécule à partir de sa forme triplet.

Lors d'une acquisition, les molécules fluorescentes vont redevenir actives de manière stochastique, c'est-à-dire que lors de l'excitation de l'échantillon, les molécules fluorescentes ne vont pas toutes fluorescer en même temps (Figure 10B). Ainsi, à un instant  $t$ , le logiciel d'analyse est en mesure de distinguer plusieurs taches d'Airy, chacune correspondant à une molécule fluorescente individuelle (Figure 10C). La position de ces molécules peut alors être déterminée avec une précision supérieure à la limite de résolution (environ 30 nm au lieu de 250 nm). Après un calcul de coordonnées, le logiciel garde en mémoire la localisation du centre de chacune des taches de diffraction. Puis les molécules fluorescentes vont s'éteindre et d'autres

s'allumeront jusqu'à obtenir suffisamment de points pour reconstruire une image de l'échantillon étudié (Figure 10D à F).



**Figure 10 : Principe de la technique de microscopie haute résolution PALM/STORM appliquée à la spore**  
**A** : spore avant excitation ; **B** : quelques molécules vont s'activer ; **C** : le logiciel calcule et garde en mémoire le centre de taches d'Airy correspondant chacune à la localisation d'une molécule fluorescente individuelle ; **D** : d'autres molécules différentes s'activent ; **E** : le logiciel calcule et garde en mémoire le centre de chacun des tâches d'Airy ; **F** : au bout de plusieurs cycles le logiciel compile l'ensemble des points collectés et recrée une image dite super résolue de la spore ; **G** : image de spore observée en microscopie photonique classique ; **H** : image de spore super résolue obtenue en STORM (marquage membranaire en Cy5).

#### 4.6.1. STORM

L'imagerie STORM nécessite l'emploi de molécules fluorescentes ayant la propriété de clignoter. De manière générale les fluorophores utilisés sont des molécules fluorescentes de la famille des Alexa, des cyanines, des Syto ou encore des Atto, ainsi que leurs dérivés, qui sont d'excellents fluorophores (brillants et peu sensibles à la photodégradation). Ces molécules sont généralement fonctionnalisées, c'est-à-dire couplé avec un ligand tel qu'un anticorps ou une lectine (Wheat Germ Agglutinin (WGA), concanavaline...) qui a pour rôle de s'accrocher sur la cible d'intérêt (protéine spécifique ou aux parties glucidiques des peptidoglycanes par exemple pour les lectines). A notre connaissance, aucune image super résolue n'a été publiée à ce jour avec les techniques PALM/STORM sur des spores bactériennes, bien que des images de fluorescence avec d'autres techniques de microscopie photonique aient déjà été obtenues. L'une des seules études trouvées dans la littérature montrant une image super résolue d'une

structure de la spore bactérienne, obtenue sur *Clostridium tyrobutyricum*, a été réalisée par une technique différente et moins résolutive, le 3D SIM (D'Incecco *et al.*, 2018). Cette étude a permis d'obtenir des images super-résolues du cortex de la spore de *C. tyrobutyricum* grâce à un marquage réalisé pendant sporulation, à l'aide de la sonde WGA-Alexa488. Par ailleurs, l'imagerie de fluorescence menée sur des bactéries végétatives se concentre en majorité sur des molécules ou des structures absentes chez la spore, et privilégie largement l'emploi de mutants (utilisation de protéines fluorescentes fusionnées à une molécule d'intérêt) (Jennings *et al.*, 2011; Cattoni, Fiche and Nöllmann, 2012; Andreas Gahlmann and W. E. Moerner, 2014; Gunsolus *et al.*, 2014; Altinoglu, Merrifield and Yamaichi, 2019).

Comparativement aux protéines de fusion compatibles avec la microscopie PALM, les sondes externes utilisées pour l'imagerie STORM offrent un meilleur marquage en termes d'intensité de fluorescence, de résistance à la photodégradation et de quantité de molécules marqués. Il en résulte une meilleure résolution en STORM qu'en PALM. Cependant, l'inconvénient majeur de cette technique réside dans la nécessité d'utilisation d'un tampon pour provoquer le clignotement des molécules, phénomène indispensable à cette technique de microscopie. Cette solution tampon est toxique pour les cellules vivantes, ce qui ne permet pas de réaliser des observations *in vivo*. Les premières phases de germination de la spore bactérienne étant purement mécanique, elles pourraient cependant être observées par cette technique.

### 4.6.2. PALM

L'avantage majeur de la technique PALM par rapport au STORM pour l'imagerie des spores bactériennes est que les protéines fluorescentes compatibles avec cette technique ne nécessitent pas de tampon d'oxydo-réduction lors de l'acquisition des images, ce qui permet l'observation *in vivo* des cellules. Cependant, cette technique offre une résolution légèrement inférieure à celle du STORM car ces protéines fluorescentes émettent généralement une intensité de fluorescence inférieure à celle des sondes organiques externes utilisé en STORM. De plus leur synthèse est dépendante de la machinerie cellulaire et du choix des signaux d'expression (promoteur, RBS, ...) insérés lors de la construction. Le PALM nécessite la construction de souches recombinantes à l'aide d'outils de biologie moléculaire dont la mise en œuvre peut être très longue et compliquée. Néanmoins, une fois les mutants créés et validés, leur utilisation pour imager les structures d'intérêt est très simple car elle ne nécessite pas de préparation d'échantillons particulière, contrairement au marquage par des sondes externes.





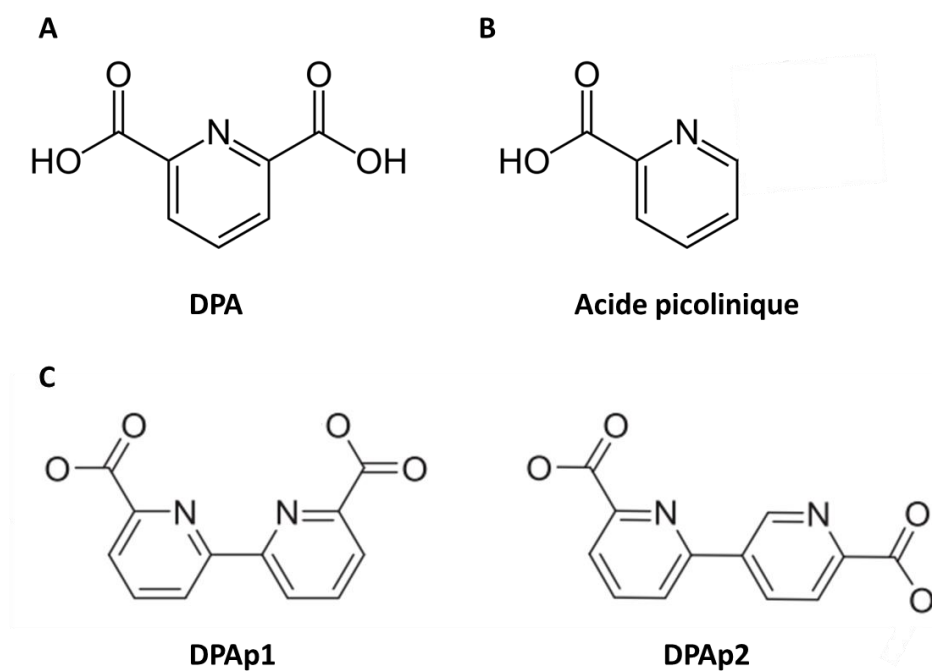


# **Chapitre 1**

**Les photoproduits du DPA  
(DPAp) – Identification, suivi  
de leur formation et effets  
biologiques**

### I.1. Introduction

L'acide dipicolinique (DPA) est une molécule spécifique à la spore bactérienne. Cette molécule semble impliquée dans la résistance des spores bactériennes face à une exposition aux UV (Slieman and Nicholson, 2001b; Douki, Setlow and Setlow, 2005). Cependant, des zones d'ombres demeurent concernant les mécanismes d'action relatifs aux dégâts photochimiques induits par les UV sur l'ADN. Il a en effet été montré qu'en présence de DPA, des spores en solution exposées aux UVc sont plus sensibles à ce stress que des mutants ne possédant pas de DPA. Le DPA apparaît donc comme un photosensibilisateur. Pourtant, l'effet inverse est observé si les spores sont exposées en condition sèche (Slieman and Nicholson, 2001b). Le DPA semble alors être dans ce cas photoprotecteur. Ce double rôle n'a pour le moment pas d'explication. Par ailleurs, il a été montré depuis plusieurs années qu'exposer le DPA à un rayonnement UV induit la formation d'une multitude de photoproduits, appelés photoproduits du DPA (DPAp), dont certains sont fluorescents. Or à notre connaissance, très peu d'études dédiées aux DPAP ont vu le jour. Récemment un laboratoire a toutefois réussi à identifier et synthétiser deux DPAP (Nardi *et al.*, 2021), qui semblent être issus de la fusion de deux acides picoliniques (Fig. 11). Une précédente étude avait déjà proposé l'acide picolinique comme étant un possible photoproduit du DPA exposé aux UV (Noell *et al.*, 2015). L'un des photoproduits identifié appelé DPAP1 (Fig. 11C) a été caractérisé comme photosensibilisateur de l'ADN, suggérant que certains DPAP pourraient ainsi être impliqués dans la résistance des spores aux UV. Le peu d'études s'étant intéressées à ces molécules ont surtout réalisé des expériences *in vitro* sur des solutions de DPA de synthèse exposées aux UVc (Nudelman, Bronk and Efrima, 2000; Sarasanandarajah *et al.*, 2005). Il existe un vrai manque de données concernant la formation *in vivo* de ces molécules et leur influence dans la survie de la spore. La plupart des méthodes disponibles pour tracer les photoproduits sont destructives pour les spores. Il existe peu de méthodes permettant d'étudier dans des conditions biologiques les photoproduits formés *in vivo*. Un des objectifs des travaux présentés dans ce chapitre consistait à améliorer le suivi de la formation des photoproduits dans la spore en étudiant la fluorescence de ces molécules. Au laboratoire, un projet mené par M. Pacheco (doctorant de l'équipe) s'est intéressé à suivre la fluorescence de molécules telles que les DPAP. Une collaboration a alors vu le jour pour éclairer sur ce que sont vraiment ces DPAP et sur leur impact dans la résistance des spores face à un stress lumineux.



**Figure 11 :** Formules chimiques du DPA (A), de l'acide picolinique (B) et des deux DPAp identifiés en 2021 nommés DPAp1 et DPAp2 (Nardi *et al.*, 2021).

Ce chapitre présente dans un premier temps les résultats d'un article écrit en collaboration avec M. Pacheco, doctorant du laboratoire travaillant sur la mise au point d'outils spectroscopiques pour le suivi de la fluorescence de molécules dans des milieux complexes, telles que le DPA dans la spore (Pacheco, 2022). Le but de cette première étude a été d'identifier les DPAp produits lors d'une exposition UVc, caractériser la fluorescence de ces photoproduits et de mettre au point un protocole de suivi de la formation des photoproduits directement sur les spores. La seconde partie du chapitre est quant à elle focalisée sur la caractérisation des effets biologiques des DPAp dans la spore bactérienne et est présentée sous la forme d'un article.

## **I.2. Etude 1 : Identification des DPAp *in vitro* et caractérisation de leur fluorescence *in vivo***

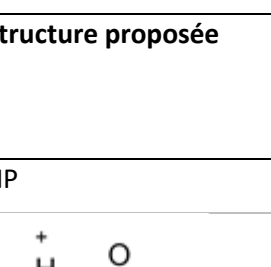

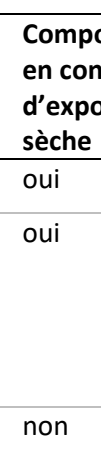
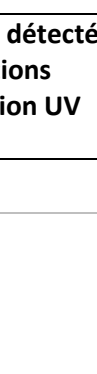

### I.2.1. Introduction : identification des DPAp *in vitro*

La première partie de ce chapitre est consacrée à l'identification des DPAp formés lors d'une exposition du DPA aux UVc. Tous les résultats présentés dans cette section 1.2. ont été publiés sous forme d'un article dans le journal « Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy », consultable avec le DOI <https://doi.org/10.1016/j.saa.2022.121502> dont M. Pacheco a réalisé les expérimentations en spectrométrie de masse ainsi que certaines analyses de temps de vie de fluorescence. Ma propre

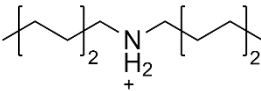
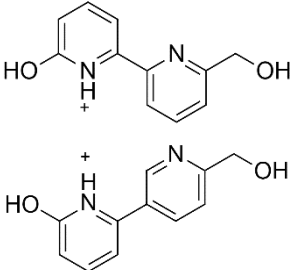
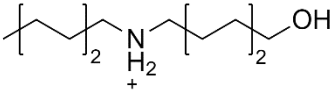
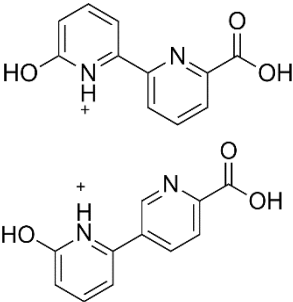
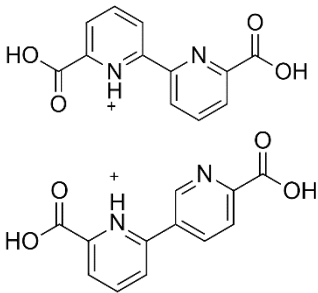
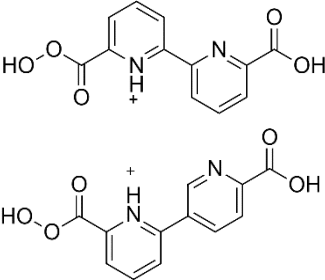
contribution à ce travail a été d'améliorer la méthode de suivi de formation des DPAP *in vivo* déjà mise au point dans la littérature par suivie de l'intensité de fluorescence (Nudelman, Bronk and Efrima, 2000; Sarasanandarajah *et al.*, 2005). Pour ce faire, la mesure d'intensité de fluorescence a été couplé avec à l'étude des temps de vie de fluorescence utilisé *in vitro* par M. Pacheco. Les résultats de spectrométrie de masse, indispensables à l'identification des DPAP, sont résumés ci-dessous en guise d'introduction des résultats *in vivo* de l'article.

Les résultats de spectrométrie de masse réalisés sur du DPA exposé aux UVc ont permis d'identifier une dizaine de nouveaux DPAP, dont les DPAP1 et DPAP2 identifiés dans une précédente étude (Nardi *et al.*, 2021) (Tab. 1). Ces résultats montrent que beaucoup des DPAP identifiés semblent être issus de la dimérisation de deux acides picoliniques.

**Tableau 1:** Liste des composés trouvés par spectrométrie de masse, par injection directe de la solution de DPA après une heure de traitement UVc en condition sèche. ND : non déterminé. NP : Non proposé. a.u.: unité arbitraire. Plus les valeurs Err [ppm] et mSigma sont faibles, plus la correspondance est forte (extrait et modifié du manuscrit de thèse de M. Pacheco (Pacheco, 2022))

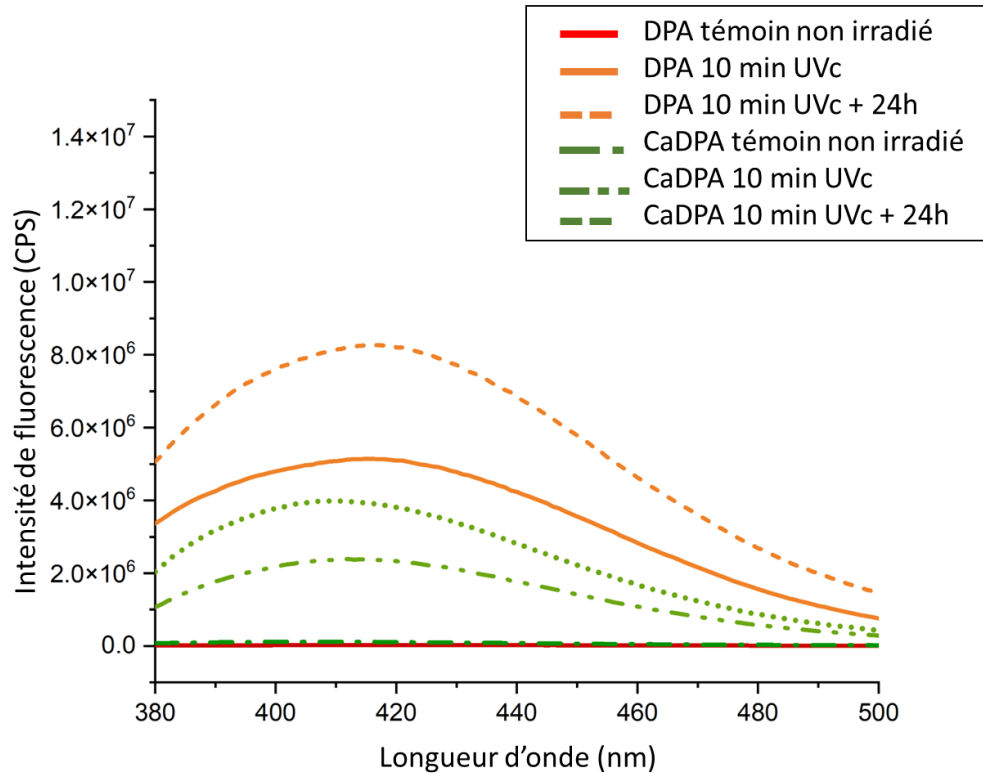
$m/z_{\text{experimental}} [M+H]^+$	Err [ppm]	mSigma	Formule brute proposée	Structure proposée	Composé détecté en conditions d'exposition UV sèche	Composé détecté en conditions d'exposition UV humide
122.0236	0.7	5.8	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> NO <sub>2</sub>	NP	oui	oui
124.0392	0.8	3.7	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> NO <sub>2</sub>		oui	oui
130.1589	0.7	2.5	C <sub>8</sub> H <sub>20</sub> N		non	oui
150.0184	1.2	1.1	C <sub>7</sub> H <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	NP	oui	oui
157.0758	1.1	3.6	C <sub>10</sub> H <sub>9</sub> N <sub>2</sub>		oui	oui
168.0290	0.6	1.5	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> NO <sub>4</sub>		oui	oui
182.0447	0.2	n.a.	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> NO <sub>4</sub>		oui	oui

## Chapitre 1 – Etude 1

186.2217	-0.3	0.6	C <sub>12</sub> H <sub>28</sub> N		oui	oui
190.0110	-8.2	12.9	C <sub>4</sub> H <sub>4</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub>	NP	oui	oui
201.0658	0.5	1.7	C <sub>11</sub> H <sub>9</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>		oui	oui
202.2165	0.3	12.9	C <sub>12</sub> H <sub>28</sub> NO		non	oui
217.0607	0.4	13.5	C <sub>11</sub> H <sub>9</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>		non	oui
245.0556	0.2	13.3	C <sub>12</sub> H <sub>9</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>		non	oui
261.0505	0.5	15.2	C <sub>12</sub> H <sub>9</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>		non	oui
270.5129	ND	ND	NP	NP	oui	oui
372.9975	ND	ND	NP	NP	oui	oui

Par ailleurs, une forme instable du DPA, qui peut probablement être qualifiée de DPAP, semble être également obtenue après une exposition *in vitro* du DPA. Cette instabilité

expliquerait l'augmentation de la fluorescence de la solution irradiée constatée quelques heures après l'exposition UV (Fig. 12). Ces résultats montrent également que la formation de DPAP peut être suivie *in vitro* par une augmentation de l'intensité de fluorescence.



**Figure 12 :** Spectres d'émission de fluorescence du DPA (10 mM) et du CaDPA (50 mM),  $\lambda_{ex}$  = 300 nm. Les lignes rouge (DPA) et vert foncé (CaDPA) ont été obtenues avant traitement UVc (irradiation de 10 min. à 0.120 J/cm<sup>2</sup>). Les lignes pleines orange et vert clair correspondent aux spectres d'émission de DPAP et CaDPAP après irradiation. Les spectres annotés « + 24h » proviennent des mêmes échantillons après 24h.

L'objectif suivant a été d'appliquer cette méthode de suivi de la formation des DPAP directement sur des spores en la couplant à l'étude des temps de vie de fluorescence.

### I.2.2. Matériel et méthodes

#### I.2.2.1. *Souches bactériennes et conditions de culture*

Les souches PS533 (type sauvage), PS4150 et FB122 de *B. subtilis* ont été utilisées dans cette étude. La souche PS533 a été obtenue grâce à la donation de P. Setlow du département de biologie moléculaire, microbienne et structurale du Centre de la santé de l'Université du Connecticut, aux États-Unis. Cette souche porte un plasmide codant pour la résistance à la kanamycine. PS4150 est une souche mutante considérée sans manteau protéique en raison de la délétion des séquences codantes *cotE* et *gerE*, ce qui rend cette souche très peu

autofluorescente (Ghosh *et al.*, 2008). FB122 est une souche mutante considérée sans DPA grâce à la délétion de l'opéron *spoVF* et du gène *SleB* (Paidhungat *et al.*, 2000). Les deux souches mutantes PS4150 et FB122 contiennent également deux cassettes de résistance, une pour la spectinomycine et l'autre pour la tétracycline.

Pour la production de spores, les différentes souches ont d'abord été isolées sur un milieu agar LB contenant des antibiotiques (10µg/mL de kanamycine pour PS533, spectinomycine 100 µg/ml + 10µg/mL de tétracycline pour PS4150 et FB122) à 37°C pendant 12 heures. Une colonie isolée a ensuite été placée sur un milieu liquide Schaeffer's-glucose double force (2xSG) à 37°C sous agitation jusqu'à ce qu'elle atteigne une DO de 0,6. Ensuite, la culture a été diluée 10 fois sur un milieu 2xSG frais et incubée sous agitation pendant 5 jours à 37°C. Toutes les spores purifiées ont été lavées au moins 3 fois avec de l'eau distillée stérilisée à 4°C jusqu'à atteindre 98% de pureté (vérifié au microscope à contraste de phase) et ont été stockées à 4°C.

### *1.2.2.2. Protocole d'exposition aux UVc*

L'exposition aux UVc a été réalisée à l'aide d'un système d'irradiation UV CROSSLINKER® CL-508 (UVItec Ltd, UK) à 254 nm, avec un flux de 0,120 J/cm<sup>2</sup>. Chacune des suspensions de spores (500 µl) ont été exposée aux UVc dans une cuvette en quartz, pendant un temps défini. Pour éviter un effet d'écran (« shielding effect ») dû à une concentration élevée de spores (Reidmiller *et al.*, 2003), les suspensions ont été ajustées à une concentration de 10<sup>7</sup> spores/ml.

### *1.2.2.3. Vérification de la non perméabilisation des spores par dosage du DPA in vivo*

Après avoir été exposées aux UVc, les spores ont été centrifugées 15 minutes à 12 000 g. Le surnageant contenant potentiellement du DPA si les spores se sont perméabilisées suite à une exposition aux UVc trop intense, a ensuite été récolté. Le dosage du DPA a été effectué selon le protocole proposé par Hindle and Hall, 1999. Le surnageant a ensuite été dilué au quart dans un tampon acétate de sodium 1M (C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>NaO<sub>2</sub>-3H<sub>2</sub>O, Sigma-Aldrich, Allemagne, 136,08 g/mol, pureté > 99 %) pH 5,6, contenant 30 µmM de terbium (TbCl<sub>3</sub>, Sigma-Aldrich, Allemagne, 373,38 g/mol, pureté = 99,9 %). Les spectres d'émission de fluorescence ont été acquis sur un spectrophotomètre Jobin Yvon FluoroMax-4 (Horiba Scientific, Kyoto, Japon). Les longueurs d'onde d'excitation et d'émission étaient respectivement de 280 ± 10 nm et 545 ± 5 nm. Une lame de verre a été placée devant le détecteur pour filtrer la diffusion Rayleigh de l'excitatrice dans l'eau.



### *1.2.2.4. Fluorescence Lifetime Imaging (FLIM)*

Les images de durée de vie de fluorescence ont été collectées à l'aide d'un module de comptage de photons uniques corrélés dans le temps (TCSPC) (Picoquant, Allemagne) sur un microscope à balayage Nikon A1-MP équipé d'un objectif Plan Apo IR x 60 (NA : 1,27, immersion dans l'eau, Nikon, Japon), à une vitesse de balayage de 1 image par seconde. Une excitation de 700 nm a été fournie par un laser IR (Chameleon, Coherent, Californie) délivrant des impulsions d'environ 100 femtosecondes à une fréquence de répétition de 80 MHz. L'émission de fluorescence des spores a été collectée sur trois canaux de détection : FF01-492/SP-25 (400-492 nm), FF03-525/50-25 (500-550 nm) et FF01-575/25-25 (563-588 nm) (Semrock, États-Unis). Pour l'imagerie de la durée de vie de fluorescence, la fluorescence a été collectée à travers un filtre d'émission passe-bande 680/SP (Semrock, USA). L'enregistrement TCSPC a été effectué sur 200 canaux temporels (résolution finale de 64 ps). Nous avons effectué l'acquisition d'images de durée de vie de fluorescence sur les spores en utilisant le logiciel Symphotime (Picoquant, Allemagne). Les durées de vie de fluorescence ont ensuite été déterminées en utilisant le logiciel MAPI.

### *1.2.2.5. Analyse de la fluorescence résolue dans le temps*

L'analyse de la durée de vie de la fluorescence a été effectuée en utilisant la représentation en diagramme de phase « phasor plot » fournie par le logiciel MAPI (IRI, USR 3078 CNRS, BCF, disponible sur demande à l'adresse suivante : <http://biophotonique.univ-lille1.fr/spip.php?rubrique60>)(Leray *et al.*, 2013).

### *1.2.2.6. Représentation phasor plot*

Le diagramme de phase « phasor plot » est une représentation graphique des données brutes de la TCSPC dans un espace vectoriel obtenu par la décomposition mathématique de la transformée de Fourier. Chaque courbe de décroissance de fluorescence est convertie en coordonnées [g ; s], calculées par les transformées en cosinus et en sinus de la décroissance de l'intensité de fluorescence mesurée  $I(t)$ , définies par :

$$g(\omega) = \frac{\int_0^T I(t) \cdot \cos(n\omega t) dt}{\int_0^T I(t) dt}$$

$$s(\omega) = \frac{\int_0^T I(t) \cdot \sin(n\omega t) dt}{\int_0^T I(t) dt}$$

Où «  $\omega$  » est la fréquence angulaire de répétition du laser, «  $n$  » la fréquence harmonique et «  $T$  » la largeur finie de la fenêtre de mesure temporelle. Pour une décroissance mono-exponentielle, les coordonnées [g ; s] sont situées sur un demi-cercle centré sur le point [0,5 ; 0] avec un rayon de 0,5. Alors que pour une décroissance multi-exponentielle, les coordonnées [g ; s] ne seront plus situées sur le demi-cercle mais à l'intérieur de ce demi-cercle. Dans le demi-cercle, les courtes durées de vie de fluorescence sont proches des coordonnées [1;0], et les longues durées de vie de fluorescence se rapprochent de l'origine [0;0].

### *I.2.2.7. Analyse statistique*

L'intensité de fluorescence des spores bactériennes a été analysée statistiquement avec une analyse de variance (ANOVA réalisée avec Origin® (OriginLab®, USA),  $p < 0,05$ ) pour évaluer les différences significatives avant et après l'irradiation UVc.

### I.2.3. Résultats et discussion

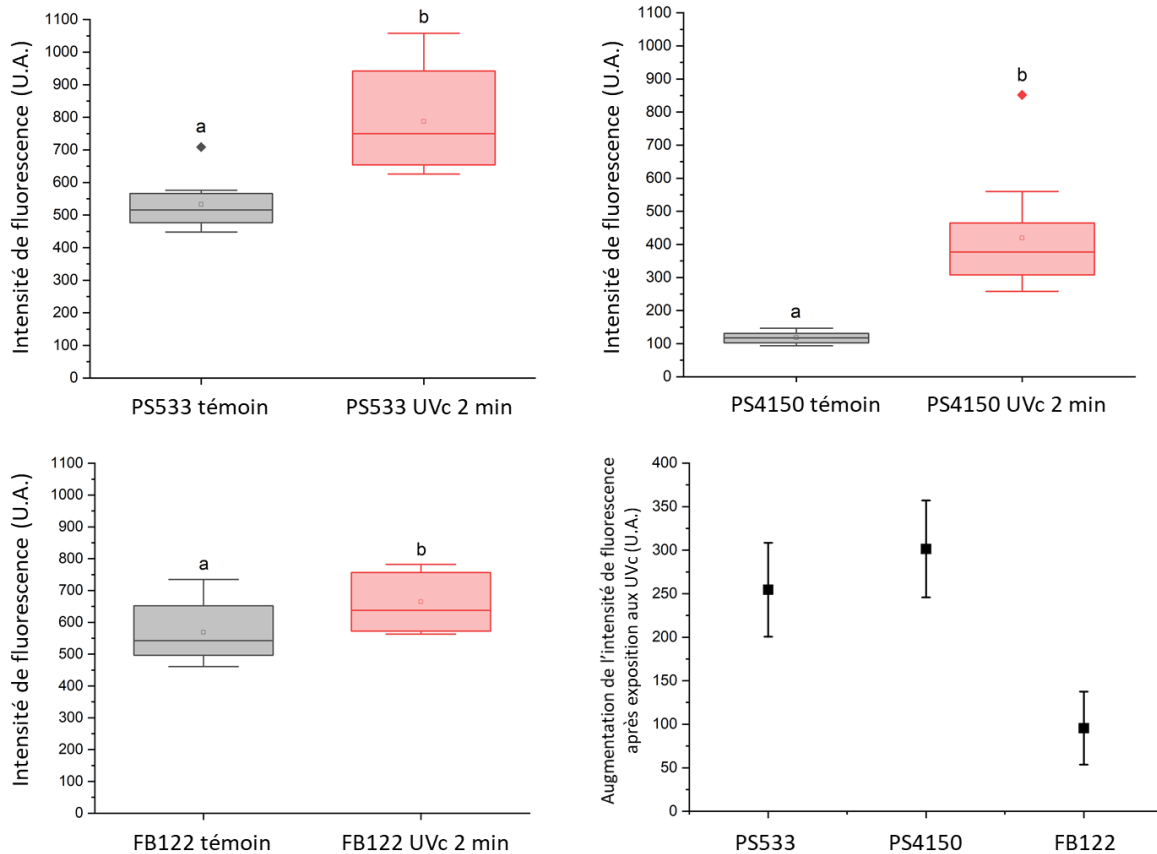
Les résultats *in vitro* ont permis d'observer la formation de photoproduits après exposition du DPA aux UVc par mesure de fluorescence. L'objectif est ici d'observer si en conditions *in vivo* la formation de photoproduits par le CaDPA contenu dans le protoplaste de la spore peut également être visible et caractérisée. Le traitement appliqué *in vitro* (0,120 J/cm<sup>2</sup> pendant 10 min) est considéré létal (>99% de mortalité) sur les spores. Ce genre de forte exposition aux UV pourrait entraîner une perméabilisation des spores qui relâcheraient alors leur CaDPA et les photoproduits formés dans le milieu. Un test de vérification a été réalisé en amont pour observer si le CaDPA et ses photoproduits fluorescents n'étaient pas libérés à l'extérieur de la spore après ce traitement UVc. Les spores ont été centrifugées après exposition aux UV et le CaDPA a été dosé dans le surnageant comme décrit dans la section C du matériel et méthodes. Aucune libération de CaDPA n'a été détectée, sauf pour la souche PS4150 qui a montré une perméabilisation partielle, en libérant une très petite partie de son contenu en CaDPA (données non montrées). Cette libération de CaDPA après exposition aux UVc peut s'expliquer par un impact plus important des UVc sur la structure des spores de la souche PS4150, en particulier sur la membrane interne, en raison de l'absence du manteau des spores. Le traitement a donc été réduit à un temps d'exposition de 2 minutes, ce qui permet à la souche PS4150 de ne pas se perméabiliser. En effet, quelques secondes suffisent à inactiver 90% de la suspension de spores. Pour 30 secondes de traitement, l'inactivation est déjà supérieure à 99%

de la population. Bien que le traitement soit létal, il a permis aux spores de conserver leur CaDPA. Cependant, des traitements plus courts en termes de temps d'irradiation, et surtout à dose non létale, n'ont pas permis de distinguer clairement l'augmentation de l'intensité de fluorescence.

La figure 13 montre les variations de l'intensité de fluorescence après 2 minutes d'exposition aux UVc à 0,120 J/cm<sup>2</sup> pour toutes les souches. Une augmentation est observée dans tous les cas. Pour la souche sauvage PS533, la valeur moyenne de l'intensité de fluorescence passe de 532 à 787 (u.a. - unité arbitraire) (Fig. 13.A). La souche PS4150, dont le manteau est fortement dégradé, sert de témoin non autofluorescent. En effet, l'augmentation de l'intensité observé de cette souche n'est pas influencée par l'autofluorescence du manteau et est donc probablement due en majeure partie à la formation du photoproduit du CaDPA. La valeur moyenne d'intensité de fluorescence de cette souche passe de 117 à 419 (u.a.) (Fig. 13.B). La figure 13.C montre que la souche sans CaDPA, FB122, est celle qui a connu la plus faible augmentation. Sa valeur moyenne d'intensité de fluorescence est passée de 568 à 664 (u.a.). Ces résultats permettent de vérifier qu'*in vivo* la formation de photoproduits du CaDPA semble bien avoir lieu. En effet la souche FB122, présente la plus faible augmentation de l'intensité de fluorescence après irradiation, qui est d'environ  $95 \pm 41$  (u.a.) (Fig. 13.D). Cette faible augmentation pourrait être générée par la faible présence résiduelle de CaDPA dans cette souche (Paidhungat *et al.*, 2000) ou par la production de photoproduits fluorescents issus d'une autre molécule que le CaDPA. Cette faible augmentation de l'intensité de fluorescence de la souche FB122 couplée au fait que l'augmentation de l'intensité de la fluorescence pour les spores PS533 et PS4150, est respectivement de  $254 \pm 53$  (u.a.) et  $301 \pm 55$  (u.a.) suggère que la formation de CaDPAp semble bien avoir lieu lors d'une exposition *in vivo* aux UVc.

Ces résultats permettent également d'observer l'influence du manteau dans la formation de photoproduits fluorescents. La souche PS4150 présente en effet une augmentation de l'intensité de fluorescence beaucoup plus importante que les autres souches, 20 % de plus que les PS533 (Fig. 13.D). L'hypothèse ici est que le manteau pourrait potentiellement absorber une partie des UVc, ce qui pourrait expliquer que l'augmentation d'intensité de fluorescence due à la formation de photoproduits fluorescents soit significativement moins importante pour les souches possédant un manteau. Plusieurs publications ont déjà montré que le manteau des spores de différentes espèces pouvait avoir un effet dans la résistance aux UV (UVb et UVa) en absorbant une partie grâce à des pigments (Riesenman and Nicholson, 2000; Moeller *et al.*, 2005; Cortesão *et al.*, 2019). Cependant la spore de *B. subtilis* ne possède pas de pigments

et il n'a jamais été montré que l'absence de manteau engendre une plus grande sensibilité aux UVc. L'autre hypothèse, pourrait être que l'autofluorescence du manteau cache simplement une partie de la fluorescence des photoproduits formés lors de l'exposition aux UVc.

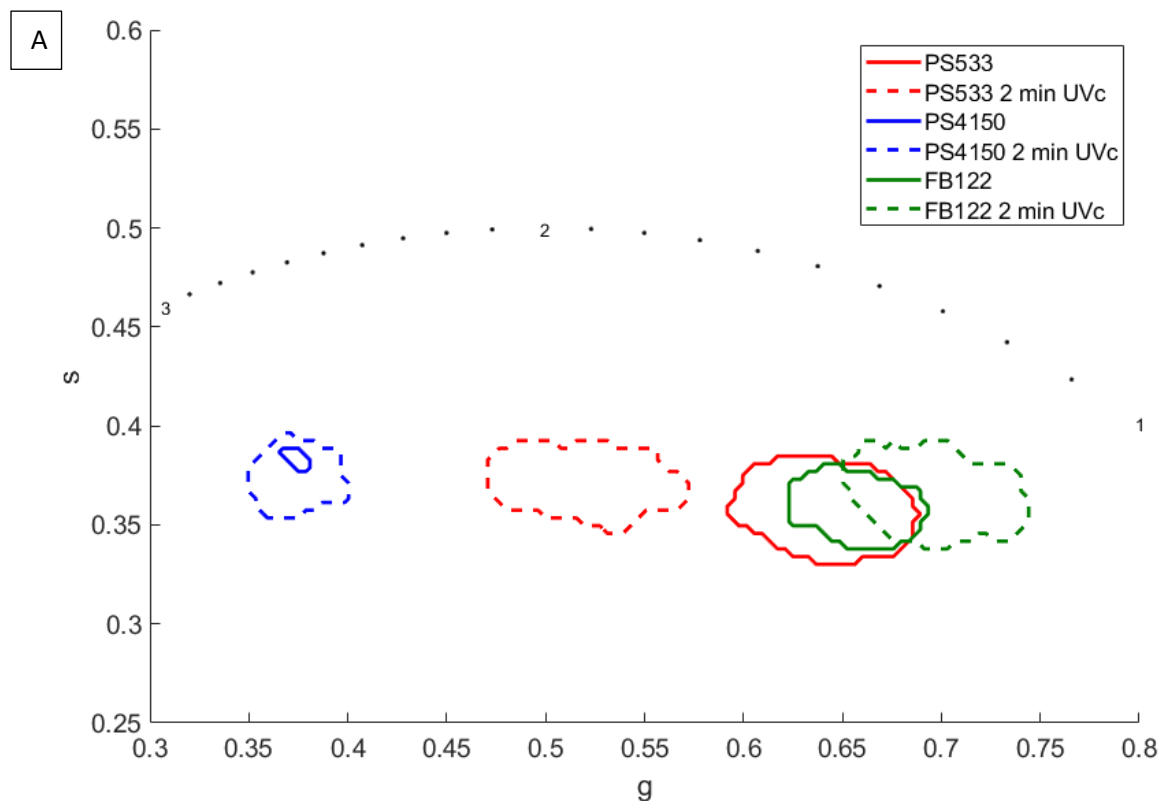


**Figure 13** : Intensité de fluorescence des spores bactériennes (N=10) avant et après irradiation pour les souches PS533 (type sauvage) (A), PS4150 (sans manteau) (B), FB122 (sans CaDPA) (C). Augmentation des valeurs d'intensité de fluorescence après irradiation pour chaque souche (D). Les lettres différentes au-dessus du box plot (a,b) représentent des différences significatives ( $p=0,05$ ) entre les conditions. (Modifié et traduit de l'article co-écrit avec M. Pacheco).

Pour caractériser plus en détail la fluorescence *in vivo* des photoproduits du CaDPA, une projection « phasor plot » a été réalisée afin de pouvoir observer les déplacements des durées de vie de fluorescence en fonction de l'irradiation Fig. 14(A). Cette projection nous permet de mettre en évidence l'allongement des durées de vie de fluorescence de la souche PS533 qui s'est déplacée principalement sur un axe horizontal, suggérant une augmentation de la proportion de longues durées de vie de fluorescence. Les temps de vie de la souche PS4150 semblent eux se déplacer faiblement vers l'intérieur du demi-cercle, ce qui signifie l'apparition de durées de vie de fluorescence multiples. Pour la souche FB122, l'irradiation n'a pas semblé

déplacer la représentation du diagramme de phase vers des valeurs plus élevées, mais au contraire l'a fait évoluer vers une plus grande proportion de temps de vie fluorescents courts. En l'absence de CaDPA, cet effet observé pourrait être dû à d'autres composés. En effet une précédente étude a montré que les protéines du manteau peuvent être impactées lors d'une exposition aux UVc (Elegbeleye *et al.*, 2021). Cette photochimie des protéines du manteau (par la production de photoproduits fluorescents par exemple) ou encore la formation de photoproduits par d'autres molécules avec des temps de vie de fluorescence plus courts pourrait être la cause des résultats observés. Le tableau associé, Fig. 14(B), montre les durées de vie moyennes de fluorescence obtenues pour toutes les souches étudiées. Pour la souche PS533, la durée de vie moyenne de la fluorescence a augmenté de  $1,54 \pm 0,15$  ns à  $1,85 \pm 0,19$  ns. La durée de vie moyenne de la fluorescence des deux autres souches n'a pas beaucoup changé. Les durées de vie de fluorescence constantes de la PS4150 avant et après l'irradiation pourraient être expliquées par une production plus faible de photoproduits, mais cela n'est pas cohérent avec les changements d'intensité rapportés (Fig 13). Les protéines du manteau semblent avoir des temps de vie court lorsque l'on compare les souche PS533 et FB122 témoins à la souche PS4150 témoin. Au contraire, les CaDPAP semblent augmenter le temps de vie de fluorescence lorsque l'on compare les PS533 avant et après irradiation (Fig. 14). En l'absence de ces courtes durées de vie de fluorescence provenant des protéines du manteau, le temps de vie de fluorescence global des spores PS4150 est déjà très long et complètement décalé sur la gauche du diagramme avant exposition au UVc. Une explication possible pourrait être que l'exposition aux UVc de la souche PS4150 entraîne bel et bien la production de CaDPAP comme le montre l'augmentation d'intensité de fluorescence Fig. 13, mais que le temps de vie global des PS4150 ne sera pas modifié à cause de l'absence du manteau. Le décalage de temps de vie à cause de l'absence du manteau masquerait ainsi la formation des CaDPAP dont les temps de vie longs se confondrait avec le temps de vie de fluorescence résiduel de la spore. Pour appuyer cette hypothèse, il est connu que le pH à l'intérieur de la spore bactérienne, est aux alentours de pH6 (Setlow and Setlow, 1980; Magill *et al.*, 1994). Or, il a été montré au laboratoire qu'une solution de CaDPA exposé aux UVc dans un tel environnement, montre une durée de vie moyenne de fluorescence de 3,2 ns. Ces durées de vie sont supérieures à celles de la spore avant irradiation pour les souches PS533 et FB122. Ceci donc permet d'expliquer l'augmentation de la durée de vie par l'apparition de photoproduits qui allongent les durées de vie de fluorescence globale des spores de la souche PS533, et pourrait expliquer le léger changement pour la souche PS4150. Ainsi, l'exposition aux UVc semble finalement n'augmenter de manière significative que la durée de vie de la fluorescence de la souche PS533. Cette observation est probablement rendue

possible grâce aux temps de vie de fluorescence courts des protéines du manteau qui contrebalancent les longues durées de vie des photoproduits formés durant l'exposition des spores aux UVc.



	$\tau_{\text{moyen}}$ avant UVc (ns)	$\tau_{\text{moyen}}$ après UVc (ns)
<b>PS533</b>	$1.54 \pm 0.15$	$1.85 \pm 0.19$
<b>PS4150</b>	$2.91 \pm 0.24$	$2.93 \pm 0.32$
<b>FB122</b>	$1.48 \pm 0.13$	$1.43 \pm 0.16$

**Figure 14 :** (A) Projection phasor plot avant exposition aux UVc (ligne pleine) et après exposition aux UVc (ligne pointillée) pour chaque souche : PS533 (rouge), PS4150 (bleu) et FB122 (vert). Où g et s représentent les valeurs aux deux coordonnées [g;s] du tracé en phasor. (B) Tableau : Temps de vie de fluorescence moyens ( $\tau_{\text{moyen}}$ ) obtenus par projection phasor pour toutes les souches utilisées avant et après irradiation (0,120 J/cm<sup>2</sup> pendant 2 min). (Modifié et traduit de l'article co-écrit avec M. Pacheco).

## I.2.4 Conclusions de la première étude

Cette étude a permis dans un premier temps d'identifier une dizaine de nouveaux DPAP ainsi que d'observer la structure de ces molécules. Ces résultats sont importants pour comprendre d'où vient l'augmentation d'intensité de fluorescence observée après exposition du DPA aux UVc. Les premiers résultats ayant été acquis *in vitro* sur des solutions de DPA, la seconde partie de l'étude réalisée *in vivo* a permis de recentrer l'effet des UVc sur les spores bactériennes. Il a

## Chapitre 1 – Etude 1

ainsi été montré que les spores exposées aux UVc voyaient leur intensité et leur temps de vie de fluorescence augmenter. Ces phénomènes ont été attribués à la formation de CaDPAP. Les photoproduits responsables de cette augmentation de la fluorescence sont probablement ceux composés d'un double cycle pyridine (Tab. 1). Ce travail a permis de développer une nouvelle méthode de suivi de la formation des photoproduits dans le protoplaste de spores par l'utilisation du temps de vie de fluorescence. Il met également en évidence les avantages de l'utilisation de la microscopie à fluorescence et de l'imagerie de durée de vie de fluorescence pour étudier le compartiment interne des spores bactériennes. Ce protocole ouvre la possibilité de travailler plus en profondeur l'influence des photoproduits du DPA sur la spore.

### **I.3. Etude 2 : Caractérisation des effets biologiques des DPAP dans la spore bactérienne**

Le projet ayant pour but d'étudier la résistance des spores aux UV à travers la photochimie du CaDPA, l'objectif suivant a été de réaliser une étude pour caractériser les effets biologiques des photoproduits en s'appuyant sur les résultats précédents. La grande difficulté de cette étude résidait dans le fait que la production de DPAP *in vivo* nécessite l'exposition des spores aux UVc. Comme il l'a été décrit dans la première étude de la section 1.2. de ce chapitre, un protocole permettant de suivre l'apparition de photoproduits dans les spores à travers des observations d'une augmentation de l'intensité et du temps de vie de fluorescence des spores a été mis en place. Cependant, l'application de doses létales est nécessaire pour observer la formation des photoproduits à l'intérieur des spores avec ce protocole. Ce stress a un effet global en impactant significativement d'autres molécules de la spore que le CaDPA, pouvant même provoquer une perméabilisation des spores à des doses plus élevées. Il est alors difficile de distinguer les effets dû uniquement aux photoproduits formés. La mise au point d'un protocole permettant de s'affranchir de l'exposition des spores aux UVc tout en produisant des photoproduits a été nécessaire. Les résultats de cette étude sont présentés sous la forme d'un article qui a fait l'objet d'une publication dans le journal « Journal of photochemistry and photobiology : B », consultable en ligne avec le DOI suivant : <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2022.112569>

---



# **Uptake of UVc induced photoproducts of Dipicolinic Acid by *Bacillus subtilis* spores – effects on the germination and UVc resistance of the spores.**

J. Dikec,<sup>1</sup> M. Pacheco,<sup>1</sup> M. Lavaud,<sup>1,2</sup> P. Winckler,<sup>1,2</sup> JM Perrier-Cornet<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>UMR Procédés Alimentaires et Microbiologiques, L'Institut Agro Dijon, Université de Bourgogne Franche-Comté, 1, Esplanade Erasme, 21000 Dijon, France.

<sup>2</sup>Dimacell Imaging Facility, L'Institut Agro Dijon, Université de Bourgogne Franche-Comté, 1 Esplanade Erasme, 21000 Dijon, France.

## **Abstract**

Dipicolinic acid (DPA) is a specific molecule of bacterial spores which is essential to their resistance to various stresses such as ultraviolet (UV) exposure and to their germination. DPA has a particular photochemistry that remains imperfectly understood. In particular, due to its ability to absorb UVc radiation, it is likely to form *in vitro* a wide variety of photoproducts (DPAP) of which only about ten have been recently identified. The photochemical reactions resulting in DPAP, especially those inside the spores, are still poorly understood. Only one of these DPAP, which probably acts as a photosensitizer of DNA upon exposure to UVc, has been identified as having an impact on spores. However, as UVc is required to form DPAP, it is difficult to decouple the overall effect of UVc exposure from the possible effects of DPAP alone. In this study, DPAP were artificially introduced into the spores of the FB122 mutant strain of *Bacillus subtilis*, one that does not produce DPA. These experiments revealed that some DPAP may play a positive role for the spore. These benefits are visible in an improvement in spore germination rate and kinetics, as well as in an increase in their resistance to UVc exposure.

## **1. Introduction**

Bacterial spores are dormant forms of bacteria able to survive in extreme environments. Their resistance properties are due to a complex multilayer structure and a dehydrated core. This core contains DNA and other specific spore molecules, including dipicolinic acid (DPA). In spores, DPA is chelated to a large extent with Ca<sup>2+</sup>, forming the CaDPA complex. This key molecule represents a large proportion of the dry weight of the spore, attaining 10%<sup>1</sup>. DPA is produced by the mother cell during the sporulation process and is taken up by the developing

forespore<sup>2</sup>. This active process is still not completely understood. Some studies have shown that protein transporters, such as SpoVAD and SpoVV, may play a major role<sup>3,4</sup>. These two channels form a two-step transport pathway allowing DPA to be translocated from the mother cell into the forespore during the sporulation process. The DPA molecule participates in spore germination by triggering the activation of a cortex lytic enzyme called CwIJ<sup>5</sup>.

DPA is known to play a role in spore resistance to various physical stresses such as high temperature, desiccation and radiation exposure through dehydration of the spore core<sup>6-8</sup>. The role of DPA photochemical properties in spore resistance to UVc radiation has already been pointed out<sup>9</sup>. Indeed, DPA may play the role of photosensitizer or photoprotector depending on the hydration of the environment<sup>6,7,10</sup>. DPA may cause bacterial spore inactivation through the production of specific spore DNA damage called Spore Photoproducts (SP). Moreover, previous studies have revealed that UVc exposure produces a variety of partially fluorescent DPA photoproducts (DPAp) and that some of them may also be photosensitizers<sup>7,9,11</sup>. It should be noted that natural DPA and CaDPA show some UVc absorption but exhibit only very weak fluorescence following excitation<sup>12</sup>. Although major steps toward a fuller comprehension of DPA photochemistry have been taken in the past decades, certain points remain unclear. Few DPAp molecules have been identified and the biological impact of DPAp on spore survival and outgrowth is not clear<sup>9,13</sup>. The photochemistry of DPA in spores is not easy to study because of the extreme impermeability of this resistant bacterial form. Studies have most frequently used destructive methods to obtain access to the spore DPA or used chemically synthesized DPA. It is nonetheless difficult to relate *in vitro* studies with the *in vivo* photochemistry of DPA within the spore protoplast, because of the high specificity of this structure. In order to meet the challenge of investigating *in vivo* UVc induced DPAp without recourse to destructive extracting methods, we rely here on the detection of DPAp fluorescence by spectroscopic methods<sup>11-15</sup>.

The aims of the present study were I) to provide a protocol of DPAp supplementation on bacterial spores, without exposing the spores to UVc; II) to observe the biological effects of these artificially introduced DPAp on spore germination and UVc resistance. As UVc can affect living systems in many ways, it is highly challenging to distinguish *in vivo* the possible effects of the DPAp produced during UVc exposure from the overall effect of UVc. For example, UVc exposure can result in the production of reactive oxygen species (ROS) and disturb the plasma membrane integrity<sup>16,17</sup>. It has been shown that it can degrade bacterial spore crust and directly affect DNA<sup>14,18</sup>. As mentioned above, there is possibly spore-specific DNA damage (SP) caused by DPA upon UVc irradiation. A method which distinguishes the effects

of DPAP from those of UVc would provide new understanding on UVc resistance in bacterial spores. To create such a method, bacterial spores from the FB122 strain, which are DPA deficient, were supplemented with DPAP produced by *in vitro* UVc exposition of synthetic DPA. This method thus bypassed the overall effects of UVc irradiation on spores, revealing the biological effects of DPAP alone. Our study not only provides information on the biological effects of DPAP, but also contributes to the understanding of DPA photochemistry, advancing research that has taken place in recent years.

## 2. Experimental procedures

### 2.1. Chemicals

DPA (Sigma-Aldrich, Germany, 167.12 g/mol, purity > 98%) solution was prepared in sterilized water at 500 µg/ml and stored at room temperature.

### 2.2. Bacterial strains

*Bacillus subtilis* mutant strain FB122 was used in this study. In this strain, the *SpoVF* and *SleB* genes have been replaced with spectinomycin and tetracycline resistance cassettes. As *SpoVF* codes for DPA synthetase, its deletion results in spores lacking DPA inside the spore core. The *SleB* gene codes for the SleB protein, which is involved in the germination process. It is replaced in order to avoid spontaneous germination of the FB122 spore.<sup>5</sup>

### 2.3. Spore production and DPA supplementation protocol

For spore production, FB122 was first isolated on Luria-Bertani (LB) agar medium containing spectinomycin 100 µg/ml + 10 µg/mL tetracycline. An isolated colony was then incubated on double strength Schaeffer's-glucose liquid medium (2xSG) at 37°C under agitation. When an OD of 0.6 was reached, the culture was diluted 10 times on fresh 2xSG medium supplemented or not with native DPA or UVc irradiated DPA, with a final concentration of 100 µg/ml. It was then incubated 5 days at 37°C under agitation. Spores were harvested by centrifugation at 11,000 g for 15 min and washed with sterilized cold (4°C) distilled water until purity of around 98% was observed by means of phase-contrast microscopy.

Samples obtained via this method are referenced in the text and figures as follows:

- FB122 for FB122 spores which were not supplemented.

- FB122 DPA for FB122 spores which were supplemented with DPA.
- FB122 DPAP<sub>Xmin</sub> for FB122 spores which were supplemented with DPAP produced by UVc irradiation of DPA for X min.

To facilitate comprehension, where possible, a color code is adopted in the figures as follows: FB122 spores are represented in dark grey; FB122 DPA in blue; FB122 DPAP in green or red depending on the nature of the photoproducts (DPAP or unstable DPA).

### 2.4. UVc exposure protocol

UVc irradiation was performed using a UV irradiation system CROSSLINKER® CL-508 (UVItec Ltd, UK) at 254 nm, with a flux of 0.120 J/cm<sup>2</sup>. To produce DPAP, each spore suspension (500 µl) or DPA solution (1 ml) was exposed to UVc in a quartz cuvette, over various exposure times. To avoid a shielding effect due to a high spore concentration,<sup>19</sup> suspensions were adjusted to a concentration of 10<sup>7</sup> spore/ml.

Samples exposed to UVc are referenced in the text as follows:

- FB122 UVc Ymin for FB122 exposed to UVc for Y min.
- FB122 DPA UVc Ymin for FB122 supplemented with DPA and exposed to UVc for Y min.

### 2.5. DPA assay

Bacterial spore PS533 strain (considered as wild type) has been UVc exposed during 2, 5 and 10 min with a flux of 0.120 J/cm<sup>2</sup>. After 30 minutes autoclaving at 100 °C to extract DPA from the spores, the irradiated spores solutions were centrifuged for 15 minutes at 12,000 g. The supernatant containing DPA was then harvested. DPA assay was performed according to the protocol proposed by Hindle and Hall (1999)<sup>20</sup>. The previous DPA solution was diluted one-fourth in 1M sodium acetate buffer (C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>NaO<sub>2</sub>-3H<sub>2</sub>O, Sigma-Aldrich, Germany, 136.08 g/mol, purity > 99 %) pH 5.6, containing 30 µM terbium (TbCl<sub>3</sub>, Sigma-Aldrich, Germany, 373.38 g/mol, purity = 99.9 %). Fluorescence emission spectra were acquired on a Jobin Yvon FluoroMax-4 (Horiba Scientific, Kyoto, Japan). The excitation and emission wavelengths were 280 ± 10 nm and 545 ± 5 nm, respectively. A glass slide was placed in front of the detector to filter out Rayleigh scattering from the water.

## 2.6. Fluorescence intensity measurements and Fluorescence Lifetime Microscopy (FLIM)

Fluorescence intensity and lifetime images were collected on a Nikon A1-MP scanning microscope equipped with a Plan Apo IR 60x objective (NA: 1.27, Water Immersion, Nikon, Japan) at a scanning speed of 1 frame per second. FLIM images were acquired using a time-correlated single-photon counting (TCSPC) module (Picoquant, Germany). A 710 nm multiphoton excitation was provided by an IR laser (Chameleon, Coherent, California) delivering femtosecond pulses at a repetition rate of 80 MHz. Fluorescence emission of spores was collected on three detection channels for multiphoton imaging: FF01-492/SP-25 (400-492 nm), FF03-525/50-25 (500-550 nm) and FF01-575/25-25 (563-588 nm) (Semrock, USA). For fluorescence lifetime imaging, fluorescence was collected through a short-pass emission filter 680/SP (Semrock, USA). TCSPC recording was performed over 200 temporal channels (final resolution 0.64 ps). Fluorescence lifetimes were plotted on phasor diagrams using the MAPI software (IRI, USR 3078 CNRS, BCF, available on request at: <http://biophotonique.univ-lille1.fr/spip.php?rubrique60>). An analysis of the contours of each phasor plot representation was performed using a Matlab code (Mathworks, Natick, MA, USA)<sup>21</sup>. The phasor plot is a graphical representation of the raw values of the fluorescence lifetimes obtained by TCSPC, in a 2 dimensional vector space. This representation is obtained by converting the fluorescence decay histograms into (g,s) coordinates. P(i,j) represents a pixel in the FLIM image with coordinates (i,j) and  $I_{i,j}(t)$  is the fluorescence decay intensity associated with the pixel, the coordinates (g,s) are defined :

$$g_{i,j}(\omega) = \frac{\int_0^T I_{i,j}(t) \cdot \cos(\omega t) dt}{\int_0^T I_{i,j}(t) d(t)}$$

$$s_{i,j}(\omega) = \frac{\int_0^T I_{i,j}(t) \cdot \sin(\omega t) dt}{\int_0^T I_{i,j}(t) d(t)}$$

Where  $\omega = 2\pi f$  and  $f = 1/T$  the laser repetition rate.

## 2.7. Spore germination, outgrowth, and viability measurements

Germination measurements and viability measurements after UVc exposure were taken by means of CFU on LB agar plates. Colonies were counted after 15h of incubation at 37°C.

It is important to note that FB122 DPA and DPAP supplemented spores, like the wild type spore, can germinate without the addition of DPA in the medium, whereas FB122 cannot.

Moreover, FB122 DPA supplemented spores appear bright in phase contrast microscopy, like the wild type spore, whereas FB122 non-DPA supplemented spores did not appear as bright as WT spores. These observations were used to confirm the DPA uptake by FB122 spores.

Growth curves were obtained by placing spores on LB liquid medium in a 96-well plate reader (Thermo Scientific Multiskan FC, France), at 37°C under continuous agitation. Measurements were performed at 600 nm, over 300 min (one point every 5 min). Experiments were undertaken in triplicate and each condition was replicated on 10 wells.

### 2.8. Statistical analysis and growth curve fitting

The fluorescence intensity of bacterial spores, the growth speed value and germination delay were statistically analysed with a variance analysis (ANOVA) performed with Origin® (OriginLab®, USA), followed by a Tukey test (p-value <0.05).

Growth curves were fitted with a dose response model using Origin® (OriginLab®, USA) software. The fitting function was the following:

$$y = A1 + \frac{A2 - A1}{1 + 10^{(t_c - t)\mu}} \quad (1)$$

Where  $\mu$  = growth speed, A1 = bottom asymptote, A2 = top asymptote,  $t_c$  = centre of exponential phase, t = time (min).

## 3. Results and discussion

### 3.1. Extrinsic DPAP uptake versus direct DPAP generation inside the spore core

In order to characterize the effects of DPAP in the spore, the FB122 strain, initially DPA deficient, was used. This strain has been widely used in various studies, sometimes in conjunction with DPA supplementation<sup>5,22,23</sup>. Thanks to the DPA supplementation protocol in place, the spores of this strain may or may not contain DPA depending on the sporulation conditions. UVc exposure of DPA is known to produce DPAP, some of which exhibit fluorescence properties<sup>9,11,24</sup>. Since the FB122 strain is able to uptake DPA from its environment during sporulation, incorporation of fluorescent DPAP in the spores may potentially occur. Fluorescence measurements can then be used to monitor this process.

FB122 and FB122 spores supplemented with DPA were irradiated with UVc over increasing exposure times, as described in the experimental procedures section. The fluorescence of each sample was measured after irradiation. Results are presented Fig. 1A. The

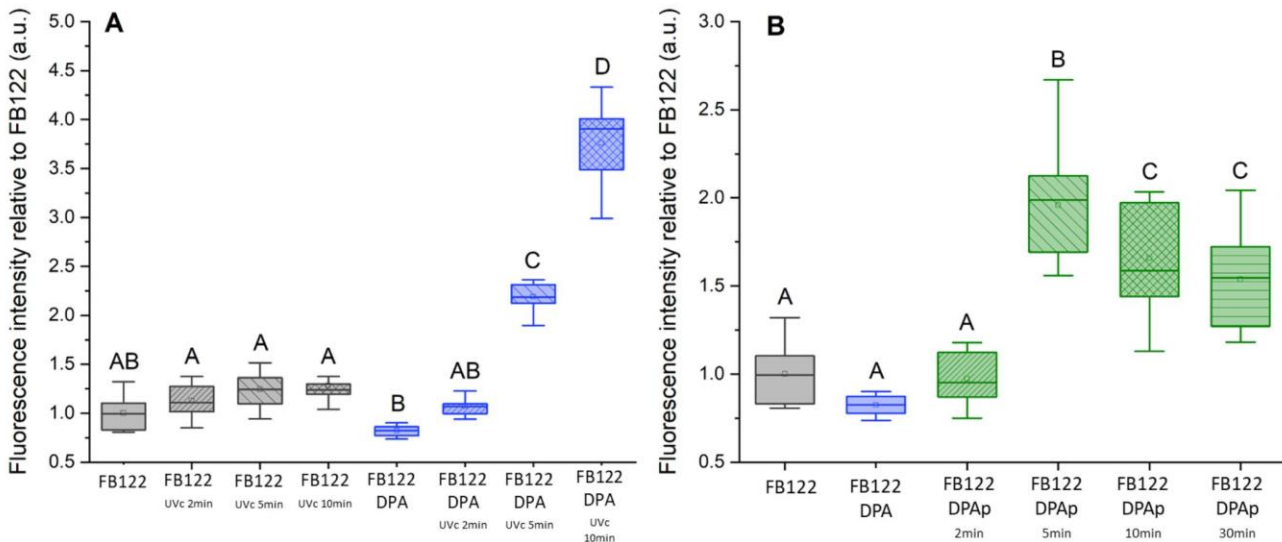


untreated spores were naturally fluorescent due essentially to the proteins of the coat. The incorporation of DPA in FB122 spores did not significantly change the spore fluorescence level, although a slight decrease was observed. This finding was consistent with the very weak fluorescence of DPA. After UVc exposition, an increase in fluorescence as a function of exposure time was observed in FB122 spores supplemented with DPA only. On the contrary, FB122 spores without DPA supplementation exposed to UVc did not exhibit a significant increase in fluorescence. A similar observation was made in a previous work comparing the fluorescence of FB122 and PS533 (wild type) spores after UVc irradiation, where only the fluorescence of the PS533 spores (which contain DPA) increased after the UVc exposure<sup>11</sup>. This increased fluorescence was attributed to the production of DPAP within the spore core. It is known that the longer the DPA is irradiated by UVc, the higher the fluorescence, in relation to the kinetics of DPAP production<sup>9,24,25</sup>. It was also observed that the rate of DPA consumption *in vivo* increased with the duration of UVc exposure, using a terbium-DPA assay as described in the experimental procedures section (Supplementary Material Fig. S1). The fluorescence increases in FB122 supplemented with DPA when exposed to UVc (FB122 DPA<sub>UVc</sub> Y<sub>min</sub>) confirmed that the forespore had indeed taken up DPA during the sporulation process and that this added DPA was sensitive to UVc. This conclusion was further supported by the observation that FB122 spores supplemented with DPA were able to germinate in a medium with no added DPA, unlike standard FB122 spores. In addition, these supplemented FB122 spores appeared bright under phase contrast microscopy, like the wild type PS533, whereas standard FB122 spores appeared darker (data not shown).

The fluorescence of FB122 spores supplemented with DPAP (FB122 DPAP<sub>Xmin</sub>), in place of DPA, was then quantified (Fig. 1B). DPAP were obtained by prior UVc irradiation of DPA in sterilized water, over increasing exposure times. The fluorescence intensity of irradiated DPA solutions used to supplement FB122 spores during sporulation was monitored as a function of UVc exposure time (Supplementary Material Fig. S2). The results show that the fluorescence intensity of DPA is a function of exposure time, meaning that the more DPA is irradiated, the more DPAP is formed. The fluorescence intensity of the spores supplemented with DPAP increased significantly compared to the control FB122 supplemented with DPA. This increase in fluorescence suggested that forespores were able to uptake DPAP during the sporulation process, as they did with DPA. For DPA uptake, it has been shown that SpoVA and SpoVV channels, located respectively in the inner and outer membrane, could play a major role. It has also been shown that the SpoVA channel, which is located in the inner membrane, binds

with weaker affinity to some DPA and CaDPA isomer forms. Indeed, it has been suggested that providing a mix of DPA and DPA isomers in the sporulation medium results in a specific uptake of DPA, and not the isomer forms<sup>3</sup>, by the SpoVAD channel subunits. Other studies have demonstrated that after UVc irradiation, DPA can undergo dimerization or conformational change to create DPAP with a similar structure to DPA<sup>9,11</sup>. Thus, it is hypothesized that only DPAP whose structure is very similar to that of DPA can be taken up during sporulation and be responsible for the fluorescence increase observed in comparison to the control. The fluorescence intensity of FB122 supplemented with DPAP was maximum for photoproducts created by prior UVc exposition of DPA of 5 minutes. It decreased in cases where DPAP were created by longer UVc exposition times (Fig. 1B). This behavior was not observed in FB122 supplemented with DPA and then irradiated with UVc (Fig. 1A) nor in the irradiated DPA solutions (supplementary material Fig. S2). In these latter case, fluorescence increased with irradiation time, in line with previous work which has shown that the concentration of DPAP depends on the exposure time to UVc<sup>11</sup>. These differences supports the hypothesis of a selective uptake, one in which only DPAP with a structure very similar to that of DPA are selected to pass into the SpoVV then SpoVA channels. Indeed, the nature of fluorescent DPAP may change over a long exposure to UVc, morphing from a structure similar to DPA to a structure not compatible with the transport channels. It is also conceivable that the duration of irradiation reduces the amount of photoproduct that can be integrated into the spore. In short, it appears that DPAP within the spore core may be different depending on whether these DPAP were produced by DPA irradiated *in vivo*, directly within the spore core (Fig. 1A), or created by *in vitro* exposure of DPA to UVc, prior to supplementation of FB122 spores (Fig. 1B). This hypothesis relies on both the selectivity of the SpoVA and SpoVV DPA pumps and the kinetics of DPA photochemistry under UVc. Dual channel selection was expected to be the main factor explaining this difference *in vivo* versus *in vitro*.





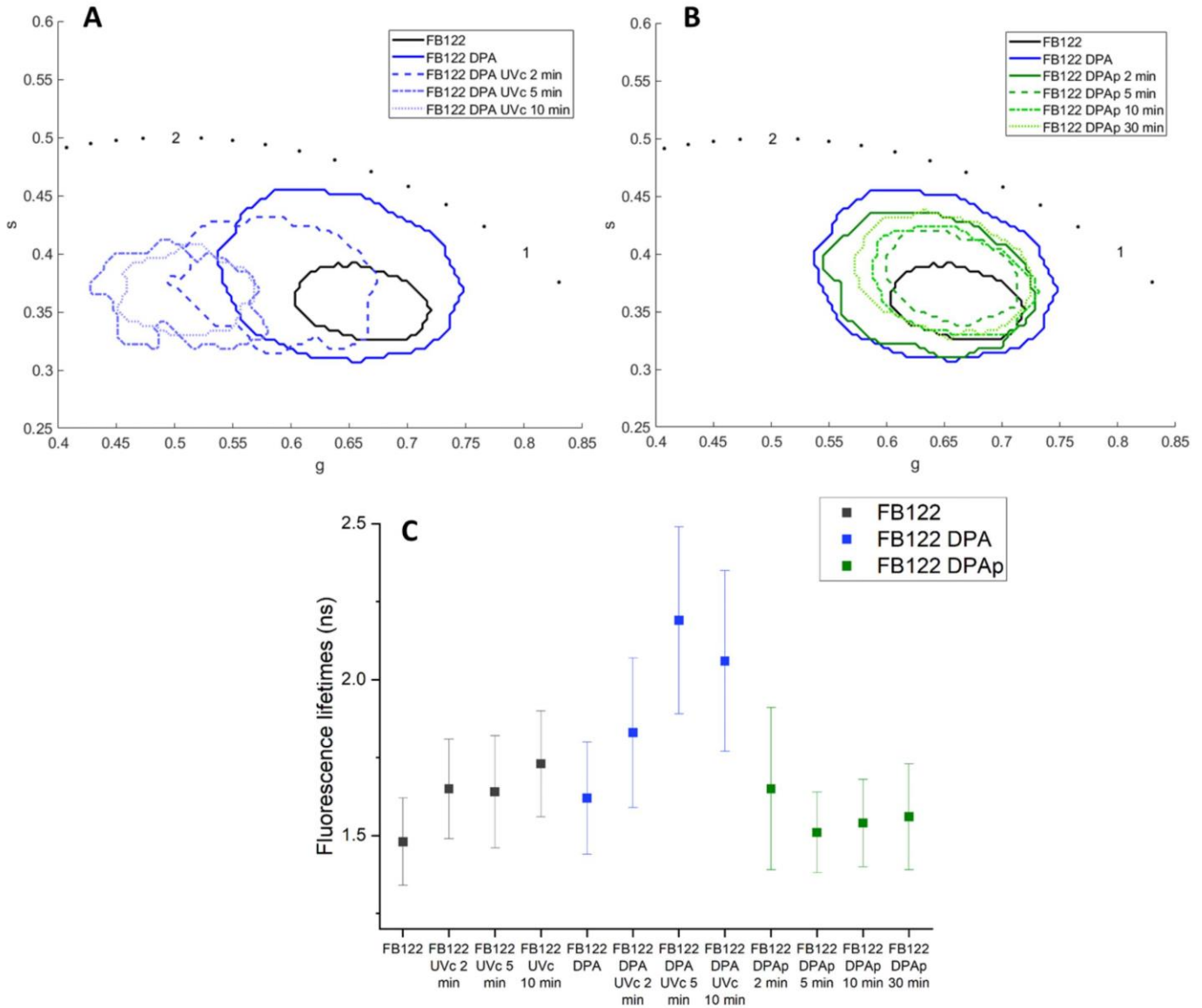
**Figure 1:** Box plots representing fluorescence intensity measurements of FB122 spores supplemented with DPA. **A:** Fluorescence intensity measurements after exposition to UVc of FB122 and FB122 spores supplemented with DPA. **B:** Fluorescence intensity measurements of FB122 spores supplemented with DPAP. Different letters above the box plots represent significant differences (Tukey  $p < 0.05$ ).

Fluorescence intensity values alone did not allow to assess variations of the photoproducts nature. To further test the hypothesis of a difference in DPAP forms within the spore depending on how these photoproducts were created, fluorescence lifetime measurements were carried out on the bacterial spores (Fig. 2). Fluorescence lifetime is an intrinsic property of fluorescent molecules that can be used to characterize biomolecules and their environment. Fluorescence lifetime measurements were plotted using phasor representation, which is a graphical representation of the fluorescence lifetimes, as described in the material and methods experimental procedures section. In the phasor plot, fluorescence lifetimes are defined by polar coordinates represented on a semi-circle. A point inside the semi-circle indicate the presence of several fluorescence lifetimes, while a point on the semi-circle indicate the presence of a single lifetime. In the semi-circle, the short fluorescence lifetimes are close to the coordinates [1;0], and the long fluorescence lifetimes approach the origin [0;0]. In Figure 2, the distributions of the fluorescence lifetimes for each observed condition are outlined for clarity.

The incorporation of DPA during sporulation did not result in a change in mean fluorescence lifetimes (Fig. 2C), only a widening of their distribution (Fig. 2A and 2B), probably because DPA is only very weakly fluorescent. DPA did not significantly contribute to the fluorescence signal that is mostly generated by coat proteins. Previous work has shown that

the average fluorescence lifetime of spores is a function of the UVc irradiation time, due to DPAP generation<sup>11</sup>. Moreover, the mean lifetime of global DPAP produced is much longer than that of coat proteins (about 1.5 ns). Indeed, the creation of DPAP directly inside the spores by means of UVc exposition lengthened the average fluorescence lifetime of the FB122 spores initially supplemented with DPA, whereas FB122 spores not supplemented did not present a significant fluorescence lifetime variation when exposed to UVc (Fig. 2C). This observation confirmed the hypothesis that the presence of DPA is the main factor of change in fluorescence lifetimes inside bacterial spores upon UVc irradiation.

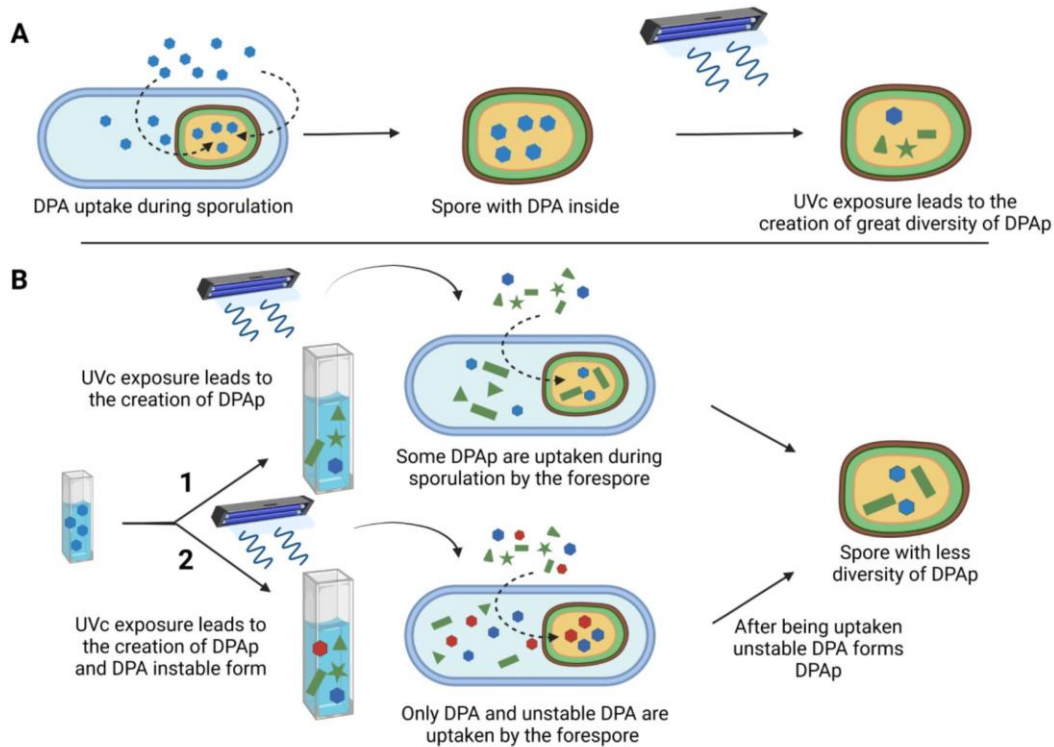
A clear difference appeared regarding the phasor plot representations and mean values of fluorescence lifetimes between the FB122 spores supplemented with DPA and exposed to UVc (FB122<sub>UVc Xmin</sub>) and the FB122 spores supplemented with DPAP (FB122<sub>DPAP Xmin</sub>). When DPA was irradiated *in vivo*, directly inside the spore core, fluorescence lifetimes increased significantly with UVc exposure time, from  $1.62 \pm 0.14$  ns to  $2.19 \pm 0.3$  ns (Fig. 2A and 2C). This lengthening of fluorescence lifetimes can be explained by DPAP production; the observed lifetimes were similar to those observed in the PS533 strain (wild type) reported in a previous work<sup>11</sup>. However, when DPAP were produced by increasing *in vitro* irradiations of DPA and added during the sporulation of FB122 spores, the fluorescence lifetime distribution seemed to change very little (Fig. 2B), remaining at a low mean value of 1.6 ns, similar to the mean fluorescence lifetime value of FB122 spores supplemented with DPA (Fig. 2C). This indicates that the fluorophores incorporated in FB122 spores were different from those obtained by *in vivo* irradiation of the spores and even different from the DPAP obtained *in vitro*. This difference is consistent with the hypothesis of a selective incorporation of certain DPAP by the spore during sporulation.



**Figure 2:** **A:** Outlines of phasor plot representations for FB122 spores supplemented with DPA before and after UVc treatment. FB122 without DPA is the control condition. **B:** Outlines of phasor plot representations for FB122 spores supplemented with DPAp. FB122 without DPA and FB122 supplemented with DPA are the control conditions. **C:** Graphical representation of the mean lifetimes for each condition (N = 5).

A previous study has reported that a part of DPA exposed to UVc remains in a non-fluorescent, unstable form that could become fluorescent DPAp or return to stable DPA after de-excitation<sup>11</sup>. It is therefore possible that the increase in fluorescence intensity observed in FB122 spores supplemented with DPAp was due to an uptake by the forespore of this unstable DPA form that may become stable fluorescent DPAp once inside the spore. Fig. 3 summarizes the different

ways in which the FB122 forespore might concentrate DPAP in its protoplast, including this last hypothesis.

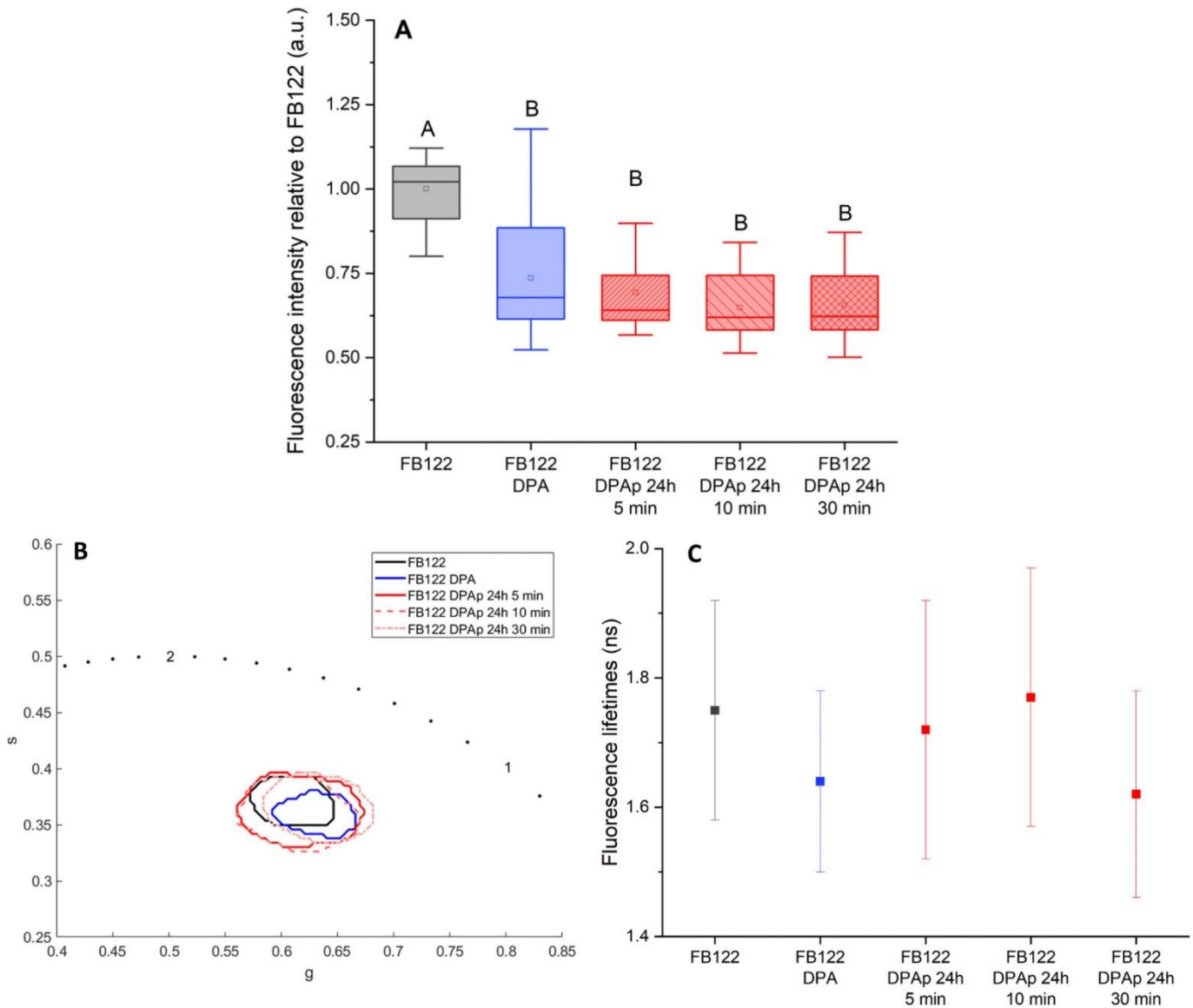


**Figure 3:** Schematic representation of possible ways to introduce DPAP inside the FB122 forespore during sporulation. DPA: Blue; DPAP: Green shapes with various forms representing various DPAP; unstable DPA forms: Red. **A:** Introduction of DPA inside FB122, followed by UVC exposure to create DPAP inside the spore. **B:** Introduction of DPAP inside FB122 spores depending on uptake selectivity. Two possible ways are considered: 1) selection of certain DPAP or 2) uptake of DPA and unstable DPA, which would become DPAP once in the core. These two ways may explain the differences observed in these spores in terms of fluorescence intensity and lifetime.

Experiments were performed to determine which of the two hypothetical pathways shown in Fig. 3B was most likely to explain the difference in fluorescence intensity and lifetimes reported above. DPA was exposed to UVC for 5, 10 and 30 min and then introduced into the sporulation medium as before. To distinguish whether unstable forms of DPA play an important role in the creation of DPAP inside the core, this irradiated DPA was not added to the sporulation medium until 24 h after the UVC exposure. The time lapse between the irradiation of the DPA and its addition to the sporulation medium allows the unstable form of DPA to stabilize into either DPA or DPAP<sup>11</sup>, guaranteeing that the forespore will thus not incorporate unstable DPA, which



has had time to stabilize into DPA or DPAp. Results of fluorescence intensity and fluorescence lifetime measurements are presented in Fig. 4.



**Figure 4:** Fluorescence intensity (A) and lifetime (B) measurements of FB122 spores supplemented with UVc irradiated DPA and stabilized 24 hours. Different letters represent significant differences (Tukey  $p < 0.05$ ). (C) Phasor plot representations of mean fluorescence lifetimes for each condition (N = 5).

The primary finding of this experiment was that there was no significant difference in fluorescence intensity or fluorescence lifetime in FB122 spores supplemented with DPA (FB122 DPA) compared to FB122 spores supplemented with stabilized DPA after UVc exposure, regardless of the duration of irradiation. These results are very different from those

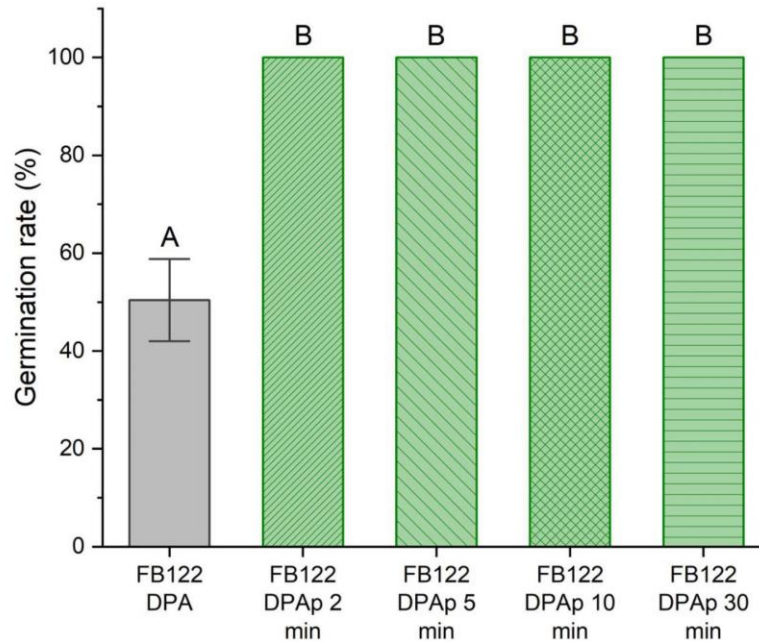
reported for the previous experiment, where an increase in fluorescence intensity was measured when spores were supplemented with DPA irradiated with UVc just before supplementation (Fig. 1B). In light of the hypotheses pictured in Fig. 3B, these results indicated that DPAP could not be taken up by the forespore during sporulation. Thus, the most likely pathway for DPAP accumulation inside the spore would be an uptake of the unstable irradiated DPA that became DPAP later, once inside the core. This explanation is strengthened by a control experiment (supplementary data Fig. S3) in which the fluorescence intensity of DPA solutions after UVc exposure was monitored during 36h. Results showed that these DPA solutions have a fluorescence intensity higher than non-exposed DPA (that do not exhibit a detectable fluorescence intensity) during this 24 hour period. Furthermore, fluorescence intensity of DPA solution lightly increase during the 24 hour period after UVc exposure. This increase in fluorescence intensity has been previously attributed to unstable DPA that forms DPAP some time after UVc exposure. Moreover, as previously stated, SpoVA channels are highly selective. It therefore appears unlikely that molecules of a structure different from that of DPA could pass through these channels. This could be the case for DPAP.

A second observation was a significant decrease in fluorescence intensity between FB122 spores and FB122 spores supplemented with DPA. This decrease in fluorescence intensity was also observed in the previous experiment (Fig. 1B) but was not significant. This phenomenon may be due to a slight absorption of the excitation light by DPA, reducing the excitation of coat protein fluorescence. It is important to note that the fluorescence intensity decline in the FB122 spores supplemented with DPA compared to the control FB122 were of the same order of magnitude in both experiments. The fluorescence intensity of FB122 spores supplemented with DPA represents about 80 % of the fluorescence intensity of the control FB122 in Fig. 3B and 70 % in Fig. 4.

Finally, concerning fluorescence lifetimes, no change was observed between DPA-supplemented FB122 spores and spores supplemented with stabilized (24-hour delay) irradiated DPA (Fig. 4B and 4C). The overall fluorescence lifetimes of the spores, represented by phasor plot outlines, and the average fluorescence lifetimes were very similar. This finding suggests that 24 h after DPA exposure to UVc, the molecules incorporated into the spores during the sporulation process may be overwhelmingly DPA. These results supported the hypothesis that the accumulation of DPAP by supplementation with DPA exposed to UVc just prior to incubation occurred *via* unstable forms of DPA.

### 3.2. Biological effects of DPA photoproducts

As very little is known about DPA photoproduct molecules, there is a corresponding lack of knowledge concerning their potential biological effects. These DPAP may be involved in the damage observed on spores after UVc exposure, including the creation of a specific DNA lesion call SP. On the contrary, DPAP may absorb more UVc radiation and bring about an increase in UVc resistance. Two DPAP have recently been identified and the presence of one of them has been shown to contribute to DNA degradation through CPD formation during UVc exposure<sup>9</sup>. SPs are specific DNA lesions found on spores after exposure to UVc. This DNA lesion is a dimerization of two adjacent thymines on the same DNA strand, leading to DNA embrittlement<sup>26-28</sup>. To our knowledge, no other negative or beneficial effect of DPAP on spore survival has ever been reported. In order to assess the possible effects of DPAP on spore germination, FB122 spores enriched with DPAP (FB122 DPAP<sub>xmin</sub>) were compared to FB122 spores enriched with DPA (FB122 DPA) (Fig. 5). An initial concentration of 10<sup>7</sup> spores/ml was diluted and spread on LB agar medium to carry out plate counting for each sample. The proportions of germinated spores are represented in percentage values where 100% is equal to the initial spore concentration (10<sup>7</sup> spores/ml). First, we note that around 50% of FB122 spores supplemented with DPA were able to germinate on LB agar without adding DPA in the medium as a germinant, unlike non-supplemented FB122 spores. The absence of the SleB enzyme explains the fact that the mutant spores had such a low germination rate. SleB is one of the two cortex lytic enzymes (CLE), along with the CwIJ enzyme, which are found on the spore cortex and whose role it is to digest a part of the cortex during germination. These enzymes allow the spore to continue on to the last phase of germination and then to outgrowth<sup>29</sup>. Surprisingly, spores supplemented with UVc irradiated DPA presented higher germination rates than spores supplemented with non-UVc exposed DPA. This finding was observed even in the case of slight UVc exposure.



**Figure 5:** Box plot representing germination rates relative to the FB122 strain in media supplemented with DPA. Different letters represent significant differences (Tukey  $p < 0.05$ ).

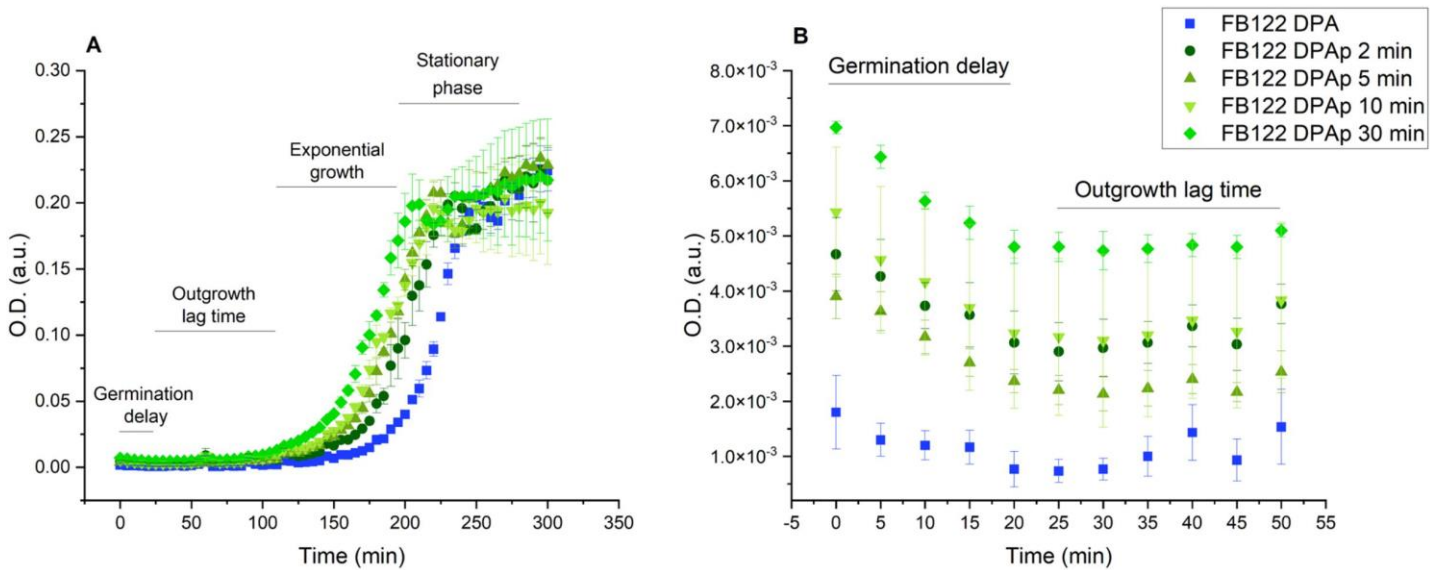
These results indicated that DPAP uptake by FB122 during sporulation seemed to improve germination. In addition, these findings point to the conclusion that DPAP incorporated during sporulation (probably originating in the unstable form of DPA) appeared to enhance germination better than DPA itself. DPA is known to activate the cortex lytic enzyme (CLE), called CwIJ, inside the spore cortex during germination. As detailed above, once activated, CLE degrades the cortex, allowing the spore to pursue germination. One hypothesis is that DPAP might trigger the activation of the CLE CwIJ more efficiently than DPA. Further investigations are necessary to understand the role DPAP play in the germination process, with particular attention to the relation between DPAP and CwIJ but are outside the scope of the present article.

For more details on the effect of DPAP on spore physiology, germination and outgrowth, FB122 spores supplemented with UVc treated DPA were observed over 5h and compared to FB122 supplemented with DPA without UVc treatment (Fig. 6). Classical growth curves, obtained by measuring cell culture absorbance at 620 nm, were observed for each condition. Germination delay, lag phase, exponential phase and stationary phase are reported (Fig. 6A). The longer DPA was exposed to UVc, the faster the stationary phase was reached. To better understand the impact of DPAP on spore development, 3 parameters were observed during



growth: germination delay, growth speed and duration of lag phase before exponential growth (Fig. 6B). Germination delay is a component of the total lag time observed in the beginning of the growth curves. This total lag time is probably composed of multiple lag times associated with different stages of germination and outgrowth<sup>30</sup>. Studies are generally limited to observations of germination delay. Here, germination delay corresponding to the germination lag time (time before germination) was distinguished from the lag time associated with outgrowth (time between germination and outgrowth).

At the beginning of germination, a drop in the absorbance is generally observed, corresponding to the release of DPA by the spore. This drop can be used to identify the end of the germination lag time. The maximal absorbance drops were measured in each condition and mean values were compared among conditions with ANOVA analysis followed by Tukey tests (Fig. 6B). Maximal absorbance drops seemed to occur after circa 25 min in both FB122 supplemented with DPA and FB122 supplemented with DPAP. As no significant difference was observed, it seems that the presence of DPAP did not affect germination delay. The “ $\mu$ ” slope coefficient represented the growth rate of the bacilli at the inflexion point of the exponential phase (Fig. 6B). No significant difference was observed among the five conditions either, indicating that DPAP may not affect growth speed during the exponential phase. Finally, the time to reach the inflexion point of the exponential phase was also measured (Fig. 6A and Table 1). Since the growth speeds and the germination lag times were the same in all conditions, this time could be directly correlated to the outgrowth lag time. In other words, the shorter the time to reach the inflexion point of the exponential phase, the earlier the growth would have started (shorter outgrowth lag time). Significant differences were observed among the different conditions. In cells sporulated with DPAP, the exponential phase was reached sooner than in cells sporulated with DPA, pointing to a shorter outgrowth phase. Moreover, outgrowth lag times were shorter in FB122 sporulated with DPAP produced by high UVc exposure of DPA, compared to those produced with low exposure. In summary, the presence of DPAP seemed to affect the lag time occurring after germination but not the delay before germination nor the growth rate after the lag time phase. One hypothesis is that some DPAP can be used as a carbon source by vegetative cells after germination. This would promote their growth and explain the reduction of the lag period before the phase of exponential growth.



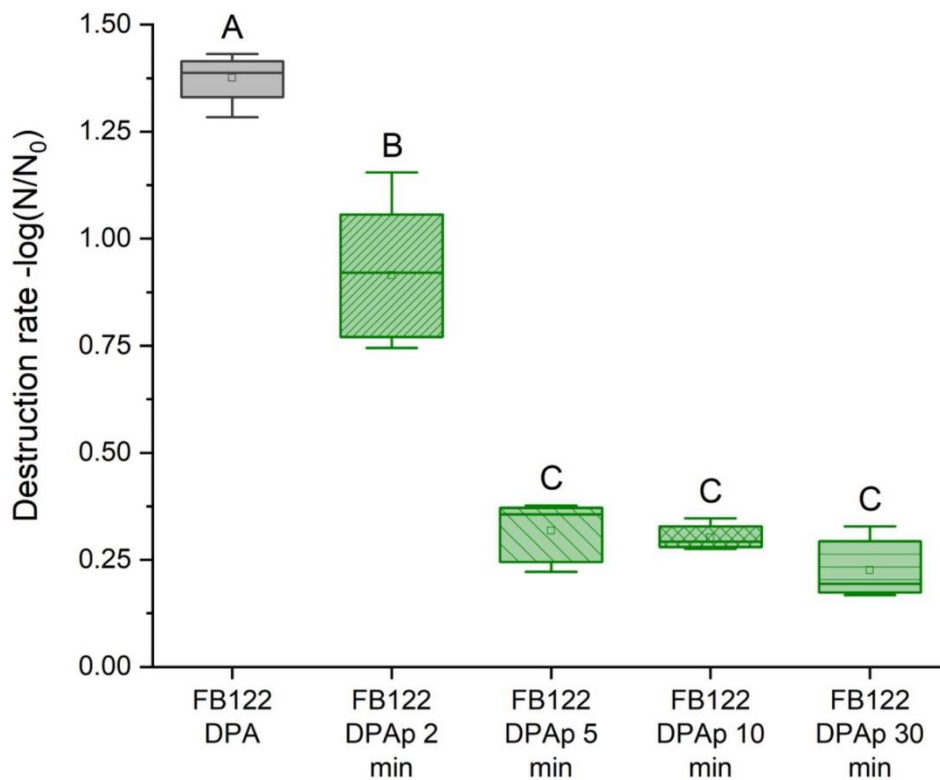
**Figure 6:** FB122 supplemented with DPA: germination and growth parameters. **A:** Mean growth curves from FB122 supplemented with DPA (■); FB122 supplemented with DPAP, coming from DPA previously exposed to UVC 2 min (●); 5 min (▲); 10 min (▼) and 30 min (◇). **B:** Zoom on the first hour of the growth curve showing the germination delay.

**Table 1:** Fitting Parameters: germination delay; a coefficient representing the growth speed at the inflexion point of the exponential phase; time to reach the inflexion point. Different letters represent significant differences (Tukey  $p < 0.05$ ).

	FB122 DPA	FB122 DPA UVC 2 min	FB122 DPA UVC 5 min	FB122 DPA UVC 10 min	FB122 DPA UVC 30 min
<b>Parameters</b>					
Germination delay (min)	23 ± 3	25 ± 0	27 ± 3	27 ± 3	28 ± 3
Group (Tukey test $p < 0.05$ )	A	A	A	A	A
$\mu \cdot 10^2$ (growth speed) ( $\text{min}^{-1}$ )	3.1 ± 0.3	2.9 ± 0.2	2.7 ± 0.6	2.7 ± 0.4	2.7 ± 0.4
Group (Tukey test $p < 0.05$ )	A	A	A	A	A
Middle of exponential phase (min)	221 ± 1	200 ± 5	192 ± 3	185 ± 5	176 ± 6
Group (Tukey test $p < 0.05$ )	A	B	BC	CD	D

3.3. Photoprotection effect

Some of the recently identified DPAP seem to enhance CPD formation on the bacterial DNA strand during UVc exposure<sup>9,10</sup>. To determine whether DPAP uptake by the forespore had similar properties, UVc resistance was investigated in FB122 spores supplemented with DPA and DPAP (Fig. 7). In the case of FB122 supplemented with DPA, a destruction rate of 1.4 log (*i.e.* inactivation of 96% of the initial population) was observed when exposed to UVc at a dose of 30 J/m<sup>2</sup>. Interestingly, this rate drops significantly in FB122 spores supplemented with DPAP. When DPAP were produced by 2 min DPA exposition before uptake by the forespore (FB122 DPAP<sub>2min</sub>), an inactivation of about 1 log was observed. For FB122 spores supplemented with DPAP produced by at least 5 min UVc exposition, there was an even weaker inactivation of about 0.3 log (or 50% of the initial population).



**Figure 7:** Box plot representing FB122 spore (complemented or not with DPAP) inactivation rate after 30 J/m<sup>2</sup> UVc treatment. Different letters indicate significant differences (Tukey test  $p < 0.05$ ).

These results show that the uptake of DPAP enhances resistance to UVc stress. This effect seems dependent on the UVc irradiation time used to create DPAP from DPA. The observed photoprotection may be due to some DPAP forms produced during the previous *in vitro*

exposure and selected by the forespore. These photoprotective DPAP are probably naturally present after direct UVc exposure of bacterial spores but in this latter case, their protective effect is probably diluted by the overall deleterious effect of the UVc.

The results reported in section 3.1 revealed an increase in spore fluorescence intensity after UVc exposure, attributed to the generation of fluorescent DPAP forms. This intensity increase, related to the duration of the UVc treatment, appears to be correlated to UVc resistance (Fig. 1 and Fig. 7). In consequence, fluorescent DPAP and photoprotective DPAP could be one and the same. Their protective properties may arise from the absorption of part of the UV radiation without the release of energy into DNA reactive molecules, as happens in DPA<sup>31</sup>. This is the first time to our knowledge that certain DPAP are reported to have a direct, positive impact on spore resistance to any kind of stress. Previous studies have been focused only on the impact of DPA on spore resistance properties<sup>6,31-33</sup>, and only one study demonstrated that some DPAP can have a photosensitizer effect<sup>9</sup>. The results presented here reveal that certain DPAP may attenuate the negative effects observed on spores that undergo UVc radiation. Nevertheless, it is unlikely that these photoprotective DPAP are the only DPAP form that is produced *in vivo*, inside the spore core, in the case of direct UVc exposure on spores. The difference in fluorescence lifetime between DPAP produced by *in vivo* versus *in vitro* UVc exposition suggests that different forms co-exist, some of which may be not protective (Fig. 2).

#### 4. Conclusions

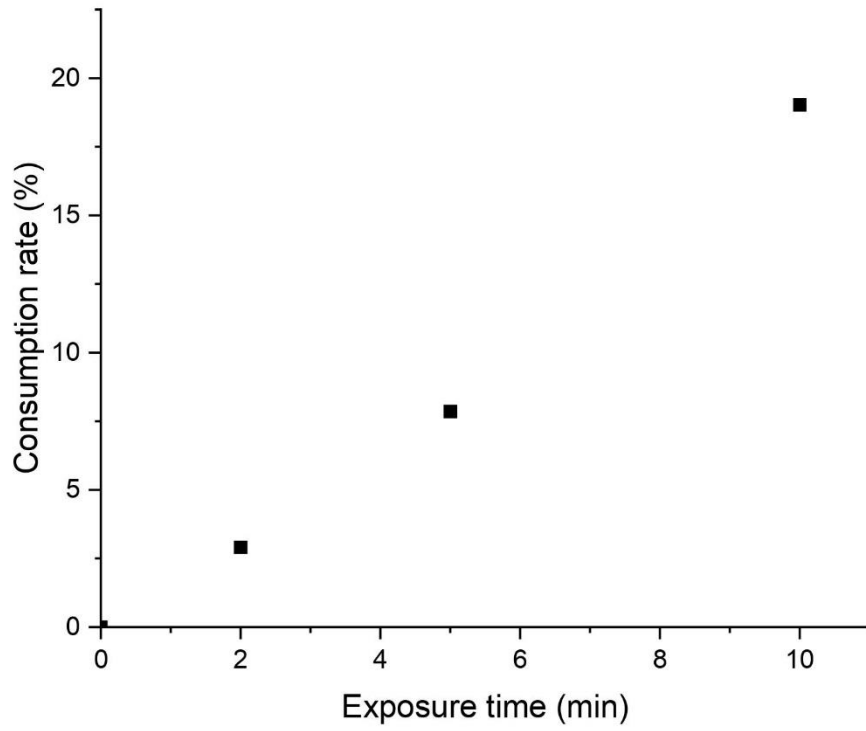
The results presented in this study reveal surprising DPAP benefits for the spore. The DPAP seem not only to enhance germination rate but also to shorten the outgrowth delay before the exponential growth phase. Moreover, an increase in UVc stress resistance is observed in spores containing DPAP. To our knowledge, this has never been previously reported. Future investigations to characterize these DPAP will be of major interest for decontamination purposes. Indeed, these molecules may afford new tools to force germination and lead to the enhancement of certain decontamination methods. In addition, investigations into DPAP production and its impact on bacterial spores would lead to improved comprehension of DPA photochemistry, DPA uptake mechanisms during sporulation and spore UV resistance. At the present time, it is not known whether these beneficial DPAP are also produced *in vivo* when spores are UVc exposed. If so, it could mean that a bacterial spore exposed once to UVc might become more resistant to future exposure, if such DPAP were produced in sufficient quantities.

### References

1. Murrell, W. G. The Biochemistry of the Bacterial Endospore. *Adv. Microb. Physiol.* **1**, 133–251 (1967).
2. Errington, J. Bacillus subtilis sporulation: Regulation of gene expression and control of morphogenesis. *Microbiol. Rev.* **57**, 1–33 (1993).
3. Li, Y. *et al.* Role of a SpoVA Protein in Dipicolinic Acid Uptake into Developing Spores of Bacillus subtilis. *J. Bacteriol.* **194**, 1875–1884 (2012).
4. Ramírez-Guadiana, F. H. *et al.* A two-step transport pathway allows the mother cell to nurture the developing spore in Bacillus subtilis. *PLoS Genet.* **13**, 1–18 (2017).
5. Paidhungat, M., Ragkousi, K. & Setlow, P. Genetic requirements for induction of germination of spores of Bacillus subtilis by Ca<sup>2+</sup>-dipicolinate. *J. Bacteriol.* **183**, 4886–4893 (2001).
6. Slieman, T. A. & Nicholson, W. L. Role of Dipicolinic Acid in Survival of Bacillus subtilis Spores Exposed to Artificial and Solar UV Radiation. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 1274–1279 (2001).
7. Cortesão, M. *et al.* Bacillus subtilis spore resistance to simulated mars surface conditions. *Front. Microbiol.* **10**, 1–16 (2019).
8. Paidhungat, M., Setlow, B., Driks, A. & Setlow, P. Characterization of spores of Bacillus subtilis which lack dipicolinic acid. *J. Bacteriol.* **182**, 5505–5512 (2000).
9. Nardi, G., Lineros-Rosa, M., Palumbo, F., Miranda, M. A. & Lhiaubet-Vallet, V. Spectroscopic characterization of dipicolinic acid and its photoproducts as thymine photosensitizers. *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **245**, 118898 (2021).
10. Desnous, C., Guillaume, D. & Clivio, P. Spore photoproduct: A key to bacterial eternal life. *Chem. Rev.* **110**, 1213–1232 (2010).
11. Pacheco, M., Dikec, J., Winckler, P., Coelho, C. & Perrier-Cornet, J. M. Spectroscopic and microscopic characterization of dipicolinic acid and its salt photoproducts – A UVc effect study on DPA in solution and in bacterial spores. *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **280**, 121502 (2022).
12. Alimova, A. *et al.* Native fluorescence and excitation spectroscopic changes in Bacillus subtilis and Staphylococcus aureus bacteria subjected to conditions of starvation. *Appl. Opt.* **42**, 4080 (2003).
13. Noell, A. C. *et al.* Spectroscopy and viability of bacillus subtilis spores after ultraviolet irradiation: Implications for the detection of potential bacterial life on Europa. *Astrobiology* **15**, 20–31 (2015).
14. Elegbeleye, J. A., Gervilla, R., Roig-Sagues, A. X. & Buys, E. M. Ultraviolet-C inactivation and hydrophobicity of Bacillus subtilis and Bacillus velezensis spores isolated from extended shelf-life milk. *Int. J. Food Microbiol.* **349**, 109231 (2021).
15. Kong, L., Setlow, P. & Li, Y. Q. Analysis of the Raman spectra of Ca<sup>2+</sup>-dipicolinic acid alone and in the bacterial spore core in both aqueous and dehydrated environments. *Analyst* **137**, 3683–3689 (2012).
16. Santos, A. L. *et al.* Wavelength dependence of biological damage induced by UV radiation on bacteria. *Arch. Microbiol.* **195**, 63–74 (2013).
17. Santos, A. L. *et al.* Effects of UV radiation on the lipids and proteins of bacteria studied by mid-infrared spectroscopy. *Environ. Sci. Technol.* **47**, 6306–6315 (2013).
18. Slieman, T. A. & Nicholson, W. L. Artificial and solar UV radiation induces strand breaks and cyclobutane pyrimidine dimers in Bacillus subtilis spore DNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 199–205 (2000).
19. Reidmiller, J. S., Baldeck, J. D., Rutherford, G. C. & Marquis, R. E. Characterization of UV-peroxide killing of bacterial spores. *J. Food Prot.* **66**, 1233–1240 (2003).
20. Hindle, A. A. & Hall, E. A. H. Dipicolinic acid (DPA) assay revisited and appraised for spore detection. *Analyst* **124**, 1599–1604 (1999).
21. Leray, A., Padilla-Parra, S., Roul, J., Héliot, L. & Tramier, M. 827Spatio-Temporal Quantification of

- FRET in Living Cells by Fast Time-Domain FLIM: A Comparative Study of Non-Fitting Methods. *PLoS One* **8**, (2013).
22. Magge, A. *et al.* Role of dipicolinic acid in the germination, stability, and viability of spores of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **190**, 4798–4807 (2008).
  23. Taylor, W. *et al.* DNA damage kills bacterial spores and cells exposed to 222-Nanometer UV radiation. *Appl. Environ. Microbiol.* **86**, 1–14 (2020).
  24. Nudelman, R., Bronk, B. V. & Efrima, S. Fluorescence emission derived from dipicolinic acid, its sodium, and its calcium salts. *Appl. Spectrosc.* **54**, 445–449 (2000).
  25. Bronk, B. V., Shoaibi, A., Nudelman, R. & Akinyemi, A. N. Physical perturbation for fluorescent characterization of microorganism particles. *Chem. Biol. Sens.* **4036**, 169 (2000).
  26. Setlow, P. & Li, L. Photochemistry and Photobiology of the Spore Photoproduct: A 50-Year Journey. *Photochem. Photobiol.* **91**, 1263–1290 (2015).
  27. Yang, L. & Li, L. Spore photoproduct lyase: The known, the controversial, and the unknown. *J. Biol. Chem.* **290**, 4003–4009 (2015).
  28. Setlow, B. & Setlow, P. Dipicolinic acid greatly enhances production of spore photoproduct in bacterial spores upon UV irradiation. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 640–643 (1993).
  29. Setlow, P. Germination of spores of *Bacillus* species: What we know and do not know. *J. Bacteriol.* **196**, 1297–1305 (2014).
  30. Stringer, S. C., Webb, M. D. & Peck, M. W. Lag time variability in individual spores of *Clostridium botulinum*. *Food Microbiol.* **28**, 228–235 (2011).
  31. Douki, T., Setlow, B. & Setlow, P. Photosensitization of DNA by dipicolinic acid, a major component of spores of *Bacillus* species. *Photochem. Photobiol. Sci.* **4**, 591–597 (2005).
  32. Setlow, P. Spore Resistance Properties. *Microbiol. Spectr.* **2**, (2016).
  33. Slieman, T. A. & Nicholson, W. L. Role of Dipicolinic Acid in Survival of *Bacillus subtilis* Spores Exposed to Artificial and Solar UV Radiation. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 1274–1279 (2001).

SUPPLEMENTARY MATERIAL



**Figure S1:** *In vivo* consumption of DPA in spores undergoing UVc exposure, monitored by terbium DPA assay.



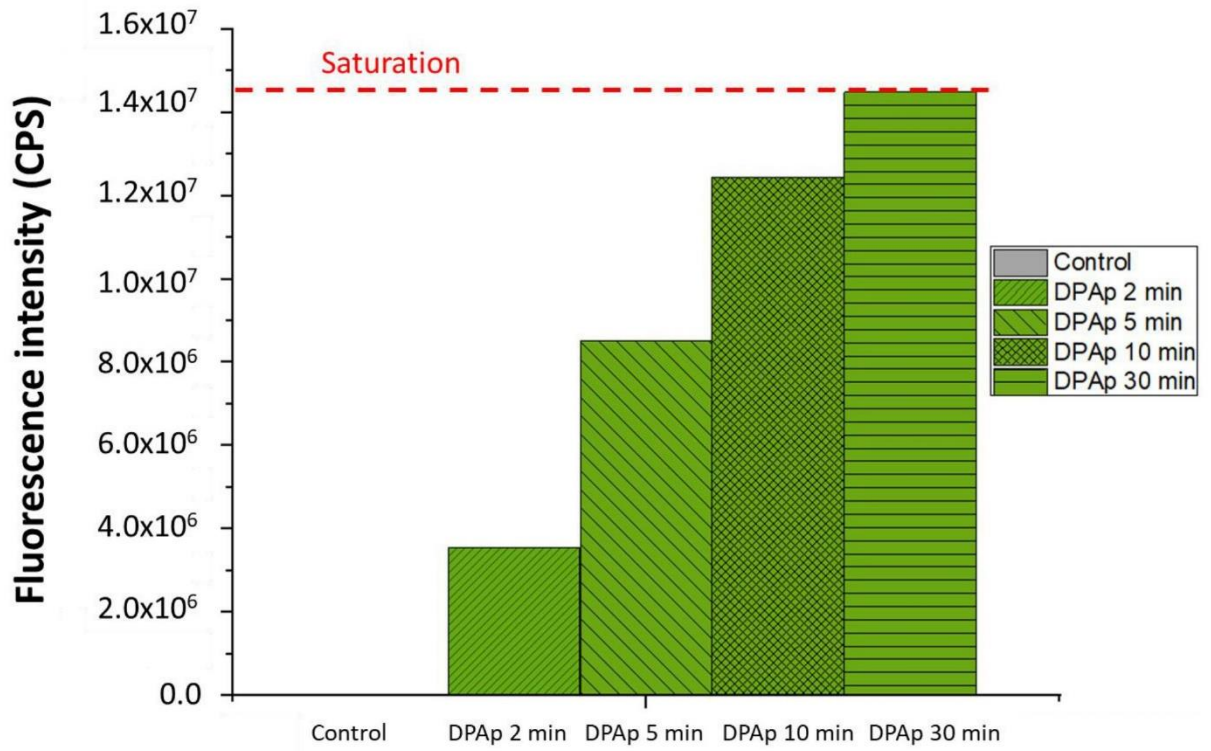
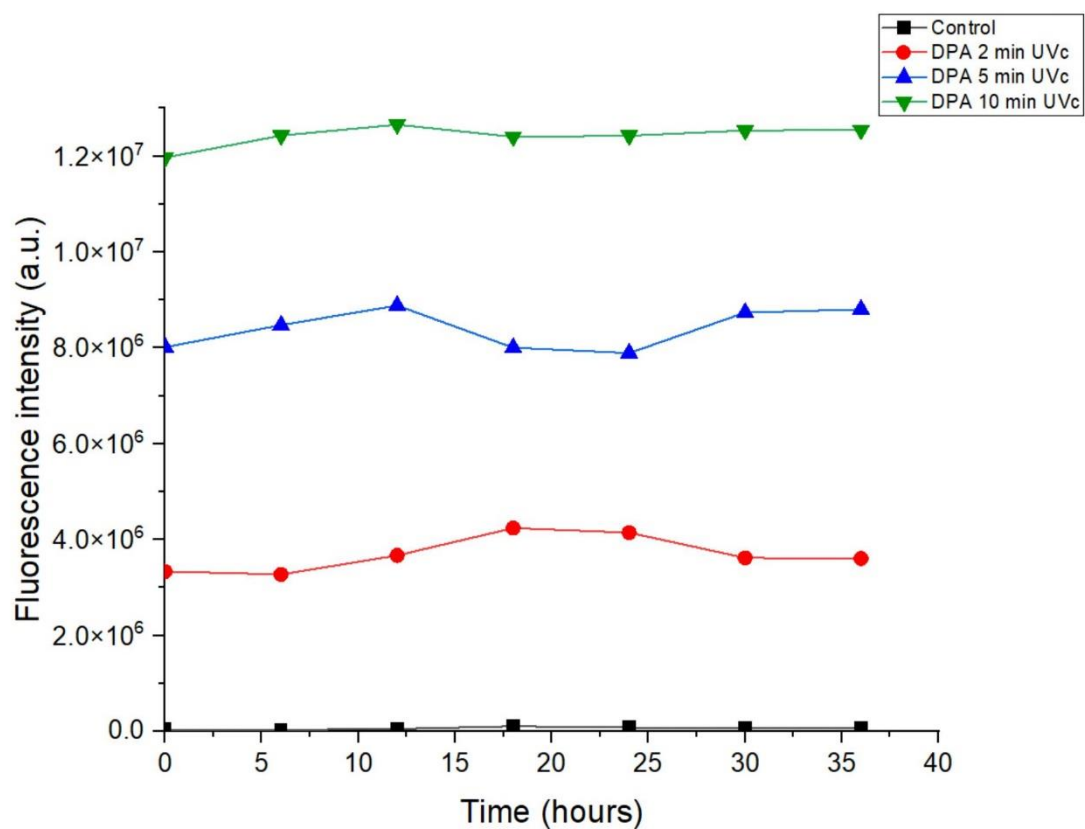


Figure S2: Influence of UVc exposure time on the fluorescence intensity of DPA solutions used to supplement FB122 spores.

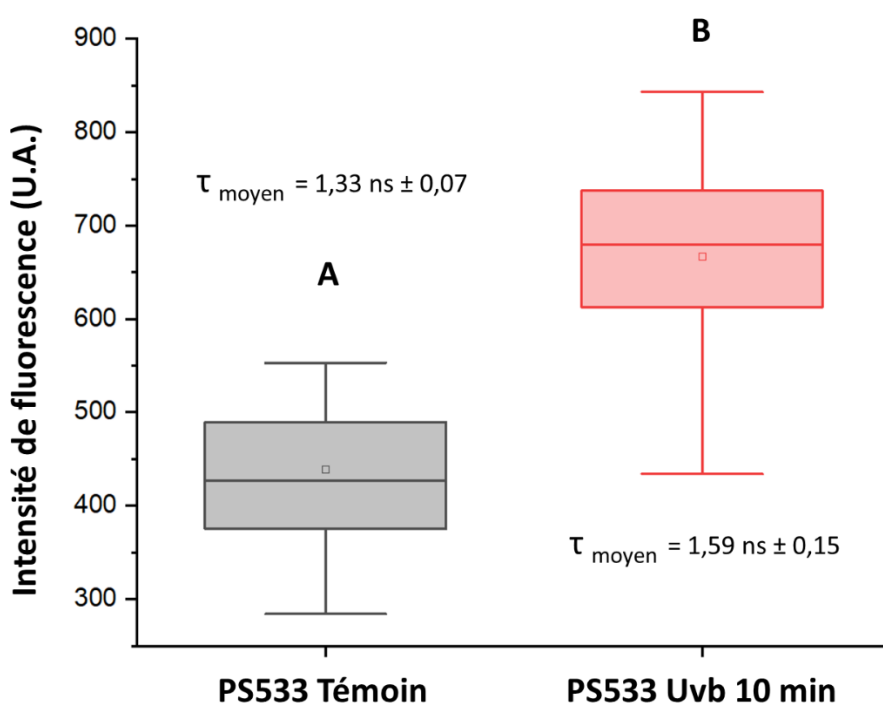




**Figure S3:** Fluorescence intensity of DPA solutions monitored after 2 min (red), 5 min (blue) or 10 min (green) UVc exposure and unexposed control DPA solution (black). The DPA solution exposed to UVc for 30 min is not shown because the fluorescence intensity measurements exceed the saturation limit of the spectrometer.

### I.4. Résultats complémentaires et conclusions du chapitre 1

Ces deux études montrent que la formation de photoproduits peut être suivie *in vivo* au sein du protoplaste des spores. Elles semblent également montrer qu'un photoproduit instable non répertorié dans la littérature, issu de l'exposition du DPA aux UVc, précède l'apparition de certains photoproduits fluorescents. Reste à savoir si ces photoproduits peuvent être naturellement créés. Dans l'environnement, les UVc solaires n'arrivent pas au niveau du sol car ils sont filtrés par l'atmosphère terrestre. Il serait intéressant d'observer si les UVb naturellement présents peuvent induire la formation de ces photoproduits, pour savoir si les effets biologiques constatés des DPAP peuvent également être observés en conditions naturelles. Une expérience supplémentaire a été menée pour observer si l'apparition éventuelle de photoproduits peut également être suivie en utilisant le protocole développé dans cette partie du manuscrit, après une exposition des spores aux UVb (Fig. 15).



**Figure 15 :** Intensité de fluorescence des spores bactériennes (N=12) avant et après irradiation UVb (312 nm) 10 min à 0.120 J/cm<sup>2</sup>, pour la souche PS533 (type sauvage). Les lettres représentent une différence d'intensité de fluorescence significative.  $\tau_{\text{moyen}}$  est la valeur de temps de vie de fluorescence moyenne de l'ensemble des spores observées.

## Chapitre 1 – Résultats complémentaires et conclusion

Ces résultats montrent que comme pour une exposition aux UVc, l'intensité de fluorescence des spores augmente significativement après 10 min d'exposition aux UVb. Il a fallu cependant augmenter le temps d'irradiation par rapport à une exposition aux UVc, pour que l'augmentation d'intensité de fluorescence soit détectable. Par ailleurs, le temps de vie de fluorescence tend à s'allonger après exposition aux UVb, comme cela a été observé précédemment lors d'une exposition aux UVc. Ces deux résultats semblent montrer que des photoproduits du DPA peuvent également être formés lors d'une exposition UVb. Il faut cependant s'interroger si ces photoproduits sont identiques à ceux formés lors de l'exposition aux UVc. Cette question sera abordée dans le prochain chapitre de ce manuscrit.

Un autre point important concerne l'effet des photoproduits sur la spore. Jusqu'ici, seul le DPAp1, identifié très récemment, a été caractérisé comme ayant un effet biologique photosensibilisant lors d'une exposition aux UV. Dans le présent travail, il apparaît cependant que les photoproduits peuvent avoir plusieurs effets bénéfiques pour la spore. Ces résultats sont d'autant plus intéressants que les effets constatés ne concernent pas seulement la létalité face aux UVc, mais également la cinétique de reprise de la germination et la croissance des cellules végétatives. Une identification précise des photoproduits responsables de ces effets biologiques pourrait donner lieu à leur synthèse et leur utilisation comme des germinants plus efficaces encore que le DPA. L'intérêt des germinants réside dans le fait que les cellules végétatives sont bien plus faciles à détruire que les spores, en particulier dans le contexte de la conservation des aliments. Lorsque la germination débute, les spores perdent en effet leurs propriétés de résistances. Des barèmes de traitements physiques (comme la température ou la pression) moins intenses, compatibles avec la conservation des propriétés organoleptiques des aliments, peuvent alors être utilisés. Ainsi, disposer de molécules induisant la germination de manière très efficace est très intéressant pour améliorer la maîtrise des procédés de décontamination en agroalimentaire. Il peut également s'avérer possible que certains photoproduits puissent avoir un effet délétère sur les formes végétatives d'autres micro-organismes, conférant un avantage aux spores relarguant ces molécules dans leur environnement naturel. Cela reste une voie à explorer. Cependant, tout comme certains photoproduits augmentent la résistance aux UVc, la survie à d'autres stress physiques, tels que la température ou la pression, pourrait être améliorée par certains de ces photoproduits, ce qui est un inconvénient dans la perspective de processus de décontamination.

Un autre potentiel d'utilisation réside dans le fait que la production de DPAp fluorescents est proportionnelle à la dose d'UVc utilisée lors de l'irradiation. L'intensité de

## Chapitre 1 – Résultats complémentaires et conclusion

fluorescence résultante semble de plus rester assez stable dans le temps, semblant pouvoir être observée au moins plusieurs jours après irradiation. Ces propriétés pourraient être exploitées de différentes manières. Des capsules constituées d'une solution de spores ou de DPA encapsulé dans une matière perméable aux UVc comme du quartz par exemple pourraient être utilisées comme sondes de pénétration aux UVc dans un milieu d'intérêt. En agroalimentaire, des jus de fruits, du lait ou même de l'eau peuvent être traités par l'utilisation de rayonnement UVc, en passant dans de petits capillaires par exemple (Tremarin, Brandão and Silva, 2017; Ansari, Ismail and Farid, 2019; Prado *et al.*, 2019; Delorme *et al.*, 2020). Ajouter ces capsules dans ce type de liquide et les récolter par centrifugation après l'exposition aux UVc pourrait permettre de tester l'efficacité du dispositif d'irradiation, en mesurant l'intensité de fluorescence résultant de la dose qu'elles auront reçue.

Il reste encore à investiguer plus en détail le lien entre hydratation, DPA/CaDPA et production de DPAP/CaDPAP. En effet, les résultats obtenus en spectrométrie de masse ont été acquis en utilisant du DPA en solution, or les spores sont considérées comme très déshydratées et ce même en suspension dans de l'eau. Toutefois le CaDPA présent dans les spores tendrait à se rapprocher d'une forme sèche amorphe, comme l'a montré une étude américaine en 2012 (Kong, Setlow and Li, 2012). La quantité d'eau au sein du protoplaste peut cependant légèrement varier selon que les spores soient sèches ou en suspension (Kong, Setlow and Li, 2012). Le DPA semblant jouer un rôle différent dans la résistance des spores aux UV selon la condition d'hydratation, il semble dès lors important de déterminer si l'hydratation exerce également une influence sur la nature des photoproduits créés lors d'une exposition du DPA aux UVc. Des travaux complémentaires entrepris au laboratoire (thèse de M. Pacheco, 2022) ont en effet permis de révéler quelques différences dans la formation des DPAP lorsque ceux-ci sont créés par irradiation en condition sèche comparativement à une irradiation en solution (Pacheco, 2022). Il semble qu'en condition sèche, une moins grande diversité de DPAP soit formée (Tab. 1). Une différence remarquable entre les conditions d'irradiation consiste en l'absence de certains DPAP en conditions sèches, notamment les DPAP1 et DPAP2. L'état fortement déshydraté du protoplaste des spores fait que la formation de DPAP *in vivo* se produit dans des conditions probablement similaires à l'irradiation *in vitro* en condition sèche, même si les spores sont irradiées en solution. Les deux photoproduits précédemment identifiés par Nardi *et al.* 2021 (Nardi *et al.*, 2021), DPAP1 et DPAP2, pourraient ainsi n'être formés que *in vitro*, ou bien seulement en très petite quantité dans la spore, du fait de la faible hydratation intrinsèque de cette dernière. L'absence de formation du DPAP1 en dessous d'un certain seuil

## Chapitre 1 – Résultats complémentaires et conclusion

d'hydratation pourrait expliquer en partie la disparition de l'effet photosensibilisateur dû au DPA lorsque les spores sont exposées aux UVc en conditions sèches. Dans cette condition, l'hydratation déjà faible du protoplaste est alors en effet à son minimum. Cette hypothèse explique le rôle ambigu que semble jouer la présence de DPA dans la résistance de la spore aux UVc en fonction des conditions d'hydratation. En condition sèche, le DPA protégerait ainsi l'ADN en absorbant une partie des rayonnements UVc, sans augmenter la photosensibilité de l'ADN par la production du DPAP1, comme cela pourrait se passer en conditions plus hydratée. Cette hypothèse repose néanmoins sur le fait que seul le DPAP1 soit le seul photosensibilisateur parmi les DPAP formés, ou que la formation d'éventuels autres DPAP photosensibilisateurs soit également limitée par l'état de faible hydratation du protoplaste, ce qui n'a encore jamais été montré. Finalement, les DPAP ayant été introduits artificiellement dans les spores dans la seconde étude présentée dans ce chapitre sont créés *in vitro* et en solution. On peut alors se demander si les DPAP provoquant les effets biologiques observés sont également formés *in vivo* lorsque les spores sont directement exposées aux UVc. Ces résultats questionnent la transposition des études *in vitro* sur la photochimie du DPA, réalisées en solution, sur les spores dont le protoplaste est considéré comme très peu hydraté. Cette question est développée dans le chapitre suivant, qui s'intéresse plus en détail au rôle de l'hydratation sur la photochimie du DPA.

# Chapitre 2

**Influence de l'état d'hydratation sur la  
photochimie du CaDPA et lors d'une  
exposition aux UV**

### II.1. Introduction

Dans le premier chapitre, des photoproduits du DPA ont été identifiés et une première étude de leurs effets biologiques a été réalisée. Le double rôle du DPA explicité dans le premier chapitre semble être potentiellement lié à la formation de DPAP spécifique de l'état d'hydratation de la molécule lors de son exposition aux UVc. En effet, le DPAP1 identifié comme photosensibilisateur semble ne plus être formé en conditions sèche. Il apparaît nécessaire d'étudier plus en profondeur comment les conditions d'hydratation peuvent influencer la formation de ces photoproduits. Les conditions d'hydratation différentes entre les études faites en solution *in vitro* et celle faites *in vivo* sur la spore où le DPA est dans un environnement beaucoup moins hydraté posent des questions sur la transposition des études faites *in vitro* à celles faites *in vivo* où les conditions ne sont pas les mêmes. Dans les études réalisées au chapitre précédent, comme dans beaucoup d'études parues jusqu'alors, du DPA a été utilisé pour la création de photoproduits (DPAP) et non du CaDPA. Or, il est connu que dans les spores, plus de 90% du DPA est chélate à des ions calcium formant ainsi du dipicolinate de calcium (CaDPA). Ce deuxième chapitre ayant pour objectif d'approfondir la caractérisation de la photochimie du DPA en fonction de ses conditions d'hydratation mais également de fournir une étude plus proche du DPA contenu dans les spores. Du CaDPA a donc été utilisé par la suite pour la formation de photoproduits (CaDPAP). Il a été montré dans le chapitre 1 que des photoproduits sont également formés lorsque les spores sont exposées aux UVb. Il apparaît nécessaire de savoir si ces CaDPAP dans ces deux conditions sont similaires. C'est pourquoi du CaDPA *in vitro* exposé aux UVb a également été étudié et comparé au CaDPA exposé aux UVc.

Trois techniques de spectroscopie ont été utilisées pour approfondir les connaissances sur la photochimie du DPA, la spectroscopie Raman, FTIR et O-PTIR. Les techniques d'analyses spectrales d'absorption infrarouge et de diffusion Raman peuvent en effet permettre de voir de fines différences de composition chimique entre deux échantillons. Elles ont été mises en œuvre pour observer les modifications chimiques du CaDPA après exposition aux UV, modifications traduisant la formation de CaDPAP. L'effet des conditions d'hydratation (état sec ou en solution) peut également être observé par ces techniques. Par ailleurs, une technique spectrale récente, appelée « Optical Photothermal Infrared spectroscopy » (O-PTIR), a également été utilisée pour cette étude du CaDPA et de la spore bactérienne. Son intérêt réside dans sa haute résolution spatiale, permettant d'obtenir des spectres d'absorption infrarouges à l'échelle de chaque spore au lieu d'une mesure d'ensemble dans le cas d'une étude *in vivo* qui

est présenté dans la dernière partie de ce chapitre. La première partie de ce chapitre présente des résultats complémentaires non publiés comparant les spectres issus du DPA et du CaDPA exposés aux UVc. Ces résultats ont pour objectif d'analyser les potentielles différences de photochimie entre le DPA et le CaDPA. Il est important de noter qu'une petite proportion de DPA non chélaté aux ions calcium subsistent dans la spore. Ainsi, même s'il s'avérait que le CaDPA et le DPA produisent des DPAP complètement différent, les études portant sur les DPAP resterait pertinentes et nécessaire pour comprendre la photochimie et la résistance de la spore aux UV dans son ensemble. La seconde partie du chapitre est présentée sous forme d'un article et se focalise sur des résultats concernant l'influence de l'hydratation sur la photochimie du CaDPA, lors de son exposition *in vitro* aux UV. La technique de spectroscopie O-PTIR n'a pas encore été utilisée à ce jour pour observer le CaDPA ni les spores bactériennes. L'acquisition et la caractérisation du spectre du CaDPA exposé aux UV ainsi que des spores de *B. subtilis* pourrait nous permettre d'en apprendre davantage sur les dégâts engendrés par les rayonnements UV sur la spore. C'est pourquoi la troisième et dernière partie de ce chapitre est dédiée à l'apport de la spectroscopie O-PTIR pour la caractérisation de la spore bactérienne. Cette partie a pour but de servir d'introduction à de futures études qui pourront comparer les résultats *in vitro* présentés dans ce chapitre avec de futurs résultats acquis *in vivo* sur les spores exposées aux UV.

### II.2. Comparaison entre DPAP et CaDPAP

#### II.2.1. Protocole

Du DPA concentré à 120 mM et du CaDPA concentré à 60 mM ont été exposés à un flux d'UVc de 0,120 J/cm<sup>2</sup> pendant 2 min pour former des photoproduits.

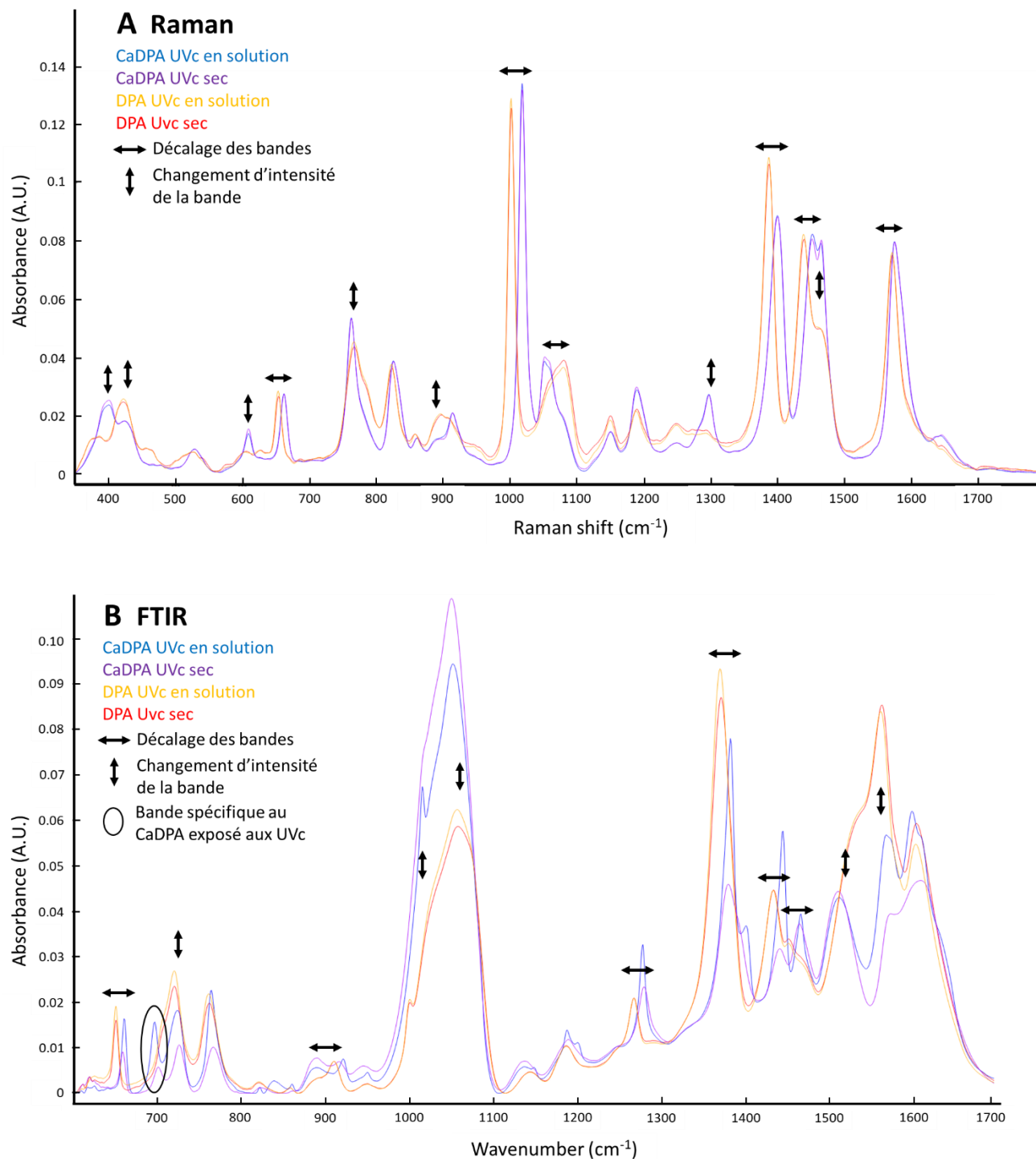
Les données présentées ci-dessous ont été acquises en spectroscopie Raman, FTIR et O-PTIR et analysées avec les mêmes protocoles que dans l'article présenté en section 2.3. de ce chapitre.

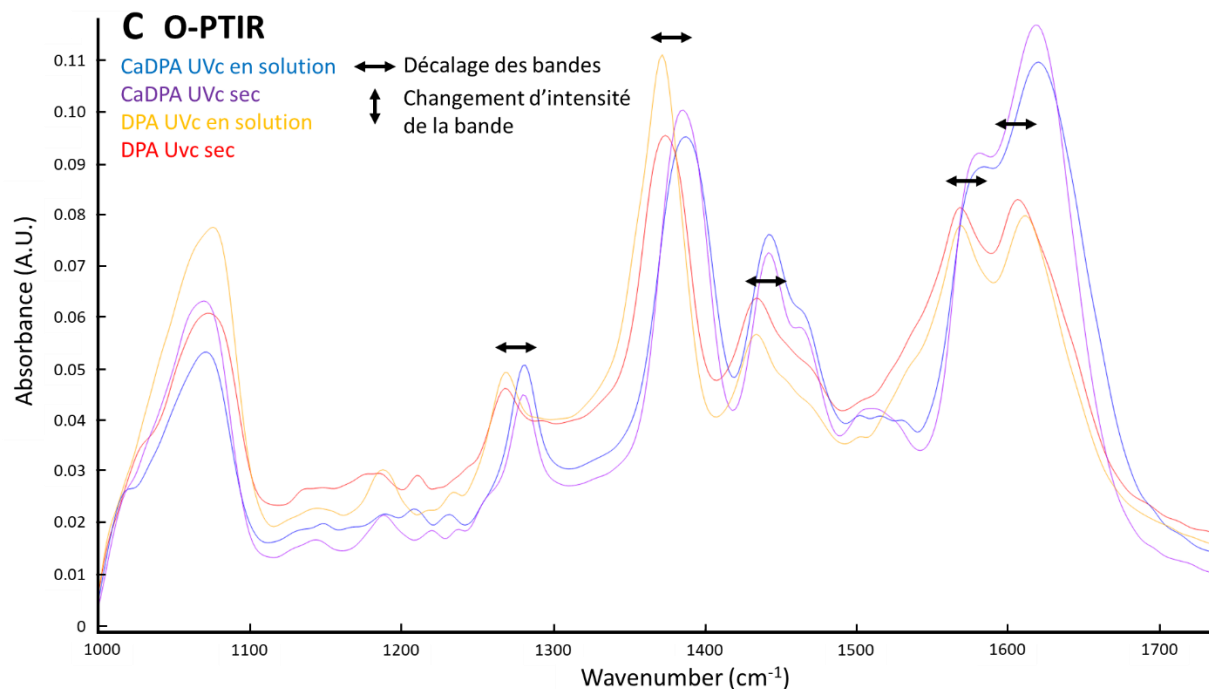
#### II.2.2. Résultats et discussion

Comme expliqué en introduction de ce chapitre, c'est l'exposition *in vitro* aux UVc du DPA qui est souvent étudiée, pour transposer ensuite les résultats à la compréhension des mécanismes *in vivo*. Or, dans les spores, le DPA est en majorité chélaté aux ions calciums, formant du CaDPA. La production de photoproduits (CaDPAP) lors de l'exposition de cette molécule aux UVc pourrait ainsi se révéler légèrement différente de la production de DPAP. Il



apparaît donc important de comparer les photoproduits CaDPap et DPAP, pour observer d'éventuelles différences entre ces molécules. La figure 16 représente les spectres du DPA et du CaDPA exposés aux UVc.





**Figure 16** : Spectres Raman (A), FTIR (B) et O-PTIR (C) du CaDPA et du DPA après 2min d'exposition aux UVc (0,120 J/cm<sup>2</sup>). En bleu et orange : exposition en solution de respectivement le CaDPA et le DPA. En violet et rouge, exposition en condition sèche. Les spectres sont obtenus par un moyennage de 10 spectres individuels pour le Raman et le FTIR, et d'environ 100 spectres pour l'O-PTIR.

On observe globalement que le DPA et le CaDPA irradiés ont des profils spectraux très similaires pour les trois techniques utilisées. De légères différences sont néanmoins visibles, principalement entre les spectres du DPA exposé aux UVc et du CaDPA exposé aux UVc, les conditions d'hydratation semblant peu influencer les spectres dans chacun des cas. Ces différences entre les conditions d'hydratation seront plus détaillées dans la section 2.3. de ce chapitre. Parmi les différences observées entre le DPA et le CaDPA irradiés, une bande spécifique au CaDPA exposé aux UVc est visible vers un peu moins de 700 cm<sup>-1</sup> dans le spectre FTIR. Dans la littérature, cette bande ne semble pas avoir été identifiée sur le spectre infrarouge du CaDPA (McCann and Laane, 2008). Cette bande pourrait traduire l'apparition d'une liaison spécifique d'un photoproduit du CaDPA exposé aux UVc, trahissant l'apparition d'un photoproduit différent de ceux générés par le DPA. Il est cependant étrange que seule cette bande trahisse l'apparition de photoproduits spécifique aux CaDPA. Ainsi, cette bande est plus probablement la même que celle de l'épaule observé à 701 cm<sup>-1</sup> sur le spectre du DPA correspondant aux liaisons entre atomes de carbone. Les principales différences semblent néanmoins provenir de changements d'intensité et de décalage d'environ 10 cm<sup>-1</sup> sur certaines bandes comme indiqué sur la Fig. 16. Les décalages semblent survenir sur les bandes du CaDPA

exposées aux UVc vers des plus grands nombres d'ondes par rapport aux bandes du DPA exposé aux UVc. Dans la littérature, ce décalage est également observé entre les spectres du CaDPA et du DPA non exposé aux UV (McCann and Laane, 2008; Kong, Setlow and Li, 2012). Il pourrait s'expliquer par un léger changement de conformation induit par la chélation du calcium. Par ailleurs, la littérature indique que la différence de concentration entre les échantillons de DPA et CaDPA pourrait également induire un léger décalage dans le spectre (Arsov, Urbančič and Štrancar, 2018). Il semble de ce fait que les photoproduits issus du DPA et du CaDPA sont probablement très similaires. Certains photoproduits du DPA peuvent probablement, comme le DPA lui-même, chélater des ions calcium au niveau de leur groupe carboxyle (si le pH est suffisamment haut pour induire une forme déprotoné du groupe carboxyle). Leurs spectres Raman ou infrarouge seront alors légèrement modifiés à cause de cette chélation. Des formes spécifiques de CaDPAp très différentes des DPAP, pourraient être envisagées, mais si elles existent, elles restent minoritaires car sinon les spectres seraient bien plus différents.

### **II.3. Etude 3 : Influence de l'hydratation sur la photochimie du CaDPA.**

L'étude présentée ci-dessous a été réalisée, sur du CaDPA *in vitro* exposé à deux gammes d'UV, l'UVc et l'UVb, dans deux conditions d'hydratation différentes. L'objectif était de caractériser *in vitro* l'effet d'hydratation sur la photochimie du CaDPA par spectrométrie FTIR, Raman et O-PTIR. Ces techniques d'analyse spectrale étant considérées peu destructives, ce travail de caractérisation peut ensuite servir d'étude préliminaire à l'observation de la formation de CaDPAP *in vivo*, directement dans les spores bactériennes. Cette caractérisation *in vitro* de l'influence de l'hydratation sur la photochimie du CaDPA est présentée sous la forme d'un article en soumission au « journal of photochemistry and photobiology A : Chemistry ». Ma contribution à cette étude a été d'acquérir les spectres Raman et une partie des spectres O-PTIR, de faire l'ensemble des analyses spectrales et des prétraitements nécessaires ainsi que de rédiger l'article. Les analyses et la rédaction de la partie concernant l'analyse « multiblocks » ont été réalisées par L. Dujourdy (ingénieure de recherche).

---

### **Influence of hydration on calcium dipicolinate (CaDPA) during UVb and UVc exposure studied via Raman, FTIR and O-PTIR spectroscopy.**

J. Dikec<sup>1</sup>, M. Pacheco<sup>2</sup>, L. Dujourdy<sup>3</sup>, C. Sandt<sup>4</sup>, P. Winckler<sup>1,5</sup>, JM Perrier-Cornet<sup>1,5</sup>

<sup>1</sup>UMR Procédés Alimentaires et Microbiologiques, L'Institut Agro Dijon, Université de Bourgogne-Franche-Comté, 1, Esplanade Erasme, 21000 Dijon, France.

<sup>2</sup>UMR Procédés Alimentaires et Microbiologiques, L'Institut Agro Dijon, Université de Bourgogne-Franche-Comté, 1, Esplanade Erasme, 21000 Dijon, France.

<sup>3</sup>L'institut Agro Dijon - Service d'Appui à la Recherche, F-21000 Dijon, France

<sup>4</sup>SMIS beamline, Synchrotron Soleil, L'Orme des Merisiers, BP 48 Saint Aubin, 91192 Cedex Gif-sur-Yvette, France

<sup>5</sup>Dimacell Imaging Facility, L'Institut Agro Dijon, Université de Bourgogne Franche-Comté, 1 Esplanade Erasme, 21000 Dijon, France.

#### **Abstract**

Calcium dipicolinate (CaDPA), a major component of bacterial spores, is known to be either a photoprotective or a photosensitizing agent in terms of UV radiation, depending on its hydration state. This molecule is also known to produce numerous photoproducts (DPAp) upon UV exposure, some of which influence spore resistance. The purpose of this study was to better characterize the influence of hydration on the photochemistry of CaDPA using vibrational spectroscopy through three different techniques: Raman, FTIR and O-PTIR microspectroscopy. Synthetic CaDPA was exposed to UVc or UVb in dry conditions or in a water solution. Raman, FTIR and O-PTIR spectra of dry or wet CaDPA were compared before and after irradiation. Results suggest that UVc and UVb exposure mainly affects the bands corresponding to the pyridine ring of CaDPA. However, this effect differs depending on the UV range and the hydration state during UV exposure. Spectra of one DPAp identified in a previous publication as a photosensitizer, named DPAp1, were also acquired by means of the same three spectroscopy techniques. Although DPAp1 comes from a dimerization of two DPA molecules, its spectra appear to be quite different from those of CaDPA. Moreover, this study compares the data provided by O-PTIR, Raman and FTIR spectroscopy via a multiblock analysis. While

the information obtained via O-PTIR seems to be closer to that provided by Raman than to that provided by FTIR, the three techniques seem to be quite complementary.

### 1. Introduction

Bacterial spores are known to be one of the most resistant forms of life, especially to UV light. For example, spores show a resistance to UVc which is 10 to 50 times higher than that of vegetative cells<sup>1</sup>. The exposure of spores to UVc leads to DNA strand breaks and the formation of specific lesions on spore DNA called Spore Photoproducts (SPs). These SPs are the result of the dimerization of two adjacent thymine on the same DNA strand, leading to DNA damage. This type of lesion is the main cause of mortality in spores exposed to UVc<sup>2,3</sup>. In contrast, UVb exposure generates less mortality than UVc at the same dose. UVb exposure also generates SPs in lesser quantities and leads to the increase in another type of lesion called Cyclobutane Pyrimidine Dimers (CPDs). CPDs are another type of lesion that are also derived from the dimerization of adjacent pyrimidines (thymine or cytosine)<sup>2,4</sup>. Several components are involved in the resistance of spores to UV light. Some of these components, such as the SP lyase enzyme, are only involved in repairing SP lesions created during UV exposure. Others, such as the NER repair system or the spore coat structure, are not only involved in UV resistance but also in resistance to other physical stresses like exposure to other light types. Some factors, like the SP lyase enzyme, influence spore resistance to both UVc and UVb. This is, for example, the case for small acid soluble proteins (SASPs) and dipicolinic acid (DPA).

DPA is a spore-specific molecule located in the spore core, chelated primarily with  $\text{Ca}^{2+}$  (CaDPA)<sup>3-5</sup>. The presence of CaDPA improves the resistance of spores to UVb. However, the role of this molecule during UVc exposure is still not clearly understood. CaDPA appears to have a dual role in the resistance of spores to UVc, depending on the hydration state. When spores are exposed to UVc in an aqueous suspension, CaDPA seems to have a photosensitizing role by increasing the SP formation on DNA. On the contrary, under dry conditions, CaDPA takes on a photoprotective role<sup>4</sup>. It is known that when exposed to UVc, CaDPA forms photoproducts (CaDPAp)<sup>4</sup>. One on-going study has been undertaken to better understand the photochemistry of DPA and CaDPA and to characterize their photoproducts. About ten of these photoproducts have been characterized so far, one of which has been chemically synthesized (DPAp1)<sup>6,7</sup>. It has been demonstrated through Raman and infrared spectroscopy studies that

hydration seems to affect the conformation of CaDPA<sup>8-13</sup>. Nevertheless, the role of hydration of CaDPA upon exposure to UV light has not been widely studied.

Moreover, although CaDPA has an absorption band at the UVc/UVb boundary, around 280 nm, there is also a minor absorption band at 340 nm in the UVb domain. Previous studies of the photochemistry of CaDPA have focused mainly on UVc and less on UVb<sup>8</sup>. One aim of the present study is thus to examine the influence of CaDPA hydration on its photochemistry during UVb and UVc exposition. To do so, three spectroscopy techniques were used: Raman microspectroscopy, Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) and Optical Infrared Photothermal Spectroscopy (O-PTIR). Raman and FTIR spectroscopy are two techniques known for their complementarity and have been widely used to study CaDPA. O-PTIR is a relatively new technique and, to our knowledge, has never been used to study CaDPA. Thus, this article also discusses the contributions of O-PTIR to the study of CaDPA through chemometric analyses. The differences in the spectra of CaDPA *in vitro*, before and after exposure to UVc and UVb in dehydrated and in solution conditions were observed. The results provided details on the influence of the hydration of CaDPA during both UVc and UVb exposure. UVb and UVc influences on CaDPA were also compared. Finally, the spectra of the only chemically synthesized and commercially available DPA photoproduct (DPAp1) were also acquired and characterized via the three techniques used in this study.

## 2. Experimental procedures

### 2.1. Sample preparation

DPA (Sigma-Aldrich, Germany, 167.12 g/mol, purity > 98 %) solution (120 mM) was prepared in water and stored at room temperature. The pH was adjusted to 8 with a Tris base buffer (Sigma-Aldrich, Germany, 121 g/mol, purity > 99.9 %). CaDPA solution (60 mM) was prepared with a 1:1 mol/mol mix of DPA solution and CaCl<sub>2</sub> (Sigma-Aldrich, Germany, 110.98 g/mol, purity > 96 %).

Two hydration states were used during UV exposure, but all spectral acquisitions were performed in dry conditions. All samples were dried for 50 min directly on the support for spectral analysis: glass slides for Raman, ZnS slides for O-PTIR and directly on the diamond ATR crystal for FTIR.

### 2.2. UVc exposure protocol

UV irradiation was performed using a UV irradiation system CROSSLINKER® CL-508 (UVItec Ltd, UK) at 254 nm or 312 nm with a flux of 0.120 J/cm<sup>2</sup> for 2 min. 200 µl of CaDPA in solution were exposed to UV in a quartz cuvette and then dried on an appropriate support. Dry CaDPA was irradiated directly on glass slides (for Raman) or ZnS slides (for O-PTIR) after 50 min of drying. For FTIR, dry samples were UV exposed on glass slides after drying, then solubilized and deposited on the diamond ATR crystal.

### 2.3. Spectroscopy analysis

#### 2.3.1. Raman

Raman Stoke spectra were recorded using a DXR Raman microscope (Thermo Fisher Scientific) operated with Omnic 9.1. The microscope was equipped with a CCD detector, a 532 nm laser (10 mW) and corresponding edge filter. The microscope was operated in confocal mode with a 50 µm pinhole. In this mode, the full range grating gave a 4-8 cm<sup>-1</sup> spectral resolution over a 100-3400 cm<sup>-1</sup> range. The spectra were measured in backscatter configuration with a 100X/0.9NA LWD objective. Two scans of 30 seconds were coadded to improve the signal-to-noise ratio. The system was calibrated before the experiment using the built-in automatic wavelength and laser frequency calibrations.

#### 2.3.2. ATR-FITR

ATR-FTIR spectra were measured with a Nicolet 5700 spectrometer equipped with a MIRacle ATR accessory with a 2 mm, single-bounce diamond crystal (refractive index  $n=2.4$ , angle 45°). 20 µl of the sample were deposited on the crystal and dried at room temperature. Spectra were recorded by coadding 128 scans between 600 and 4000 cm<sup>-1</sup> at 1 cm<sup>-1</sup> resolution. The crystal was washed with water/ethanol/paper between each measurement. Assuming a refractive index of 1.6 for CaDPA and DPAP1, the depth of penetration of the beam in the powder was approximately 4.0 µm at 770 cm<sup>-1</sup>, 3.1 µm at 1000 cm<sup>-1</sup>, 2.2 µm at 1380 cm<sup>-1</sup>, and 1.9 µm at 1600 cm<sup>-1</sup>.

#### 2.3.3. O-PTIR

O-PTIR was performed at the SMIS beamline of the Synchrotron Soleil using a mIRage microscope (Photothermal Spectroscopy Corporation, Santa Barbara, CA, USA) controlled by the PTIR Studio software. The IR laser was a MIRCAt tunable pulsed Quantum Cascade Laser

(Daylight Solutions, San Diego, CA, USA), scanning in four stages from 920 to 1800 and 2700 to 3026  $\text{cm}^{-1}$  at a pulse rate of 100 kHz. The probe laser was a Continuous Wave Cobolt 532 nm laser and its photothermally-induced modulation was recorded with an Avalanche Photo Diode detector (APD). Both lasers were focused on the sample through a 40 $\times$ /0.78NA Schwarzschild objective (Pike Technologies, Madison, WI, USA) and data were collected in reflection mode. A background spectrum was collected on an IR-reflective ITO layered low-emissivity glass slide (Kevley Chesterland, OH, USA) with 50-100 coadded scans. Spectra were recorded at 2  $\text{cm}^{-1}$  data point spacing from 920 to 1800  $\text{cm}^{-1}$  and 2700 to 3026  $\text{cm}^{-1}$  at 100  $\text{cm}^{-1}/\text{s}$  speed.

### 2.4. Statistical analysis

In this study, the differences in the spectra of UV-exposed CaDPA are investigated to understand the particularities of these spectra following exposure. Some of these differences are directly visible on the spectra but others are more difficult to detect and interpret. Sometimes minor differences may contain a large amount of information which can be critical to understanding the data completely. For this reason, direct interpretation of the spectral results can prove difficult. To overcome these difficulties and obtain deeper insights, we need to use data mining methods. These methods must be suitable for handling large multidimensional datasets and exploring all spectral information simultaneously. Sampling, instrument, experiment, environment and modelling all contribute to the accuracy of the spectral methods employed in this study. The impact of some of these factors is easier to correct than others. Certain factors are more difficult to control and/or correct, including light scattering in the infrared range and fluorescence in the Raman. To gain accuracy, interference from these factors should be eliminated or minimized by using appropriate sample presentation and/or mathematical pre-processing before implementing multivariate data analysis methods.

#### *Pre-processing in Raman spectra*

Background correction is a very important aspect of pre-processing. Certain phenomena such as fluorescence induce unequal amplitude shifts on different wavenumbers (Raman shifts). These amplitude shifts must be compensated before proceeding with further analysis. In our



case, a background correction removal was carried out first by subtracting the glass signal from the spectrum.

### *Pre-processing in FTIR spectra*

Due to various instrumental and scattering effects, the FTIR spectrum is superimposed on top of a background. Like Raman spectroscopy, the background in FTIR signals consists of broad bands (low frequency regions). Background correction methods may be as simple as subtracting an offset (DC shift) or removing a piecewise constructed baseline by selecting a few points and joining those points through straight lines.

### *Pre-processing common to Raman, FTIR, and O-PTIR spectra*

Derivatives are mainly used to resolve peak overlap (or enhance resolution) and eliminate constant and linear baseline drift between samples. First and second derivatives are more common in practice than higher-order ones. The noise present in the raw signals also contains very high frequency components and these in turn are also enhanced due to derivatization process, along with genuine Raman, FTIR or O-PTIR bands. To suppress these noisy components, a smoothing operation is generally adopted. Second derivative spectra were computed using a Savitzky-Golay filter set as follows: polynomial degree as 2, derivative order of polynomials as 2 and number of smoothing points (called windows) 5. The spectra were then normalized using vector normalization. This normalization process was also performed to compare the non-derived spectra. The software used to handle spectroscopic data (pre-processing and basic chemometric analysis) was Quasar 1.5, based on Orange, a user-friendly, open-source tool for machine learning and data visualization<sup>9,10</sup>.

### *Chemometric methods*

Data analysis tools can be classified as univariate, multivariate or megavariate, depending on the number of variables considered in the analysis of a single sample at a time. Many chemometric tools can be introduced, such as data projection linear methods<sup>11</sup>, which compress raw data, uncover hidden correlations and separate useful information from noise. Projection methods provide a very intuitive and visual approach for data analysis and Principal

Component Analysis (PCA) is the main tool for this purpose. The subspace identified by PCA constitutes the most faithful dimensional approximation of the original data. This allows for the compression of the data dimensionality while ensuring a minimal loss of information<sup>12</sup>.

As spectroscopy data came from a multiplatform analysis of the same samples (Raman, FTIR and O-PTIR), a multiblock dataset was built in which the data were not simply multivariate but also multimodal, i.e., multivariate and multisource. In this case, spectral profiles are multivariate (as the responses are acquired at several wavenumbers) and the modes are represented by the three different spectroscopy techniques. Multiblock data analysis accomplishes tasks similar to those undertaken with single-block chemometric techniques such as PCA, but they can achieve an enhanced understanding of the common and the distinct information present in the data acquired from different platforms<sup>13</sup>. In order to assess relationships and trends in our multiple datasets, a multiple co-inertia analysis (mCIA) was used.

Multiblock analyses were conducted using R 4.1.2 (R Core Team 2021), RStudio 1.4.1106 (RStudio Team 2021), and multiblock (Liland 2022) and omicade4 packages<sup>14</sup>.

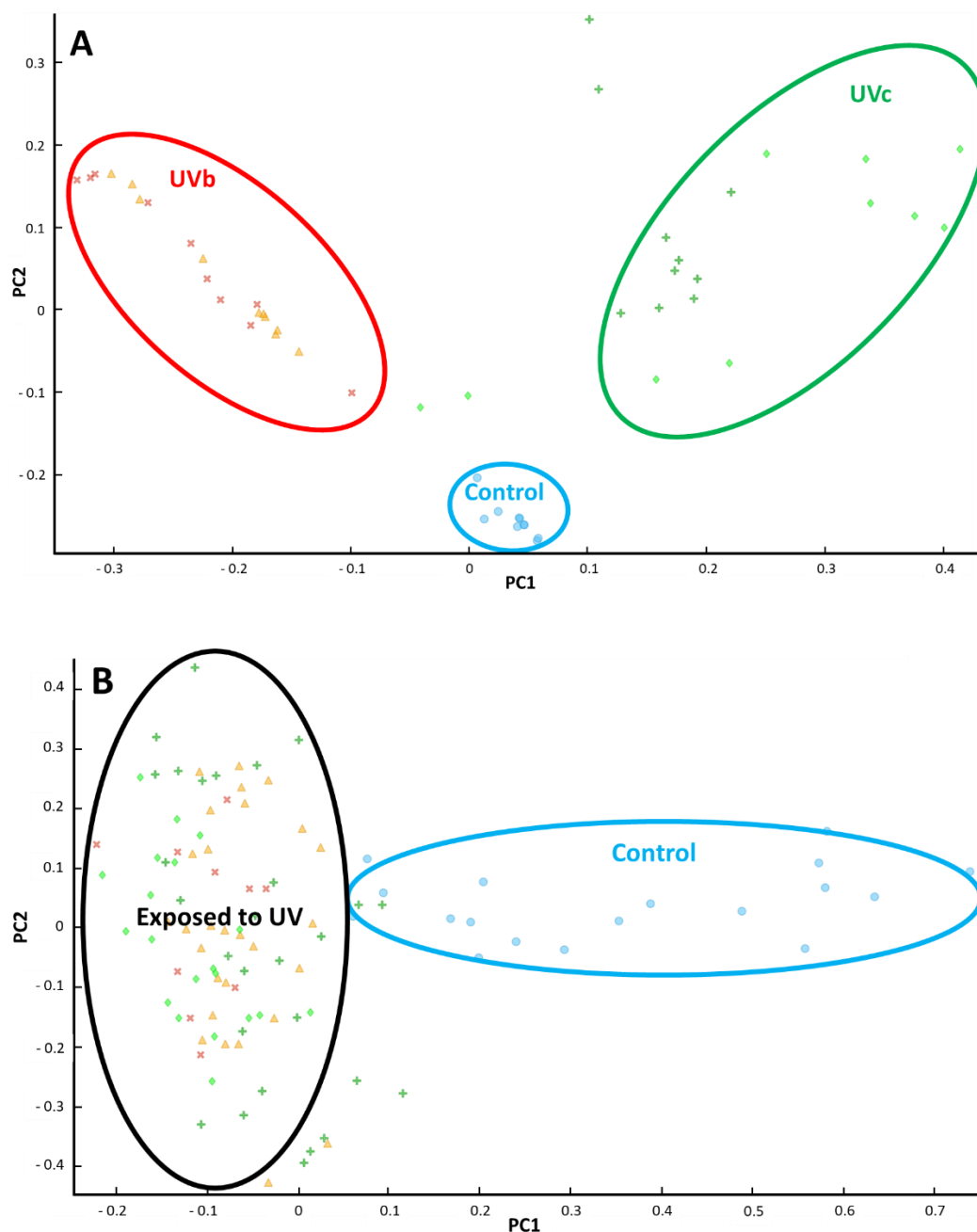
### 3. Results & discussion

#### 3.1. UVb and UVc influence on CaDPA

Although UVb and UVc are both known to affect the survival of microorganisms, their impacts on biological samples are different. UVb and UVc can both produce SP lesions on spore DNA but CPDs are also formed during UVb exposure<sup>6,15,16</sup>. When spores are exposed to these radiations, their fluorescence intensity and their fluorescence lifetime increase (data not shown). This phenomenon is attributed to the formation of CaDPAp. Nevertheless, it is unclear whether these CaDPAp are the same depending on the nature of the exposure (UVc or UVb). Thus, Raman, FTIR and O-PTIR spectroscopy have been used to investigate the influence of UVc versus UVb radiation on CaDPA.

Figure 1 shows the score plots from PCA obtained with Raman and O-PTIR spectra. FTIR is not represented here because only the score plots from Raman and O-PTIR clearly identify the difference between the control condition and CaDPA exposed to UV. The score plot from Raman PCA clearly separates CaDPA exposed to UVc from CaDPA exposed to UVb.

The PCA of O-PTIR data only distinguishes the control condition (non-exposed CaDPA) from UV-exposed CaDPA, without considering the UVc/UVb difference.



**Figure 1:** Score plots from PCA of *in vitro* CaDPA exposed to UVb and UVc in liquid or dry conditions. **A:** score plot from Raman microspectroscopy measurements **B:** score plot from O-PTIR spectroscopy measurements. Blue points represent CaDPA control samples. Red crosses and orange triangles represent UVb-exposed CaDPA under dry and liquid conditions respectively. Green crosses and rhombus shapes represent UVc-exposed CaDPA under dry and liquid conditions respectively.

Judging by these results, Raman spectroscopy seems to be the most sensitive technique with which to observe the influence of UVb and UVc on CaDPA. These results reflect a difference in the photochemistry of CaDPA depending on the nature of the exposition, which

may be related to a potential difference in CaDPAP formed during these exposures. To further investigate the CaDPA photochemistry, the PCA of Raman spectra was performed using measurements on UVb- versus UVc-treated CaDPA (see Fig. S1 in supplementary data). Loadings of the first principal component (PC1) distinguish UVb from UVc exposure and pinpoint the spectral bands involved in this difference. The specific spectral bands and their structural correspondences are listed in Table 1.

**Table 1:** Main Raman spectral bands highlighted by PCA distinguishing CaDPA exposed to UVc from CaDPA exposed to UVb.

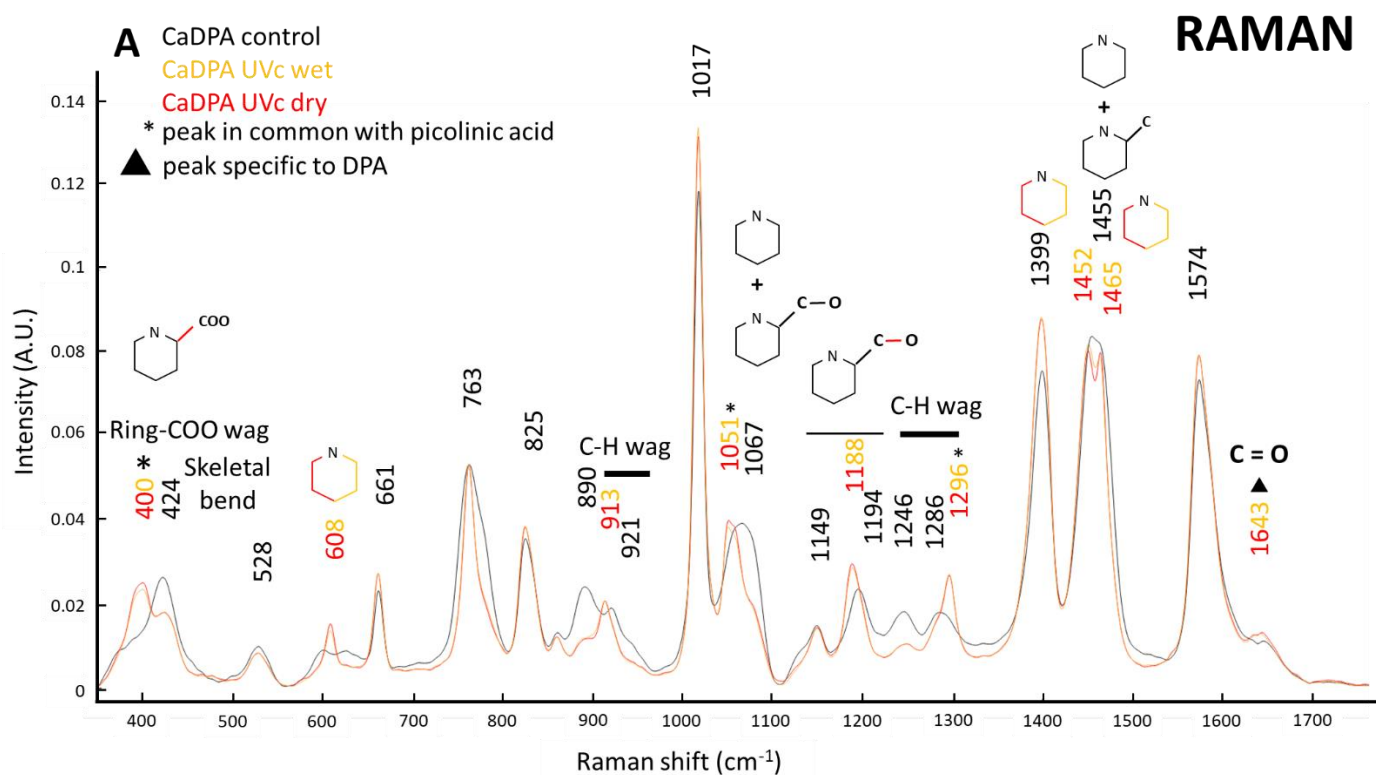
CaDPA UVc exposed VS CaDPA UVb exposed			
Raman PC1 68%	Bands (cm <sup>-1</sup> )	Correspondence	More represented in
	1465	Ring stretch	UVb
	1020	Ring respiration	UVb
	1014	Ring respiration	UVc
	762	C-H	UVb

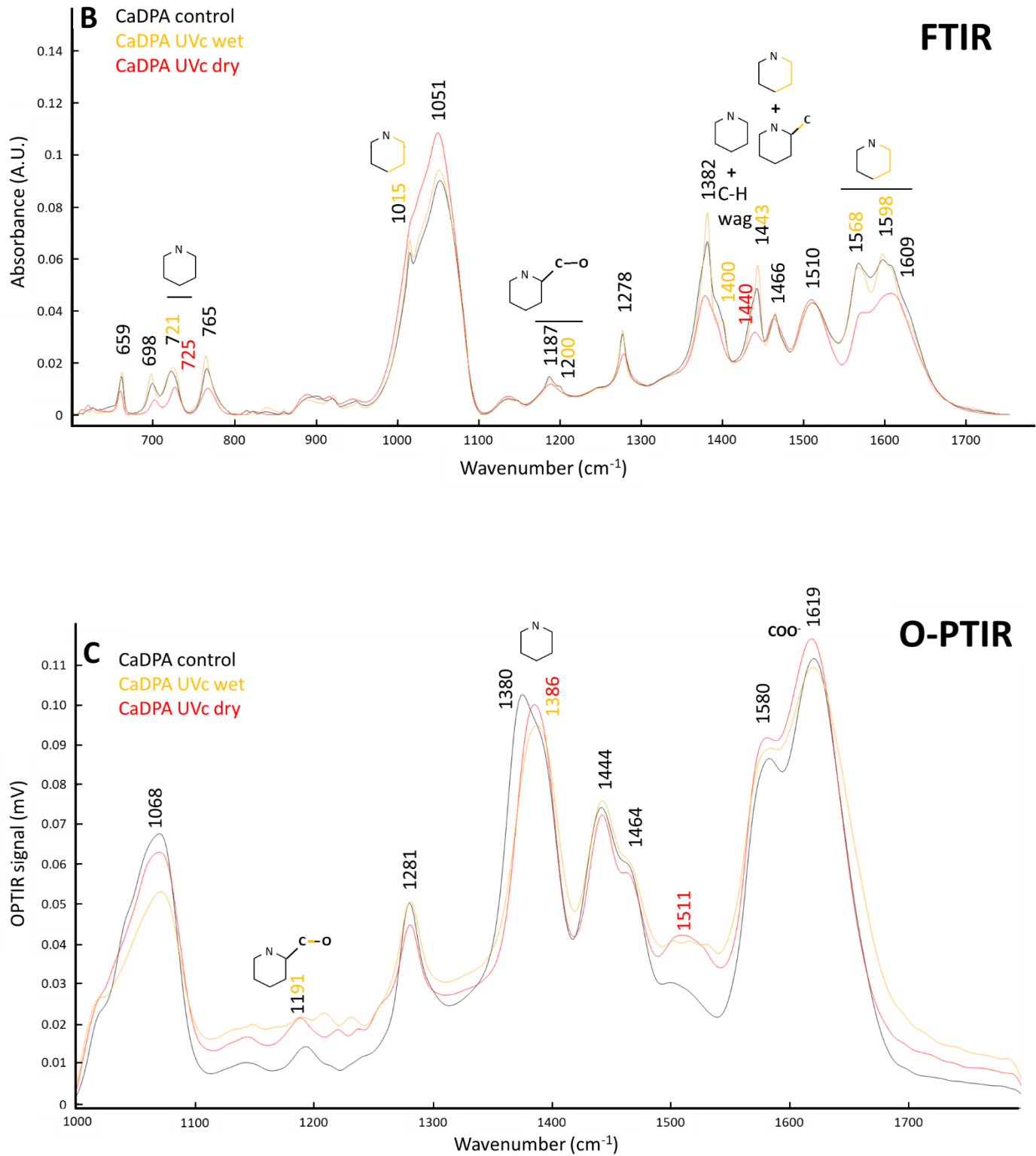
Results show that the difference in the photochemistry of CaDPA seems to appear mainly in the bands related to the pyridine ring of DPA. The second main difference corresponds to the CH bonds. These CH bonds are also mainly found on the pyridine ring. These findings suggest that UV has an impact on the CaDPA ring that does not occur in the same way depending on the UV wavelength used for irradiation. Previous studies have shown that some photoproducts seem to be formed by a dimerization of two picolinic acids<sup>6,7</sup>. These bipyridine ring structures could exhibit changes in their spectral print which can be spotted in bands corresponding to the pyridine ring after UV exposure. In addition, another fraction of the identified photoproducts appears to be formed by a carbon chain with a nitrogen. It is possible that these photoproducts, which arise from pyridine ring breakage, are more or less frequent depending on exposure conditions. This may also influence the Raman bands related to the pyridine ring.

### 3.2. Influence of hydration state on CaDPA photochemistry

#### 3.2.1. Influence of hydration on UVc effects

CaDPA has been widely studied through Raman and infrared spectroscopy<sup>17-22</sup>. An *in vitro* study has already observed that CaDPA can undergo conformational changes depending on its hydration state<sup>18</sup>. In this work, the influence of the hydration of CaDPA during exposure to UV light was studied. The influence of hydration on CaDPA was studied separately for UVc and UVb exposure. Moreover, this is the first time to our knowledge that O-PTIR spectra of CaDPA have been reported. Figure 2 represents the spectra of CaDPA obtained before and after exposure to UVc in the liquid or dry state for each of the three spectroscopic methods. The bands in common with picolinic acid have been highlighted in Figure 2. This molecule is known to be one of the photoproducts formed upon exposure of CaDPA to UV<sup>6,7</sup>.



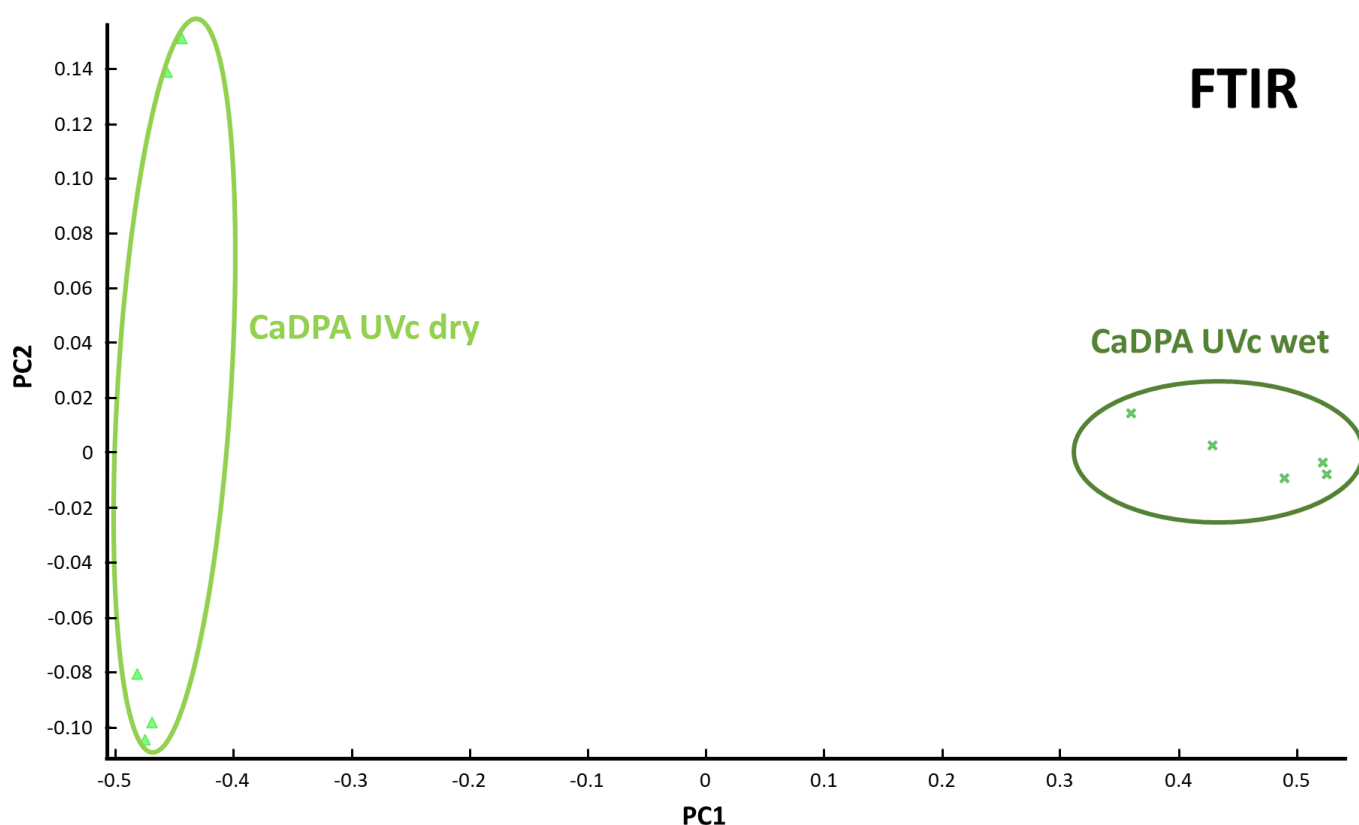


**Figure 2:** Spectra of CaDPA in control conditions (black) and CaDPA exposed to UVc in solution (yellow) or dry conditions (red) obtained with Raman (A), FTIR (B) and O-PTIR (C) spectroscopy. Only the band differences between the spectra have been identified; color indicates in which spectra the band appears.

The Raman and infrared CaDPA spectra here are similar to those reported in the literature<sup>17-22</sup>. Bands attributed to the pyridine ring are predominant. Interestingly, O-PTIR spectra seem to be less dominated by the pyridine ring bands, as a large band corresponding to carboxyl groups is observed around 1619 cm<sup>-1</sup>. Differences between control and samples exposed to UVc are mainly observed on the pyridine ring, whether with Raman, FTIR or O-PTIR. Bands in the Raman spectra related to picolinic acid appear after irradiation at 400-1051-1296 cm<sup>-1</sup>. This molecule is an intermediate used to create photoproducts like DPAP1<sup>6,7</sup>. Finally, a tiny band in Raman spectra at 1643 cm<sup>-1</sup>, corresponding to the carboxyl groups of DPA, appears after UVc exposure. This band could be the result of a structural change in CaDPA leading to the creation of CaDPAP with carboxyl groups, as for example in the case of DPAP1 or DPAP2 identified recently<sup>6</sup>.

Hydration state seems to have a slight influence on CaDPA photochemistry. Although no differences between liquid or dry conditions were noted on Raman spectra (Fig. 2A), certain differences are visible when using FTIR and O-PTIR spectroscopy. On FTIR and O-PTIR spectra (Fig. 2B and C), CaDPA exposed to UVc in liquid conditions seems to remain closer to the control condition than CaDPA exposed in a dry state. In bacterial spores, CaDPA is present in a highly dehydrated amorphous state<sup>18</sup>. Thus, *in vitro* UVc exposition of CaDPA in a dry state is probably a closer representation of what happens *in vivo*. The differences between wet and dry CaDPA exposed to UVc appear on bands related first to the pyridine ring (FTIR: 725, 1015, 1400, 1568-1597 cm<sup>-1</sup>), then to bands related to C-O bonds of the carboxyl groups (FTIR: 1200 cm<sup>-1</sup> and O-PTIR: 1190 cm<sup>-1</sup>) and finally to the bands related to the bond between the ring and the carboxyl group (Raman: 1455 cm<sup>-1</sup> and FTIR: 1443 cm<sup>-1</sup>). These spectral differences in spectra suggest a structural change in CaDPA during UVc exposure, leading to the formation of some DPAP. Previous studies have proposed that CaDPA under UVc exposure may undergo a decarboxylation followed by a dimerization to form DPAP<sup>6,23</sup>. The decarboxylation can be deduced from the appearance of bands characteristic of picolinic acid on Raman spectra and probably through the changes in bands related to the bond between the ring and the carboxyl group. The modifications of bands linked to the pyridine ring may reflect the dimerization of CaDPA and the production of DPAP, as described in other studies<sup>6,7</sup>. Finally, the previously identified photoproducts reveal that some of them undergo the loss of an oxygen from the carboxyl group. The formation of these photoproducts may be linked to the modification of the bands related to the carbon-oxygen bond (FTIR: 1200 cm<sup>-1</sup> and O-PTIR: 1190 cm<sup>-1</sup>).

The CaDPA molecule is known to act as a photoprotector or photosensitizer depending on the hydration state of its environment during UV exposure<sup>4</sup>. Based on the spectra comparison above (Fig. 2), hydration state seems to have a weak influence globally on CaDPA after UVC exposure. Slight differences can be observed, primarily on FTIR spectra. To proceed further in the data analysis, the second derivative of the spectra was used to highlight certain hidden shoulders or peaks in the spectral bands. PCA was applied to the derived spectra. Raman and O-PTIR data did not provide any relevant distinction based on hydration state, but FTIR provided a more meaningful discrimination. The two principal components (PCs) of the FTIR PCA that best explain the differences between the effects of hydration states are plotted in Figure 3. Some additional differences appear using this method, and the spectral bands associated with these components are listed in Table 2.



**Figure 3:** Score plot of *in vitro* CaDPA exposed to UVC in liquid and dry conditions with FTIR measurements. Light green represents CaDPA exposed to UVC in dry conditions; dark green represents CaDPA exposed to UVC in wet conditions.



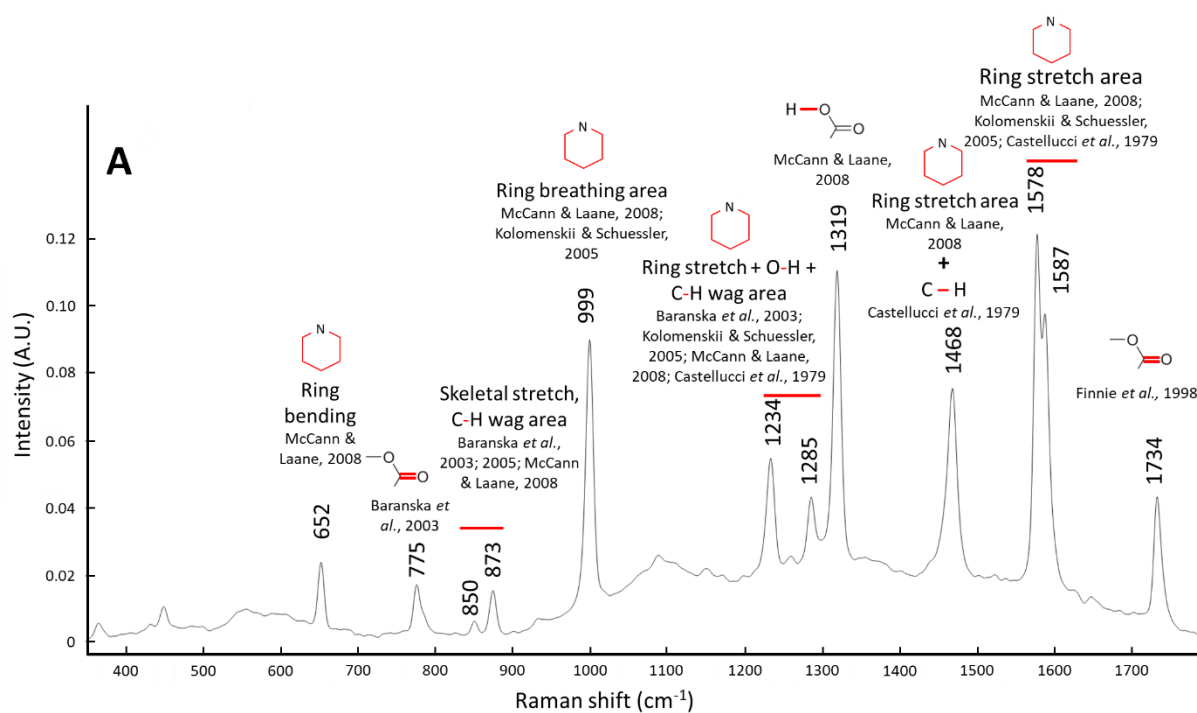
**Table 2:** Spectral FTIR bands from PC1, discriminating wet versus dry CaDPA under UVc exposition

		CaDPA UVc <sub>wet</sub> exposed VS CaDPA UVc <sub>dry</sub> exposed		
		Bands (cm <sup>-1</sup> )	Correspondance	More represented in
FTIR PC1 92%		1444	Ring stretch + ring-C	dry
		1389	COO <sup>-</sup> asymmetric stretch	wet
		1382	Ring stretch + Ring-C	dry

FTIR seems to be a more efficient spectroscopic technique than Raman or O-PTIR to discriminate differences between CaDPA exposed to UVc in wet or dry states. As remarked previously, it appears that the photochemistry of CaDPA during UVc exposure in liquid or dry conditions may be principally tracked in the bands related to the pyridine ring and the carboxyl group. Similar to the previous observation, the bands related to the pyridine ring are more affected by hydration state than are the bands of the carboxyl group (Tab. 2). These results suggest that exposing CaDPA to UVc in liquid or dry conditions may not result in the same conformational changes, and that different photoproducts may be formed depending on hydration state. This may explain why bacterial spores do not have the same sensitivity to UVc radiation depending on hydration state during exposition. Indeed, the bond between the carbon of the carboxyl group and the pyridine ring is more clearly observed in the dry state after irradiation than in the wet state (Tab. 2). This could mean that CaDPA exposed to UVc in a dry state may be less reactive or undergo less decarboxylation, thus creating less DPAP. This hypothesis is in agreement with previous mass spectrometry results showing that dry irradiated CaDPA forms less DPAP<sup>7</sup>.

### 3.2.2. DPAP1 spectra

When CaDPA is exposed to UVc, numerous photoproducts (DPAP) can be formed. It has recently been shown that many DPAP seem to have a structure close to that of DPA<sup>6,7</sup>. Only one of these identified DPAP, called “photoproduct 1” (DPAP1), has been chemically synthesized<sup>6</sup> and commercialized. To our knowledge, the Raman, infrared and O-PTIR spectra of this DPAP1 have never been reported. The spectra of DPAP1 obtained via these three techniques are presented Figure 4 and compared to the spectra of CaDPA after exposure to UVc. The proposed band assignment is based on the literature on similar compounds such as 2,2'-Bipyridine<sup>20,24-27</sup>.



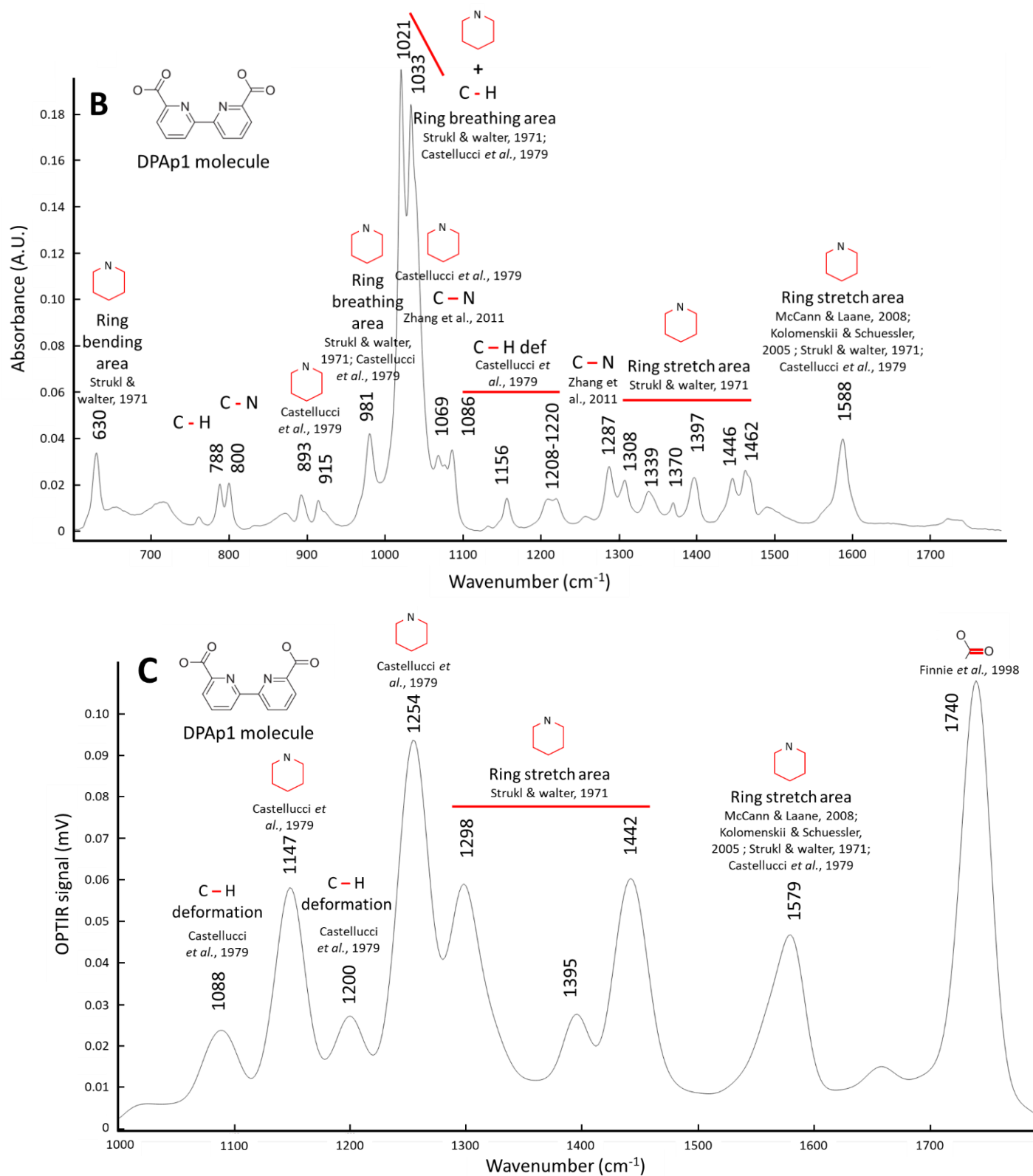
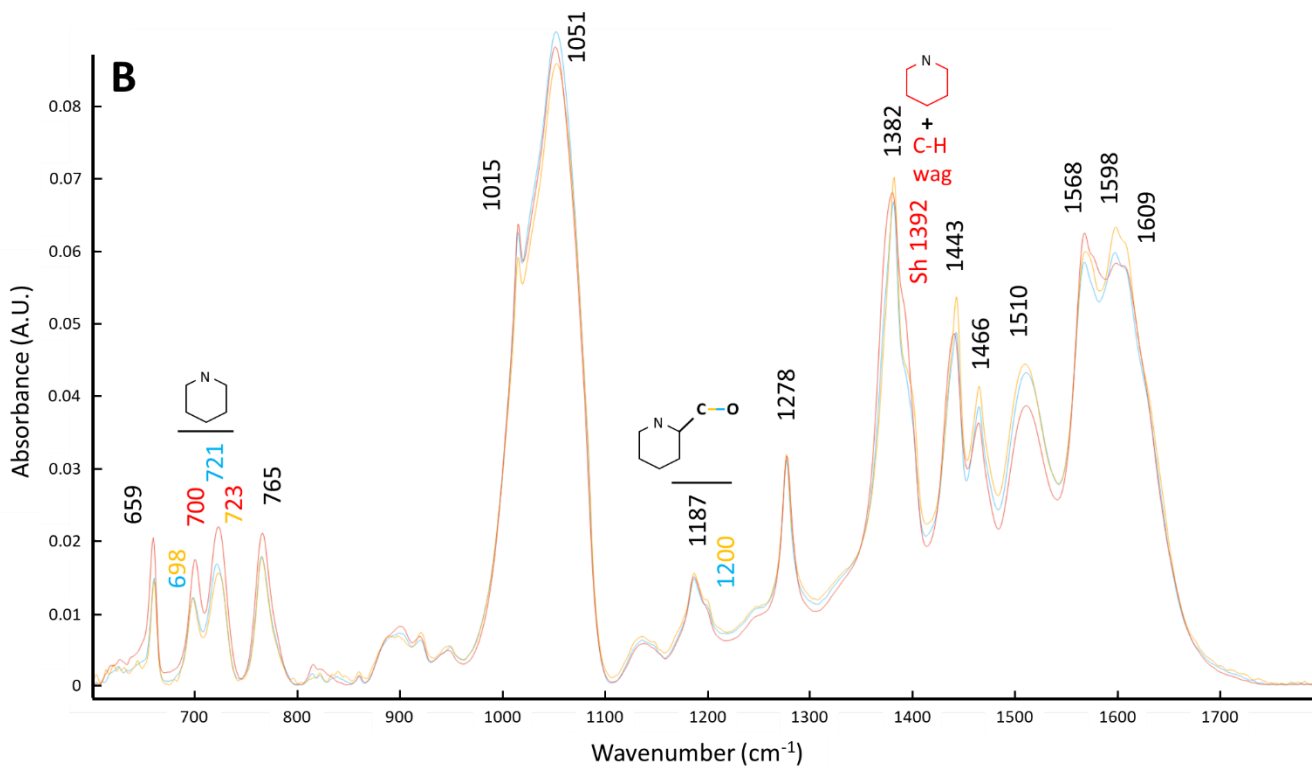
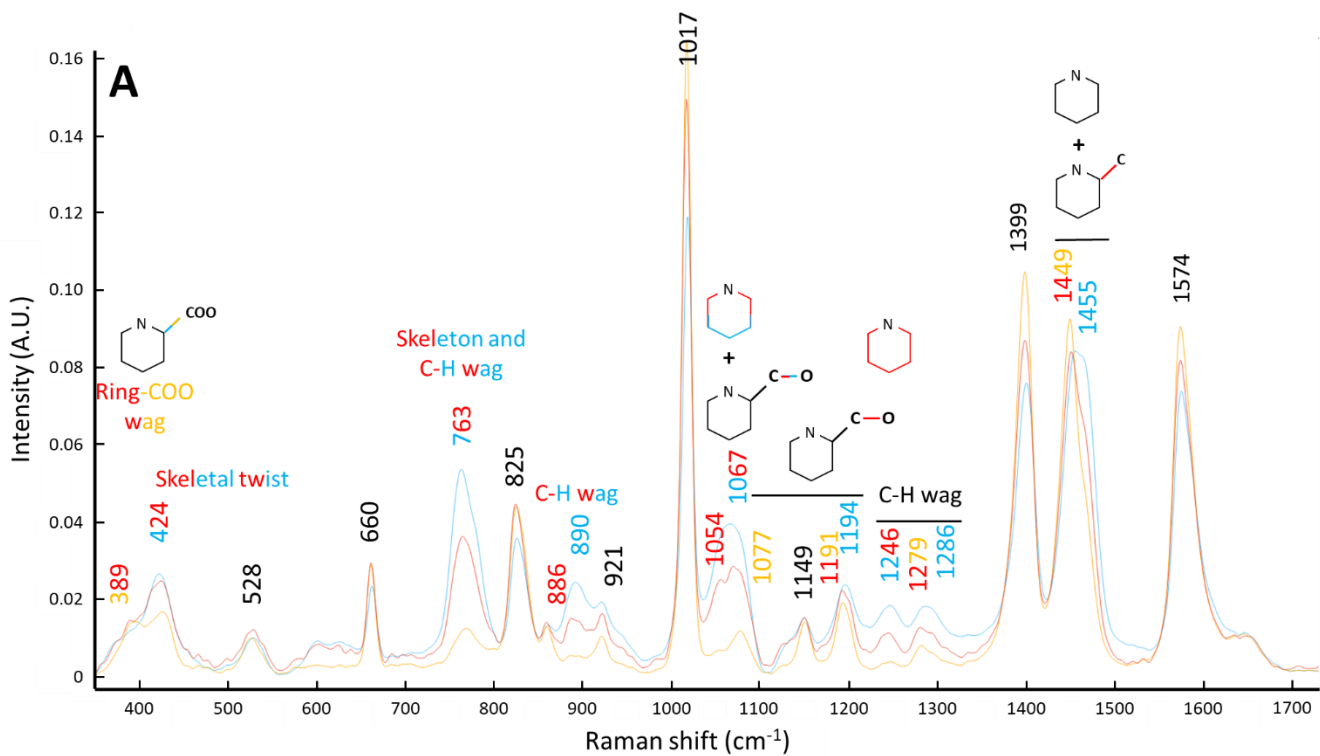


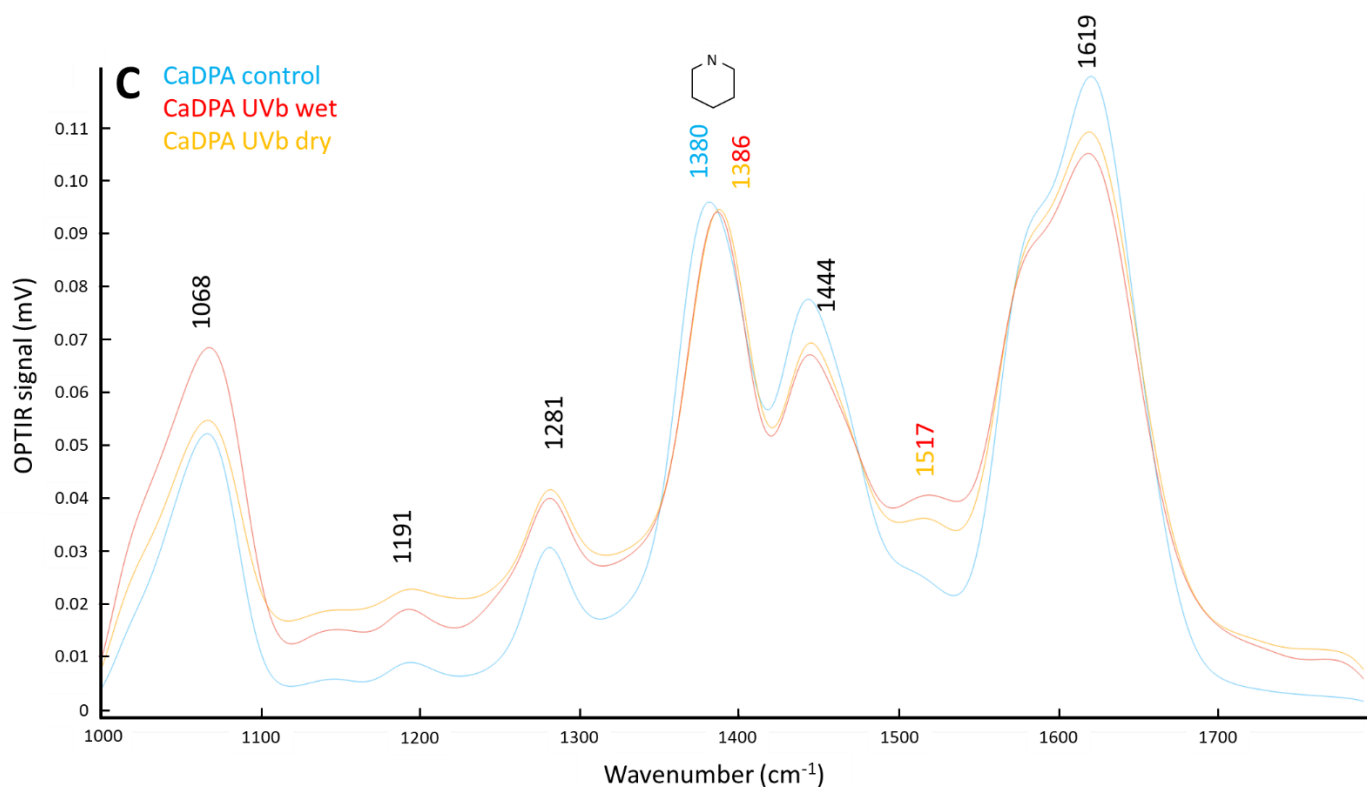
Figure 4: Raman (A), FTIR (B) and O-PTIR (C) spectra of DPAp1.

As for CaDPA, the pyridine ring seems to be dominant in all the spectra. Although they share some similarities, DPAP1 and CaDPA spectra are clearly different, each with certain characteristic bands. For example, the characteristic strong ring breathing band occurring around  $1017\text{ cm}^{-1}$  in CaDPA Raman spectra is shifted to  $999\text{ cm}^{-1}$  in DPAP1 (Fig. 4). There are also some bands on the DPAP1 spectra that do not appear on CaDPA spectra, such as the band at  $1734\text{ cm}^{-1}$ . In addition, some bands are common to CaDPA and DPAP1, such as bands corresponding to the pyridine ring around  $1468, 1578\text{ cm}^{-1}$  on Raman spectra,  $1021\text{ cm}^{-1}$  on FTIR spectra and  $1445\text{ cm}^{-1}$  on O-PTIR spectra. Nevertheless, none of the recognizable DPAP1 bands can be observed on the spectra of CaDPA exposed to UVc (Fig. 2). This absence of recognizable DPAP1 bands on CaDPA spectra after UV exposure may be explained by similar structures, in addition to DPAP1 being in lesser concentration compared to CaDPA. Indeed, not all CaDPA is consumed to produce photoproducts when this molecule is exposed to UV over a few minutes.<sup>7</sup> Thus, the DPAP1 bands may be mixed with and/or masked by those of CaDPA.

### 3.3. Influence of hydration during UVb exposure

Although UVb exposure is used less frequently than UVc in decontamination processes, this type of radiation is present in the earth's environment, unlike UVc. Studying the influence of CaDPA photochemistry on spore resistance to UVb could thus improve the understanding of its importance in the context of the natural environment. In addition, spores exposed to UVb appear to form photoproducts within the spore core, as in the case of UVc exposure. Nevertheless, UVb does not seem to have the same influence on the CaDPA molecule as UVc, as observed above (Fig. 1). Figure 5 represents the CaDPA spectra obtained before and after UVb exposure in wet and dry conditions for each of the three spectroscopy methods used.





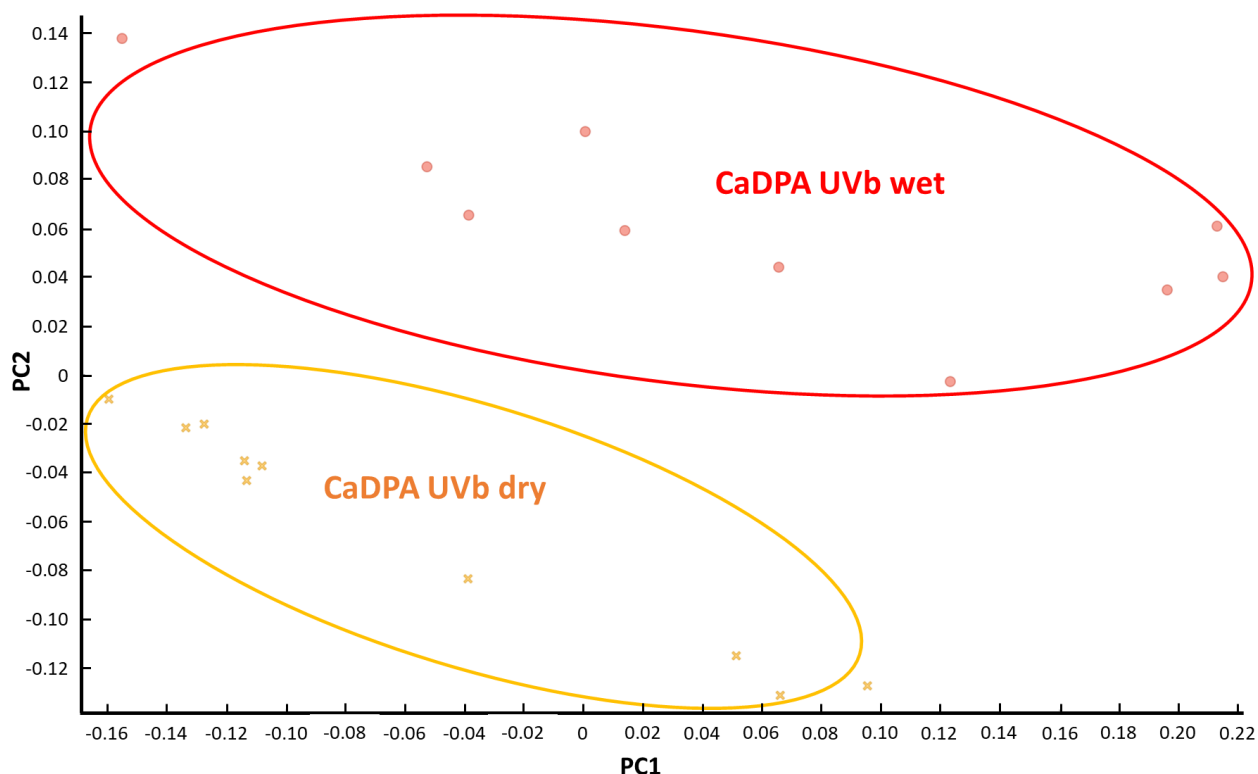
**Figure 5:** Spectra of CaDPA in control conditions (blue) and CaDPA exposed to UVb in liquid (red) or dry (orange) conditions obtained with Raman (A), FTIR (B) and O-PTIR (C) spectroscopy. Only the band differences between the spectra are identified; color indicates in which spectra the band appears.

The most notable differences were observed in Raman and FTIR spectra. Raman spectra exhibit differences between control conditions and UVb exposure for bands at 389-424  $\text{cm}^{-1}$ , 763  $\text{cm}^{-1}$ , 1054-1067  $\text{cm}^{-1}$ , 1191-1194  $\text{cm}^{-1}$ , 1246-1286  $\text{cm}^{-1}$  and 1449-1455  $\text{cm}^{-1}$ . These bands are mainly related to the pyridine ring and the carboxyl group. Less difference was observed after UVb exposure than following UVc exposure (Fig. 2). FTIR was the second informative technique. Bands mainly differ around 698-723  $\text{cm}^{-1}$  and for two shoulders at 1200  $\text{cm}^{-1}$  and 1392  $\text{cm}^{-1}$ , corresponding to the pyridine ring, carboxyl group and pyridine ring + C-H bonds respectively. O-PTIR exhibited slight differences, mainly around 1380-1386  $\text{cm}^{-1}$ , corresponding to the pyridine ring and to an unidentified band at 1517  $\text{cm}^{-1}$ , as seen on CaDPA after UVc exposure.

When these spectra are compared to those obtained after UVc exposure (Fig. 4), certain interesting differences become apparent. Raman spectra after UVb exposure differ mainly around 763  $\text{cm}^{-1}$ , 1051-1067  $\text{cm}^{-1}$  and 1455  $\text{cm}^{-1}$  compared to spectra after UVc exposure. All these bands are related to the pyridine ring and to C-H bonds. Moreover, the ring deformation

band at  $608\text{ cm}^{-1}$  that appears after UVc exposure (Fig. 2) is not observed after UVb exposure (Fig. 5). In FTIR spectra, the main differences with UVc are observed for bands at  $1015\text{ cm}^{-1}$  and around  $1568\text{-}1609\text{ cm}^{-1}$ . These bands also correspond to the pyridine ring. The O-PTIR spectra are very similar to those obtained in the case of UVc exposure (Fig. 2). These findings are coherent with the differences presented in Tab. 1, where it is noted that CaDPA exposed to UVc or UVb seems to differ mainly at the level of the pyridine ring.

PCA was performed with data obtained for each of the three spectroscopy methods to determine whether or not the hydration states of CaDPA during UVb exposure can be distinguished. The findings presented in Figure 6 are very different from those obtained in the case of UVc exposure (Fig. 3). In the case of UVc exposure, FTIR proved the best way to observe differences between the two hydration conditions, but here only Raman spectroscopy barely distinguishes these two conditions. Based on this finding, the second component (PC2) of the PCA reveals the hydration influence during UVb exposure. Table 3 indicates the bands that differ between these two conditions.



**Figure 6:** Score plot of *in vitro* CaDPA exposed to UVb in liquid and dry conditions, from Raman spectroscopy measurements. Red dots represent CaDPA exposed to UVb under wet conditions; orange dots represent CaDPA exposed to UVb under dry conditions.

**Table 3:** Spectral Raman bands from PC2, discriminating wet versus dry CaDPA under UVb exposition

CaDPA UVb <sub>wet</sub> exposed VS CaDPA UVb <sub>dry</sub> exposed			
Raman PC2 18%	Bands (cm <sup>-1</sup> )	Correspondence	More represented in
	1021	Ring respiration	Dry
	1015	Ring respiration	Wet

The slight photochemical difference due to hydration during UVb exposure appears to be once again located on bands related to the pyridine ring (Tab. 3). This observation concerning the pyridine ring is in line with the absence of differences in lethality observed on bacterial spores of *B. subtilis* exposed to UVb in dry or wet conditions<sup>4</sup>. CaDPA appears to be less impacted by hydration conditions during UVb exposure than during UVc exposure. Moreover, the chemical reactions and photoproduct creation undergone during UVb and UVc exposure are likely to be different, at least in part.

### 3.4. Multiblock analysis

When one has several tables of data from different sources, the combination of these sets is "more than the sum of its parts." Indeed, it contains not only the information from the respective blocks (by "blocks" we mean a data matrix containing observations or measured variables from one source), but also information about their interrelationships. When several blocks of data are available, it can be interesting to identify common variations, i.e., to integrate the data. The basis for data integration is that there is a flow of information from one block to another. By combining the blocks, a more complete picture of the system under study is obtained. The goal of multiblock analysis is to identify variations present in all or many blocks, and to distinguish these variations from those that are unique to each block. In this way, it is possible to detect trends or strong variations in the data that are not easily detected using single-block analyses, such as, for example, a principal component analysis on each block<sup>28</sup>.

Raman and FTIR analyses are commonly used together, as they are considered complementary. As O-PTIR is a new technique, one objective here was to explore its potential compared to the other two. For this purpose, two different parameters were studied, the wavelength of irradiation (UVb and UVc) and the hydration state during the UV exposure (wet and dry), in order to determine if one technique was better able than the others to discriminate one of the parameters. The multiple co-inertia method (mCOA) was used to study the relationships between our 3 datasets (spectra from FTIR, Raman and O-PTIR analyses) and to

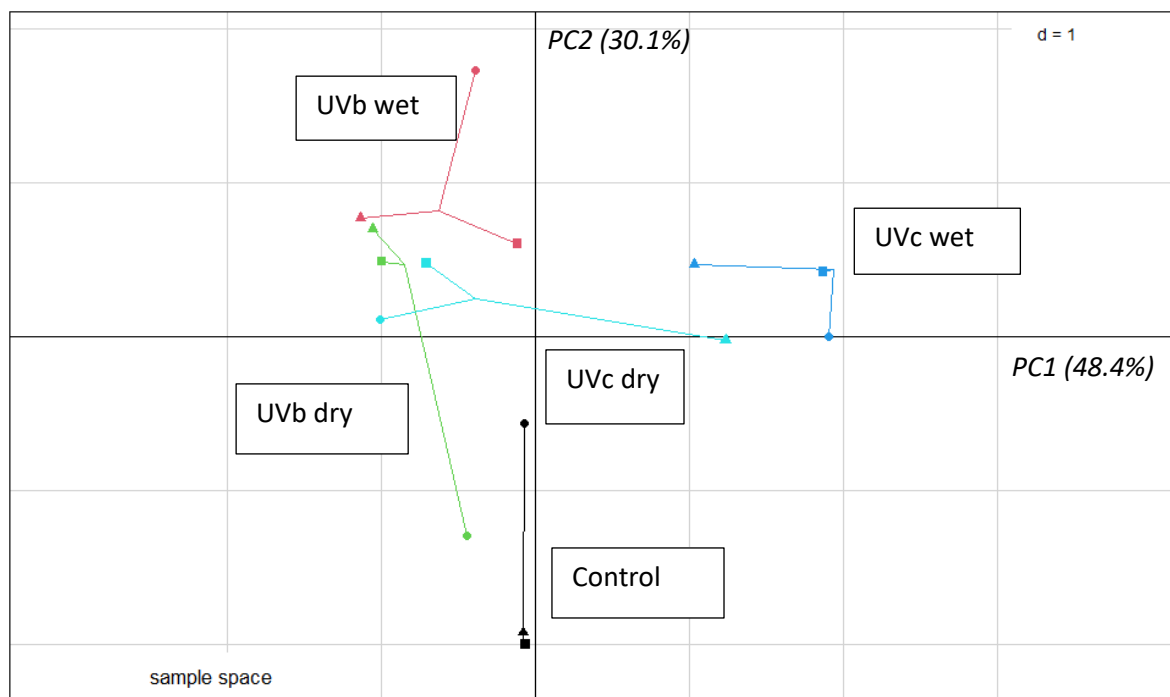


extract latent variables from information of different natures, reflecting different facets of a behavior. Co-inertia analysis (CIA) is a multivariate method that identifies trends or co-relationships in multiple datasets which contain the same samples. The rows or columns of the matrix have to be weighted similarly and thus must be “matchable”. MCOA creates a set of reference scores, for which each block's individual scores should correlate maximally, and the variance within each block is also taken into account<sup>29</sup>. Data from the different datasets were first pre-processed as mentioned above.

Figure 7 shows the individual spaces where each sample is projected. This is the global factorial map or score map concerning the mCOA 1 and 2 components. Each PC has an associated eigenvalue which represents the amount of variability contained in that PC. The first two PCs of the mCOA accounted for 48.4% and 30.1% of variance respectively.

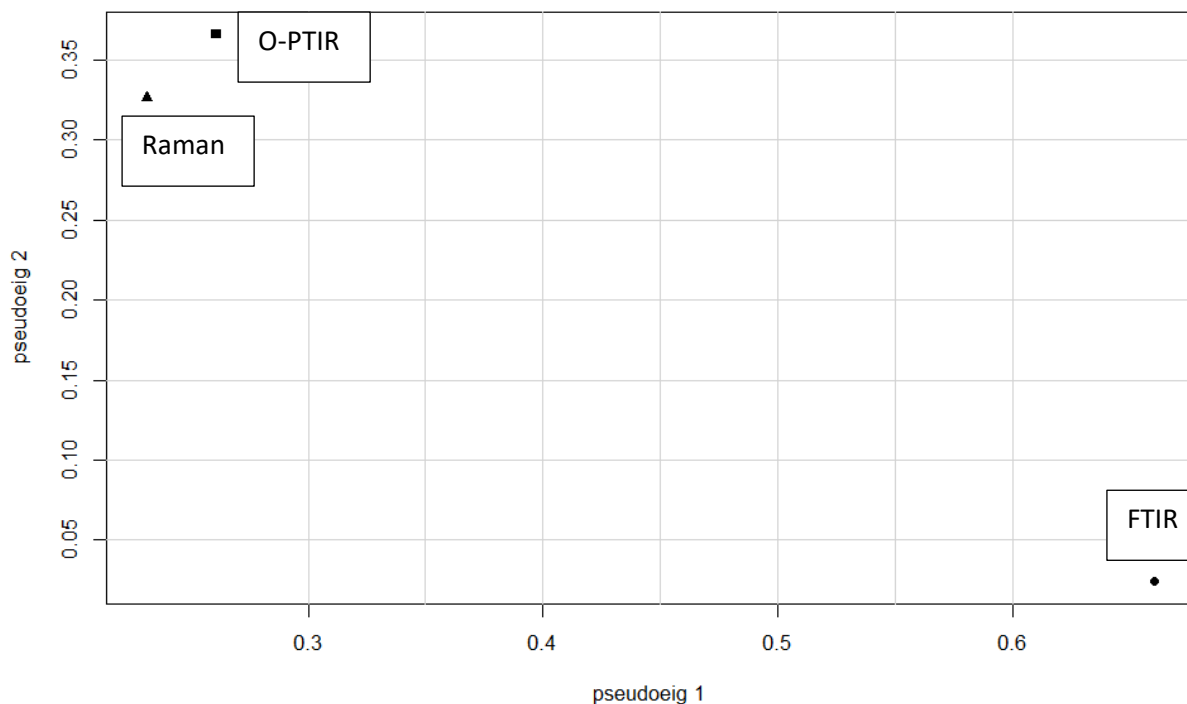
The shapes represent the samples analyzed by the different instruments. The shorter the edge, the better the correlation between the samples of the different techniques. It will be noted that the correlation is relatively weak for the whole data set as shown by the long edges. Whatever the analysis considered (FTIR, Raman or O-PTIR), certain samples stand out from the others, with the exception of CaDPA UVc wet and CaDPA. The FTIR domain is very discriminating; axis 1 separates dry UVc samples (negative area) from wet UVc samples (positive area) and axis 2 separates dry UVb samples (negative area) from wet UVb samples (positive area).

In the case of the Raman measurements, axis 1 separates the samples according to the nature of the UV: samples treated with UVb are positioned in the negative area of the axis and samples treated with UVc in the positive area. As for the O-PTIR measurements, this separation between UV treatments is less clear.



**Figure 7:** Score map of the mCOA 1 and 2 components. CaDPA under various conditions: solution irradiated by UVb (red), solution irradiated by UVc (blue), powder irradiated by UVc (light blue), powder irradiated by UVb (green) and non-irradiated control (black). Dots corresponds to FTIR analysis, triangles to Raman analysis and squares to O-PTIR.

Figure 8 shows the link between each data table (i.e., from each spectroscopic analysis) and the reference structure (which is the global data table from all spectroscopic analyses). In Figure 8, the FTIR dataset is highly weighted on the first axis. This dataset therefore contributes the most of the 3 datasets to the variance on this axis. Raman and O-PTIR data contribute highly to the second axis. On the basis of this exploratory study, it may be said that whatever the platform considered (FTIR, Raman or O-PTIR), UVc wet and control samples stand out from the others. The FTIR domain is very discriminating: axis 1 separates dry samples exposed to UVc (negative area) from samples in solution exposed to UVc (positive area); axis 2 separates dry samples exposed to UVb (negative area) from samples in solution exposed to UVb (positive area). With Raman spectroscopy, axis 1 separates the samples according to the nature of the UV: samples treated with UVb are positioned in the negative area of the axis and samples treated with UVc are in the positive area. In the case of O-PTIR spectroscopy, this separation between the two UV treatments is less clear.



**Figure 8:** Summarizing the concordance among analyses by representing the pseudo-eigenvalue spaces of the 3 spectroscopic datasets. Dot corresponds to FTIR analysis, triangle to Raman analysis and square to O-PTIR analysis. The pseudo-eigenvalue space represents overall co-structure between datasets and shows which analysis contributes more to the total variance.

### Conclusion & perspectives

The aim of this study was to provide new insights on CaDPA photochemistry. Spectroscopy results show that CaDPA exposed to UVc can be distinguished from CaDPA exposed to UVb at the level of the pyridine ring bands. These differences in bands may reflect a difference in photoproduct formation resulting from UVc or UVb exposure. Moreover, the hydration state seems to have a slight influence on CaDPA photoreaction, also visible in the pyridine ring bands. These findings may help to unravel the molecule's dual role in the UV resistance of spores. The hydration effect seems to play a more important role during UVc exposure than during UVb exposure. The spectra of DPAP1, to our knowledge the only photoproduct clearly identified as a DNA photosensitizer, was compared to CaDPA exposed to UVc or UVb. The spectral signature of this DPAP1 was not observed on any spectra of CaDPA exposed to UV. We suggest that this photoproduct may not be formed in sufficient quantities during UV exposure to be visible on these spectra. To further examine the issues raised in the present work, it would be interesting to apply the same type of spectral analysis directly on *in vivo* bacterial spores before and after UV exposure. We hope that this kind of study will provide

new insights to more fully understand the influence of CaDPA photochemistry on the UV resistance of spores.

### References

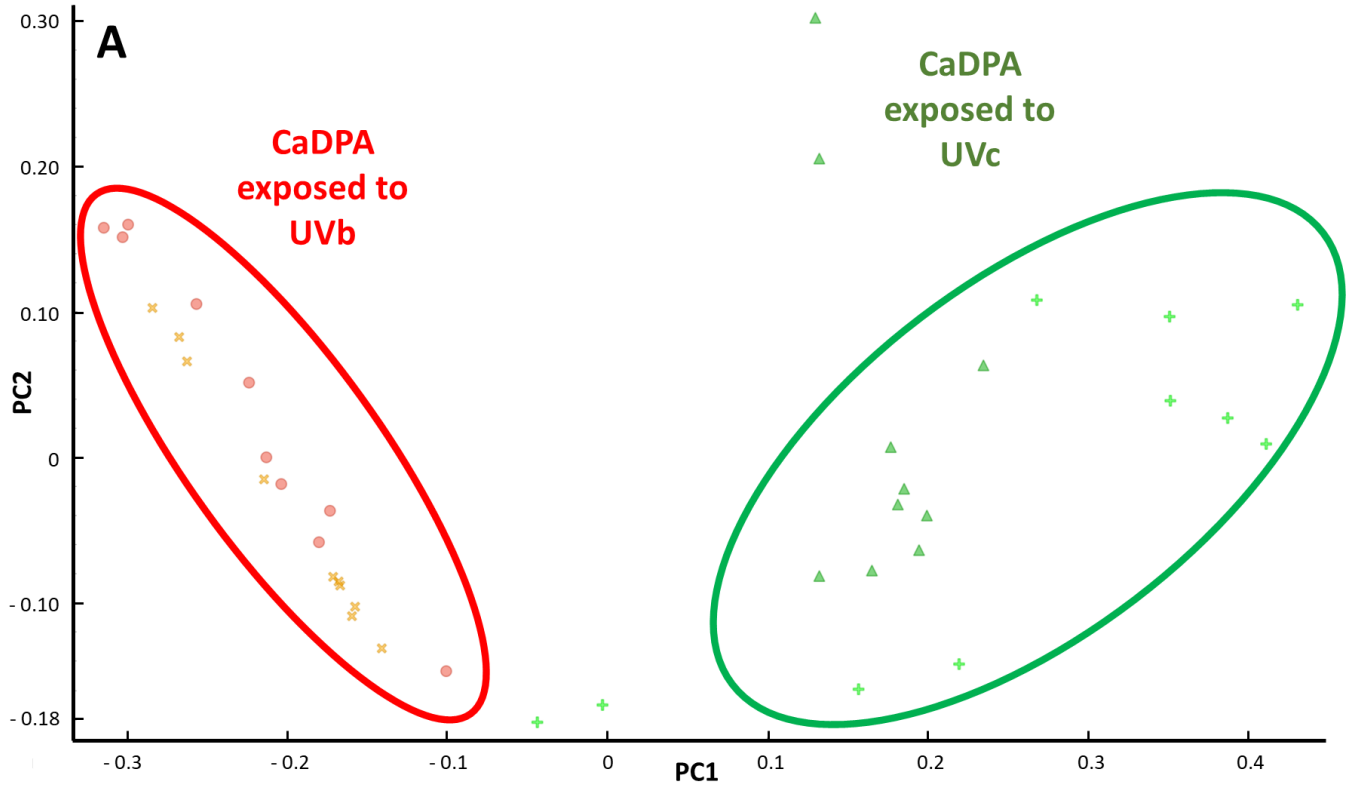
1. Nicholson, W. L., Schuerger, A. C. & Setlow, P. The solar UV environment and bacterial spore UV resistance: Considerations for Earth-to-Mars transport by natural processes and human spaceflight. *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 571, 249–264 (2005).
2. Slieman, T. A. & Nicholson, W. L. Artificial and solar UV radiation induces strand breaks and cyclobutane pyrimidine dimers in *Bacillus subtilis* spore DNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 199–205 (2000).
3. Setlow, P. Spore Resistance Properties. *Microbiol. Spectr.* 2, (2016).
4. Slieman, T. A. & Nicholson, W. L. Role of Dipicolinic Acid in Survival of *Bacillus subtilis* Spores Exposed to Artificial and Solar UV Radiation. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 1274–1279 (2001).
5. Riesenman, P. J. & Nicholson, W. L. Role of the spore coat layers in *Bacillus subtilis* spore resistance to hydrogen peroxide, artificial UV-C, UV-B, and solar UV radiation. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 620–626 (2000).
6. Nardi, G., Lineros-Rosa, M., Palumbo, F., Miranda, M. A. & Lhiaubet-Vallet, V. Spectroscopic characterization of dipicolinic acid and its photoproducts as thymine photosensitizers. *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 245, 118898 (2021).
7. Pacheco, M., Dikec, J., Winckler, P., Coelho, C. & Perrier-Cornet, J. M. Spectroscopic and microscopic characterization of dipicolinic acid and its salt photoproducts – A UVc effect study on DPA in solution and in bacterial spores. *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 280, 121502 (2022).
8. Alimova, A. et al. Native fluorescence and excitation spectroscopic changes in *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus* bacteria subjected to conditions of starvation. *Appl. Opt.* 42, 4080 (2003).
9. Toplak, M., Read, S. T., Sandt, C. & Borondics, F. Quasar: Easy machine learning for biospectroscopy. *Cells* 10, 1–10 (2021).
10. Toplak, M. et al. Infrared Orange: Connecting Hyperspectral Data with Machine Learning. *Synchrotron Radiat. News* 30, 40–45 (2017).
11. Brereton, R. G. *Chemometrics: Data Analysis for the Laboratory and Chemical Plant.* vol. 8 (2003).
12. Cordella, C. B. Y. PCA: The Basic Building Block of Chemometrics. *Analytical Chemistry* vol. 47 (2012).
13. Mishra, P. et al. Recent trends in multi-block data analysis in chemometrics for multi-source data integration. *TrAC - Trends Anal. Chem.* 137, 116206 (2021).

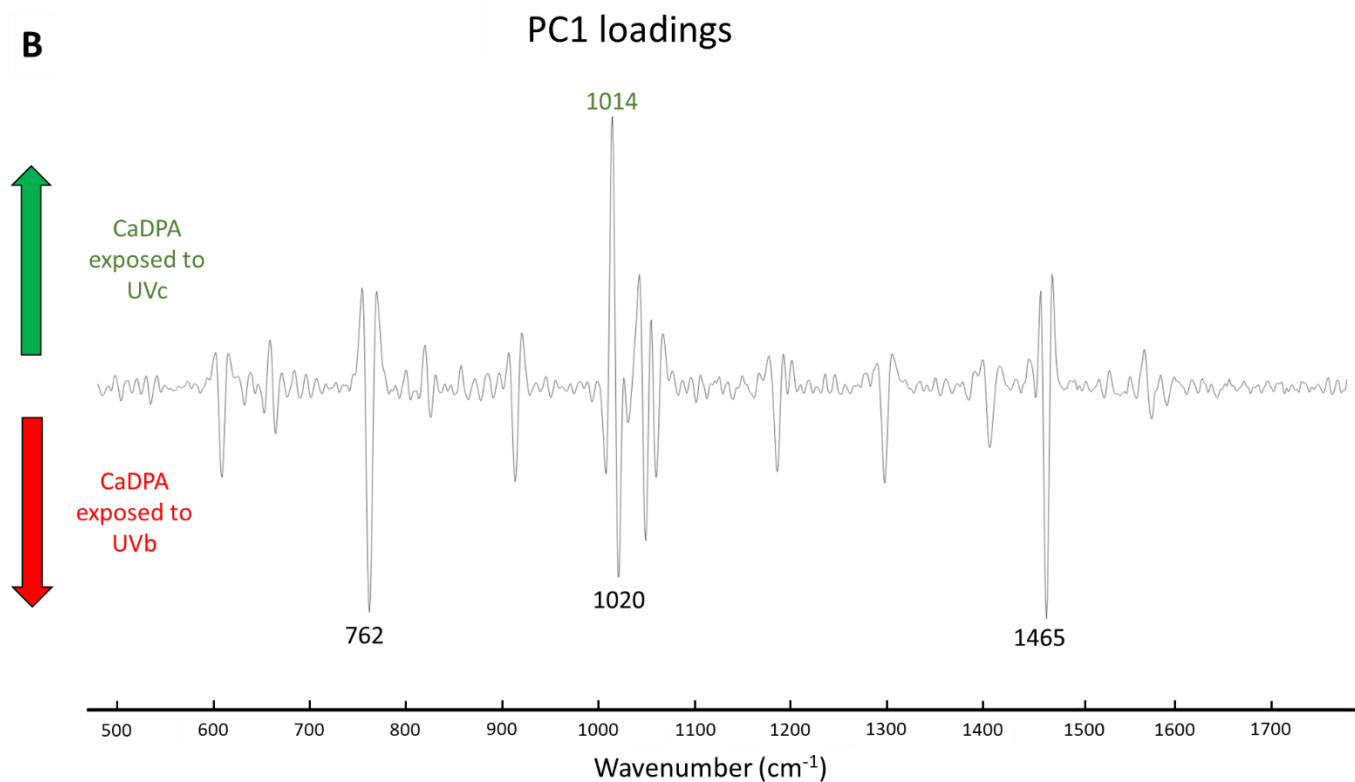
14. Meng, C., Kuster, B., Culhane, A. C. & Gholami, A. M. A multivariate approach to the integration of multi-omics datasets. *BMC Bioinformatics* 15, 1–13 (2014).
15. Santos, A. L. et al. Wavelength dependence of biological damage induced by UV radiation on bacteria. *Arch. Microbiol.* 195, 63–74 (2013).
16. Setlow, P. & Li, L. Photochemistry and Photobiology of the Spore Photoproduct: A 50-Year Journey. *Photochem. Photobiol.* 91, 1263–1290 (2015).
17. Kong, L., Setlow, P. & Li, Y. Q. Direct analysis of water content and movement in single dormant bacterial spores using confocal Raman microspectroscopy and Raman imaging. *Anal. Chem.* 85, 7094–7101 (2013).
18. Kong, L., Setlow, P. & Li, Y. Q. Analysis of the Raman spectra of Ca<sup>2+</sup>-dipicolinic acid alone and in the bacterial spore core in both aqueous and dehydrated environments. *Analyst* 137, 3683–3689 (2012).
19. Lu, X., Al-Qadiri, H. M., Lin, M. & Rasco, B. A. Application of Mid-infrared and Raman Spectroscopy to the Study of Bacteria. *Food Bioprocess Technol.* 4, 919–935 (2011).
20. McCann, K. & Laane, J. Raman and infrared spectra and theoretical calculations of dipicolinic acid, dinicotinic acid, and their dianions. *J. Mol. Struct.* 890, 346–358 (2008).
21. Valentine, N. B., Johnson, T. J., Su, Y.-F. & Forrester, J. B. FTIR spectroscopy for bacterial spore identification and classification. *Chem. Biol. Sensors Ind. Environ. Monit.* II 6378, 63780P (2006).
22. Kolomenskii, A. A. & Schuessler, H. A. Raman spectra of dipicolinic acid in crystalline and liquid environments. *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 61, 647–651 (2005).
23. Noell, A. C. et al. Spectroscopy and viability of bacillus subtilis spores after ultraviolet irradiation: Implications for the detection of potential bacterial life on Europa. *Astrobiology* 15, 20–31 (2015).
24. Castellucci, E., Angeloni, L., Neto, N. & Sbrana, G. IR and Raman spectra of A 2,2'-bipyridine single crystal: internal modes. *Chem. Phys.* 43, 365–373 (1979).
25. Strukl, J. S. & Walter, J. L. Infrared and Raman spectra of heterocyclic compounds-III. The infrared studies and normal vibrations of 2,2'-bipyridine. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Spectrosc.* 27, 209–221 (1971).
26. Finnie, K. S., Bartlett, J. R. & Woolfrey, J. L. Vibrational spectroscopic study of the coordination of (2,2'-bipyridyl-4,4'-dicarboxylic acid)ruthenium(II) complexes to the surface of nanocrystalline titania. *Langmuir* 14, 2741–2749 (1998).
27. Barańska, M., Chruszcz, K., Boduszek, B. & Proniewicz, L. M. FT-IR and FT-Raman study of selected pyridinephosphonocarboxylic acids. *Vib. Spectrosc.* 31, 295–311 (2003).
28. Eslami, A., Qannari, E. M., Kohler, A. & Bougeard, S. Multivariate analysis of multiblock and multigroup data. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 133, 63–69 (2014).

29. Chessel, D. & Hanafi, M. Analyses de la co-inertie de K nuages de points. *Rev. Stat. Appliquée* 44, 35–60 (1996).

## Supplementary materials

This figure represents how data are treated to create the different tables found in the manuscript identifying discriminating bands from PC1.





**Figure S1: Results from Raman analysis of CaDPA exposed to UVb compared to CaDPA exposed to UVc.**  
**A:** Raman PCA from CaDPA exposed to UVc and UVb. Red dots represent CaDPA exposed to UVb in solution; orange crosses represent CaDPA exposed to UVb in dry conditions; dark green triangles represent CaDPA exposed to UVc in solution and light green crosses represents CaDPA exposed to UVc in dry conditions. **B:** PC1 loading plot. Only the bands 10% superior to background noise from original Raman spectra of the different CaDPA sample are identified.





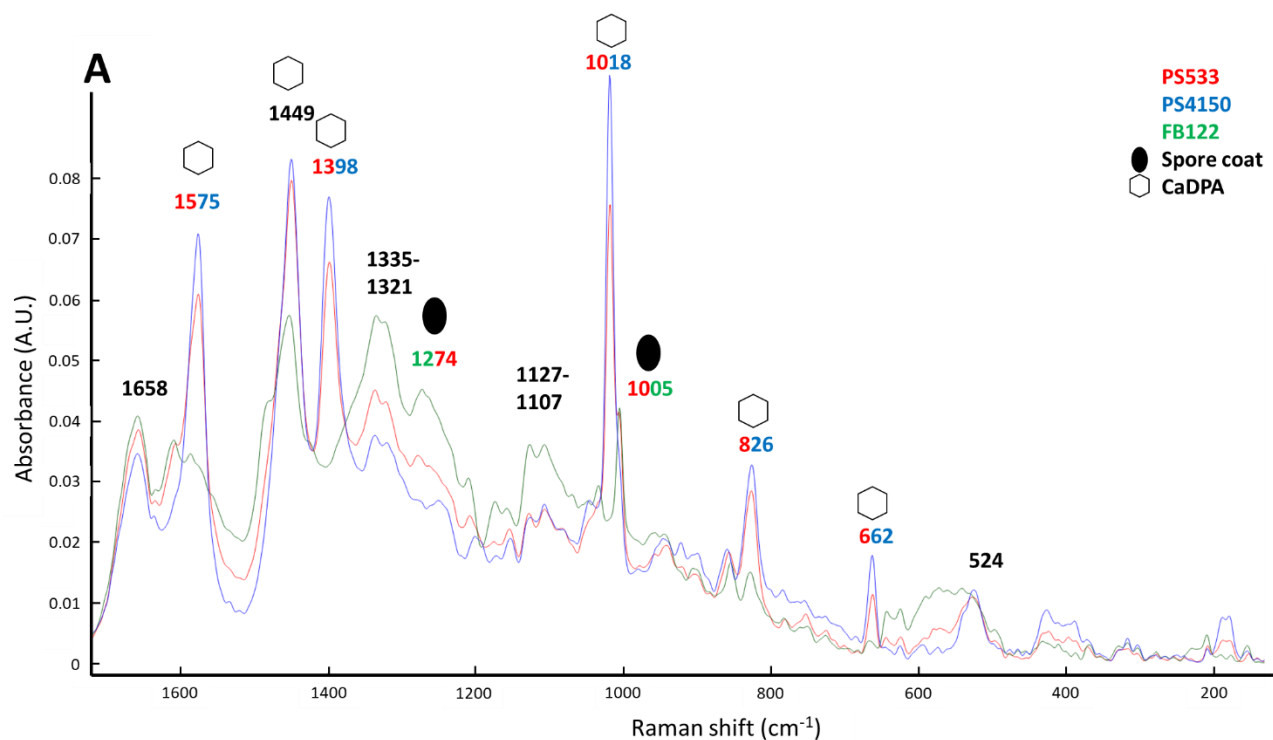
### II.4. Apport de l'O-PTIR à l'étude des spores bactériennes : comparaison avec la spectroscopie Raman et FTIR

L'étude précédente a montré que les spectroscopies Raman, infrarouge et O-PTIR peuvent être complémentaires pour étudier la photochimie du CaDPA. L'étape suivante est de réaliser les mêmes expériences, mais cette fois-ci *in vivo*, sur le CaDPA contenu dans des spores de *B. subtilis*. L'intérêt de cette expérience *in vivo* est double. Premièrement, les rayonnements UV sont connus pour impacter différentes espèces chimiques présentes dans la spore et il serait intéressant de pouvoir identifier clairement ces espèces ainsi que la nature des dégâts encourus. Par exemple, il serait intéressant de caractériser les bandes spectrales impactées par la dégradation de l'ADN, des protéines du manteau ou des protéines du protoplaste, ainsi que d'identifier une signature spectrale de la production des CaDPAP. Ces bandes, une fois identifiées, pourraient permettre d'observer à quelle dose, puissance ou longueur d'onde d'irradiation surviennent ces dégradations, voire d'observer dans quel ordre elles apparaissent. Deuxièmement, étudier la spore à l'aide de méthodes peu perturbatrices peut apporter des informations sur la photochimie du CaDPA *in vivo*, qui pourrait être différente de ce qui se produit *in vitro* même en condition sèche. L'étude du CaDPA *in vivo* est en effet complexe et les méthodes employées pour l'étudier sont souvent invasives et destructrices. Une méthode classique pour étudier le CaDPA synthétisé *in vivo* consiste à l'extraire en détruisant thermiquement les spores à l'aide d'un autoclavage ou à faire germer les spores et récupérer le CaDPA relargué durant la germination. Dans ces conditions, on peut se demander dans quelle mesure ce CaDPA extrait peut être considéré comme « *in vivo* ». L'étude des CaDPAP dans les spores implique néanmoins de pouvoir les distinguer des autres molécules présentes, ce qui peut s'avérer parfois complexe. C'est d'ailleurs pour cette raison que l'analyse des photoproduits produits *in vivo* n'a pas été réalisée par spectrométrie de masse dans le 1<sup>er</sup> chapitre.

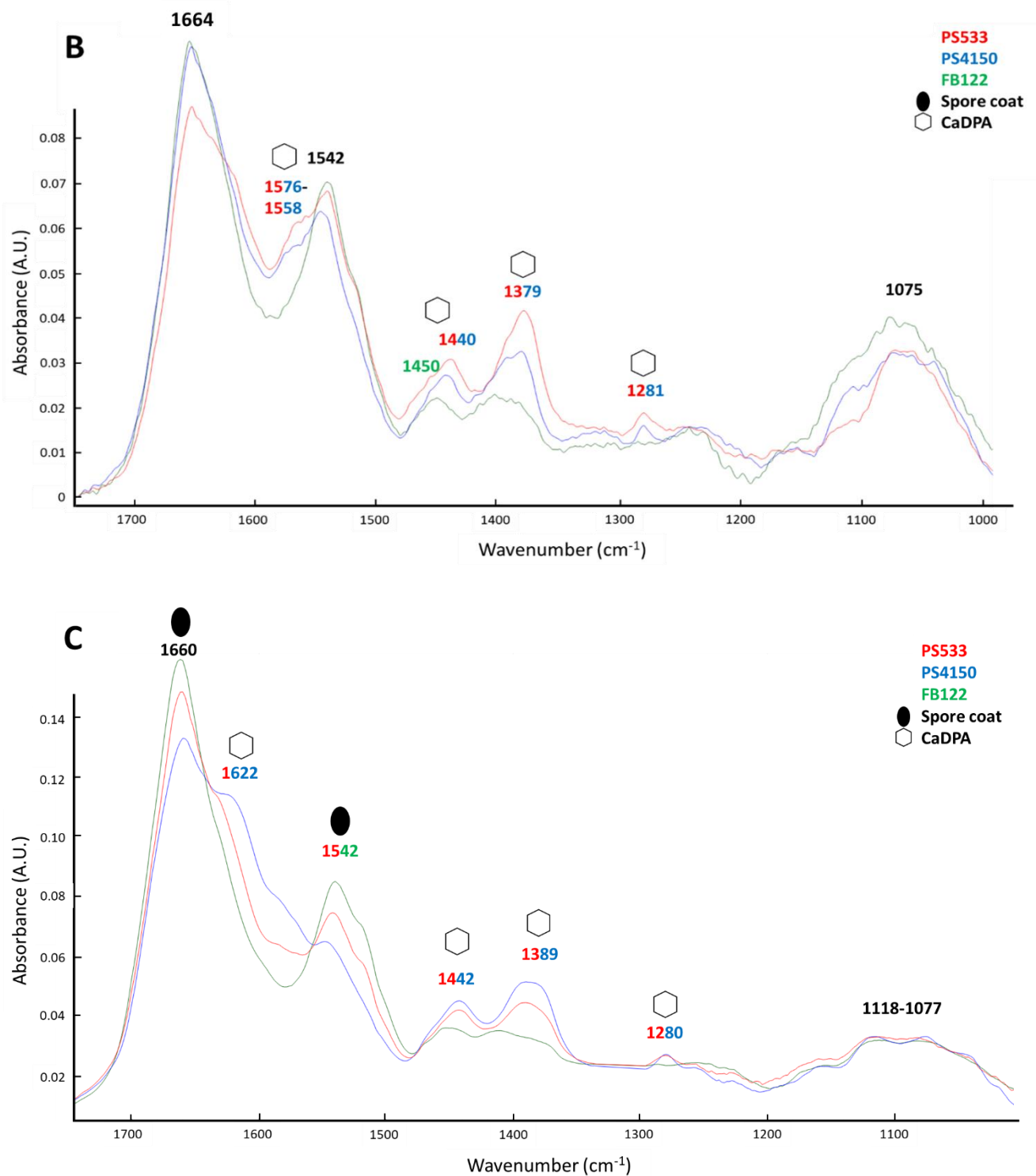
Pour toutes ces raisons, il a été nécessaire dans un premier temps, de bien caractériser le spectre de la spore avec les trois techniques de spectroscopie utilisées. Les spectres Raman et infrarouge de la spore de *B. subtilis* sont bien connus et ont déjà fait l'objet de plusieurs publications (Perkins *et al.*, 2004; Chen, Huang and Li, 2006; Huang *et al.*, 2007; Noell *et al.*, 2015; Malyshev *et al.*, 2021). Le spectre O-PTIR de la spore, à notre connaissance, n'a pas été réalisé précédemment, cette technique est relativement récente.

## Chapitre 2 – Discussion et perspectives

Ainsi, les spectres O-PTIR de spores bactériennes de différentes souches ont été acquis pour comparaison avec les données issues des spectroscopies FTIR et Raman. Afin d'identifier clairement les bandes liées respectivement au CaDPA et au manteau de la spore, des souches mutantes déficientes en CaDPA (souche FB122) et sans manteau (PS4150) ont été utilisées en plus de la souche sauvage (PS533). Les spectres Raman, FTIR et O-PTIR obtenus sont clairement différents (Fig. 17). Les bandes liées au CaDPA dominent les spectres de spores pour les spectroscopies Raman et FTIR. Ces résultats sont en accord avec des études précédentes sur les spores de *B. subtilis* (Perkins *et al.*, 2004; Chen, Huang and Li, 2006; Huang *et al.*, 2007; Noell *et al.*, 2015; Malyshev *et al.*, 2021). En ce qui concerne les spectres acquis par la spectroscopie O-PTIR, les bandes relatives au CaDPA sont moins prépondérantes et, comme la spectroscopie Raman, quelques bandes liées aux protéines de l'enveloppe de la spore sont visibles contrairement au FTIR où seule une bande liée au CaDPA apparaît.



## Chapitre 2 – Discussion et perspectives



**Figure 17** : Spectres de spores PS533 (rouge), PS4150 (bleu) et FB122 (verts) obtenus en spectroscopie Raman (A), FTIR (B) et O-PTIR (C). Les spectres sont obtenus par un moyennage de 5 à 15 spectres de spores individuelles pour le Raman et le FTIR, et d'environ 140 spectres pour l'O-PTIR. PS533 est la souche sauvage, ; PS4150 une souche mutante sans manteau ; FB122 une souche mutante sans CaDPA. L'ovale noir identifie les bandes liées au manteau de la spore ; la forme hexagonale identifie les bandes liées au CaDPA.

## Chapitre 2 – Discussion et perspectives

Sur les spectres O-PTIR des spores bactériennes (Fig 17.C), le CaDPA se caractérise principalement par deux bandes respectivement à 1389 et 1442  $\text{cm}^{-1}$ , ainsi que par une bande mineure autour de 1280  $\text{cm}^{-1}$  et un épaulement autour de 1622  $\text{cm}^{-1}$ . Ces bandes ont été attribuées au CaDPA du fait de leur absence sur les spores mutantes FB122, déficientes en CaDPA dans leur protoplasme (spectres verts dans la Fig. 17.C). Il est intéressant de noter que les protéines ressortent majoritairement dans des spectres O-PTIR, avec deux bandes fortes à 1542 et 1660  $\text{cm}^{-1}$  situées dans la région amide II et I, respectivement. La bande à 1542  $\text{cm}^{-1}$  peut être attribuée principalement aux protéines du manteau, en raison de sa quasi-absence dans le mutant PS4150 (spectre bleu dans la Fig. 17.C). La bande la plus forte, autour de 1660  $\text{cm}^{-1}$  peut probablement être attribuée en partie à des protéines de l'enveloppe de la spore, en raison de sa moindre intensité sur les spectres PS4150. Il est intéressant de noter que les deux bandes attribuées au manteau de la spore dans les spectres O-PTIR sont probablement dues à des protéines différentes de celles contribuant à la bande à 1274  $\text{cm}^{-1}$  dans les spectres Raman, car cette région correspond aux amides III. Ainsi, Raman et O-PTIR semblent être complémentaires pour étudier la signature du manteau de la spore bactérienne. L'O-PTIR pourrait ainsi être très intéressante dans le cadre de l'étude de l'influence des UV sur les spores bactériennes car les protéines du manteau des spores ont déjà été identifiées comme étant affectées par ces radiations (Elegbeleye *et al.*, 2021).

### II.5. Discussion et perspectives

La littérature indique que l'hydratation semble faire jouer un double rôle au CaDPA en augmentant la formation de lésions sur l'ADN des spores lors d'une exposition aux UV en solution, que ce soit *in vitro* ou *in vivo* (Slieman and Nicholson, 2001a). Les résultats présentés dans ce chapitre indiquent que l'impact d'une exposition aux UV sur le CaDPA est visible par plusieurs méthodes spectroscopiques. Cet impact semble également fonction de l'état d'hydratation de la molécule lors de l'irradiation. Néanmoins, toutes ces différences, bien que visibles, ne sont globalement pas drastiques. La section 1.3. du chapitre 1 ainsi qu'une étude de 2021 (Nardi *et al.*, 2021) ont montrées que les photoproduits du DPA sont constitués de groupements fonctionnels tels que des noyaux pyridine et des acides carboxyliques, avec une structure probablement assez similaire à celle du DPA. Les techniques de spectroscopies utilisées sont basées sur l'observation des liaisons chimiques entre atomes. Comme il l'a été montré dans le chapitre 1 les photoproduits ont des structures légèrement différentes avec des fonctions chimiques similaires. Les faibles différences observées sur les spectres avant et après exposition aux UV peuvent ainsi s'expliquer par ces faits. D'un côté, une faible différence a

## Chapitre 2 – Discussion et perspectives

également été observée entre les spectres du CaDPA exposé aux UVc en comparaison du CaDPA exposé aux UVb. Ce résultat peut là aussi s'expliquer par une similarité des photoproduits formés dans ces deux conditions. D'un autre côté, l'hydratation semble avoir un rôle moins important lors d'une exposition aux UVb. Ce résultat pourrait au contraire être interprété comme une différence de photochimie entre l'UVb et l'UVc au moins dans l'une des deux conditions d'hydratation testée. De plus amples investigations sont nécessaires pour conclure sur une spécificité de photoproduit dans l'une ou l'autre des gammes d'UV testées.

Les résultats présentés au chapitre précédent indiquent par ailleurs que les DPAP formés en condition sèche ou en solution lors d'une exposition aux UVc semblent en partie différents. Les résultats du présent chapitre vont dans le même sens. En effet, quelques différences sur les spectres sont observables quand le CaDPA est exposé aux UV en condition sèche en comparaison avec la condition plus hydratée. Les quelques différences observées peuvent s'expliquer par la formation de DPAP différents ou bien encore d'une cinétique de formation dépendant de l'hydratation. En se basant sur l'ensemble des résultats présentés dans ces deux premiers chapitres, l'hydratation semble bien à être responsable d'un changement de la photochimie du CaDPA. Cependant, il est pour le moment difficile d'identifier spécifiquement un photoproduit dans l'une ou l'autre des conditions d'hydratation sec ou en solution. Il est probable que le double rôle du CaDPA ne s'explique pas que par une photochimie modifiée par l'hydratation. Une autre hypothèse à envisager, est par exemple qu'il est possible que dans un environnement plus sec, les photoproduits et CaDPA triplets responsables de la formation de lésions spécifiques sur l'ADN des spores appelées « spore photoproduits » (SP) soient tout simplement plus contraints dans leur mouvement. Cette contrainte pourrait limiter leur accès à l'ADN et donc la formation de SP.

De plus amples investigations sont nécessaires pour mieux comprendre le rôle de l'hydratation dans la photochimie du CaDPA et de ce que cela implique pour la résistance des spores bactériennes aux radiations UV. Réaliser le même type d'étude *in vivo* permettrait d'observer si certaines molécules et/ou structures de la spore sont plus ou moins impactées en fonction de l'hydratation de leur environnement lors d'une exposition aux UV. L'O-PTIR semble fournir des informations différentes des spectroscopies Raman et FTIR, qui ont déjà été beaucoup utilisées sur la spore. Il serait alors possible en couplant ces trois techniques comme dans l'étude présentée dans ce chapitre d'approfondir les connaissances sur les modifications engendrées par les rayonnements UV sur les spores. Il serait également intéressant de voir si le profil des bandes du CaDPA dans les spores varie dans la même manière que ce qui a été

## Chapitre 2 – Discussion et perspectives

observé *in vitro*. Enfin, l'acquisition de spectres de spores supplémentées en DPAP artificiellement comme étudiée dans le 1<sup>er</sup> chapitre pourrait également permettre de mieux cerner ces DPAP qui semblent avoir un effet positif sur la résistance des spores.

# Chapitre 3

**Effet d'un laser infrarouge pulsé sur  
la spore de *B. subtilis*.**



### III.1. Caractérisation de l'inactivation des spores par un laser NIR pulsé.

#### III.1.1 Introduction

Comme il a été vu dans les deux chapitres précédents, une exposition des spores des *B. subtilis* aux UVc peut entraîner des dégâts photochimiques impactant la structure et la germination des spores. Afin de chercher à mieux comprendre comment et à quelles doses l'irradiation UV agit sur la spore nous avons essayé de mettre au point un protocole d'irradiation aux UVc directement sous microscope, permettant d'observer ensuite la germination des spores traitées.

Le défi de la mise en place de ce protocole réside dans le fait qu'un microscope classique ne permet pas de laisser passer de la lumière UV. Celle-ci serait en effet absorbée lors de son passage au travers des différents composants optiques du microscope. Des éléments optiques adaptés à une illumination UV existent (objectif, sources) mais constituent un investissement important du fait de la spécificité des matériaux optiques nécessaires et des sécurités à mettre en œuvre. Une alternative pour générer une exposition pouvant se rapprocher illumination aux UVc pourrait être d'utiliser un laser pulsé proche infrarouge (NIR) dont les propriétés permettent une absorption multiphotonique. Ce type de laser est disponible sur les microscopes dédiés à l'imagerie dite multiphotonique. La longueur d'onde étant inversement proportionnelle à l'énergie des photons, l'utilisation d'un laser pulsé à 750 nm peut générer : une excitation équivalente à l'UVc ( $\approx 250$  nm) dans le cas d'une absorption 3 photons ; une excitation équivalente à l'UVa ( $\approx 375$  nm) dans le cas d'une absorption 2 photons. Il est cependant nécessaire de s'interroger sur la réelle similitude des effets provoqués soit par absorption monophotonique de photons UV, ou bien par absorption multi-photonique de photons IR. De précédentes études ont révélé que certains dégâts engendrés par une excitation NIR pulsée pouvaient effectivement être similaires à ceux d'une exposition aux UV sur des cellules eucaryotes (Nadiarnykh *et al.*, 2012). Cependant cette observation n'a à notre connaissance jamais été réalisée sur des spores bactériennes.

#### III.1.2. Etude 4 : Effet d'un laser pulsé proche infrarouge sur les spores de *B. subtilis*

L'objectif de l'étude présentée ci-dessous, a ainsi été de vérifier dans quelle mesure l'utilisation d'un laser NIR pulsé était capable d'inactiver les spores de *B. subtilis*, et de comparer cette potentielle inactivation à celle provoquée par une exposition aux UVc. Par ailleurs caractériser le phénomène d'inactivation par irradiation IR peut également permettre de mieux cerner les effets délétères de la microscopie biphotonique, qui est encore largement

considérée comme peu perturbatrice pour les tissus et organismes observés. Cette étude a été publiée dans le « journal of photochemistry and photobiology : B » et est consultable en ligne avec le DOI suivant : <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2022.112530>

---

### **Effects of pulsed near infrared light (NIR) on *Bacillus subtilis* spores**

J. Dikec<sup>1</sup>, N. Bechoua<sup>1</sup>, P. Winckler<sup>1,2</sup>, JM Perrier-Cornet<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> *UMR Procédés Alimentaires et Microbiologiques, L'Institut Agro Dijon, Université de Bourgogne Franche-Comté, 1, Esplanade Erasme, 21000 Dijon, France.*

<sup>2</sup> *Dimacell Imaging Facility, L'Institut Agro Dijon, Université de Bourgogne Franche-Comté, 1 Esplanade Erasme, 21000 Dijon, France.*

#### **Abstract**

In this study, we develop a characterization of bacterial spore resistance to NIR pulsed light under modalities traditionally used in multiphoton microscopy. Energy dose and laser power are both key parameters in spore and bacterial cell inactivation. Surprisingly, spores and vegetative cells seem to show a similar sensitivity to pulsed NIR, spores being only 2-fold more resistant than their vegetative counterparts. This work enables us to eliminate certain hypotheses concerning the main driver of spore inactivation processes. Our findings suggest that damage leading to inactivation is mainly caused by photochemical reactions characterized by multiple possible pathways, including DNA damage or oxidation processes.

#### **1. Introduction**

A bacterial spore is a particular biological object presenting great resistance properties to various physical and chemical stresses. Spores can survive high shock pressure of several GPa, high temperatures and are generally much more UV-resistant than vegetative cells<sup>1-3</sup>. This resistance is due to a particular multilayer structure and to the presence of specific spore molecules<sup>4</sup>. It is a major concern in fields such as health, space and the food industry. Because of their resistance, bacterial spores can endure various decontamination processes without alteration and thus are an important vector of contamination leading to food poisoning or spoilage. Over the past decades, major improvements have been made in understanding the role of spore structures on their resistance properties<sup>1,5-7</sup>.

Bacterial spore structures can be examined via different non-invasive techniques, including various techniques based on near infrared radiation (NIR) wavelengths (700-1000 nm)<sup>5,8-14</sup>. For example, a NIR laser has been used in Raman spectroscopy to investigate changes in molecular composition during spore germination or under various conditions such as dehydration or heat stress<sup>8-11</sup>. Another example is multiphoton imaging, which requires a femtosecond-pulsed NIR laser source and can be used to image bacterial spores<sup>15,16</sup>. This technique allows for long observations with limited probe photobleaching, high focal plan selectivity and better sample penetration. Although NIR methods are usually considered to be minimally perturbative, a recent study has shown that bacterial spores may undergo damage if a high NIR power is used during Raman experiments<sup>17</sup>. Regarding multiphoton excitation, high photon density excitation is required because of the low probability of multiphoton absorption. This kind of laser exposure may induce underestimated damage to living systems, among which certain have already been identified and studied<sup>18-24</sup>. Mammalian and plant cells have previously been used to identify and understand impairments caused by pulsed femtosecond infrared light<sup>19,22,24-26</sup>. In these studies, the nature of the deteriorations mainly depends on the irradiation power<sup>27,28</sup>. For high NIR pulsed irradiations with a peak intensity in the range of TW/cm<sup>2</sup>, some studies found that plasma formation occurred, leading to cell death by DNA degradation or cell rupture<sup>19,25,27</sup>. Because of the weak NIR absorption of water and the pulsed nature of such lasers, the photothermal effect is limited (resulting in an increase of less than 1°C) at the power usually used for microscopy (a few GW/cm<sup>2</sup>). However, the specific absorption of certain pigments like melanin can induce a photothermal stress that causes structural and DNA damage in living cells<sup>20</sup>. Although NIR is not very energetic in itself, photochemical reactions such as the creation of DNA strand breaks or DNA photoproducts may also occur in the case of multiphoton absorption processes<sup>24,29,30</sup>. Although spores are known to have specific resistance to many physical stresses like UV radiation or pulsed visible light exposure, there is a lack of information concerning the nature of the hypothetical damage that occurs when they encounter NIR pulsed irradiation.

Bacterial spores are known to have particular resistance mechanisms against UV radiation. This resistance engages specific spore molecules such as Small Acid Soluble Proteins (SASPs) or dipicolinic acid (DPA)<sup>31-33</sup>, localized in the spore core. Moreover, spores undergo specific damage following UV radiation. Indeed, UV radiation in spores can lead to the formation of a bond between two adjacent thymine molecules on the same DNA strand, forming molecules called Spore Photoproducts (SP). These SP can be repaired via a unique DNA repair

pathway with SPlyase molecules<sup>34,35</sup>. In vegetative cells, pulsed NIR exposure seems to cause some photochemical damage similar to that caused by UV radiation through multiphoton absorption<sup>21</sup>, such as the formation of cyclobutane pyrimidine dimers (CPD) or pyrimidine (6-4) pyrimidine photoproducts (6-4PP). As in SP formation, CPD and 6-4PP formation may occur between two adjacent thymines on the same DNA strand after UV exposure. These two compounds are the main DNA UVc photoproducts found in vegetative cells. In bacterial spores, they are largely replaced by the formation of SP<sup>36</sup>. However, because of the lack of information concerning NIR damage in bacterial spores, the occurrence of SP formation relative to CPD and 6-4PP has not yet been described in this kind of irradiation exposure.

In this study, we characterize bacterial spore resistance to NIR pulsed light under modalities traditionally used in multiphoton microscopy. Our findings will allow us to better understand what happens to bacterial spores during pulsed NIR exposure and to elucidate the differences and similarities with the effects of UV light, which is to some extent comparable to pulsed NIR exposure<sup>21</sup>. Since multiphoton absorption can be used in fluorescent microscopy to image bacterial spores, investigating the biological perturbations occurring during such experiments may provide useful information to pursue minimally perturbative observations. Hence, the aims of this study are: I) to assess bacterial spore sensitivity to pulsed NIR radiation in the species *Bacillus subtilis*, II) to compare resistance in bacterial spores and in vegetative cells, III) to further the comprehension of potential mechanisms inducing spore inactivation after pulsed NIR irradiation.

## 2. Materials & methods

### 2.1. Bacterial strains, growth conditions and spore suspension preparation

The bacterial strain *B. subtilis* PS533 was obtained from the Department of Molecular, Microbial and Structural Biology, University of Connecticut Health Center, USA. This strain is a wild-type strain derived from the PS832 strain and carrying the pUB110 plasmid encoding a gene of resistance to kanamycin. A colony was isolated on Luria-Bertani (LB) agar containing 10 µg/mL kanamycin. Vegetative cells of PS533 were cultivated for 5 h under agitation until the exponential phase was reached at 37°C in LB broth medium. A pre-culture was carried out by inoculating an isolated colony on LB agar to which kanamycin (10 µg/mL) was added, in 50mL 2 x Schaeffer's medium-glucose (2xSG) under agitation at 37°C, until DO 0.6 was reached. This pre-culture was then diluted at a ratio 1:10 in 90 mL of 2xSG medium in a baffled flask under agitation at 37°C for 5 days. Spores were harvested by centrifugation at 11,000 g

for 15 min and washed with cold (4°C) distilled water until purity of approximately 98% was observed by phase-contrast microscopy (a minimum of 4 washings required).

### 2.2. *Experimental setup*

A spore suspension (3  $\mu$ l,  $10^8$  spores/ml) or a vegetative cell suspension (3  $\mu$ l,  $10^8$  cells/ml) was dropped on a nutrient rich Luria Broth medium (LB) supplemented with agarose 1%. The agarose gel formed a square of 2 cm per side and 1 cm thick when placed on a microscope slide at room temperature. A 20 x 20 mm glass coverslip was then placed on the suspension drop. The sample was observed using a Nikon A1-MP scanning microscope equipped with a Plan APO IR 60x objective (NA, 1.27; Water Immersion, Nikon, Japan). The sample was irradiated immediately after preparation by a femtosecond NIR pulsed laser (Chameleon Ultra Ti:Sapphire Vision II, Coherent, California) through the same objective. The laser provided NIR irradiation from 700 nm to 1000 nm at a repetition rate of 80 MHz with a pulse width of 140 fs. The first visible evidence of the germination phase (loss of refractivity by phase contrast microscopy) for both control and irradiated samples was observed on a few spores before 30 min when the samples were incubated at 37°C and after 40 min when they were incubated at room temperature. This difference in germination onset allowed us to hypothesize that irradiation of our sample immediately after preparation occurs effectively before the beginning of germination induction. Immediately after irradiation, a thermostat-controlled chamber set at 37°C (Okolab, Italy) was placed around the sample to maintain the temperature of the LB medium at around 37°C, which is optimal to trigger spore germination and outgrowth. The temperature of the medium was monitored with a K-type thermocouple probe.

### 2.3. *Pulsed NIR irradiation and microscopy image analysis*

The experimental setup irradiated 8 areas of 170  $\mu$ m<sup>2</sup>, plus one control area for each run of the experiment. At  $t=0$  s, spores of *B. subtilis* were spread on nutritive agar and immediately imaged after irradiation using bright field microscopy. The 8 square areas were irradiated with continuous scans by a femtosecond pulsed laser source, using different average powers ranging from 3.4 to 26 GW/m<sup>2</sup>. After 150 min of incubation at 37°C, a bright field image of the same area was acquired. Scan speed was given as the number of 1 pixel/ $\mu$ s corresponding to 30 scan/min. Laser intensity was measured after the objective with a PM100D Digital Handheld Optical Power and Energy Meter Console coupled with an S130C Slim Photodiode Power Sensor (Thorlabs, USA, New Jersey).

A bright field image of irradiated spores or vegetative cells was acquired through an Andor camera (Andor Technology Ltd, Belfast, UK) immediately after irradiation and was considered as the initial time ( $t = 0$  s). Spore germination observation was limited to 150 min after initial time due to the invasion of germinating cells from outside the irradiated areas into the observation field. Vegetative cell growth was observed for only 60 min for the same reason. After the observation period, destruction rate was calculated in each area as follows:

$$\text{Destruction rate} = \frac{\text{Number of ungerminated spores inside the } 170 \mu\text{m}^2 \text{ area}}{\text{Total initial number of spores in this area}}$$

### 2.4. Statistical analysis

All experiments were performed in at least triplicate with 7 to 79 cells for each point. An analysis of variance (ANOVA) followed by a Tukey's test was performed using OriginPro 2021 (OriginLab Corporation, USA) to compare the inactivation rates among different wavelengths. The significance of difference between the inactivation rates was determined for *P-values* below 0.05 and indicated with a letter index.

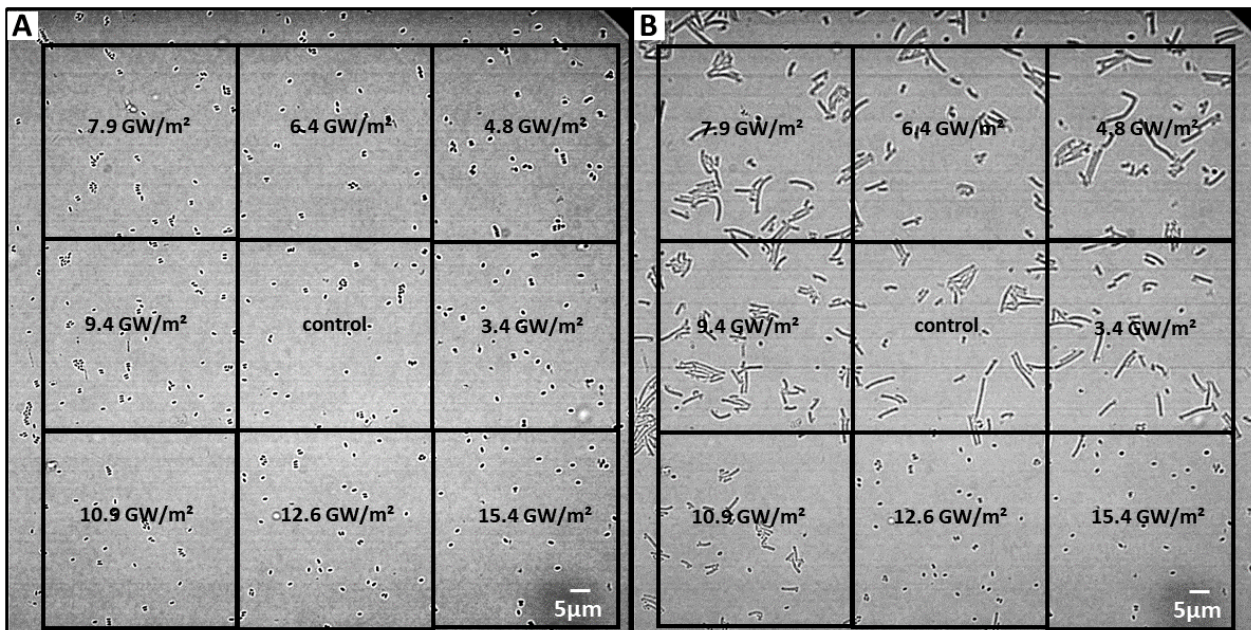
## 3. Results

### 3.1. Effect of 750 nm irradiation intensity

#### 3.1.1 Spores

Results of irradiation experiments are illustrated in Fig. 1. Spores or vegetative cells of a  $170 \mu\text{m}^2$  region of interest were irradiated for 1 min at 750 nm by a femtosecond pulsed laser source, using surface powers ranging from 3.4 to 15.4 GW/m<sup>2</sup>. Germination was observed in non-irradiated (control) spores and in those irradiated at powers below 12.6 GW/m<sup>2</sup>. Most spores irradiated at laser powers higher than 10.9 GW/m<sup>2</sup> remained unchanged (Fig. 1B).

To control whether non-germinated spores were inactivated or just delayed, spores irradiated using mean powers of 15.4 and 12.6 GW/m<sup>2</sup> were observed for more than 4 h. No germination was observed, suggesting an irreversible effect of the treatment on spore germination (data not shown). To verify whether the spores were really inactivated or simply blocked in their germination, two other experiments were performed. A first observation was that irradiated spores no longer appear bright and are larger than dormant spores under phase contrast microscopy. Nevertheless, no growth and division was observed unlike the control. Then, to force spores to germinate, these treatments were also performed on LB supplemented with 30 mM CaDPA. No difference in the number of vegetative cells 150 min after irradiation was observed compared to the control medium not supplemented with CaDPA (data not shown). These results support that exposure to pulsed NIR does not seem to block the first steps of germination which are mechanical but still kill the spores. Such spores are considered inactivated in the following discussion.



**Figure 1:** Spores of *Bacillus subtilis* on nutritive agar before (A) and 150 min after (B) a 750 nm femtosecond pulsed laser irradiation. Each square area was irradiated 1 min at an average laser power ranging from 0 to 15.4 GW/m<sup>2</sup>.

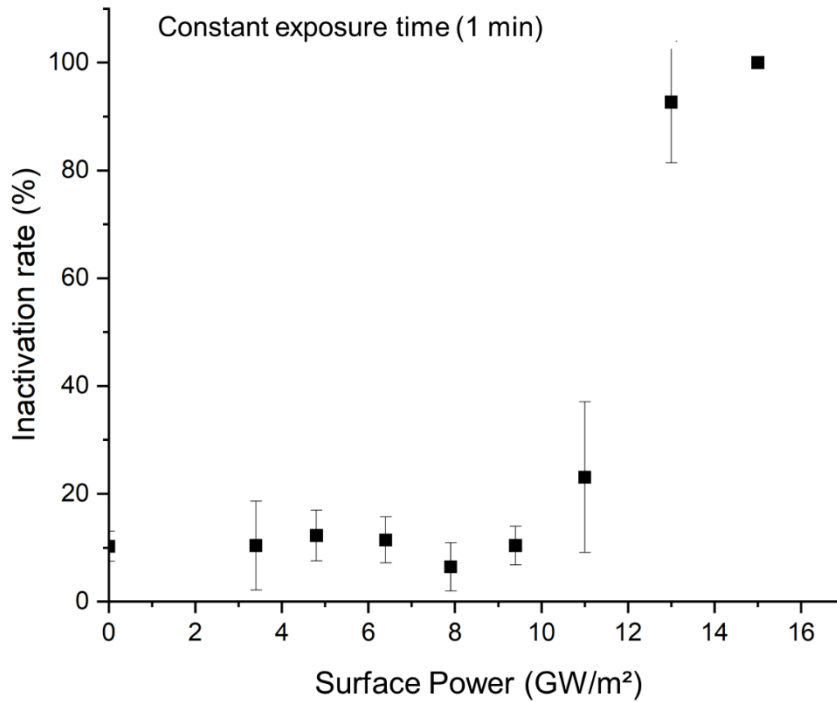
For each experiment, images were analyzed in order to determine the proportion of inactivated spores 150 min after the NIR irradiation. Germinated and ungerminated spores were counted in each square to obtain a percentage of inactivated spores for the different laser power conditions (Fig.2). The inactivation of the entire spore population as given by the experimental setup (limit of detection of 2 log countable) was observed in a relatively short laser power range,

namely between 10.9 and 15.4 GW/m<sup>2</sup>. An intensity threshold of around 10.9 GW/m<sup>2</sup> could be observed, above which the power intensity had a dramatic impact on spores. Above this threshold, the percentage of ungerminated spores quickly reached 100% at around 14-15 GW/m<sup>2</sup>. For an average power below 10 GW/m<sup>2</sup>, the percentage of germination remained close to 10%, which is not a significant change compared to the non-irradiated case. This 10% value can be explained by the presence of nutritive superdormant spores. In the present conditions, where *B. subtilis* spores on LB medium are not thermally activated, the proportion of superdormant spores is known to vary between 1 and 12%<sup>37</sup>.

This range of spore inactivating power of 14-15 GW is higher (between 2- and 5-fold) than what is usually used in two-photon microscopy imaging. However, such power is not highly unusual and can be required in specific cases, i.e. FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching), low intensity fluorescence imaging or thick sample imaging. Furthermore, it should be noted that a 1 min observation is usual in scanning microscopy. As in these conditions NIR pulsed laser irradiation can inactivate spores, it will probably also disrupt other living microorganisms. This must be kept in mind because fluorescence scanning microscopy is widely used to study cellular structures.

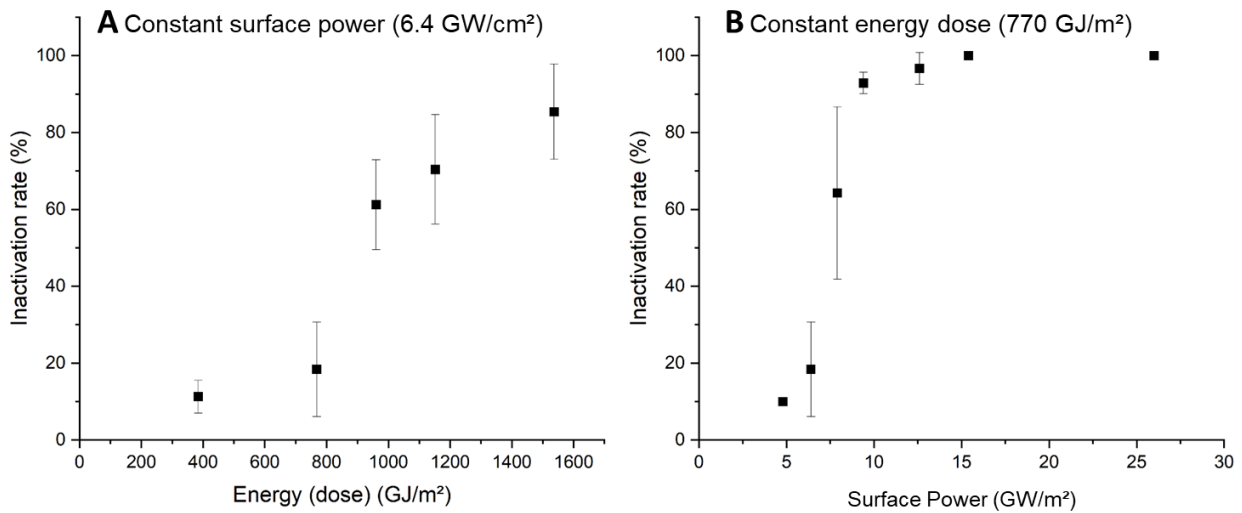
To the best of our knowledge, this is the first experiment of spore inactivation in such conditions. However, continuous IR irradiation has been tested on *B. subtilis* spores where inactivation was also obtained, but at a higher power<sup>17</sup>. In this recent work, *B. subtilis* spores were inactivated (more than 99%) by an 808 nm laser tweezer spot of 400 nm diameter and 40 mW power over more than 40 min, which represents an average surface power of 300 GW/m<sup>2</sup>. It is much higher (20 x) than the average power used in our experiments. Moreover, the application time is also much longer (40 x). This comparison leads us to put forward the hypothesis of a specific effect due to the femtosecond pulsed nature of the Ti-sapphire laser used in these experiments.





**Figure 2:** Percentage of ungerminated *B. subtilis* spores on LB agar 150 minutes after 750 nm femtosecond pulsed laser irradiation for 1 minute, as a function of mean irradiation power. 3  $\mu$ l of spore suspension was spread on LB agar medium. Error bars show the standard deviation of about 6 independent experiments. Approximately 300 spores were observed for each point.

By increasing the laser power while maintaining a constant time, the dose (total energy) received by the spore is also increased. In order to distinguish the effect of mean power from the total energy that spores receive during the treatment, *B. subtilis* spores were first exposed to the same mean power (6.4 GW/cm<sup>2</sup>) while increasing the exposure time. The total energy dose increased accordingly.



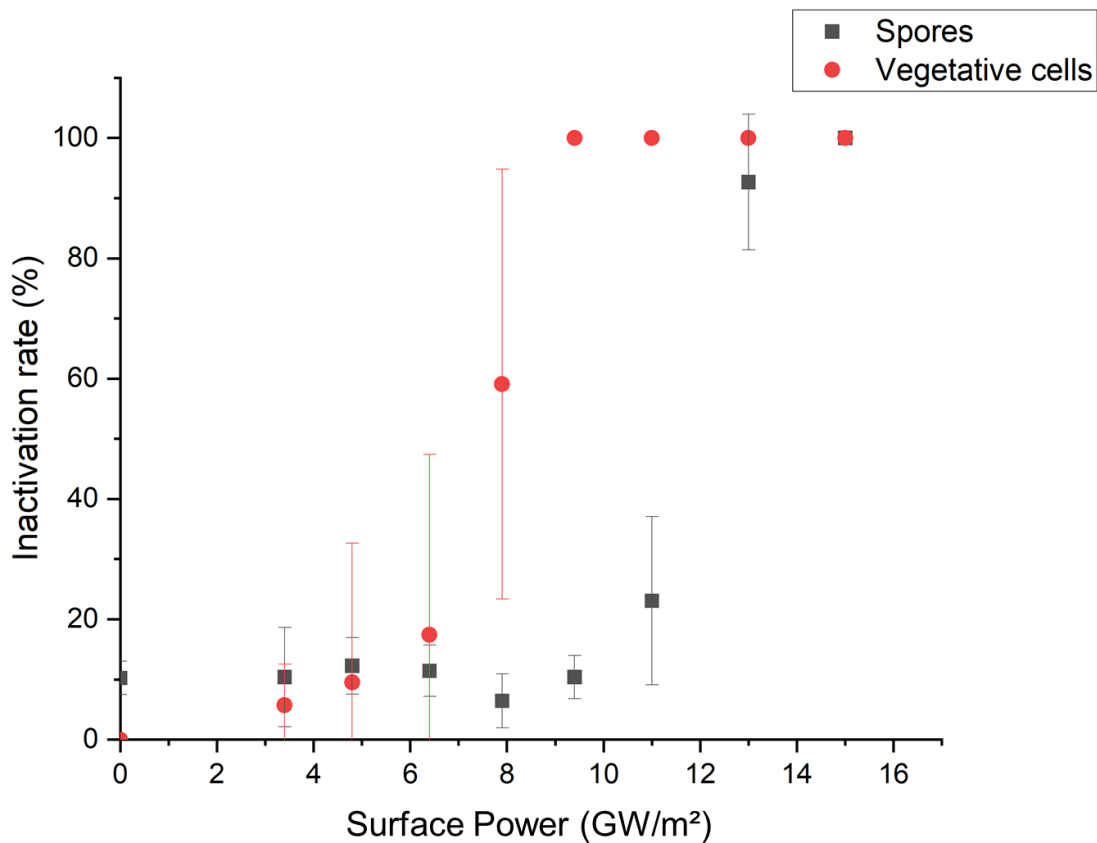
**Figure 3: (A) Effect of total energy received (dose) at constant average power irradiation of 6.4 GW/m<sup>2</sup> on *B. subtilis* spore germination. (B) Effect of average power at a constant energy of 770 GJ/m<sup>2</sup> irradiation.** Spore inactivation rate was calculated 150 min after the 750 nm femtosecond laser irradiation on LB agar medium. Each point is an average of three independent experiments of about 20 spores. Error bars are the standard deviation of the mean.

Spore inactivation was positively correlated to the energy dose received by the spore population (Fig. 3A). The effect of the energy dose appears to be slightly weaker than the power effect (Fig. 2). At a constant power of 6.4 GW/cm<sup>2</sup>, an energy dose of around 768 GJ/m<sup>2</sup> (treatment time of 2 min) was necessary to obtain the first spore inactivation. Twice the dose (more than 1536 GJ/m<sup>2</sup> (4 min)) was necessary to inactivate almost 90% of the spore population (1 log of inactivation).

Irradiations were then carried out with increased powers but a constant total energy. A total energy dose corresponding approximately to the previous threshold value of 770 GJ/m<sup>2</sup> was chosen. The spore inactivation threshold was around 6.4 GW/m<sup>2</sup>. This point is equivalent to the previous threshold corresponding to a 1-min exposure (Fig. 3A). The average power and the energy dose both affected spore viability, but did not demonstrate the same inactivation kinetics (Fig. 3). For a threshold power of around 6.4 GW/m<sup>2</sup> it is possible to obtain 1-2 log inactivation of the sample by doubling the power (12.8 GW/m<sup>2</sup>), which is not the case when doubling energy as previously observed.

3.1.2 Vegetative cells

In order to compare the spore response to NIR pulsed irradiation, a similar investigation was performed on vegetative cells of *B. subtilis*. The viability parameter, previously the spore germination ability, was replaced by a growth measurement (cell division). Thus, the growth of vegetative cells was followed for 1 h after irradiation. Cells showing no division were considered as inactivated (Fig. 4).



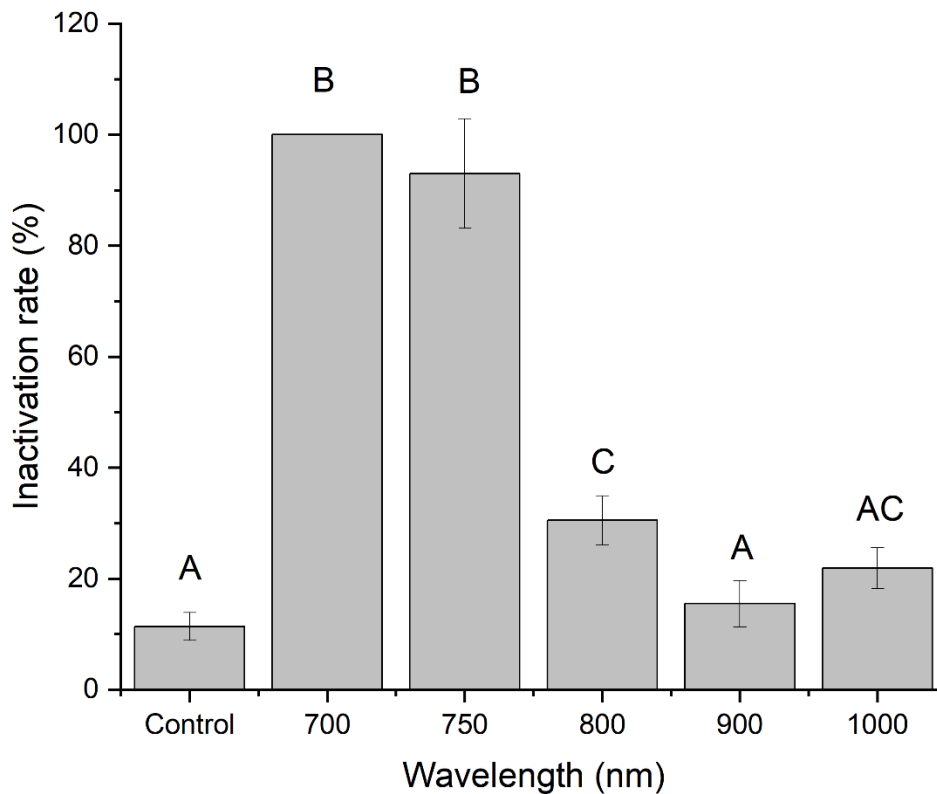
**Figure 4:** Proportion of *B. subtilis* vegetative cells (circles) and spores (squares) whose growth (or germination) was stopped following a 750 nm irradiation of 1 min, with a femtosecond pulsed laser at increasing power values. Vegetative cells and spores were observed after a growth period of 60 min and 150 min respectively on LB agar medium. Each point is an average of 3 independent experiments of about 20 cells. Error bars are the standard deviations.

The inactivation of vegetative cells began at a threshold power of 3.4 GW/m<sup>2</sup>, which is lower than the power needed for spore inactivation. Complete inactivation was obtained with a power of 9 GW/m<sup>2</sup> (square in Fig.4). Thus, as expected, vegetative cells appeared less resistant than spores, requiring almost 1.6 times less irradiation power to achieve 100% inactivation.

Nevertheless, this difference between spores and vegetative cells appears very weak in comparison to general resistance to physical stresses. Indeed, bacterial spores are known to be 10 to 50-fold more resistant than vegetative cells to UVc radiation<sup>38</sup>, more than 100-fold more resistant to wet heat at 90°C and around 20-fold more resistant to freeze-drying<sup>39</sup>. It is thus interesting to note here the relatively similar inactivation rates, as spores were found to be less than 2-fold more resistant than vegetative cells to pulsed NIR.

### *3.2. Effect of irradiation wavelength on B. subtilis spore lethality*

The effect of irradiation wavelength on spore germination was also tested, using a lethal spore treatment (13 GW/m<sup>2</sup>, 1 min, 770 GJ/m<sup>2</sup>). Average power was adjusted and controlled with a power meter, in order to guarantee the same power for each wavelength. Thus, the treatment time and the energy remained comparable to the reference treatment of 750 nm. It is known that different types of damage are generated depending on the NIR wavelength<sup>25,26,40</sup>. Using the same protocol described above, *B. subtilis* spores were irradiated with 700, 750, 800, 900 and 1000 nm NIR wavelengths for 1 min. Spore germination was followed for 150 min after irradiation and counted as described previously (Fig. 5).



**Figure 5: Proportion of ungerminated spores observed 150 min after irradiation with a femtosecond pulsed laser at different wavelengths. Average laser power was 13 GW/m<sup>2</sup> corresponding to an energy of 770 GJ/m<sup>2</sup>. Spores were allowed to grow for a period of 150 min on LB agar medium.** Each column is an average of four independent experiments of about 50 spores. Error bars represent the standard deviations. Tukey's test was used to compare inactivation among the different treatments: the same letters indicate no significant difference between treatments  $p < 0.05$ .

In this experiment, the most efficient inactivating wavelength seemed to be 700 nm. A rapid decrease in the inactivation effect was observed between 750 nm and 800 nm. Inactivation at 900 or 1000 nm irradiation was not significantly different from the untreated control. The irradiation wavelength seemed to be a key factor in spore inactivation. Conversely to water absorption of NIR, which increases more than 50-fold from 700 nm to 1000 nm, spore inactivation decreased with wavelength. It is interesting to note that the pulsed femtosecond laser Ti-sapphire is used for multiphoton imaging in the same power range that was used in our spore and vegetative cell inactivation experiment. With such a laser power, two- or three-photon absorption can occur during sample exposure. For wavelengths ranging between 700 and 800 nm, this corresponds to UVc or UVa energy. For 900 nm and above, only an energy level

equivalent to UVb and UVa energy levels can be reached by three-photon absorption. Nevertheless, as shown previously, the similar sensitivities of spores and vegetative cells is a very different case from that observed during UV exposure. This finding suggests that NIR pulsed light and UVc light cause different pathways of inactivation.

### 4. Discussion

In this work, NIR irradiation of *B. subtilis* spores induced a strong inactivation of germination. However, determining the predominant role of the overall energy dose received by the sample versus the surface peak power still remains elusive. Both parameters are found to affect spore viability and yet to have different kinetics (Fig 3). Depending on the power used in NIR irradiation, the mechanisms involved in cell death differ. Four types of damage are known to occur in living systems exposed to NIR pulsed light, allowing us to formulate some hypotheses about the spore inhibition observed in this work. The main mechanisms reported in the literature, usually observed in vegetative cells, are plasma formation, temperature rise, thermo-elastic stress and finally the multiphoton absorption process<sup>20</sup>. This last mechanism is related to UV exposure because similar photochemical damage is found after both pulsed NIR and UV exposure.

In our experiments, spore inactivation was tested at surface powers ranging from 3.4 GW/m<sup>2</sup> to 26 GW/m<sup>2</sup> (Fig. 2; Fig. 3B) corresponding to calculated power peaks of between 300 and 2,320 TW/m<sup>2</sup>. Although plasma formation is known to be a major cause of lethality following pulsed infrared light exposition<sup>25,41,42</sup>, it appears unlikely that this phenomenon occurred during any of our experimentations. Indeed, it has been reported that a peak power superior to 10,000 TW/m<sup>2</sup><sup>25,43</sup> is necessary to induce plasma formation in Chinese hamster ovary cells and plant cells exposed to NIR. Moreover, the characteristic white luminescence observable during such events was not observed during the experimentations conducted here. In the same way, the maximum surface power of 26 GW/m<sup>2</sup> used in our experimentations (Fig. 3B) allows us to eliminate the influence of rising temperatures caused by IR absorption. Previous studies have in fact demonstrated that temperatures will not increase enough to cause damage in non-pigmented cells, like *B. subtilis* cells, when these cells are irradiated with a NIR femtosecond laser at an average power lower than 30 mW<sup>21,44</sup>. For a laser emitting at 750 nm through an objective of 1.27 NA, this corresponds to an energy of around 60 GW/m<sup>2</sup>. This is higher than the maximum average power used in the present study. Water is considered as the main NIR absorber medium in the case of non-pigmented cells, but it has been calculated using physical models that water will only increase its temperature by about 0.1K/100mW, for

wavelengths in a range of 650 to 850 nm<sup>44</sup>. Therefore, under the conditions of our experiments (with only water absorption taken into account), photothermal stress on vegetative cells is unlikely to happen. Studies have shown that pigmented cells, or those containing melanin-like molecules, are more sensitive to NIR pulsed light and may undergo photothermal damage<sup>20,22</sup>. Despite the fact that *B. subtilis* spores present a light gray pigmentation, they are known to be very resistant to thermal stress. For example, these spores can resist temperatures higher than 90°C for several minutes<sup>39</sup>. It appears unlikely that these kinds of temperatures were reached during our experimentation, notably because agar melting was not observed during any experiment. Thermo-elastic stress has also been evoked, described as rising pressure due to temperature increase in the observation volume, because the high frequency of a pulsed laser source does not allow for acoustic relaxation. It has been demonstrated that thermo-elastic stress may occur even if the temperatures are not high enough to cause thermal stress. For example, a previous study has reported that *Bacillus globigii* spores irradiated at 800 nm with a power peak of 100,000 TW/m<sup>2</sup> undergo total disintegration after 500 laser pulses due to thermo-elastic stress<sup>27</sup>. However, it has also been demonstrated that a peak power weaker than 50,000 TW/m<sup>2</sup> does not produce this kind of stress<sup>45</sup>. In the present study, a maximum peak power of around 2,320 TW/m<sup>2</sup> (average surface power 26 W/m<sup>2</sup>) was used, which is far too low to induce this stress, despite the greater number of pulses because of a repetition rate of 80 MHz. Neither spore nor vegetative cell disintegration was observed in the experiments conducted in this study, and thermo-elastic stress is unlikely to contribute to the reported inactivation process.

The present study demonstrates that irradiation at wavelengths higher than 800 nm were ineffective in reducing spore germination (Fig. 5). These results can be explained by the photochemical damage corresponding to the fourth mechanism that may be induced by pulsed NIR exposure. Due to the high photon density provided by the femtosecond pulsed laser, molecules are susceptible to the absorption of two or three photons simultaneously. As the energy of light is inversely proportional to its wavelength, two or three NIR photon absorption can be the energy equivalent of one UV photon absorption (Table 1).

**Table 1: Range of UV wavelengths equivalent to the simultaneous absorption of two or three photons of NIR wavelength.**

<b>Irradiation wavelength (nm)</b>	<b>Wavelength equivalent (nm) if two photon absorption</b>	<b>Wavelength equivalent (nm) if three photon absorption</b>
<b>700</b>	350 (UV A)	233 (UV C)
<b>750</b>	325 (UV A)	250 (UV C)
<b>800</b>	400 (Visible)	266 (UV C)
<b>900</b>	450 (Visible)	300 (UV B)
<b>1000</b>	500 (Visible)	333 (UV A)

Thus, multiphoton absorption can result in damage similar to that found after UV exposure. In vegetative cells, this damage includes the production of direct DNA photochemical effects, like cross-linking, strand breaks or photoproduct formation such as CPD or 6-4 photoproducts<sup>42</sup>. Previous investigations have found that DNA strand breaks and CPD formation increase with pulsed NIR average powers similar to the power ranges used in our study<sup>20,21</sup>. These types of photochemical damage caused by multiphoton absorption of DNA could be an explanation for the inactivation rate observed here. This hypothesis is supported by the observation of a decreased inactivation rate for increasing wavelengths (Fig. 5). Indeed, CPD formation decreases with increasing irradiation wavelengths and is known to be almost undetectable at 800 nm<sup>21</sup>. This is in accordance with our results which show little inactivation above 800 nm. It is known that after UVc exposure, bacterial spores and vegetative cells exhibit different behaviors, mainly due the presence of Spore Photoproducts (SP). SP replace the majority of CPD and 6-4PP that are the main DNA photoproducts found in vegetative cells. SP formation results from the specific photochemistry of the spore DNA and the involvement of certain spore specific molecules such as dipicolinic acid (DPA) and Small Acid Soluble Proteins (SASPs)<sup>35,46</sup>. However, SP formation after pulsed NIR exposure has not yet been studied. We observed here that higher powers and shorter wavelengths comprised between 700-750 nm are more efficient in inactivating spores than longer wavelengths. These results are interesting to compare with bacterial spore resistance to UV irradiation because NIR pulsed light is supposed to mimic at least a part of UV damage, through two- and three-photon absorption<sup>21,41</sup>. However, this hypothesis is probably not the sole explanation, since bacterial spores are known to be 10 to 50 times more resistant to 254 nm UVc radiation than vegetative cells<sup>38</sup>, which is not observed here. On the contrary, the present study reports that spores of *B. subtilis* require only 1.6 times more pulsed NIR light power than vegetative cells to be fully inactivated. This relatively small difference in terms of NIR resistance between spores and vegetative cells could



be explained by the fact that multiphoton absorption is generated inside the spore/cell in the focus plane, directly inside the spore protoplasm. Thus, spore envelopes cannot play their protective role as they do in UV radiation, for example. In the case of multiphoton absorption, the difference in terms of resistance probably lies only in spore protoplasm composition and hydration. Oxidation caused by NIR pulsed radiation may play a key role in explaining the observed inactivation rate. Previous studies have reported that oxidation processes can occur in the same power range of pulsed NIR laser that was used here. For example, it has been reported that 7 mW average power is enough to produce ROS in PTK2 cells<sup>18</sup>. In addition, Varma *et al.* reported that after NIR exposure in *B. globigii*, SASPs, one of the key molecules involved in spore DNA photochemistry, are found to be oxidized<sup>27</sup>. The very low water activity inside the spore core could explain the greater resistance compared to vegetative cells. Because of the lack of available water inside bacterial spores, ROS production may be impaired during pulsed NIR exposure. It is interesting to compare the unusually close inactivation rates between spores and vegetative cells reported in the present study with the inactivation rate described for spores lacking DPA, a molecule found only in spores. The latter are known to be only 2.5 fold more resistant than vegetative cells to UV radiation<sup>32</sup>. It seems that DPA-lacking spores and vegetative cells (naturally deprived of DPA) react in almost the same way, by significantly increasing the formation of CPD and 6-4PP. Therefore, the close inactivation rates between spores and vegetative cells in the case of pulsed NIR exposure may indicate similar damage in the two forms, despite major physiological differences between them, as reported in spores lacking DPA exposed to UV radiation.

Multiple pathways may lead to the spore inactivation observed in this work, and further studies would be welcome to better understand the mechanisms involved here. However, the present work enables us to eliminate certain hypotheses about the main driver of spore inactivation processes, and we submit that the main factor of inactivation is photochemical damage. Moreover, it seems that this photochemical damage is different from that resulting from UV exposure, despite the link between high power femtosecond pulsed NIR and UV through the multiphoton absorption process as previously reported<sup>29</sup>. It is interesting to highlight the unusually small difference observed between spores and vegetative cells, when using NIR pulsed irradiation. In light of this consideration, we believe that investigations into the effect of pulsed NIR exposure on bacterial spores could bring new insights in the struggle to overcome what remains a decontamination challenge. This study indicates that multiphoton excitation microscopy may potentially lead to significant cellular alterations in bacterial spores.

### Acknowledgement

This work was supported by the Regional Council of Bourgogne-Franche-Comté. We would like to thank the DImaCell imaging facility for the use of microscopy equipment; Dr. Thibaut They member of PAM Lab and Mary Bouley Director of the Center for Languages and Cultures at the University of Burgundy for their assistance in proofreading.

### References

1. Setlow, P. Spore Resistance Properties. *Microbiol. Spectr.* 2, (2016).
2. Burchell, M. J., Mann, J. R. & Bunch, A. W. Survival of bacteria and spores under extreme shock pressures. *Mon. Not. R. Astron. Soc.* 352, 1273–1278 (2004).
3. den Besten, H. M. W., Wells-Bennik, M. H. J. & Zwietering, M. H. Natural Diversity in Heat Resistance of Bacteria and Bacterial Spores: Impact on Food Safety and Quality. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 9, 383–410 (2018).
4. Atrih, A. & Foster, S. J. Bacterial endospores the ultimate survivors. *Int. Dairy J.* 12, 217–223 (2002).
5. Loison, P., Gervais, P., Perrier-Cornet, J. M. & Kuimova, M. K. Effect of ethanol perturbation on viscosity and permeability of an inner membrane in *Bacillus subtilis* spores. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1858, 2060–2069 (2016).
6. Nguyen Thi Minh, H., Durand, A., Loison, P., Perrier-Cornet, J. M. & Gervais, P. Effect of sporulation conditions on the resistance of *Bacillus subtilis* spores to heat and high pressure. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 90, 1409–1417 (2011).
7. Bressuire-Isoard, C., Broussolle, V. & Carlin, F. Sporulation environment influences spore properties in *Bacillus*: Evidence and insights on underlying molecular and physiological mechanisms. *FEMS Microbiol. Rev.* 42, 614–626 (2018).
8. Zhang, P., Kong, L., Setlow, P. & Li, Y. Q. Characterization of wet-heat inactivation of single spores of *Bacillus* species by dual-trap raman spectroscopy and elastic light scattering. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 1796–1805 (2010).
9. Kong, L. et al. Characterization of bacterial spore germination using phase-contrast and fluorescence microscopy, Raman spectroscopy and optical tweezers. *Nat. Protoc.* 6, 625–639 (2011).
10. Kong, L., Setlow, P. & Li, Y. Q. Analysis of the Raman spectra of Ca<sup>2+</sup>-dipicolinic acid alone and in the bacterial spore core in both aqueous and dehydrated environments. *Analyst* 137, 3683–3689 (2012).
11. Kong, L., Setlow, P. & Li, Y. Q. Direct analysis of water content and movement in single dormant bacterial spores using confocal Raman microspectroscopy and Raman imaging. *Anal. Chem.* 85, 7094–7101 (2013).

12. Modugno, C. et al. Understanding the Effects of High Pressure on Bacterial Spores Using Synchrotron Infrared Spectroscopy. *Front. Microbiol.* 10, 1–10 (2020).
13. Tiburski, J. H., Rosenthal, A., Guyot, S., Perrier-Cornet, J. M. & Gervais, P. Water Distribution in Bacterial Spores: A Key Factor in Heat Resistance. *Food Biophys.* 9, 10–19 (2014).
14. Georget, E. et al. In situ investigation of *Geobacillus stearothermophilus* spore germination and inactivation mechanisms under moderate high pressure. *Food Microbiol.* 41, 8–18 (2014).
15. He, W. et al. Two-photon luminescence imaging of *Bacillus* spores using peptide-functionalized gold nanorods. *Nano Res.* 1, 450–456 (2008).
16. Fiole, D. et al. Two-photon intravital imaging of lungs during anthrax infection reveals long-lasting macrophage-dendritic cell contacts. *Infect. Immun.* 82, 864–872 (2014).
17. Malyshev, D. et al. Laser induced degradation of bacterial spores during micro-Raman spectroscopy. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 120381 (2021) doi:10.1016/j.saa.2021.120381.
18. Tirlapur, U. K., König, K., Peuckert, C., Krieg, R. & Halbhuber, K. Femtosecond near-infrared laser pulses elicit generation of reactive oxygen species in mammalian cells leading to apoptosis-like death. *Exp. Cell Res.* 263, 88–97 (2001).
19. König, K., So, P. T. C., Mantulin, W. W. & Gratton, E. Cellular response to near-infrared femtosecond laser pulses in two-photon microscopes. *Opt. Lett.* 22, 135 (1997).
20. König, K. Cell damage during multi-photon microscopy. *Handb. Biol. Confocal Microsc.* Third Ed. c, 680–689 (2006).
21. Nadiarykh, O., Thomas, G., Van Voskuilen, J., Sterenborg, H. J. C. M. & Gerritsen, H. C. Carcinogenic damage to deoxyribonucleic acid is induced by near-infrared laser pulses in multiphoton microscopy via combination of two- and three-photon absorption. *J. Biomed. Opt.* 17, 116024 (2012).
22. Glickman, R. D. & Johnson, T. E. Multiphoton absorption is probably not the primary threshold damage mechanism for femtosecond laser pulse exposures in the retinal pigment epithelium. *Laser Interact. with Tissue Cells XV* 5319, 162 (2004).
23. Kong, X. et al. Comparative analysis of different laser systems to study cellular responses to DNA damage in mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* 37, (2009).
24. Botchway, S. W., Reynolds, P., Parker, A. W. & O'Neill, P. Use of near infrared femtosecond lasers as sub-micron radiation microbeam for cell DNA damage and repair studies. *Mutat. Res. - Rev. Mutat. Res.* 704, 38–44 (2010).
25. Chen, I. H., Chu, S. W., Sun, C. K., Cheng, P. C. & Lin, B. L. Wavelength dependent damage in biological multiphoton confocal microscopy: A micro-spectroscopic comparison between femtosecond Ti:sapphire and Cr:forsterite laser sources. *Opt. Quantum Electron.* 34, 1251–1266 (2002).

26. Kong, X. et al. Comparative analysis of different laser systems to study cellular responses to DNA damage in mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* 37, (2009).
27. Varma, S., Hagan, N., Antoine, M., Miragliotta, J. & Plamen, D. Interaction of near-infrared femtosecond laser pulses with biological materials in water. *Opt. Eng.* 53, 1–7 (2014).
28. Kong, X. et al. Laser microirradiation to study in vivo cellular responses to simple and complex DNA damage. *J. Vis. Exp.* 2018, 1–10 (2018).
29. Tycon, M. A., Chakraborty, A. & Fecko, C. J. Generation of DNA photolesions by two-photon absorption of a frequency-doubled Ti:sapphire laser. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 102, 161–168 (2011).
30. Träutlein, D., Deibler, M., Leitenstorfer, A. & Ferrando-May, E. Specific local induction of DNA strand breaks by infrared multi-photon absorption. *Nucleic Acids Res.* 38, (2009).
31. Nicholson, W. L., Setlow, B. & Setlow, P. Ultraviolet irradiation of DNA complexed with  $\alpha/\beta$ -type small, acid-soluble proteins from spores of *Bacillus* or *Clostridium* species makes spore photoproduct but not thymine dimers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 8288–8292 (1991).
32. Paidhungat, M., Setlow, B., Driks, A. & Setlow, P. Characterization of spores of *Bacillus subtilis* which lack dipicolinic acid. *J. Bacteriol.* 182, 5505–5512 (2000).
33. Setlow, P. I will survive: DNA protection in bacterial spores. *Trends Microbiol.* 15, 172–180 (2007).
34. Xue, Y. & Nicholson, W. L. The two major spore DNA repair pathways, nucleotide excision repair and spore photoproduct lyase, are sufficient for the resistance of *Bacillus subtilis* spores to artificial UV-C and UV-B but not to solar radiation. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 2221–2227 (1996).
35. Yang, L. & Li, L. Spore photoproduct lyase: The known, the controversial, and the unknown. *J. Biol. Chem.* 290, 4003–4009 (2015).
36. Moeller, R. et al. UV-radiation-induced formation of DNA bipyrimidine photoproducts in *Bacillus subtilis* endospores and their repair during germination. *Int. Microbiol.* 10, 39–46 (2007).
37. Zhang, Y. & Mathys, A. Superdormant spores as a hurdle for gentle germination-inactivation based spore control strategies. *Front. Microbiol.* 9, 1–10 (2019).
38. Nicholson, W. L., Munakata, N., Horneck, G., Melosh, H. J. & Setlow, P. Resistance of *Bacillus* Endospores to Extreme Terrestrial and Extraterrestrial Environments. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64, 548–572 (2000).
39. Setlow, P. Spores of *Bacillus subtilis*: Their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals. *J. Appl. Microbiol.* 101, 514–525 (2006).
40. Vogel, A. & Venugopalan, V. Pulsed laser ablation of soft biological tissues. *Chem. Rev.* 103, 577–644 (2003).

41. König, K., So, P. T. C., Mantulin, W. W., Tromberg, B. J. & Gratton, E. Two-photon excited lifetime imaging of autofluorescence in cells during UVA and NIR photostress. *J. Microsc.* 183, 197–204 (1996).
42. Kong, X., Wakida, N. M. & Yokomori, K. Application of Laser Microirradiation in the Investigations of Cellular Responses to DNA Damage. *Front. Phys.* 8, 1–8 (2021).
43. Cheng, P. chin et al. Multi-photon fluorescence microscopy - The response of plant cells to high intensity illumination. *Micron* 32, 661–669 (2001).
44. Schönle, A. & Hell, S. W. Heating by absorption in the focus of an objective lens. *Opt. Lett.* 23, 325 (1998).
45. Vogel, A., Noack, J., Hüttman, G. & Paltauf, G. Mechanisms of femtosecond laser nanosurgery of cells and tissues. *Appl. Phys. B Lasers Opt.* 81, 1015–1047 (2005).
46. Setlow, B. & Setlow, P. Dipicolinic acid greatly enhances production of spore photoproduct in bacterial spores upon UV irradiation. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 640–643 (1993).

### III.2. Résultats complémentaires - Rôle du manteau et du CaDPA dans l'inactivation des spores par un laser NIR pulsé.

#### III.2.1. Introduction

L'étude présentée au paragraphe précédent a montré que les dégâts photochimiques engendrés par l'utilisation d'un laser NIR pulsé semblent différents de ceux engendrés par l'UVc. Il est ici proposé d'approfondir la compréhension du mécanisme d'inactivation des spores par le laser NIR pulsé. Pour cela, l'étude s'est concentrée d'une part sur l'impact de ce stress sur le manteau des spores, de l'autre sur le rôle du DPA. Le manteau des spores de *B. subtilis* est connu pour être impacté lors d'une exposition aux UVc ou une lumière blanche pulsé. Cette dégradation du manteau peut entraîner des conséquences sur les propriétés physiques des spores notamment au niveau de leur adhésion à des surfaces (Clair *et al.*, 2020; Elegbeleye *et al.*, 2021). Le DPA est quant à lui connu pour jouer un rôle important dans la résistance des spores face aux UV via ses propriétés photochimiques (Slieman and Nicholson, 2001a; Douki, Setlow and Setlow, 2005). L'effet des propriétés photochimique du DPA sur la résistance au UVc des spores a été détaillé dans la section 3.1. de l'état de l'art ainsi que dans le chapitre 1 de ce manuscrit. Nous nous sommes donc intéressés particulièrement à l'implication de cette molécule dans la résistance des spores face au laser NIR pulsé.

Dans cette étude, c'est l'autofluorescence des spores qui va nous servir à évaluer l'effet de l'irradiation IR sur le manteau ainsi que sur le DPA. En effet, d'une part nous savons que l'autofluorescence des spores est en grande partie due aux protéines de leur manteau protéique. Lorsque ces protéines sont altérées ou retirées comme lors du cas d'un protocole de "decoating" chimique, l'autofluorescence des spores diminue drastiquement. D'une autre part, comme il a été observé au chapitre 1 l'autofluorescence de spores après une exposition au UVc augmente de manière significative. Dans ce cas, c'est le DPA qui, en formant des photoproduits fluorescents, augmente l'autofluorescence globale de la spore et non le manteau. Ainsi, ces deux composants de la spore aux propriétés fluorescentes différentes peuvent servir de sondes endogènes pour observer l'impact de l'exposition des spores à un laser pulsé infrarouge.

#### III.2.2. Matériels et méthodes

##### III.2.2.1. *Souches utilisées*

Dans le cadre de cette étude, trois souches différentes de *B. subtilis* ont été utilisées :

## Chapitre 3 – Résultats complémentaires

- La souche sauvage PS533, portant un plasmide contenant un gène de résistance à la kanamycine.
- La souche FB122 : mutant dont le gène codant la *DPA synthase* impliquée dans la production du DPA a été inactivé. Cette souche ne contient quasiment pas de DPA et possède une résistance à la spectinomycine et la tétracycline.
- La souche PS4150 : mutant dont le gène *cotE* impliqué dans la formation du manteau de la spore a été inactivé. Ces spores ne sont plus capables de synthétiser la majeure partie de leur manteau. Les bacilles possèdent une résistance à la spectinomycine et la tétracycline.

### III.2.2.2. Production des spores

Les spores ont été produites avec le protocole décrit dans l'article présenté en début de chapitre.

### III.2.2.3. Microscopie

Toutes les expérimentations en microscopie ont été réalisées à l'aide d'un microscope multiphotonique Nikon A1-MP équipé d'un objectif PLAN APO IR 60X immersion à eau (NA : 1,27 ; Nikon) et d'un laser infrarouge (IR) pulsé (Chameleon Ultra Ti : Sapphire Vision II, Coherent, Californie). La platine porte échantillon est équipée d'une chambre thermostatée avec contrôle de l'hygrométrie.

### III.2.2.4. Exposition au laser NIR pulsé et suivi de germination sous microscope

L'exposition IR des spores a été réalisée dans les mêmes conditions que décrites dans la partie 3.1.2. à 750 nm, avec différentes puissances laser et suivant différents temps d'exposition. Le champ optique irradié est de dimensions 72,46  $\mu\text{m}$  x 72,46  $\mu\text{m}$ . Des images grand champ en lumière blanche (transmission) sont réalisées juste après irradiation ( $t_0$ ) et au bout de 150 minutes ( $t_{150}$ ). Le taux de destruction des spores est alors défini comme le nombre de spores non germées au temps  $t_{150}$  par rapport au nombre de spores initial.

Pour suivre la germination des spores sous le microscope, un montage lame-gélose-lamelle a été réalisé comme décrit dans la partie 3.1.2. Le milieu LB-agar utilisé permet aux spores de germer et de reprendre leur développement. Le montage est maintenu à température (37°C) et hygrométrie constante dans la chambre thermostatée du microscope.

## Chapitre 3 – Résultats complémentaires

### *III.2.2.5. Mesure de l'autofluorescence des spores*

La mesure d'autofluorescence des spores a été réalisée sur le microscope Nikon A1-MP servant à l'irradiation. Le signal de fluorescence est enregistré sur trois canaux de détection. Les filtres utilisés en détection sont 400-492 nm, 500-550 nm et 563-588 nm. Les mesures d'intensité d'autofluorescence des spores se font sur la superposition du signal des 3 canaux de détections, avec le logiciel ImageJ. Une ROI (Region of Interest) de forme ovoïde, avec une aire d'environ  $1\mu\text{m}^2$ , est utilisée pour mesurer la fluorescence moyenne de chaque spore.

### *III.2.2.6. Enrichissement des spores de la souche FB122 en DPAP*

Les spores de la souche FB122 ont été enrichies selon le protocole mis au point dans le chapitre 1.

### *III.2.2.7. Mesure de viabilité par UFC*

Les tests de viabilité et de germination sont réalisés directement sous microscope comme décrit dans la partie 3.1.2.

## III.2.3. Résultats et discussion

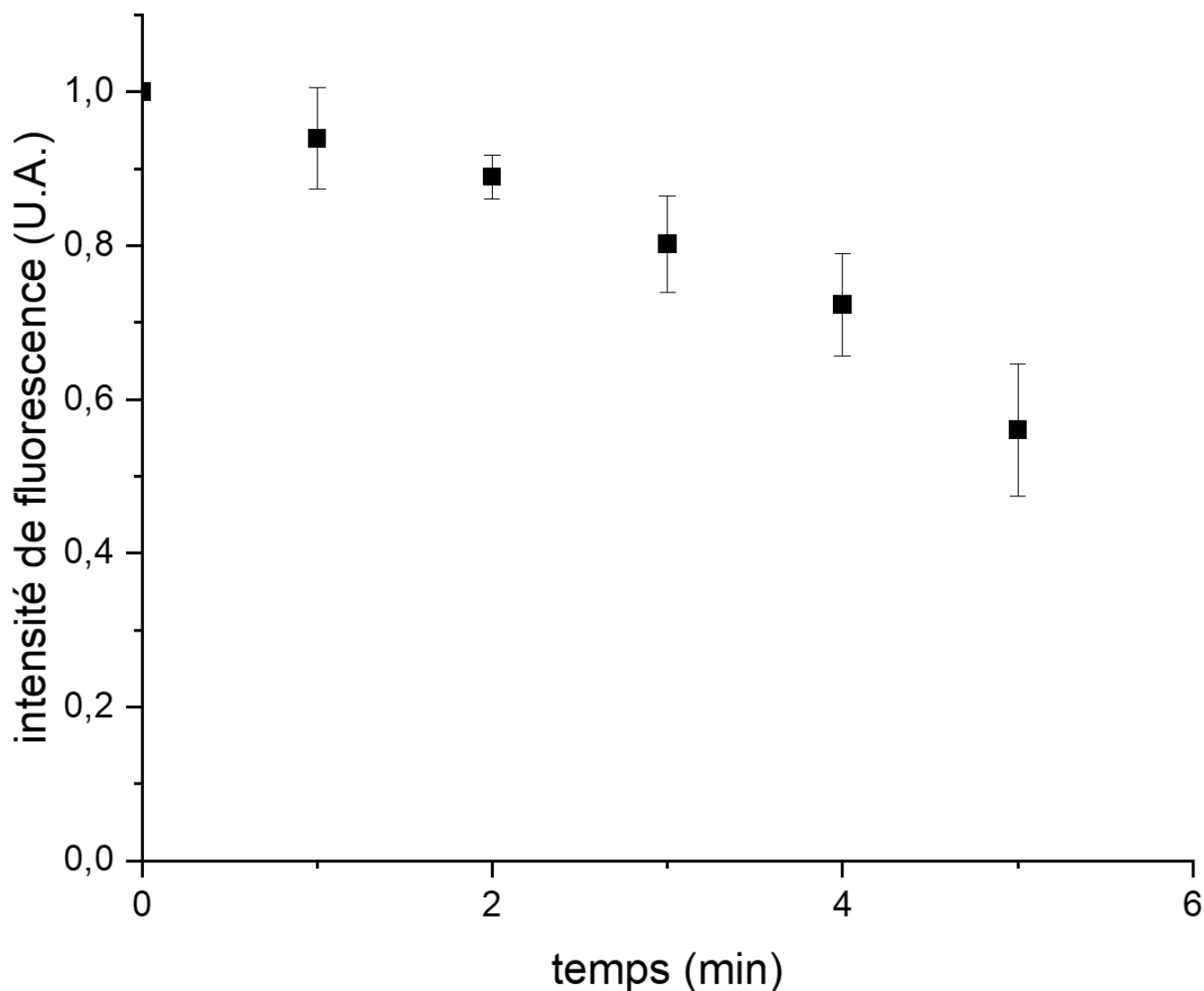
### *III.2.3.1. Effet de l'illumination NIR pulsée sur la fluorescence endogène des spores*

A l'exception de l'étude présentée dans la partie 3.1.2., les effets d'un laser NIR pulsé n'ont à notre connaissance jamais été étudiés sur les spores. Il est probable qu'une dégradation du manteau puisse survenir lors de l'exposition à ce type de rayonnement, comme c'est le cas lors de l'exposition à de la lumière blanche pulsée (Clair *et al.*, 2020). Les spores de *B. subtilis* sont naturellement autofluorescentes, cette fluorescence étant majoritairement due à des protéines du manteau. Le suivi de cette autofluorescence peut donc éventuellement nous apporter des informations relatives à la dégradation du manteau. Il est également possible que des photoproduits du DPA (DPAP), soient formés lors de cette exposition, étant donné que l'absorption multiphotonique du rayonnement laser IR pulsé apporte une énergie équivalente à celle de l'UVc. Dans les chapitres précédents, il a été montré que certains de ces photoproduits, générés par exposition UV, sont fluorescents. Leur création entraîne donc une augmentation globale de l'intensité de l'autofluorescence des spores, permettant de détecter leur présence si celle-ci est en quantité suffisante.



### Chapitre 3 – Résultats complémentaires

Pour essayer d'observer l'un ou l'autre de ces phénomènes, des spores PS533 (WT) ont été exposées à un laser pulsé à 750 nm, à une puissance de 5,49 mW, pendant 5 minutes. La figure 18 représente le suivi de l'autofluorescence de ces spores lors de leur exposition au laser NIR pulsé.



**Figure 18 :** Suivi de l'autofluorescence d'une dizaine de spores PS533 exposées à un rayonnement NIR pulsé à 750 nm de 5,49 mW, durant 5 min. La détection est réalisée sur une gamme spectrale entre 430 nm et 530 nm environ.

Après 5 min d'exposition, une diminution de la fluorescence est observée. La valeur d'autofluorescence initiale et la valeur obtenue à 5 min a été divisée par 1,8 environ. Il apparait donc que l'utilisation du laser NIR pulsé, dans les gammes de puissance utilisées pour l'imagerie multiphotonique, impacte les protéines fluorescentes du manteau de la spore. Il reste alors à déterminer si cet effet sur le manteau est facteur de létalité des spores ou non. Ce résultat

## Chapitre 3 – Résultats complémentaires

montre également que le laser IR pulsé à cette puissance ne génère que peu ou pas de DPAP fluorescents, dans ces conditions d'irradiation. Cependant il reste possible que des photoproduits fluorescents soient produits, mais en quantité non suffisante pour être détectée par rapport à l'autofluorescence du manteau. Il est également possible que des DPAP non fluorescents soient générés.

### *III.2.3.2. Nature de l'absorption multiphotonique des composés fluorescents endogènes de la spore*

Comme décrit dans la section 3.1. de l'état de l'art, les dégâts engendrés sur un organisme par une exposition aux UV dépendent de la longueur d'onde utilisée. L'UVc compris dans une gamme entre 100 et 280 nm agit principalement au niveau de l'ADN, et impacte le DPA dans le cas des spores bactérienne. La formation de lésions SP sur l'ADN des spores est la cause majoritaire de l'inactivation des spores. L'UVb compris entre 280 et 320 nm va également généré des dégâts directs sur l'ADN avec la formation de SP mais également de CPD. Finalement l'UVa compris entre 320 et 400 nm va générer principalement des dégâts photo-oxydatif causant des dégâts indirects sur l'ADN avec des lésions simples et doubles brins.

Il a donc été question dans un second temps d'identifier quel type d'absorption multiphotonique était induit par notre laser NIR pulsé sur les spores bactériennes. En effet, en fonction du type d'absorption qui a lieu, l'équivalent d'énergie reçu par la spore pourra se trouver dans des domaines de l'UV différents. Identifier le type d'absorption multiphotonique pourrait nous permettre de déduire le domaine d'UV équivalent à l'énergie perçue par la spore et ainsi d'avoir une meilleure idée des potentiels dégâts encourus par la spore. Pour les gammes de longueurs d'onde utilisées, une compétition entre une absorption 2 et 3 photons est possible (Nadiarnykh *et al.*, 2012). L'absorption à 2 photons est caractérisée par la relation  $Absorption \propto (intensité\ laser)^2$  alors que l'absorption à trois photons suit la relation  $Absorption \propto (intensité\ laser)^3$ . Néanmoins les chances qu'une absorption triphotonique se produisent est moins important qu'une absorption biphotonique. Pour identifier lequel de ces deux phénomènes est dominant pour le manteau ou le DPA, des spores ont été irradiées à 750 nm à différentes puissances. Cette longueur d'onde permet d'avoir une énergie entre l'UVa et le domaine du visible (375 nm), si l'absorption est à deux photons, ou l'UVc (250 nm) si l'absorption est à trois photons.

L'autofluorescence des spores observées précédemment en microscopie multiphotonique pourrait ainsi être un mélange de la fluorescence émise par le manteau et par des DPAP

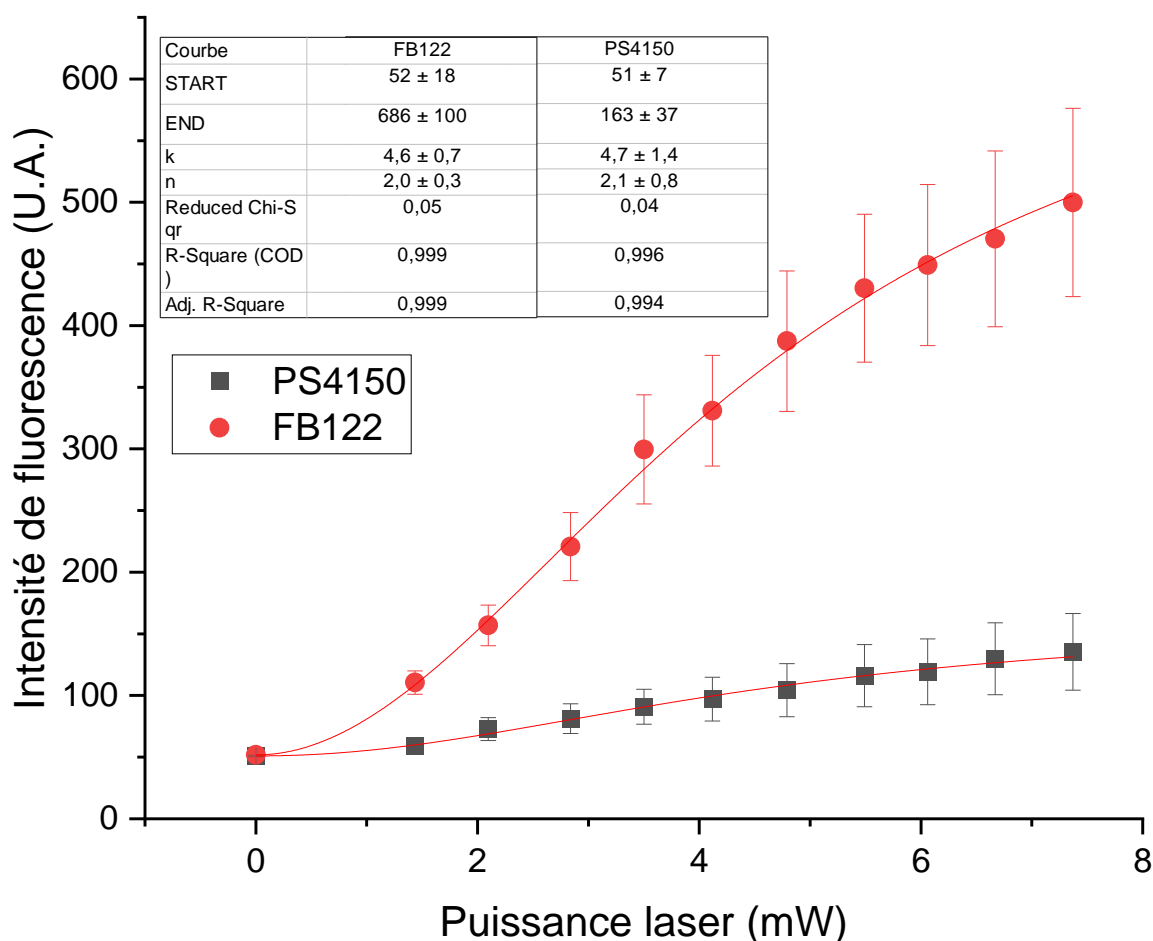
### Chapitre 3 – Résultats complémentaires

fluorescents formés pendant l'exposition au laser NIR pulsé. Pour tenter de distinguer les caractéristiques du signal de fluorescence émis par le manteau de celui des DPAP, ainsi que de déterminer lequel de ces deux signaux est le plus représenté lors d'une exposition des spores à une laser pulsé NIR, les souches PS4150 et FB122 ont été utilisées. La souche PS4150 ne possédant pas de manteau, le signal obtenu peut être attribué au CaDPA et aux potentiels DPAP. La souche FB122 ne possédant pas de DPA, le signal obtenu pourra être attribué quant à lui au manteau.

Les courbes d'intensités de fluorescences obtenues sur ces souches pour différentes puissances d'excitation sont illustrées figure 19. Elles montrent une augmentation de la fluorescence avec la puissance laser utilisée. Ces courbes ne suivent pas une dépendance purement quadratique ou cubique en fonction de la puissance d'excitation, du fait de l'apparition de phénomènes de saturation de l'émission de fluorescence. Le logiciel Origin permet d'en proposer un ajustement par la fonction « Hill 1 » dont l'équation est la suivante :

$$y = \frac{Start + (End - Start) \times x^n}{k^n + x^n}$$

Avec y la valeur de fluorescence, x la puissance laser. L'intérêt de cette fonction est que pour des valeurs de x suffisamment petites (faibles puissances laser), la formule se simplifie, ne laissant plus apparaître qu'une dépendance en  $x^n$ . Cela nous ramène ainsi à une expression pouvant caractériser l'émission de fluorescence suite à l'absorption multiphotonique, en l'absence de phénomène de saturation. Le facteur n permet de distinguer le cas d'une absorption à deux photons (n=2), d'une absorption à 3 photons (n=3).



**Figure 19 : Signal de fluorescence généré par excitation multiphotonique à 750 nm.** Les courbes expérimentales sont ajustées par la fonction Hill1. Les ronds rouges représentent les spores PS4150 et les carrés gris les spores FB122.

La figure 19 montre que pour la souche PS4150 (sans manteau mais avec du DPA) l'augmentation de la fluorescence est plus faible. L'ajustement donne un facteur n de 2 pour une excitation à 750 nm. Cela indique une absorption majoritairement biphotonique (vers 375 nm). Le CaDPA ayant une absorption vers 300 nm, cette absorption biphotonique ne semble pas due à cette molécule. D'autres composés présents dans les spores comme des protéines, voire le peu de manteau protéique restant sur cette souche pourraient être responsables de la faible augmentation de fluorescence observée. La même méthode a été appliquée pour la souche FB122 (souche sans DPA), montrant un facteur n également proche de 2. Cela semble indiquer qu'en présence des protéines fluorescentes du manteau, une excitation biphotonique semble se produire. L'autofluorescence des spores due au manteau est connue pour couvrir une large

## Chapitre 3 – Résultats complémentaires

bande d'excitation et d'émission, s'étend sur quasiment tout le domaine du visible. L'absorption biphotonique de photons à 750 nm apportant dans ce cas une énergie à la frontière du domaine du visible, pourrait générer l'autofluorescence du manteau. En conclusion, dans les spores sauvages PS533 qui ont été étudiées dans l'étude présentée dans la section 1.2. de ce chapitre, une absorption à deux photons est probablement responsable en majeure partie des dégâts engendrés. Ainsi, le CaDPA ne semble à priori pas être très impliqué dans le stress NIR pulsé à 750 nm.

### *III.2.3.3. Effets des photoproduits du DPA sur la résistance à une irradiation NIR pulsée*

En se basant sur les résultats du paragraphe précédent, le CaDPA ne semble pas être impacté par une exposition à un laser NIR pulsé. Or, il a été montré dans la section 1.3. du chapitre 1 que les DPAP peuvent impacter la résistance des spores face aux UVc. Pour conclure ce chapitre, une dernière étude a été menée sur l'effet des DPAP sur la résistance des spores au laser NIR pulsé. Pour ce faire, du DPA a été irradié *in vitro* aux UV pendant 30 min, pour créer des DPAP. Des spores FB122 ont ensuite été enrichies avec ces DPAP, puis exposées au laser NIR à 750 nm pendant 2 minutes, à différentes puissances. Des spores FB122 enrichies en DPA (non irradié UV) servaient de contrôle. Les taux de destruction obtenus sont représentés figure 20.

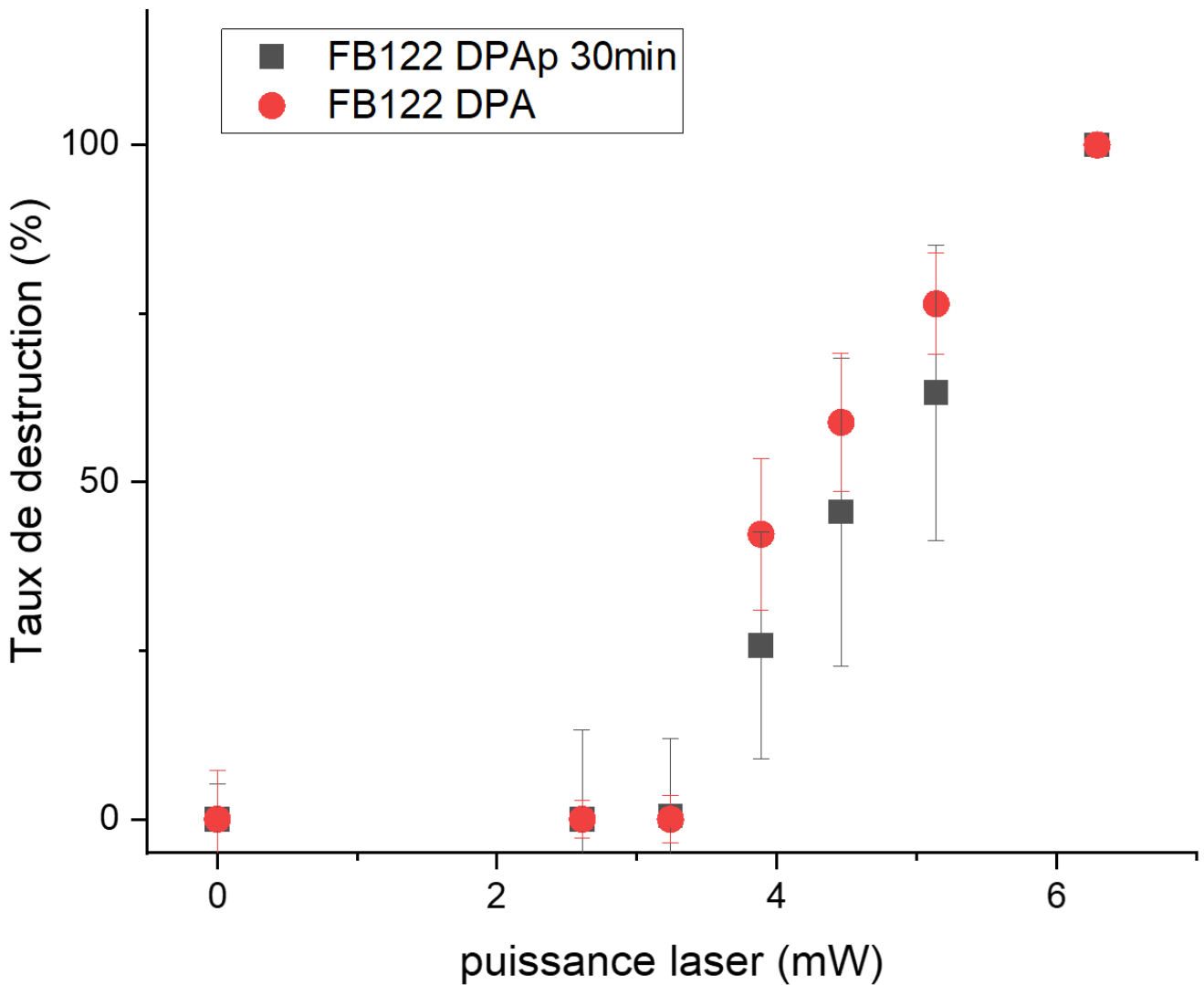


Figure 20 : Taux de destruction de spores FB122, enrichies en DPA ou en DPAP et soumises à un laser IR pulsé.

Les résultats obtenus ne permettent pas d'observer de différences entre les différentes conditions. Le taux de destruction de 100% est atteint pour 6 mW, pour les deux conditions. Cette expérimentation a permis de constater que les spores FB122 germent plus lentement sous le microscope que les spores PS533 (WT). Le taux de germination reste également plus faible que pour la souche sauvage. Cette observation montre que les DPAP ne semblent pas jouer un rôle majeur dans la résistance des spores face à une irradiation laser NIR pulsée.

### III.2.4. Conclusion sur les effets d'une irradiation laser NIR pulsée sur les spores de *B. subtilis*

L'utilisation d'un laser NIR pulsé, générant une absorption multiphotonique, devait à l'origine servir de voie d'irradiation similaire à une source UVc, du fait d'un apport énergétique équivalent. Une étude du stress engendré par ce type de laser a révélé que la létalité observée sur les spores était causée par des dégâts photochimiques. Cependant, ces dégâts semblent différents de ceux observés après une exposition des spores aux UVc. De plus, les spores ne semblent à peine plus résistantes à ce stress que des cellules végétatives (2 fois plus). Le CaDPA ne semblent pas être impacté par l'exposition à un laser NIR pulsé. En effet, l'exposition à un laser NIR pulsé semble ne pas engendrer la production de DPAP *in vivo* contrairement aux UVc. De plus, le manteau des spores semble être la structure la plus impactée, à travers un phénomène d'absorption majoritairement biphotonique. Ces résultats traduisent que la destruction engendrée sur les spores lors de l'exposition à ce type de laser semble subvenir par un stress différent de celui engendré par les UV. Le protocole d'irradiation par excitation multiphotonique n'est donc pas équivalent à une irradiation UV monophotonique. C'est à ce jour le seul stress physique qui affecte les spores avec autant d'efficacité que les cellules végétatives, qui sont pourtant connues pour être bien moins résistantes que leur forme de dormance. Cette propriété pourrait être due à la façon très focalisée d'apporter la perturbation photonique au centre de la spore.

Ces dernières années de plus en plus de travaux mettent en garde contre l'utilisation de lasers infrarouge continus ou pulsés. Ces lasers infrarouges utilisés dans des techniques de microscopie et de spectroscopie telles que le Raman ou le FTIR sont cependant à ce jour encore considérés comme très peu perturbateurs. Les résultats présentés dans ce chapitre 3 s'inscrivent dans la suite de ces études de mise en garde de l'utilisation à haute puissance de lasers infrarouge. Ils confirment en effet que ces lasers peuvent provoquer des effets délétères lors de leur utilisation. La démonstration que même les spores bactériennes, pourtant considérées comme une des formes de vie les plus résistantes sur Terre, puissent être significativement impactées lors de l'utilisation d'un tel laser dans des conditions d'imagerie biphotonique en est un bon exemple.

# Chapitre 4

**Mise au point d'un marquage pour  
l'imagerie super résolue  
(STORM/PALM) des structures de la  
spore bactérienne de *B. subtilis***



### IV.1. Introduction

A cause de sa petite taille d'environ 1  $\mu\text{m}$ , il est très difficile voire impossible d'observer en détail les structures de la spore avec des techniques de microscopie photonique classique. C'est pour cela que plusieurs études se sont tournées vers l'observation des structures de la spore à travers la microscopie électronique, qui offre une limite de résolution bien supérieure à celle de la microscopie optique. Néanmoins, la microscopie électronique a le désavantage de ne pas pouvoir réaliser d'observation *in vivo* car les échantillons doivent être fixés et observés sous vide. Plus facile d'accès et moins perturbatrice des structures observées, l'observation en microscopie photonique peut nous permettre de réaliser des observations *in vivo* des spores après traitements lumineux (UV ou NIR pulsé par exemple). L'observation de l'évolution des structures lors de la germination, ou des dégâts structurels causés par différents traitements, nécessite cependant l'accès à une meilleure résolution que celle offerte par la limite de diffraction.

Pour répondre à ce besoin d'une meilleure résolution pour l'observation des spores en imagerie photonique, il a été décidé de se tourner vers les techniques de microscopie photonique PALM et STORM. Ces techniques permettent de repousser la limite de résolution de la microscopie photonique à environ 80 à 20 nm. Le principe de ces techniques d'imagerie super résolue est décrit dans l'état de l'art à la **section 4.6.** Il n'existe à ce jour dans la littérature aucune image super résolue des structures de spores bactérienne utilisant la microscopie PALM/STORM. Cela est probablement en partie dû à la difficulté de marquage qu'impose ce modèle biologique. Quelques sondes externes sont compatibles avec le marquage de structure d'une spore bactérienne et il existe des mutants de spores de *B. subtilis* dont certaines protéines sont fusionnées à une GFP. Cependant, les images obtenues étant de résolution classique (limitée par diffraction), elles ne nous permettent pas de distinguer les structures internes de la spore l'une de l'autre. Cela nous donne néanmoins un aperçu de la faisabilité de marquage d'une protéine dans la spore et nous permet de repérer de bonnes molécules candidates pouvant servir de marqueur de structure. Les objectifs de l'étude présentée de ce chapitre ont ainsi été de s'inspirer de ce qui a déjà été réalisé dans la littérature pour I) mettre au point un marquage par sondes externes des structures de la spore, compatible avec la technique de microscopie STORM. II) créer des mutants exprimant la protéine fluorescente mEos2 compatible avec la technique de microscopie PALM. Comme il a été vu dans les deux chapitres précédents, une exposition des spores des *B. subtilis* aux UVc peut entraîner des dégâts photochimiques

impactant la structure et la germination des spores. La mise au point de tels marquages pourrait permettre de plus finement déterminer ces dégâts structurels.

### IV.2. Marquage pour l'imagerie STORM

La grande difficulté de ce projet réside dans le fait que les spores sont très imperméables aux marquages par des sondes externes. Malgré tout, des protocoles existent pour faire rentrer des sondes dans la spore, comme le marquage pendant la sporulation ou encore l'utilisation d'éthanol pour perméabiliser certaines structures. Etant donné que le projet vise à imager la structure de la spore, l'utilisation de protocole perméabilisant la spore ou autres perturbations n'a pas été retenue pour le marquage. De même, ajouter un stress, pour perméabiliser la cellule végétative afin que des marqueurs puissent rentrer dans la cellule et à terme marquer la spore en cours de formation n'est pas non plus souhaitable. En effet, stresser les cellules végétatives va également exercer une influence sur la sporulation, dont l'effet peut affecter le développement de certaines structures de la spore (Abhyankar *et al.*, 2016). Le marquage pendant sporulation par des sondes connues pour être absorbées par la cellule mère puis par la spore en formation a semblé le plus approprié. Une seconde difficulté est que la spore est également imperméable tampon chimique nécessaire au clignotement des sondes externes utilisées en STORM. Là encore une perméabilisation de la spore entraînerait une perturbation des structures à imager, et cela n'a pas été envisagé. Différentes sondes ont été testées pour voir si l'une d'entre elles pouvait fournir un marquage permettant l'observation en super résolution d'une structure de la spore, malgré une accessibilité du tampon de réaction très limitée.

#### IV.2.1. Matériel et méthode/Mise au point

##### IV.2.1.1. *Souches utilisées et conditions de culture*

Les souches PS533 (considérée comme souche sauvage) et PS4150 (sans manteau) ont été utilisées pour la mise au point d'un marquage pour la microscopie super résolue.

La sporulation a été réalisée selon le protocole décrit lors des chapitres précédents.

Les souches de *B. subtilis* ont été rendu compétentes en étant cultivées dans un milieu MD composé MN 1X (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,06 mg/L, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,1 mg/L, trisodium de citrate 0,01 mg/L), glucose 50%, L-tryptophane 5 mg/ml, citrate d'ammonium ferrique 2,2 mg/ml, glutamate K 40% et MgSO<sub>4</sub> 1M.

### IV.2.1.2. Sondes externes et mise au point du tampon utilisé

Plusieurs sondes externes ont été testées pour marquer différentes structures de la spore. La concanavoline et la WGA couplées à diverses molécules fluorescentes de la famille des Alexa (Molecular Probes) ont été utilisées pour marquer les peptidoglycanes du cortex des spores. La sonde Cy5-PE a quant à elle été utilisée pour marquer les lipides des membranes. Le tableau 2 résume les différentes sondes utilisées et leurs caractéristiques.

**Tableau 2 : Sondes utilisées et structures ciblées**

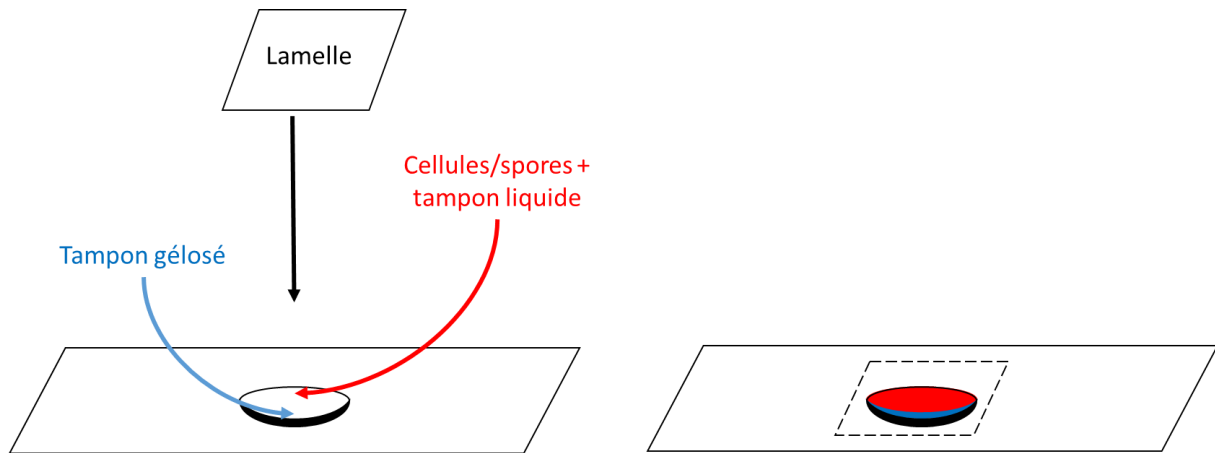
Sonde (concentration)	Longueurs d'onde excitation - émission en nm	Structure marquée
Concanavoline-Alexa 488 (1 $\mu$ M)	488 - 519	Cortex (peptidoglycanes)
Concanavoline-Alexa 594 (1 $\mu$ M)	594 - 617	Cortex (peptidoglycanes)
Concanavoline-Alexa 647 (1 $\mu$ M)	647 - 688	Cortex (peptidoglycanes)
WGA-Alexa 647 (1 $\mu$ M)	647 - 688	Cortex (peptidoglycanes)
Cy5-PE (1 $\mu$ M)	565 - 666	Membranes

La microscopie STORM nécessite un clignotement des molécules fluorescentes utilisées. Pour faire clignoter les sondes exogènes, un environnement aux propriétés d'oxydo-réduction contrôlées, fournies par une solution tampon, est nécessaire. Ce tampon est composé de catalase, qui joue le rôle d'antioxydant, de glucose agissant comme accepteur d'oxygène, d'une glucose oxydase qui greffe l'oxygène du milieu de réaction sur le glucose et d'une molécule avec un pouvoir réducteur. Deux molécules réductrices ont été testées pour optimiser la qualité et la durée de clignotement des sondes utilisées, la cystéamine (MEA) et le  $\beta$ -mercaptoéthanol. Suite à plusieurs essais sur des cellules végétatives, il s'est avéré que le MEA donne de meilleurs résultats que le  $\beta$ -mercaptoéthanol. Seul le MEA a donc été utilisé par la suite comme agent réducteur dans le tampon.

### IV.2.1.3. Mise au point du protocole d'immobilisation

L'acquisition d'une image en STORM pouvant durer plusieurs minutes, les cellules imagées doivent être parfaitement immobiles durant ce temps sous peine de fausser la reconstitution de l'image super résolue. Les spores, bien qu'incapables de se mouvoir par elles-mêmes, sont assez petites et légères pour être soumises au mouvement brownien du liquide dans lequel elles sont observées. La figure 21 montre le protocole d'immobilisation des spores mis en place. 45  $\mu$ l de tampon gélosé sont déposés au fond d'une lame à dépression d'une

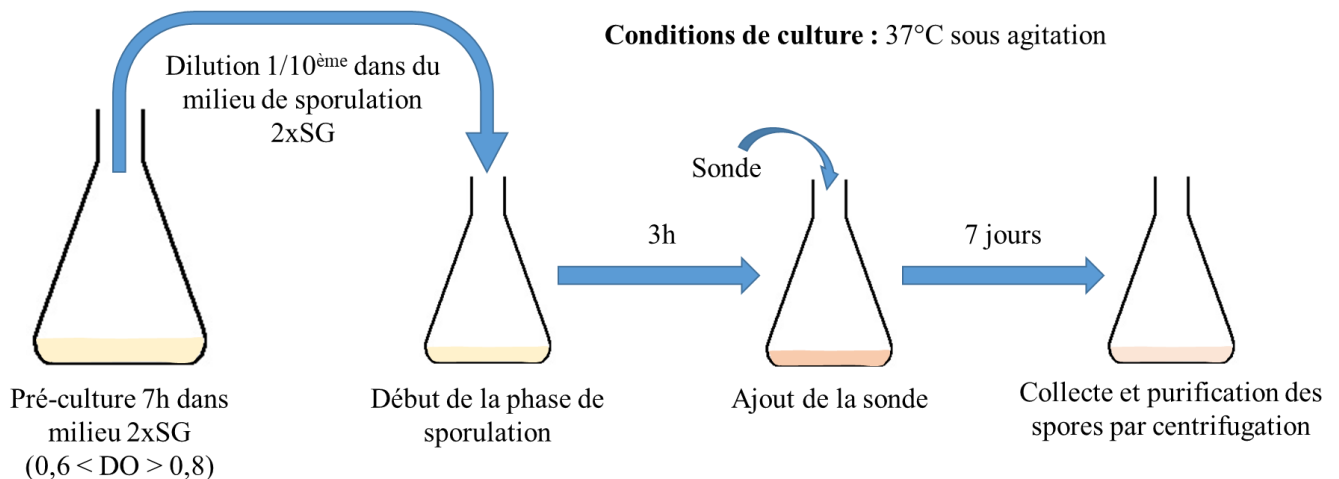
contenance d'environ 50  $\mu\text{l}$ . 5  $\mu\text{l}$  d'échantillon suspendus dans du tampon liquide sont ajoutés par-dessus, avant le dépôt d'une lamelle.



**Figure 21 : Protocole d'immobilisation sur lame à dépression**

### IV.2.1.4. Mise au point du protocole de marquage

Les spores bactériennes sont difficiles à marquer de par leur imperméabilité. Le marquage est effectué pendant la sporulation comme décrit dans la littérature (Pogliano *et al.*, 1999; Cowan *et al.*, 2004; Loison *et al.*, 2016). La figure 22 schématise le protocole de marquage pendant sporulation. Les sondes sont ajoutées 3 h après le début de la sporulation et la culture incubée dans le noir à 37°C durant 7 jours.



**Figure 22 : Protocole de marquage pendant la sporulation. Ce protocole permet de faire entrer des sondes fluorescentes au sein de la spore lors de sa formation.**

Le problème posé par cette méthode de marquage est que le protocole de sporulation classique met en œuvre un volume de sporulation de 100 ml. Cela nous fait utiliser une quantité très importante de sonde, qui est assez onéreuse. Il a donc été nécessaire de revoir ce protocole en

mettant au point un procédé de sporulation dans de plus petits volumes. Le problème posé par l'utilisation de petits volumes est la correcte oxygénation et agitation du milieu. Plusieurs tests ont été réalisés pour permettre de réduire au maximum le volume de sporulation, sans perturber ce processus. Les résultats de ces tests montrent que dans une fiole bafflée de 250 ml, un volume de 10 ml de culture agité à 300 rpm, les bacilles sont toujours capables de sporuler correctement. La vitesse de ce processus semble assez proche de la méthode de sporulation classique. Ainsi, un volume de sporulation de 10 ml a été utilisé pour la suite des marquages par des sondes fluorescentes externes.

### *IV.2.1.5. Imagerie super résolue*

Un microscope Nikon STORM V4 (Nikon, Japan) munis d'une caméra Hamamatsu Photonics ORCA-Flash 4.0 sCMOS (Nikon, Japan) ainsi que d'un objectif Apo TIRF 100x, NA 1.49 à immersion à huile (Nikon, Japan) a été utilisé pour acquérir les images. Cet équipement est également doté d'un système d'auto-focus (Perfect Focus System) permettant de maintenir le focus sur l'échantillon pendant toute la durée de l'expérience. Une base laser fournit les longueurs d'ondes 405 nm, 488 nm, 561 nm, 647 nm.

### IV.2.2 Résultats & discussion

Après avoir mis au point les protocoles de marquage et d'immobilisation présentés dans la section matériel et méthode, les spores marquées ont été imagées. Les méthodes de marquage et d'immobilisation semblent fonctionner correctement. Une fluorescence due aux sondes insérées dans les spores lors de la sporulation est observée pour toutes les sondes testées. Cependant aucune image super résolue exploitable n'a pu être obtenue avec ces méthodes. En effet, bien que la fluorescence des sondes soit observée, celles-ci ont beaucoup de mal à clignoter et se photo dégradent rapidement. Or la propriété de clignotement est essentielle pour la reconstruction d'images super résolues, comme expliqué dans l'introduction de ce chapitre. Le fait que les sondes, bien que présentes dans la spore, ne clignent pas est probablement dû à l'imperméabilité des couches de la spore à la solution tampon. La technique STORM ne semble ainsi pas être adaptée à l'observation de spores intègres à cause de l'inaccessibilité des sondes au tampon de réaction. Une solution à ce problème aurait pu être de perméabiliser et fixer les spores mais cela n'a pas été retenue dans le cadre de l'étude censée être menée *in vivo*.

### IV.3. Marquage pour la microscopie PALM

Les travaux réalisés par Ghosh *et al.*, 2018 et Masayama *et al.*, 2006 ont permis d'imager respectivement les spores de *B. cereus* et *B. subtilis* par marquage des protéines GerPa pour *B. cereus* et SleB pour *B. subtilis*, par fusion traductionnelle à la GFP. GerPa est une protéine localisée dans la couche interne du manteau et des théories ont été établies sur une potentielle organisation de cette protéine en une sorte de coque « Shell-like structure » autour de la spore (Ghosh, 2017). GerPa est également impliquée dans l'imperméabilité du manteau et des spores mutantes délétées de cette protéine montrent une absence de CaDPA dans leur protoplaste. Toutes ces raisons ont motivé le choix de cette protéine pour réaliser un marquage avec une protéine compatible avec la microscopie PALM. La deuxième protéine d'intérêt est la protéine SleB, localisée également dans la couche interne du manteau mais aussi au niveau de la membrane interne de la spore. La double localisation de SleB est intéressante car elle pourrait nous permettre de visualiser plusieurs structures simultanément. Les images issues de la littérature, obtenues par marquage de ces deux protéines à l'aide de la GFP, laissent à penser que ces deux protéines peuvent être des marqueurs des structures intéressantes de la spore. Ainsi, il a été décidé de construire deux souches mutantes produisant des protéines GerPa et SleB fusionnées avec la protéine fluorescente photo convertible mEos2, compatible avec la technique PALM. La mEos2 est une protéine multimérique de 25,8 kDa déjà utilisé dans plusieurs études pour obtenir un marquage compatible avec la technique PALM (McKinney *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2011; Andreas Gahlmann and W. E. Moerner, 2014; Richert *et al.*, 2014; Menzorov *et al.*, 2019). Cette protéine est photoconvertible, c'est-à-dire qu'elle possède un premier couple excitation/émission de 506/519 nm (émission d'une fluorescence verte) pouvant être convertie par une excitation avec un laser à 405 nm vers une émission d'une fluorescence rouge avec un couple 573/584 nm.

#### IV.3.1. Matériel et méthodes

##### IV.3.1.1. *Souches utilisées*

La souche GM2163 de *Escherichia coli* (*F* *dam-13::Tn 9 dcm-6 hsdR2 leuB6 his-4 thi-1 ara-14 lacY1 galK2 galT22 xyl-5 mtl-1 rpsL136 tonA31 tsx-78 supE44* McrA<sup>-</sup> McrB) dérivée de *E. coli* K12 a été utilisée pour la construction des vecteurs recombinants. Les souches PS533 (considéré comme type sauvage avec une résistance à la kanamycine) et PS4150  $\Delta$ gerE::spc,  $\Delta$ cotE::tet (sans manteau protéique) de *B. subtilis* ont été transformées avec les plasmides pSleB

ou pGerPa dans lesquels la protéine SleB ou la protéine GerPa ont été fusionnées à la protéine fluorescente photo convertible mEos2.

### IV.3.1.2. Amorces et vecteurs utilisés

Pour ce projet, plusieurs amorces ont dû être dessinées et commandées à l'entreprise Eurofins Genomics (Eurofins, France) pour amplifier par PCR les gènes *gerPA* et *sleB* ainsi que les gènes codant la protéine fluorescente *mEos2*. Les amorces utilisées sont listées dans le tableau 3 et permettent d'ajouter aux extrémités des séquences amplifiées des sites de restriction nécessaires pour le clonage.

**Tableau 3 : Liste et séquences de amorces utilisées pour la construction des mutants.** Les séquences correspondant aux sites de restriction ajoutés sont soulignées

Nom de l'amorce	Séquence de l'amorce 5'-3'
GerPa-F1	CGGGATCCAATCATTTTCTATAACAATTAGAATA
GerPa-R1	CCATGGTGAGACCACCCGCATTGGCCACGATCG
SleB-F1	CGGGATCCATGTTTGCAATCATCTCTGCAG
SleB-R1	CCATGGTGAGACCACCGACATATTCACGATAGTATTTTG
mEos2-F1	GGTGGTCTCACCATGGCTGCCATTAAACCTGACATG
GusAterm	CCCGTCGACCATTAGTCTCGGACATTCTGCTTATCGCCTAGCATTATCTGG

Le gène *mEos2* est issu du vecteur pSIPSYNmEos2 (banque plasmide UMR PAM) construit par amplification de *mEoS2* à partir du plasmide pFA6a-link-yomEos2-kan (Plasmid#44944, Addgene) et clonage dans le vecteur pSIPSYN (Darsonval *et al.*, 2018).

Les gènes *gerPa* et *sleB* fusionnés au gène *mEos2* ont été insérés dans le vecteur navette pHT315 (Arantes and Lereclus, 1991). Ce vecteur navette *E. coli-Bacillus subtilis* porte un site de clonage multiple au niveau du gène *LacZ* ce qui permet de sélectionner les clones sur milieu additionné de Xgal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside), les clones recombinants présentant une coloration bleue. Ce plasmide multicopie contient également deux cassettes de résistance, une conférant la résistance à l'ampicilline chez *E. coli* et l'autre conférant une résistance à l'érythromycine chez *E. coli* et *B. subtilis*.

### IV.3.1.3. Construction des vecteurs portant les fusions *SleB-mEos2* et *GerPa-mEos2*

Les gènes *sleB* et *gerPa* ont été amplifiés par PCR à partir d'ADN génomique de *B. subtilis* extrait par lyse à la protéinase K d'une colonie bactérienne. Les couples d'amorces SleB-F1/SleB-R1 et GerPa-F1/GerPa-R1 permettent respectivement d'amplifier les gènes *sleB* et *gerPa* créant un site *BamHI* à l'extrémité 5', et un site *NcoI* à l'extrémité 3' des produits d'amplification. Après une étape de vérification sur gel d'agarose, les fragments sont purifiés (Macherey-Nalgel, NucleoSpin Gel and PCR Clean-up kit) puis digérés par *NcoI*.

Le gène codant la protéine mEos2 a été obtenu par amplification PCR à partir du plasmide pSIPSYNmEos2 (banque plasmide UMR PAM) à l'aide des amorces mEos2-F1 et gusAterm. De la même manière des sites de restrictions, *NcoI* et *SallI*, flanquent le fragment amplifié respectivement aux extrémités 5' et 3'. Après vérification de l'amplification, le fragment est purifié puis digéré par les enzymes *NcoI*.

Les fragments de restriction des séquences des gènes *sleB* et *gerPa* ainsi que le produit de restriction du fragment *mEos2* ont été utilisés comme matrice pour amplifier par PCR les fusions *sleb-mEos2* et *gerPa-mEos2* à l'aide des couples d'amorces SleB-F1/GusAterm et GerPa-F1/GusAterm respectivement. Après vérification de l'amplification, et purification des fragments, une nouvelle restriction par les enzymes *BamHI* et *SallI* est réalisée. Ces deux produits de restriction ont été insérés à l'aide d'une ligase dans le plasmide pHT315.

Les produits de ligation du vecteur pHT315 et des gènes fusionnés ont été introduits dans la souche GM2163 de *E. coli* par électroporation. La souche transformée a été mise en culture sur milieu gélosé LB (Lysogenic Broth) additionné d'ampicilline (100 µg/ml) et de Xgal (2 mg/ml) à 37°C pendant 12h. Les colonies blanches ont été sélectionnées et mises en culture en milieu LB liquide additionné d'ampicilline (100 µg/ml) dans le but d'amplifier les plasmides recombinants. Après extraction des vecteurs à l'aide d'un kit (Macherey-Nalgel NucleoSpin® Plasmid kit), les plasmides recombinants sont vérifiés par restriction puis les fragments insérés ont été séquencés (Genewiz, Germany) afin de s'assurer de l'absence de mutations.

### IV.3.1.4. Construction des souches recombinantes de *E. coli* et *B. subtilis*

L'insertion des fragments *gerPa-mEos2* et *sleB-mEos2* dans le vecteur pHT315 a donné lieu aux deux vecteurs recombinants appelés pGerPa et pSleB. Ces plasmides ont été transférés dans les souches PS533 et PS4150 de *B. subtilis*. Pour cela les deux souches ont été rendues compétentes (c'est-à-dire capable d'intégrer de l'ADN de leur environnement) en les cultivant



dans un milieu MD pendant 4h à 37°C. Les cellules sont ensuite récoltées dans le surnageant après une centrifugation de 10 min à 5000 g. 1 µl de plasmides (1 µg/ml de cellules avec une solution mère de plasmide à 100 µg/ml) ont ensuite été mis en contact avec 300 µl de souches compétentes pendant 30 min à 37°C. 100 µl de milieu LB sont ajoutés, suivis d'une incubation de 45 min à 37°C. Les cellules transformées sont étalées sur milieu sélectif LB agar avec 25 µg/ml d'erythromycine 15h à 37°C. Les colonies sélectionnées ont été conservées en cryotubes à -80°C avec 50% de glycérol.

### *IV.3.1.5. Imagerie super résolue*

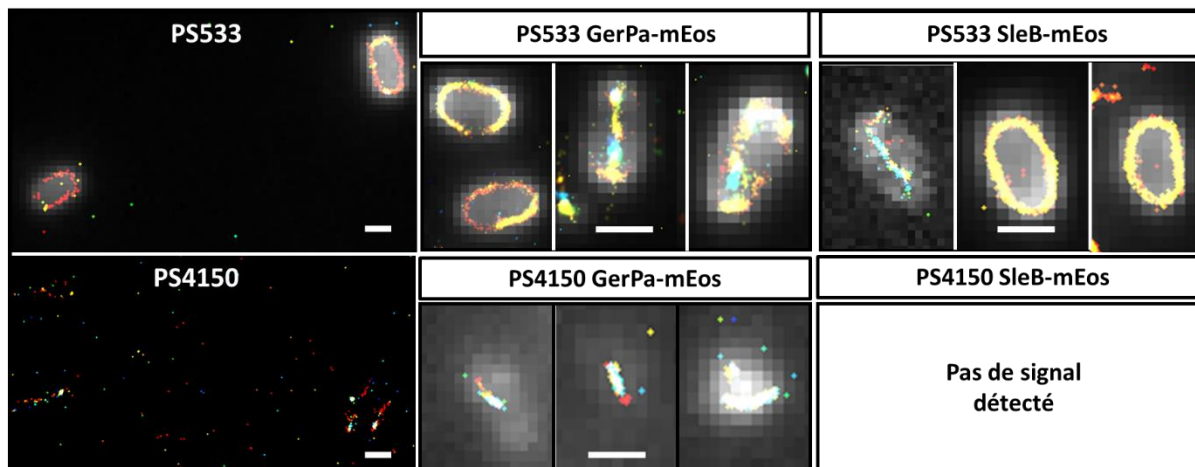
Un microscope Nikon STORM V4 (Nikon, Japan) munis d'une caméra Hamamatsu Photonics ORCA-Flash 4.0 sCMOS (Nikon, Japan) ainsi que d'un objectif Apo TIRF 100x, NA 1.49 à immersion à huile (Nikon, Japan) a été utilisé pour acquérir les images. Cet équipement est également doté d'un système d'auto focus (Perfect Focus System) permettant de maintenir le focus sur l'échantillon pendant toute la durée de l'expérience. Une base laser fourni les longueurs d'ondes 405 nm, 488 nm, 561 nm, 647 nm.

### IV.3.2 Résultats & discussion

#### *IV.3.2.1. Observations des structures de la spore*

La spore bactérienne présente une autofluorescence dans une large gamme du domaine du visible. Cette autofluorescence est en majeure partie due à certaines protéines de son manteau. Ainsi, même si les gènes recombinants sont correctement exprimés dans la souche PS533, l'autofluorescence du manteau de la spore peut masquer la fluorescence portée par la protéine mEos2 d'autant plus si l'expression hétérologue est insuffisante. C'est pour cette raison que les vecteurs recombinants ont également été transférés dans la souche PS4150 qui présente peu d'autofluorescence du fait de l'absence de la plupart des protéines du manteau. L'inconvénient de cette souche est que du fait de l'absence de protéines du manteau, la localisation des protéiques GerPa et SleB, qui se trouvent normalement dans la couche interne du manteau, pourrait être impactée. La figure 23 montre les images acquises en microscopie PALM des quatre mutants : PS533 GerPa-mEos2 ; PS533 SleB-mEos2 ; PS4150 GerPa-mEos2

et PS4150 SleB-mEos2 ainsi que des témoins PS533 et PS4150 non mutés qui n'expriment pas la protéine mEos2.



**Figure 23 : Images de spores reconstruites grâce à la technique PALM obtenues à partir des souches recombinantes de *B. subtilis* portant les fusions protéiques.** Les spores de la souche PS533 (photos du haut) et de la souche PS4150 (en bas) portant la fusion *gerPa-mEos2* ou *sleB-mEos2* (à droite) sont comparées aux spores de la souche parentale (à gauche). Chaque barre d'échelle correspond à 1  $\mu$ m.

Après analyse de plusieurs spores de chaque souche, il est apparu que l'autofluorescence du manteau, lorsque celui-ci est présent, était beaucoup trop importante pour permettre d'imager les structures marquées par la protéine mEos2 (figure 23, haut). En effet, dans la majorité des cas aucune différence visible entre le témoin PS533 et les souches PS533 pour lesquelles SleB ou GerPa sont fusionnées avec mEos2 n'a pu être observée. Quelques spores exhibent néanmoins un marquage formant une ligne avec des amas au milieu de la spore. Il est cependant difficile de déterminer si ce marquage provient ou non de mEos2 à cause de l'autofluorescence du manteau, qui contribue majoritairement au signal perçu. Ce marquage est plus probablement dû à l'autofluorescence et/ou à des spores ne se trouvant pas dans le plan focal de l'objectif.

Pour les spores mutantes sans manteau, un marquage différent est observé entre le témoin PS4150 et les souches PS4150-GerPa-mEos2 (Figure 23). Ce marquage semble se concentrer en amas au centre des spores. Ces amas pourraient être dus à une mauvaise localisation des protéines fusionnées avec mEos2. En effet, Zhang *et al.* 2012 (Zhang *et al.*, 2012) mettent en garde sur l'utilisation de la mEos2 qui en cas de surexpression peut former des agrégats dans la cellule. Le vecteur pHT315 étant un vecteur multicopie, la surexpression des protéines fusionnées avec mEos2 pourrait donner lieu à la formation d'agrégats ainsi qu'une mauvaise localisation de la protéine associées au manteau. GerPa est une protéine synthétisée lors de la phase de sporulation par la cellule mère, qui va directement se fixer sur le manteau

sporale en cours de formation. C'est une protéine charnière de la bonne structuration du manteau lors de la sporulation. Le marquage « en amas » observé pour les mutants PS4150-GerPa-mEos2 mais aussi chez certaines spores des mutants PS533-GerPa-mEos2 pourrait être lié à une agrégation de mEos2. Il a par ailleurs été montré que GerPa semble être le point d'accroche de plusieurs autres protéines GerP nécessaires à la bonne structuration du manteau. Le marquage en amas au centre des PS533-GerPa-mEos2 pourrait ainsi provenir du fait que le manteau n'arrive pas à se structurer correctement dans ce mutant. Enfin, la faible fluorescence observée sur les mutants PS4150-GerPa-mEos2 pourrait tout simplement être due à l'absence de manteau dans ce mutant, conduisant à l'impossibilité pour GerPa de se fixer à son emplacement physiologique. En effet, nous ne savons pas encore précisément où se localise GerPa dans la couche interne du manteau. De ce fait, il se peut que les quelques protéines résiduelles du manteau arrivant encore à former une structure au-dessus de la membrane externe des souches PS4150 ne comprennent pas de GerPa.

Aucun marquage n'a été détecté sur les spores de la souche PS4150-SleB-mEos2. Les mutants étant créés avec un vecteur multicopie censé augmenter le nombre de répliques des protéines de fusion, SleB devrait probablement être présente en assez grande quantité pour être détectée. L'absence de signal de fluorescence de protéine fusion SleB-mEos2 laisse supposer qu'elle n'est peut-être pas synthétisée correctement du fait de la structure multimérique de mEos2.

### IV.4. Conclusion

Bien que l'objectif principal qui était d'obtenir des images super résolues *in vivo* de différentes structures de la spore n'ait pas été atteint, cette étude a permis de développer plusieurs protocoles d'observation des spores en microscopie. Le protocole d'immobilisation sur lame à dépression pour la microscopie STORM a par exemple pu être utilisé par d'autres membres de l'équipe travaillant sur des cellules végétatives. Quatre souches mutantes avec des protéines d'intérêt fusionnées à la protéine mEos2 ont pu être construites. Cependant, bien que la construction génétique de ces mutants soit *à priori* valide, la synthèse des protéines fusionnées avec mEos2 ne semble pas effective, ce qui ne permet pas l'acquisition d'image super. Pour tenter de résoudre ce problème, une autre protéine fluorescente pourrait être testée. La protéine mEosEM, est un candidat potentiel. Dérivé de mEos2, cette protéine a été conçue pour être plus stable et pour fonctionner sous forme de monomère, et non de multimère comme mEos2. L'utilisation de cette nouvelle protéine pourrait permettre d'éviter la formation d'agrégats et de faciliter la localisation des protéines fusionnées. De plus, la littérature rapporte que mEoSEM possède une plus forte intensité de fluorescence que mEos2. La mise au point de souches recombinantes portant des fusions avec mEosEM ouvre la perspective de pouvoir peut être étudier les hypothèses évoquées précédemment quant à la localisation, la formation et l'encombrement stérique des protéines fusions GerPa-mEos2 et SleB-mEos2 dans les spores de *B subtilis*.



# **Conclusion générale et perspectives**

## Conclusion générale – Apports du projet

### V.1. Résumé des apports du projet

L'objectif de ce projet de thèse a été d'étudier la spore bactérienne de *B. subtilis* afin de mieux comprendre sa résistance aux UV. Ce projet a ainsi été divisé en deux parties menées en parallèle.

#### V.1.1. Première partie : Photochimie du CaDPA/DPA

Cette première partie, composée des deux premiers chapitres de ce manuscrit, est centrée sur la photochimie du DPA et du CaDPA. Elle consiste en l'étude de leurs photoproduits, afin de mieux comprendre le rôle de ces molécules dans la résistance des spores face aux UV. Le premier chapitre a ainsi permis de mieux caractériser les photoproduits du DPA et du CaDPA ainsi que leurs effets biologiques. Ce chapitre décrit une méthode pour suivre l'évolution de la formation de ces photoproduits, qui a été développée en collaboration avec M. Pacheco, alors doctorant au laboratoire. Cette méthode, basée sur le suivi de l'intensité de fluorescence et du temps de vie de fluorescence des photoproduits, a ensuite été appliquée *in vivo* directement sur des spores. Les résultats montrent que cette méthode permet de suivre la formation de CaDPAP fluorescents *in vivo*, tout en gardant intègre la structure des spores. Cela nous a permis d'observer que les temps de vie de fluorescence des photoproduits formés *in vitro* et *in vivo* s'avèrent très proches. Ces résultats ont été publiés dans le journal « spectrochimica acta » sous forme d'un article co-écrit avec M. Pacheco, qui a quant à lui identifié une dizaine de photoproduits du DPA en spectrométrie de masse. Ces photoproduits nouvellement identifiés révèlent pour la plupart une structure avec un noyau bi-pyridine, probablement à l'origine de l'augmentation de la fluorescence observée après exposition du DPA aux UV.

L'étude présentée dans la suite de ce chapitre s'est quant à elle focalisée sur l'identification de potentiels effets biologiques des DPAP sur les spores. Pour ce faire, un protocole de supplémentation des spores en photoproduits du DPA a été mis au point. Ce protocole permet de découpler l'exposition des spores aux UV des effets de la présence de DPAP. Les spores contenant des DPAP à la suite de cette supplémentation se sont avérées toujours viables et l'effet des DPAP sur les spores a ainsi pu être observé. Les DPAP contenus dans ces spores semblent ainsi faciliter la germination, influencer la croissance des cellules végétatives et augmenter la résistance aux UVc des spores. C'est la première fois que des effets bénéfiques des DPAP sont observés. Ces résultats ont fait l'objet d'une seconde publication dans le « journal of photobiology and photochemistry : B » au cours du projet de thèse.

## Conclusion générale – Apports du projet

Des résultats complémentaires ont également montré que l'hydratation peut exercer une influence importante sur la photochimie du DPA. Il semble en effet que, *in vitro*, certains DPAP ne soient pas formés lorsque le DPA est irradié dans un environnement sec, tel que le DPAP1, identifié dans une précédente étude comme photosensibilisateur.

Le second chapitre de ce manuscrit s'est focalisé sur le lien entre hydratation et photochimie du CaDPA. A travers l'utilisation des trois méthodes spectroscopiques Raman, FTIR et O-PTIR, il a été montré que les DPAP et les CaDPAP ne semblent pas très différents chimiquement. Ce résultat est important pour la comparaison des études réalisées *in vitro* sur des DPA à celle réalisée *in vivo* sur le CaDPA des spores. Une troisième publication actuellement soumise au « journal of photochemistry and photobiology A : chemistry » présente une étude approfondie de l'influence de l'hydratation lors d'une exposition du CaDPA aux UVc et aux UVb. Les spectroscopes Raman, FTIR et O-PTIR montrent en effet des différences dans la photochimie du CaDPA, lorsqu'il est exposé aux UVb et aux UVc. Le résultat le plus intéressant est le fait que l'influence de l'hydratation sur la photochimie du CaDPA semble également visible à travers ces méthodes. L'état d'hydratation semble influencer le CaDPA lors d'une exposition UVc mais également lors d'une exposition aux UVb. Par ailleurs, les spectres Raman, FTIR et O-PTIR du DPAP1, photoproduit caractérisé par une précédente étude comme photosensibilisateur, ont été obtenus. Les bandes caractéristiques de cette molécule n'ont cependant pas été retrouvés sur les spectres du CaDPA exposé aux UVc. Les techniques spectroscopiques utilisées étant basées sur la reconnaissance des modes de vibration des liaisons covalentes entre atomes, elles ne sont peut-être pas suffisamment précises et résolues pour distinguer des faibles formations de CaDPAP. Néanmoins, des résultats complémentaires menés sur trois souches de spores de *B. subtilis* montrent que l'utilisation de l'O-PTIR pourrait être plus intéressante *in vivo* qu'*in vitro*. Cette technique, n'a *a priori* jamais été utilisée à ce jour sur les spores bactériennes, semble permettre de visualiser des bandes correspondant à certaines protéines du manteau des spores, jusqu' alors non visibles avec la spectroscopie Raman et le FTIR. Le manteau étant connu pour être impacté par une exposition aux UVc, cette technique pourrait se révéler utile pour visualiser l'effet de ces radiations sur cette structure de la spore.

En résumé, ce deuxième chapitre a permis d'investiguer plus en détails le lien entre photochimie du CaDPA et l'état d'hydratation. Ces travaux ont permis de préparer le cadre d'une future étude *in vivo* sur des spores exposées aux UVc, dont les résultats sont en cours d'analyse.



## Conclusion générale – Apports du projet

### V.1.2. Deuxième partie : Observation en microscopie photonique de la spore soumise à un stress lumineux

La seconde partie de ce projet de thèse est présentée dans les chapitres trois et quatre. Elle visait à observer les impacts d'un stress lumineux comme les UV sur les différentes structures de la spore. Dans un premier temps, un protocole a été mis au point pour engendrer un stress équivalent à une exposition UV directement sous microscope, en utilisant une absorption multiphotonique. Dans un deuxième temps, l'objectif était d'observer en microscopie, l'impact de cette exposition sur différentes structures de la spore. Cependant, l'absorption multiphotonique ne semble pas agir sur la spore de la même manière qu'une exposition aux UV, malgré un apport d'énergie similaire. Une investigation plus détaillée de ce stress lumineux a été menée pour mieux caractériser ce phénomène et comprendre comment les spores sont inactivées par cette exposition à un laser pulsé infrarouge. En particulier, il semble que le CaDPA ne soit pas impliqué dans la résistance à ce stress, contrairement aux UV. C'est le manteau protéique qui semble quant à lui atteint par l'exposition à ce type de laser. L'ensemble de ces résultats sont regroupés dans le chapitre 3 de ce manuscrit.

Ces résultats montrent que les spores bactériennes, pourtant considérées comme une des formes de vie les plus résistantes sur Terre, peuvent être significativement impactées lors de leur exposition à ce type de laser pourtant très utilisé en imagerie biphotonique sur différents types d'échantillons biologiques. La résistance spécifique des spores est dans ce cas à peine deux fois supérieure aux cellules végétatives. Cette différence de résistance entre cellules végétatives et spores est très faible par rapport aux autres résistances telles que la température, la pression ou encore la résistance aux UVc. Ces travaux publiés dans « Journal of Photobiology and Photochemistry : B » s'inscrivent donc dans la lignée de précédentes études mettant en garde sur les effets délétères de l'utilisation des lasers pulsés infrarouge dans l'imagerie, pourtant encore largement considérés comme peu destructeurs.

Le chapitre 4 expose quant à lui la mise au point d'un marquage des structures de la spore compatible avec les techniques d'imagerie super résolue PALM/STORM. Malgré de nombreux essais, le résultat s'est avéré peu concluant, surtout pour le marquage avec des sondes externes utilisables en STORM, mais reste néanmoins encourageant en ce qui concerne la mise au point de sondes génétiques compatibles avec la technique PALM. Un premier lot de 4 mutants a pu être créé et la méthode de transformation est désormais au point. La suite de ces travaux vise à utiliser une protéine de nouvelle génération mEosEM, qui permettra de s'affranchir des problèmes rencontrés jusqu'ici concernant l'agrégation des mEos2 synthétisés.

L'obtention de ces mutants devrait permettre d'obtenir les premières images des structures des spores *in vivo*. La technique PALM pourrait ainsi servir à l'étude des dégâts engendrés par l'exposition de spores à un laser pulsé infrarouge, ou par une exposition aux UV, comme cela était initialement prévu.

### V.2. Questions annexes et perspectives d'études

Les résultats de ce projet ont pu d'une part amener de nouveaux éléments de réponse concernant le rôle du CaDPA dans la résistance des spores aux UVc. D'autre part, ces résultats soulèvent également quelques questions. L'une des questions que soulèvent ce projet concerne l'impact de l'UV solaire trouvé dans l'environnement sur la photochimie du CaDPA. Dans le chapitre 1 il a été montré qu'à la suite d'une irradiation UVb, l'intensité et le temps de vie de fluorescence des spores augmentent, traduisant la formation de photoproduits. Dans le chapitre 2 il a été montré que l'empreinte spectrale du CaDPA exposé aux UVb est légèrement différente de celle du CaDPA exposé aux UVc. De plus, l'hydratation semble moins influencer la photochimie du CaDPA exposé aux UVb que lorsqu'il est exposé aux UVc. Ces différences pourraient traduire une différence de photochimie. Les photoproduits créés lors d'une exposition UVb sont-ils très différents de ceux produits en UVc ? Des études ont déjà montré que le CaDPA est impliqué dans la résistance des spores aux UVb. Identifier les photoproduits du CaDPA exposé aux UVb par spectrométrie de masse pourrait se révéler intéressant et rapprocher cette étude des conditions trouvées dans l'environnement avec les radiations solaires composées d'UVb et surtout d'UVa.

Dans la suite de cette première question, on peut également s'interroger sur la représentativité des études faites en laboratoire par rapport à ce qui se passe réellement dans l'environnement. C'est une question bien connue des cliniciens qui observent des comportements différents de certains pathogènes entre les études menées sur des souches reproduites en laboratoire depuis des années et celles menées sur des souches cliniques issues directement des patients (Fux *et al.*, 2005). Or, dans le cas de la spore bactérienne il est bien documenté que changer les conditions de la sporulation a pour conséquence de modifier les structures et les résistances de la spore (Carlin, 2011; Nguyen Thi Minh *et al.*, 2011; Bressuire-Isoard, Broussolle and Carlin, 2018). Les conditions de sporulation standardisées utilisées en laboratoire sont pratiques pour la répétabilité des expériences menées partout dans le monde, cependant il est très probable que les spores étudiées sont différentes des spores trouvées dans l'environnement. Ce genre de réflexion dans le cadre de la sécurité alimentaire a déjà été soulevé il y a quelques années (Carlin, 2011). Dans le cas de la résistance aux UV, certaines

conditions de sporulations telles que la température, sont connues pour augmenter cette résistance (Raso *et al.*, 1998; Melly *et al.*, 2002). Il se pourrait que dans certaines conditions de sporulation, influençant par exemple la quantité d'eau dans le protoplaste de la spore, le CaDPA ne forme pas les mêmes photoproduits que ceux formés en laboratoire. Il a en effet été montré dans ce projet que la formation de DPAP peut varier en fonction des conditions de l'environnement lors de l'exposition aux UV. D'autre part, comme montré dans le chapitre 1 certains DPAP ont des effets sur la survie des spores notamment à travers la résistance aux UVc. Ainsi, si ces photoproduits peuvent être créés dans des conditions retrouvées dans l'environnement, lors d'une exposition au soleil par exemple, ils pourraient conférer des propriétés aux spores différentes de celles observées en laboratoire. Des spores ayant accumulé dans leur protoplaste des DPAP avec un effet photoprotecteur au fil des expositions au soleil pourraient se montrer plus résistantes à un processus de décontamination utilisant les UV par exemple.

Une question intéressante soulevée par l'étude des effets des DPAP sur les spores dans le chapitre 1 concerne le mécanisme d'action de ces DPAP pour induire une meilleure germination et réduire le temps avant la phase de croissance exponentielle des cellules végétatives. Il faudrait dans un premier temps observer si ce ou ces DPAP responsable(s) de l'augmentation du taux de germination passent eux aussi comme le DPA par l'activation de la CwIJ dégradant le cortex pendant la germination ou par un d'autres mécanismes. Il serait également intéressant d'observer si ces DPAP ont les mêmes effets sur des spores de différentes espèces, comme les spores formées par les clostridiiums. Identifier précisément ces DPAP pourrait finalement permettre de synthétiser de nouveaux inducteurs de germination.

L'observation d'une amélioration de la croissance des cellules végétatives par les DPAP offre là aussi des perspectives d'études. Tester si les DPAP peuvent influencer la croissance d'autres cellules végétatives comme des bactéries non sporulantes, comme *E. coli* pourrait agir comme de nouveaux composés utilisables en laboratoire pour augmenter des rendements de croissance dans des bio fermenteurs par exemple.

Dans leur environnement naturel, il se peut également que les spores tirent parti de la formation de ces DPAP. En effet, dans le cas de biofilms sporulant comme ceux de *Clostridium difficile* par exemple (Semenyuk *et al.*, 2014), ou de communautés microbiennes sporulantes, des spores formées et exposées à la lumière pourraient potentiellement former des DPAP dans le protoplaste. Ces DPAP une fois formés sont probablement libérés comme le DPA dans les premières étapes de la germination et ceux même si les spores ne sont plus viables, ces

premières étapes étant mécaniques. Ces DPAP une fois dans l'environnement pourraient favoriser la croissance des cellules végétatives venant de germer ou encore favoriser la germination des autres spores alentour. Des études concernant l'impact de ces photoproduits dans un contexte environnemental pourraient présenter des résultats intéressants pouvant expliquer en partie les différences de résistance et de croissance observée entre les souches de laboratoires et les souches naturelles.

Finale­ment, tester différentes conditions de sporulation avant l'exposition des spores aux UV pourrait modifier la formation des photoproduits formés. Notamment les conditions de sporulation modifiant l'hydratation du protoplaste des spores.

Concernant l'étude des dégâts engendré par un laser infrarouge pulsé, pour le moment le protocole mis en place ne permet pas de récupérer les spores irradiées. Il serait fondamental de pouvoir récupérer les spores après exposition au laser pour pouvoir les étudier plus en profondeur. Notamment, en extrayant leur ADN pour identifier quel type de lésions sont provoqué sur l'ADN par ce type de laser. En effet, même si le DPA ne semble pas impliqué dans cette résistance, reste la question de savoir si des SP sont formés sur l'ADN par ce type de laser. Au laboratoire, des systèmes de microfluidiques couplé à des observations microscopique comment à être mis en place. Utiliser ce genre de systèmes pour irradier de manière individuelle des spores et les récupérer au fur et à mesure pourrait être une perspective intéressante pour en apprendre d'avantages sur les dégâts engendrés par les lasers infrarouges pulsés sur les spores. De plus, comprendre pourquoi une si faible différence entre la résistance des cellules végétatives et les spores pourrait se révéler important pour développer des systèmes plus efficaces pour détruire les spores dans des processus de décontamination.

Finale­ment, le protocole de suivi de formation des photoproduits du DPA par mesure d'intensité et de temps de vie de fluorescence mis en place dans ce projet pourrait être utilisé dans de futures études. Comme détaillé dans le chapitre 1, il pourrait être possible d'utiliser les DPAP fluorescents comme sonde de pénétration des rayonnements UV dans divers milieux.



# Références bibliographiques

- Abhyankar, W. R. *et al.* (2016) 'The influence of sporulation conditions on the spore coat protein composition of *Bacillus subtilis* spores', *Frontiers in Microbiology*, 7(OCT), pp. 1–10. doi: 10.3389/fmicb.2016.01636.
- Almasoud, N. *et al.* (2021) 'Discrimination of bacteria using whole organism fingerprinting: The utility of modern physicochemical techniques for bacterial typing', *Analyst*. Royal Society of Chemistry, 146(3), pp. 770–788. doi: 10.1039/d0an01482f.
- Altinoglu, I., Merrifield, C. J. and Yamaichi, Y. (2019) 'Single molecule super-resolution imaging of bacterial cell pole proteins with high-throughput quantitative analysis pipeline', *Scientific Reports*, 9(1), pp. 1–11. doi: 10.1038/s41598-019-43051-7.
- Andreas Gahlmann and W. E. Moerner (2014) 'Exploring bacterial cell biology with single-molecule tracking and super-resolution imaging', *Nature Reviews Microbiology*, 12(1), pp. 9–22. doi: 10.1038/nrmicro3154.Exploring.
- Ansari, J. A., Ismail, M. and Farid, M. (2019) 'Investigate the efficacy of UV pretreatment on thermal inactivation of *Bacillus subtilis* spores in different types of milk', *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. Elsevier, 52(January), pp. 387–393. doi: 10.1016/j.ifset.2019.02.002.
- Arantes, O. and Lereclus, D. (1991) 'Construction of cloning vectors for *Bacillus thuringiensis*', *Gene*, 108(1), pp. 115–119. doi: 10.1016/0378-1119(91)90495-W.
- Arsov, Z., Urbančić, I. and Štrancar, J. (2018) 'Aggregation-induced emission spectral shift as a measure of local concentration of a pH-activatable rhodamine-based smart probe', *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 190, pp. 486–493. doi: 10.1016/j.saa.2017.09.067.
- Atrih, A. *et al.* (1996) 'Structural analysis of *Bacillus subtilis* 168 endospore peptidoglycan and its role during differentiation', *Journal of Bacteriology*, 178(21), pp. 6173–6183. doi: 10.1128/jb.178.21.6173-6183.1996.
- Beladjal, L. *et al.* (2018) 'Life from the ashes: survival of dry bacterial spores after very high temperature exposure', *Extremophiles*. Springer Japan, 22(5), pp. 751–759. doi: 10.1007/s00792-018-1035-6.
- Benardini, J. N. *et al.* (2003) 'Spore UV and Acceleration Resistance of Endolithic *Bacillus pumilus* and *Bacillus subtilis* Isolates Obtained from Sonoran Desert Basalt: Implications for Lithopanspermia', *Astrobiology*, 3(4), pp. 709–717. doi: 10.1089/153110703322736033.
- Berendsen, E. M. *et al.* (2016) 'A mobile genetic element profoundly increases heat resistance of bacterial spores', *ISME Journal*. Nature Publishing Group, 10(11), pp. 2633–2642. doi: 10.1038/ismej.2016.59.
- Berteau, O. and Benjdia, A. (2016) 'DNA Repair by the Radical SAM Enzyme Spore Photoproduct Lyase: From Biochemistry to Structural Investigations', *Photochemistry and Photobiology*, 93(1), pp. 1–11. doi: 10.1111/php.12702.
- Beskrovnaya, P. *et al.* (2021) 'Structural, Metabolic and Evolutionary Comparison of Bacterial Endospore and

- Exospore Formation', *Frontiers in Microbiology*, 12(March), pp. 1–17. doi: 10.3389/fmicb.2021.630573.
- Bosak, T., Knoll, A. H. and Petroff, A. P. (2013) 'The meaning of stromatolites', *Annual Review of Earth and Planetary Sciences*, 41(January), pp. 21–44. doi: 10.1146/annurev-earth-042711-105327.
- Bressuire-Isoard, C., Broussolle, V. and Carlin, F. (2018) 'Sporulation environment influences spore properties in *Bacillus*: Evidence and insights on underlying molecular and physiological mechanisms', *FEMS Microbiology Reviews*, 42(5), pp. 614–626. doi: 10.1093/femsre/fuy021.
- Burchell, M. J., Mann, J. R. and Bunch, A. W. (2004) 'Survival of bacteria and spores under extreme shock pressures', *Monthly Notices of the Royal Astronomical Society*, 352(4), pp. 1273–1278. doi: 10.1111/j.1365-2966.2004.08015.x.
- Cano, R. J. and Borucki, M. K. (1995) 'Revival and identification of bacterial spores in 25- to 40-million-year-old Dominican amber', *Science*, 268(5213), pp. 1060–1064. doi: 10.1126/science.7538699.
- Carlin, F. (2011) 'Origin of bacterial spores contaminating foods', *Food Microbiology*. Elsevier Ltd, 28(2), pp. 177–182. doi: 10.1016/j.fm.2010.07.008.
- Cattoni, D. I., Fiche, J. B. and Nöllmann, M. (2012) 'Single-molecule super-resolution imaging in bacteria', *Current Opinion in Microbiology*, 15(6), pp. 758–763. doi: 10.1016/j.mib.2012.10.007.
- Chen, D., Huang, S. S. and Li, Y. Q. (2006) 'Real-time detection of kinetic germination and heterogeneity of single *Bacillus* spores by laser tweezers Raman spectroscopy', *Analytical Chemistry*, 78(19), pp. 6936–6941. doi: 10.1021/ac061090e.
- Chirakkal, H. *et al.* (2002) 'Analysis of spore cortex lytic enzymes and related proteins in *Bacillus subtilis* endospore germination', *Microbiology*, 148(8), pp. 2383–2392. doi: 10.1099/00221287-148-8-2383.
- Christner, B. C. *et al.* (2003) 'Bacterial recovery from ancient glacial ice', *Environmental Microbiology*, 5(5), pp. 433–436. doi: 10.1046/j.1462-2920.2003.00422.x.
- Clair, G. *et al.* (2020) 'The spore coat is essential for *Bacillus subtilis* spore resistance to pulsed light, and pulsed light treatment eliminates some spore coat proteins', *International Journal of Food Microbiology*. Elsevier, 323(March), p. 108592. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108592.
- Coochill, T. P. and Sagripanti, J. L. (2009) 'Bacterial inactivation by solar ultraviolet radiation compared with sensitivity to 254 nm radiation', *Photochemistry and Photobiology*, 85(5), pp. 1043–1052. doi: 10.1111/j.1751-1097.2009.00586.x.
- Cortês, M. *et al.* (2019) '*Bacillus subtilis* spore resistance to simulated mars surface conditions', *Frontiers in Microbiology*, 10(FEB), pp. 1–16. doi: 10.3389/fmicb.2019.00333.
- Cowan, A. E. *et al.* (2004) 'Lipids in the inner membrane of dormant spores of *Bacillus* species are largely immobile', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(20), pp. 7733–7738. doi: 10.1073/pnas.0306859101.
- D'Incecco, P. *et al.* (2018) 'A fluorescence in situ staining method for investigating spores and vegetative cells

- of Clostridia by confocal laser scanning microscopy and structured illuminated microscopy', *Micron*. Elsevier, 110(April), pp. 1–9. doi: 10.1016/j.micron.2018.04.005.
- Dai, T. *et al.* (2013) 'Blue light rescues mice from potentially fatal pseudomonas aeruginosa burn infection: Efficacy, safety, and mechanism of action', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(3), pp. 1238–1245. doi: 10.1128/AAC.01652-12.
- Darsonval, M. *et al.* (2018) 'CtsR, the Master Regulator of Stress-Response in *Oenococcus oeni*, Is a Heat Sensor Interacting With ClpL1', *Frontiers in Microbiology*, 9(December), pp. 1–14. doi: 10.3389/fmicb.2018.03135.
- Delorme, M. M. *et al.* (2020) 'Ultraviolet radiation: An interesting technology to preserve quality and safety of milk and dairy foods', *Trends in Food Science and Technology*. Elsevier, 102(June), pp. 146–154. doi: 10.1016/j.tifs.2020.06.001.
- Denis, T. G. S., Dai, T. and Hamblin, M. R. (2013) 'Killing bacterial spores with blue light: When innate resistance meets the power of light', *Photochemistry and Photobiology*, 89(1), pp. 2–4. doi: 10.1111/j.1751-1097.2012.01233.x.
- Desnous, C., Guillaume, D. and Clivio, P. (2010) 'Spore photoproduct: A key to bacterial eternal life', *Chemical Reviews*, 110(3), pp. 1213–1232. doi: 10.1021/cr0781972.
- Diffey, B. L. (1991) 'Solar ultraviolet radiation effects on biological systems', *Physics in Medicine and Biology*, 36(3), pp. 299–328. doi: 10.1088/0031-9155/36/3/001.
- Djouiaï, B. *et al.* (2018) 'Role of DNA Repair and Protective Components in *Bacillus subtilis* Spore Resistance to Inactivation by 400-nm- Wavelength Blue Light', 84(19), pp. 1–11.
- Dodd, M. S. *et al.* (2017) 'Evidence for early life in Earth's oldest hydrothermal vent precipitates', *Nature*. Nature Publishing Group, 543(7643), pp. 60–64. doi: 10.1038/nature21377.
- Donnellan, J. E. *et al.* (1968) 'Effect of temperature on the photobiology and photochemistry of bacterial spores', *Nature*, 219, pp. 964–965.
- Doona, C. J. *et al.* (2014) 'High pressure germination of *Bacillus subtilis* spores with alterations in levels and types of germination proteins', *Journal of applied microbiology*, 117(3), pp. 711–720. doi: 10.1111/jam.12557.
- Douki, T., Setlow, B. and Setlow, P. (2005) 'Photosensitization of DNA by dipicolinic acid, a major component of spores of *Bacillus* species', *Photochemical and Photobiological Sciences*, 4(8), pp. 591–597. doi: 10.1039/b503771a.
- Earl, A. M., Losick, R. and Kolter, R. (2008) 'Ecology and genomics of *Bacillus subtilis*', *Trends in Microbiology*, 16(6), pp. 269–275. doi: 10.1016/j.tim.2008.03.004.Ecology.
- Edwards, H. G. M. *et al.* (2006) 'Raman spectroscopic study of the photoprotection of extremophilic microbes against ultraviolet radiation', *International Journal of Astrobiology*, 5(4), pp. 313–318. doi: 10.1017/S147355040600348X.



- Elegbeleye, J. A. *et al.* (2021) 'Ultraviolet-C inactivation and hydrophobicity of *Bacillus subtilis* and *Bacillus velezensis* spores isolated from extended shelf-life milk', *International Journal of Food Microbiology*. Elsevier B.V., 349(March 2020), p. 109231. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109231.
- Errington, J. (1993) '*Bacillus subtilis* sporulation: Regulation of gene expression and control of morphogenesis', *Microbiological Reviews*, 57(1), pp. 1–33. doi: 10.1128/mmbr.57.1.1-33.1993.
- Errington, J. (2003) 'Regulation of endospore formation in *Bacillus subtilis*', *Nature Reviews Microbiology*, 1(2), pp. 117–126. doi: 10.1038/nrmicro750.
- Esbelin, J. *et al.* (2016) 'Inactivation by Pulsed Light of *Bacillus subtilis* Spores with Impaired Protection Factors', *Photochemistry and Photobiology*, 92(2), pp. 301–307. doi: 10.1111/php.12568.
- Fajardo-Cavazos, P. *et al.* (2005) '*Bacillus subtilis* spores on artificial meteorites survive hypervelocity atmospheric entry: Implications for lithopanspermia', *Astrobiology*, 5(6), pp. 726–736. doi: 10.1089/ast.2005.5.726.
- Fajardo-Cavazos, P. *et al.* (2009) 'Bacterial spores in granite survive hypervelocity launch by spallation: Implications for lithopanspermia', *Astrobiology*, 9(7), pp. 647–657. doi: 10.1089/ast.2008.0326.
- Feignon, J. G. *et al.* (2020) 'Characterization of shocked quartz grains from Chicxulub peak ring granites and shock pressure estimates', *Meteoritics and Planetary Science*, 55(10), pp. 2206–2223. doi: 10.1111/maps.13570.
- Fekraoui, F. *et al.* (2021) 'Cycling versus Continuous High Pressure treatments at moderate temperatures: Effect on bacterial spores?', *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 74, p. 102828. doi: 10.1016/j.ifset.2021.102828.
- Fux, C. A. *et al.* (2005) 'Can laboratory reference strains mirror "real-world" pathogenesis?', *Trends in Microbiology*, 13(2), pp. 58–63. doi: 10.1016/j.tim.2004.11.001.
- Gauvry, E. *et al.* (2017) 'Knowledge of the physiology of spore-forming bacteria can explain the origin of spores in the food environment', *Research in Microbiology*, 168(4), pp. 369–378. doi: 10.1016/j.resmic.2016.10.006.
- Ghosh, A. (2017) Molecular analysis of GerP and spore-associated proteins of *Bacillus cereus*.
- Ghosh, A. *et al.* (2018) 'Proteins encoded by the gerP operon are localized to the inner coat in *Bacillus cereus* spores and are dependent on GerPA and SafA for assembly', *Applied and Environmental Microbiology*, 84(14), pp. 1–18. doi: 10.1128/AEM.00760-18.
- Ghosh, S. *et al.* (2008) 'Characterization of spores of *Bacillus subtilis* that lack most coat layers', *Journal of Bacteriology*, 190(20), pp. 6741–6748. doi: 10.1128/JB.00896-08.
- Griffin, D. W. (2004) 'Terrestrial microorganisms at an altitude of 20,000 m in Earth's atmosphere', *Aerobiologia*, 20(2), pp. 135–140. doi: 10.1023/B:AERO.0000032948.84077.12.
- Griffiths, K. K. *et al.* (2011) 'Germination proteins in the inner membrane of dormant *Bacillus subtilis* spores colocalize in a discrete cluster', *Molecular Microbiology*, 81(4), pp. 1061–1077. doi: 10.1111/j.1365-2958.2011.07753.x.

- Griffiths, K. K. and Setlow, P. (2009) 'Effects of modification of membrane lipid composition on *Bacillus subtilis* sporulation and spore properties', *Journal of Applied Microbiology*, 106(6), pp. 2064–2078. doi: 10.1111/j.1365-2672.2009.04176.x.
- Gunsolus, I. L. *et al.* (2014) 'Facile method to stain the bacterial cell surface for super-resolution fluorescence microscopy', *Analyst*, 139(12), pp. 3174–3178. doi: 10.1039/c4an00574k.
- Gwynne, P. J. and Gallagher, M. P. (2018) 'Light as a broad-spectrum antimicrobial', *Frontiers in Microbiology*, 9(FEB), pp. 1–9. doi: 10.3389/fmicb.2018.00119.
- Halstead, F. D. *et al.* (2016) 'Antibacterial activity of blue light against nosocomial wound pathogens growing planktonically and as mature biofilms', *Applied and Environmental Microbiology*, 82(13), pp. 4006–4016. doi: 10.1128/AEM.00756-16.
- Hamanaka, D. *et al.* (2006) 'Effect of the wavelength of infrared heaters on the inactivation of bacterial spores at various water activities', *International Journal of Food Microbiology*, 108(2), pp. 281–285. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2005.11.019.
- He, L., Chen, Z., *et al.* (2018) 'Germination, Outgrowth, and Vegetative-Growth Kinetics of Dry-Heat-Treated Individual Spores of *Bacillus* Species', 84(7), pp. 1–14.
- He, L., Wang, S., *et al.* (2018) 'Single-cell analysis reveals individual spore responses to simulated space vacuum', *npj Microgravity*. Springer US, 4(1). doi: 10.1038/s41526-018-0059-7.
- Hell, S. W. *et al.* (2015) 'The 2015 super-resolution microscopy roadmap', *Journal of Physics D: Applied Physics*. IOP Publishing, 48(44). doi: 10.1088/0022-3727/48/44/443001.
- Henriques, A. O. and Moran, C. P. (2007) 'Structure, assembly, and function of the spore surface layers', *Annual Review of Microbiology*, 61, pp. 555–588. doi: 10.1146/annurev.micro.61.080706.093224.
- Higgins, D. and Dworkin, J. (2012) 'Recent progress in *Bacillus subtilis* sporulation', *FEMS Microbiology Reviews*, 36(1), pp. 131–148. doi: 10.1111/j.1574-6976.2011.00310.x.
- Hindle, A. A. and Hall, E. A. H. (1999) 'Dipicolinic acid (DPA) assay revisited and appraised for spore detection', *Analyst*, 124(11), pp. 1599–1604. doi: 10.1039/a906846e.
- Horneck, G. (1993) 'Responses of *Bacillus subtilis* spores to space environment: Results from experiments in space', *Origins of Life and Evolution of the Biosphere*, 23(1), pp. 37–52. doi: 10.1007/BF01581989.
- Horneck, G. *et al.* (2001) 'Bacterial Spores Survive Simulated Meteorite Impact', *Icarus*, 149(1), pp. 285–290. doi: 10.1006/icar.2000.6543.
- Horneck, G. (2001) 'Bacterial Spores Survive Simulated Meteorite Impact', *Icarus*, 149(1), pp. 285–290. doi: 10.1006/icar.2000.6543.
- Horneck, G. *et al.* (2008) 'Microbial rock inhabitants survive hypervelocity impacts on mars-like host planets: First phase of lithopanspermia experimentally tested', *Astrobiology*, 8(1), pp. 17–44. doi: 10.1089/ast.2007.0134.

- Horneck, G., Bücker, H. and Reitz, G. (1994) 'Long-term survival of bacterial spores in space', *Advances in Space Research*, 14(10), pp. 41–45. doi: 10.1016/0273-1177(94)90448-0.
- Huang, S. S. *et al.* (2007) 'Levels of Ca<sup>2+</sup>-dipicolinic acid in individual *Bacillus* spores determined using microfluidic Raman tweezers', *Journal of Bacteriology*, 189(13), pp. 4681–4687. doi: 10.1128/JB.00282-07.
- Jennings, P. C. *et al.* (2011) 'Super-resolution imaging of the bacterial cytokinetic protein FtsZ', *Micron*. Elsevier Ltd, 42(4), pp. 336–341. doi: 10.1016/j.micron.2010.09.003.
- Kempf, M. J., Schubert, W. W. and Beaudet, R. A. (2008) 'Determination of lethality rate constants and d-values for *Bacillus atrophaeus* (ATCC 9372) spores exposed to dry heat from 115°C to 170°C', *Astrobiology*, 8(6), pp. 1169–1182. doi: 10.1089/ast.2007.0208.
- Khaneja, R. *et al.* (2010) 'Carotenoids found in *Bacillus*', *Journal of Applied Microbiology*, 108(6), pp. 1889–1902. doi: 10.1111/j.1365-2672.2009.04590.x.
- Klobutcher, L. A., Ragkousi, K. and Setlow, P. (2006) 'The *Bacillus subtilis* spore coat provides "eat resistance" during phagocytic predation by the protozoan *Tetrahymena thermophila*', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(1), pp. 165–170. doi: 10.1073/pnas.0507121102.
- Kong, L. *et al.* (2011) 'Characterization of bacterial spore germination using phase-contrast and fluorescence microscopy, Raman spectroscopy and optical tweezers', *Nature Protocols*. Nature Publishing Group, 6(5), pp. 625–639. doi: 10.1038/nprot.2011.307.
- Kong, L., Setlow, P. and Li, Y. Q. (2012) 'Analysis of the Raman spectra of Ca<sup>2+</sup>-dipicolinic acid alone and in the bacterial spore core in both aqueous and dehydrated environments', *Analyst*, 137(16), pp. 3683–3689. doi: 10.1039/c2an35468c.
- Kong, X., Wakida, N. M. and Yokomori, K. (2021) 'Application of Laser Microirradiation in the Investigations of Cellular Responses to DNA Damage', *Frontiers in Physics*, 8(January), pp. 1–8. doi: 10.3389/fphy.2020.597866.
- König, K. (2006) 'Cell damage during multi-photon microscopy', *Handbook of Biological Confocal Microscopy: Third Edition*, c, pp. 680–689. doi: 10.1007/978-0-387-45524-2\_38.
- Kozuka, S. and Tochikubo, K. (1985) 'Properties and Origin of Filamentous Appendages on Spores of *Bacillus cereus*', *Microbiology and Immunology*, 29(1), pp. 21–37. doi: 10.1111/j.1348-0421.1985.tb00799.x.
- Larin, I. K. (2021) 'On the Influence of Global Warming on the Ozone Layer and UVB Radiation', *Izvestiya - Atmospheric and Ocean Physics*, 57(1), pp. 110–115. doi: 10.1134/S0001433821010096.
- Leggett, M. J. *et al.* (2012) 'Bacterial spore structures and their protective role in biocide resistance', *Journal of Applied Microbiology*, 113(3), pp. 485–498. doi: 10.1111/j.1365-2672.2012.05336.x.
- Leray, A. *et al.* (2013) '827Spatio-Temporal Quantification of FRET in Living Cells by Fast Time-Domain FLIM: A Comparative Study of Non-Fitting Methods', *PLoS ONE*, 8(7). doi: 10.1371/journal.pone.0069335.
- Levy, C. *et al.* (2012) 'Relevant factors affecting microbial surface decontamination by pulsed light',

- International Journal of Food Microbiology*. Elsevier B.V., 152(3), pp. 168–174. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.08.022.
- Li, Y. *et al.* (2012) ‘Role of a SpoVA Protein in Dipicolinic Acid Uptake into Developing Spores of *Bacillus subtilis*’, *Journal of Bacteriology*, 194(8), pp. 1875–1884. doi: 10.1128/JB.00062-12.
- Lindberg, C. and Horneck, G. (1991) ‘Action spectra for survival and spore photoproduct formation of *Bacillus subtilis* irradiated with short-wavelength (200-300 nm) UV at atmospheric pressure and in vacuo’, *Journal of Photochemistry and Photobiology, B: Biology*, 11(1), pp. 69–80. doi: 10.1016/1011-1344(91)80269-N.
- Lindsay, J. A., Beaman, T. C. and Gerhardt, P. (1985) ‘Protoplast water content of bacterial spores determined by buoyant density sedimentation’, *Journal of Bacteriology*, 163(2), pp. 735–737. doi: 10.1128/jb.163.2.735-737.1985.
- Link, L. *et al.* (2004) ‘Extreme spore UV resistance of *Bacillus pumilus* isolates obtained from an ultraclean spacecraft assembly facility’, *Microbial Ecology*, 47(2), pp. 159–163. doi: 10.1007/s00248-003-1029-4.
- Loison, P. *et al.* (2013) ‘Direct investigation of viscosity of an atypical inner membrane of *Bacillus* spores: A molecular rotor/FLIM study’, *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*. Elsevier B.V., 1828(11), pp. 2436–2443. doi: 10.1016/j.bbamem.2013.06.028.
- Loison, P. *et al.* (2016) ‘Effect of ethanol perturbation on viscosity and permeability of an inner membrane in *Bacillus subtilis* spores’, *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*. Elsevier B.V., 1858(9), pp. 2060–2069. doi: 10.1016/j.bbamem.2016.06.003.
- López, D. *et al.* (2009) ‘Cannibalism enhances biofilm development in *Bacillus subtilis*’, *Molecular Microbiology*, 74(3), pp. 609–618. doi: 10.1111/j.1365-2958.2009.06882.x.
- MacLean, M. *et al.* (2013) ‘Sporicidal effects of high-intensity 405 nm visible light on endospore-forming bacteria’, *Photochemistry and Photobiology*, 89(1), pp. 120–126. doi: 10.1111/j.1751-1097.2012.01202.x.
- Magill, N. G. *et al.* (1994) ‘The internal pH of the forespore compartment of *Bacillus megaterium* decreases by about 1 pH unit during sporulation’, *Journal of Bacteriology*, 176(8), pp. 2252–2258. doi: 10.1128/jb.176.8.2252-2258.1994.
- Malyshev, D. *et al.* (2021) ‘Laser induced degradation of bacterial spores during micro-Raman spectroscopy’, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. Elsevier B.V., p. 120381. doi: 10.1016/j.saa.2021.120381.
- Masayama, A. *et al.* (2006) ‘Subcellular localization of a germination-specific cortex-lytic enzyme, SleB, of *Bacilli* during sporulation’, *Genes and Genetic Systems*, 81(3), pp. 163–169. doi: 10.1266/ggs.81.163.
- McCann, K. and Laane, J. (2008) ‘Raman and infrared spectra and theoretical calculations of dipicolinic acid, dinicotinic acid, and their dianions’, *Journal of Molecular Structure*. Elsevier B.V., 890(1–3), pp. 346–358. doi: 10.1016/j.molstruc.2008.05.046.
- Mckenney, P. T., Driks, A. and Eichenberger, P. (2013) ‘The *Bacillus subtilis* endospore: Assembly and

- functions of the multilayered coat', *Nature Reviews Microbiology*. Nature Publishing Group, 11(1), pp. 33–44. doi: 10.1038/nrmicro2921.
- McKenney, P. T. and Eichenberger, P. (2012) 'Dynamics of spore coat morphogenesis in *Bacillus subtilis*', *Molecular Microbiology*, 83(2), pp. 245–260. doi: 10.1111/j.1365-2958.2011.07936.x.
- McKinney, S. A. *et al.* (2009) 'A bright and photostable photoconvertible fluorescent protein', *Nature Methods*, 6(2), pp. 131–133. doi: 10.1038/nmeth.1296.
- Melly, E. *et al.* (2002) 'Analysis of the properties of spores of *Bacillus subtilis* prepared at different temperatures', *Journal of Applied Microbiology*, 92(6), pp. 1105–1115. doi: 10.1046/j.1365-2672.2002.01644.x.
- Menzorov, A. G. *et al.* (2019) 'Targeted genomic integration of EGFP under tubulin beta 3 class III promoter and mEos2 under tryptophan hydroxylase 2 promoter does not produce sufficient levels of reporter gene expression', *Journal of Cellular Biochemistry*, 120(10), pp. 17208–17218. doi: 10.1002/jcb.28981.
- Meot-Ner, M. and Matloff, G. (1979) 'Directed panspermia - A technical and ethical evaluation of seeding nearby solar systems', *Journal of the British Interplanetary Society*, 32(October 2014), pp. 419–423.
- Miteva, V. I. and Brenchley, J. E. (2005) 'Detection and isolation of ultrasmall microorganisms from a 120,000-year-old Greenland glacier ice core', *Applied and Environmental Microbiology*, 71(12), pp. 7806–7818. doi: 10.1128/AEM.71.12.7806-7818.2005.
- Moeller, R. *et al.* (2005) 'Role of pigmentation in protecting *Bacillus sp.* endospores against environmental UV radiation', *FEMS Microbiology Ecology*, 51(2), pp. 231–236. doi: 10.1016/j.femsec.2004.08.008.
- Moeller, R. *et al.* (2007) 'UV-radiation-induced formation of DNA bipyrimidine photoproducts in *Bacillus subtilis* endospores and their repair during germination', *International Microbiology*, 10(1), pp. 39–46. doi: 10.2436/20.1501.01.6.
- Molin, G. and Östlund, K. (1975) 'Dry-heat inactivation of *Bacillus subtilis* spores by means of infra-red heating', *Antonie van Leeuwenhoek*, 41(1), pp. 329–335. doi: 10.1007/BF02565067.
- Müller, A. L. *et al.* (2014) 'Endospores of thermophilic bacteria as tracers of microbial dispersal by ocean currents', *ISME Journal*, 8(6), pp. 1153–1165. doi: 10.1038/ismej.2013.225.
- Murdoch, L. E. *et al.* (2013) 'Lethal effects of high-intensity violet 405-nm light on *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, and on dormant and germinating spores of *Aspergillus niger*', *Fungal Biology*, 117(7–8), pp. 519–527. doi: 10.1016/j.funbio.2013.05.004.
- Nadiarnykh, O. *et al.* (2012) 'Carcinogenic damage to deoxyribonucleic acid is induced by near-infrared laser pulses in multiphoton microscopy via combination of two- and three-photon absorption', *Journal of Biomedical Optics*, 17(11), p. 116024. doi: 10.1117/1.jbo.17.11.116024.
- Nahidiazar, L. *et al.* (2016) 'Optimizing imaging conditions for demanding multi-color super resolution localization microscopy', *PLoS ONE*, 11(7), pp. 1–18. doi: 10.1371/journal.pone.0158884.
- Nakashio, S. and Gerhardt, P. (1985) 'Protoplast dehydration correlated with heat resistance of bacterial spores',

*Journal of Bacteriology*, 162(2), pp. 571–578. doi: 10.1128/jb.162.2.571-578.1985.

Nardi, G. *et al.* (2021) ‘Spectroscopic characterization of dipicolinic acid and its photoproducts as thymine photosensitizers’, *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. Elsevier B.V., 245, p. 118898. doi: 10.1016/j.saa.2020.118898.

Nguyen Thi Minh, H. *et al.* (2011) ‘Effect of sporulation conditions on the resistance of *Bacillus subtilis* spores to heat and high pressure’, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 90(4), pp. 1409–1417. doi: 10.1007/s00253-011-3183-9.

Nicholson, W. L. *et al.* (2000) ‘Resistance of Bacillus Endospores to Extreme Terrestrial and Extraterrestrial Environments’, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(3), pp. 548–572. doi: 10.1128/mnbr.64.3.548-572.2000.

Nicholson, W. L. *et al.* (2002) ‘Bacterial endospores and their significance in stress resistance’, *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 81(1–4), pp. 27–32. doi: 10.1023/A:1020561122764.

Nicholson, W. L., Schuerger, A. C. and Setlow, P. (2005) ‘The solar UV environment and bacterial spore UV resistance: Considerations for Earth-to-Mars transport by natural processes and human spaceflight’, *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 571(1-2 SPEC. ISS.), pp. 249–264. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2004.10.012.

Nicholson, W. L., Setlow, B. and Setlow, P. (1991) ‘Ultraviolet irradiation of DNA complexed with  $\alpha/\beta$ -type small, acid-soluble proteins from spores of Bacillus or Clostridium species makes spore photoproduct but not thymine dimers’, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(19), pp. 8288–8292. doi: 10.1073/pnas.88.19.8288.

Nicholson, W. L., Setlow, B. and Setlow, P. (2002) ‘UV photochemistry of DNA in vitro and in *Bacillus subtilis* spores at earth-ambient and low atmospheric pressure: Implications for spore survival on other planets or moons in the solar system’, *Astrobiology*, 2(4), pp. 417–425. doi: 10.1089/153110702762470518.

Nicorescu, I. *et al.* (2013) ‘Pulsed light inactivation of *Bacillus subtilis* vegetative cells in suspensions and spices’, *Food Control*. Elsevier Ltd, 31(1), pp. 151–157. doi: 10.1016/j.foodcont.2012.09.047.

Noell, A. C. *et al.* (2015) ‘Spectroscopy and viability of bacillus subtilis spores after ultraviolet irradiation: Implications for the detection of potential bacterial life on Europa’, *Astrobiology*, 15(1), pp. 20–31. doi: 10.1089/ast.2014.1169.

Nudelman, R., Bronk, B. V. and Efrima, S. (2000) ‘Fluorescence emission derived from dipicolinic acid, its sodium, and its calcium salts’, *Applied Spectroscopy*, 54(3), pp. 445–449. doi: 10.1366/0003702001949564.

Ohtomo, Y. *et al.* (2014) ‘Evidence for biogenic graphite in early archaean isua metasedimentary rocks’, *Nature Geoscience*. Nature Publishing Group, 7(1), pp. 25–28. doi: 10.1038/ngeo2025.

Pacheco, M. (2022) Développement de techniques spectroscopiques multidimensionnelles et microscopiques afin de faciliter le suivi de la fluorescence native de biomolécules. Université Bourgogne Franche-Comté.

- Paidhungat, M. *et al.* (2000) 'Characterization of spores of *Bacillus subtilis* which lack dipicolinic acid', *Journal of Bacteriology*, 182(19), pp. 5505–5512. doi: 10.1128/JB.182.19.5505-5512.2000.
- Paidhungat, M. and Setlow, P. (2001) 'Localization of a germinant receptor protein (GerBA) to the inner membrane of *Bacillus subtilis* spores', *Journal of Bacteriology*, 183(13), pp. 3982–3990. doi: 10.1128/JB.183.13.3982-3990.2001.
- Panitz, C. *et al.* (2015) 'The SPORES experiment of the EXPOSE-R mission: *Bacillus subtilis* spores in artificial meteorites', *International Journal of Astrobiology*, 14(1), pp. 105–114. doi: 10.1017/S1473550414000251.
- Paulino-Lima, I. G. *et al.* (2013) 'Isolation of UVC-Tolerant Bacteria from the Hyperarid Atacama Desert, Chile', *Microbial Ecology*, 65(2), pp. 325–335. doi: 10.1007/s00248-012-0121-z.
- Perkins, D. L. *et al.* (2004) 'Effects of autoclaving on bacterial endospores studied by fourier transform infrared microspectroscopy', *Applied Spectroscopy*, 58(6), pp. 749–753. doi: 10.1366/000370204873079.
- Piggot, P. J. and Hilbert, D. W. (2004) 'Sporulation of *Bacillus subtilis*', *Current Opinion in Microbiology*, 7(6), pp. 579–586. doi: 10.1016/j.mib.2004.10.001.
- Pogliano, J. *et al.* (1999) 'A vital stain for studying membrane dynamics in bacteria: A novel mechanism controlling septation during *Bacillus subtilis* sporulation', *Molecular Microbiology*, 31(4), pp. 1149–1159. doi: 10.1046/j.1365-2958.1999.01255.x.
- Popham, D. L. (2002) 'Specialized peptidoglycan of the bacterial endospore: The inner wall of the lockbox', *Cellular and Molecular Life Sciences*, 59(3), pp. 426–433. doi: 10.1007/s00018-002-8435-5.
- Prado, D. B. do *et al.* (2019) 'Effect of ultraviolet (UV-C) radiation on spores and biofilms of *Alicyclobacillus spp.* in industrialized orange juice', *International Journal of Food Microbiology*, 305(May). doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108238.
- Ragkousi, K. *et al.* (2000) 'Analysis of nucleoid morphology during germination and outgrowth of spores of *Bacillus species*', *Journal of Bacteriology*, 182(19), pp. 5556–5562. doi: 10.1128/JB.182.19.5556-5562.2000.
- Ramírez-Guadiana, F. H. *et al.* (2017) 'A two-step transport pathway allows the mother cell to nurture the developing spore in *Bacillus subtilis*', *PLoS Genetics*, 13(9), pp. 1–18. doi: 10.1371/journal.pgen.1007015.
- Ramos-Villarroel, A. Y. *et al.* (2012) 'The role of pulsed light spectral distribution in the inactivation of *Escherichia coli* and *Listeria innocua* on fresh-cut mushrooms', *Food Control*. Elsevier Ltd, 24(1–2), pp. 206–213. doi: 10.1016/j.foodcont.2011.09.029.
- Raso, J. *et al.* (1998) 'Influence of several environmental factors on the initiation of germination and inactivation of *Bacillus cereus* by high hydrostatic pressure', *International Journal of Food Microbiology*, 44(1–2), pp. 125–132. doi: 10.1016/S0168-1605(98)00130-5.
- Reidmiller, J. S. *et al.* (2003) 'Characterization of UV-peroxide killing of bacterial spores', *Journal of Food Protection*, 66(7), pp. 1233–1240. doi: 10.4315/0362-028X-66.7.1233.
- Reineke, K. *et al.* (2013) 'Mechanisms of endospore inactivation under high pressure', *Trends in Microbiology*.

- Elsevier Ltd, 21(6), pp. 296–304. doi: 10.1016/j.tim.2013.03.001.
- Reineke, K. and Mathys, A. (2020) ‘Endospore Inactivation by Emerging Technologies: A Review of Target Structures and Inactivation Mechanisms’, *Annual Review of Food Science and Technology*, 11(1). doi: 10.1146/annurev-food-032519-051632.
- Richert, S. *et al.* (2014) ‘In vivo labeling of peroxisomes by photoconvertible mEos2 in myelinating glia of mice’, *Biochimie*. Elsevier Masson SAS, 98(1), pp. 127–134. doi: 10.1016/j.biochi.2013.10.022.
- Riesenman, P. J. and Nicholson, W. L. (2000) ‘Role of the 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), pp. 620–626. doi: 10.1128/AEM.66.2.620-626.2000.
- Rosing, M. T. (1999) ‘<sup>13</sup>C-depleted carbon microparticles in  $\geq 3700$ -Ma sea-floor sedimentary rocks from west Greenland’, *Science*, 283(5402), pp. 674–676. doi: 10.1126/science.283.5402.674.
- Sancar, A. and Tang, M.-S. (1993) ‘Nucleotide Excision Repair’, *Photochemistry and Photobiology*, 57(5), pp. 905–921.
- Sanchez-Salas, J. L. *et al.* (2011) ‘Maturation of released spores is necessary for acquisition of full spore heat resistance during *Bacillus subtilis* sporulation’, *Applied and Environmental Microbiology*, 77(19), pp. 6746–6754. doi: 10.1128/AEM.05031-11.
- Santos, A. L. *et al.* (2013) ‘Wavelength dependence of biological damage induced by UV radiation on bacteria’, *Archives of Microbiology*, 195(1), pp. 63–74. doi: 10.1007/s00203-012-0847-5.
- Sarasanandarajah, S. *et al.* (2005) ‘Two-dimensional multiwavelength fluorescence spectra of dipicolinic acid and calcium dipicolinate’, *Applied Optics*, 44(7), pp. 1182–1187. doi: 10.1364/AO.44.001182.
- Schopf, J. W. *et al.* (2007) ‘Evidence of Archean life: Stromatolites and microfossils’, *Precambrian Research*, 158(3–4), pp. 141–155. doi: 10.1016/j.precamres.2007.04.009.
- Schubert, W. W. and Beaudet, R. A. (2011) ‘Determination of lethality rate constants and D-values for heat-resistant bacillus spores ATCC 29669 exposed to dry heat from 125°C to 200°C’, *Astrobiology*, 11(3), pp. 213–223. doi: 10.1089/ast.2010.0502.
- Semenyuk, E. G. *et al.* (2014) ‘Spore formation and toxin production in *Clostridium difficile* biofilms’, *PLoS ONE*, 9(1). doi: 10.1371/journal.pone.0087757.
- Setlow, B. *et al.* (1991) ‘Condensation of the forespore nucleoid early in sporulation of *Bacillus species*’, *Journal of Bacteriology*, 173(19), pp. 6270–6278. doi: 10.1128/jb.173.19.6270-6278.1991.
- Setlow, B. and Setlow, P. (1980) ‘Measurements of the pH within dormant and germinated bacterial spores’, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 77(5 I), pp. 2474–2476. doi: 10.1073/pnas.77.5.2474.
- Setlow, B. and Setlow, P. (1987) ‘Thymidine-containing dimers as well as spore photoproducts are found in ultraviolet-irradiated *Bacillus subtilis* spores that lack small acid-soluble proteins’, *Proceedings of the National*



*Academy of Sciences of the United States of America*, 84(2), pp. 421–423. doi: 10.1073/pnas.84.2.421.

Setlow, B. and Setlow, P. (1994) ‘Small, acid-soluble proteins bound to DNA protect *Bacillus subtilis* spores from m Being Killed by Freeze-Drying’, *Applied and Environmental Microbiology*, 61(7), pp. 2787–2790. doi: 10.1128/aem.61.7.2787-2790.1995.

Setlow, B. and Setlow, P. (1995) ‘Small, acid-soluble proteins bound to DNA protect *Bacillus subtilis* spores from killing by dry heat’, *Applied and Environmental Microbiology*, 61(7), pp. 2787–2790. doi: 10.1128/aem.61.7.2787-2790.1995.

Setlow, P. (2001) ‘Resistance of spores of *Bacillus species* to ultraviolet light’, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 38(2–3), pp. 97–104. doi: 10.1002/em.1058.

Setlow, P. (2006) ‘Spores of *Bacillus subtilis*: Their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals’, *Journal of Applied Microbiology*, 101(3), pp. 514–525. doi: 10.1111/j.1365-2672.2005.02736.x.

Setlow, P. (2007) ‘I will survive: DNA protection in bacterial spores’, *Trends in Microbiology*, 15(4), pp. 172–180. doi: 10.1016/j.tim.2007.02.004.

Setlow, P. (2014) ‘Germination of spores of *Bacillus species*: What we know and do not know’, *Journal of Bacteriology*, 196(7), pp. 1297–1305. doi: 10.1128/JB.01455-13.

Setlow, P. and Christie, G. (2021) ‘What’s new and notable in bacterial spore killing!’, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. Springer Netherlands, 37(8), pp. 1–13. doi: 10.1007/s11274-021-03108-0.

Setlow, P. and Li, L. (2015) ‘Photochemistry and Photobiology of the Spore Photoproduct: A 50-Year Journey’, *Photochemistry and Photobiology*, 91(6), pp. 1263–1290. doi: 10.1111/php.12506.

Slieman, T. A. and Nicholson, W. L. (2000) ‘Artificial and solar UV radiation induces strand breaks and cyclobutane pyrimidine dimers in *Bacillus subtilis* spore DNA’, *Applied and Environmental Microbiology*, 66(1), pp. 199–205. doi: 10.1128/AEM.66.1.199-205.2000.

Slieman, T. A. and Nicholson, W. L. (2001a) ‘Role of Dipicolinic Acid in Survival of *Bacillus subtilis* Spores Exposed to Artificial and Solar UV Radiation’, *Applied and Environmental Microbiology*, 67(3), pp. 1274–1279. doi: 10.1128/AEM.67.3.1274-1279.2001.

Slieman, T. A. and Nicholson, W. L. (2001b) ‘Role of Dipicolinic Acid in Survival of *Bacillus subtilis* Spores Exposed to Artificial and Solar UV Radiation’, *Applied and Environmental Microbiology*, 67(3), pp. 1274–1279. doi: 10.1128/AEM.67.3.1274-1279.2001.

Slieman, T. A., Rebeil, R. and Nicholson, W. L. (2000) ‘Spore photoproduct (SP) lyase from *Bacillus subtilis* specifically binds to and cleaves SP (5-thyminy1-5,6-dihydrothymine) but not cyclobutane pyrimidine dimers in UV-irradiated DNA’, *Journal of Bacteriology*, 182(22), pp. 6412–6417. doi: 10.1128/JB.182.22.6412-6417.2000.

Svobodova, A., Walterova, D. and Vostalova, J. (2006) ‘Ultraviolet light induced alteration to the skin.’, *Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacký, Olomouc, Czechoslovakia*, 150(1), pp. 25–

38. doi: 10.5507/bp.2006.003.

Takumi, K., Kinouchi, T. and Kawata, T. (1979) 'Isolation and Partial Characterization of Exosporium from Spores of a Highly Sporogenic Mutant of *Clostridium botulinum* Type A Abstract Homogeneous fragments of exosporium were isolated and purified from type A strain 1901 . The exosporium was composed of', *Microbiology and Immunology*, 23(6), pp. 443–454.

Timms, N. E. *et al.* (2019) 'New shock microstructures in titanite (CaTiSiO<sub>5</sub>) from the peak ring of the Chicxulub impact structure, Mexico', *Contributions to Mineralogy and Petrology*, 174(5). doi: 10.1007/s00410-019-1565-7.

Tocheva, E. I., Ortega, D. R. and Jensen, G. J. (2016) 'Sporulation, bacterial cell envelopes and the origin of life', *Nature Reviews Microbiology*. Nature Publishing Group, 14(8), pp. 535–542. doi: 10.1038/nrmicro.2016.85.

Tremarin, A., Brandão, T. R. S. and Silva, C. L. M. (2017) 'Inactivation kinetics of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in apple juice submitted to ultraviolet radiation', *Food Control*. Elsevier Ltd, 73, pp. 18–23. doi: 10.1016/j.foodcont.2016.07.008.

Tyrrell, R. M. (1978) 'SOLAR DOSIMETRY WITH REPAIR DEFICIENT BIOLOGICAL SYSTEMS', *Photochemistry and Photobiology*, 27, pp. 571–579.

Vasudevan, P. *et al.* (2007) 'Spore cortex formation in *Bacillus subtilis* is regulated by accumulation of peptidoglycan precursors under the control of sigma K', *Molecular Microbiology*, 65(6), pp. 1582–1594. doi: 10.1111/j.1365-2958.2007.05896.x.

Vreeland, R. H., Rosenzweig, W. D. and Powers, D. W. (2000) 'Isolation of a 250 million-year-old halotolerant bacterium from a primary salt crystal', *Nature*, 407, pp. 897–900.

Wang, W. *et al.* (2011) 'Chromosome organization by a nucleoid-associated protein in live bacteria', *Science*, 333(6048), pp. 1445–1449. doi: 10.1126/science.1204697.

Wen, J. *et al.* (2019) 'Visualization of germinosomes and the inner membrane in *Bacillus subtilis* spores', *Journal of Visualized Experiments*, 2019(146), pp. 1–9. doi: 10.3791/59388.

Williamson, C. E. *et al.* (2014) 'Solar ultraviolet radiation in a changing climate', *Nature Climate Change*, 4(6), pp. 434–441. doi: 10.1038/nclimate2225.

Wittmann, A. *et al.* (2021) 'Shock impedance amplified impact deformation of zircon in granitic rocks from the Chicxulub impact crater', *Earth and Planetary Science Letters*. Elsevier B.V., 575, p. 117201. doi: 10.1016/j.epsl.2021.117201.

Wuytack, E. Y., Boven, S. and Michiels, C. W. (1998) 'Comparative study of pressure-induced germination of *Bacillus subtilis* spores at low and high pressures', *Applied and Environmental Microbiology*, 64(9), pp. 3220–3224. doi: 10.1128/aem.64.9.3220-3224.1998.

Xing, Y. and Harper, W. F. (2020) 'Bacillus spore awakening: recent discoveries and technological

developments', *Current Opinion in Biotechnology*. Elsevier Ltd, 64, pp. 110–115. doi: 10.1016/j.copbio.2019.12.024.

Xue, Y. and Nicholson, W. L. (1996) 'The two major spore DNA repair pathways, nucleotide excision repair and spore photoproduct lyase, are sufficient for the resistance of *Bacillus subtilis* spores to artificial UV-C and UV-B but not to solar radiation', *Applied and Environmental Microbiology*, 62(7), pp. 2221–2227. doi: 10.1128/aem.62.7.2221-2227.1996.

Yang, L. and Li, L. (2015) 'Spore photoproduct lyase: The known, the controversial, and the unknown', *Journal of Biological Chemistry*, 290(7), pp. 4003–4009. doi: 10.1074/jbc.R114.573675.

Zammuto, V. *et al.* (2018) 'Comparing spore resistance of bacillus strains isolated from hydrothermal vents and spacecraft assembly facilities to environmental stressors and decontamination treatments', *Astrobiology*, 18(11), pp. 1425–1434. doi: 10.1089/ast.2017.1715.

Zhang, M. *et al.* (2012) 'Rational design of true monomeric and bright photoactivatable fluorescent proteins', *Nature Methods*. Nature Publishing Group, 9(7), pp. 727–729. doi: 10.1038/nmeth.2021.

Zhang, S. *et al.* (2018) 'Induction of *Escherichia coli* into a VBNC state by continuous-flow UVC and subsequent changes in metabolic activity at the single-cell level', *Frontiers in Microbiology*, 9(SEP), pp. 1–11. doi: 10.3389/fmicb.2018.02243.

Zhang, Y. and Mathys, A. (2019) 'Superdormant spores as a hurdle for gentle germination-inactivation based spore control strategies', *Frontiers in Microbiology*, 9(3163), pp. 1–10. doi: 10.3389/fmicb.2018.03163.

**Titre :** Résistance des spores de *Bacillus subtilis* face aux UV - Implication du DPA et caractérisation par microscopie photonique.

**Mots clés :** Spore bactérienne, Ultraviolet (UV), photochimie, Acide dipicolinique (DPA), photoproduits.

**Résumé :** Ce projet de thèse a eu pour objectif d'étudier la résistance aux UVc des spores de *Bacillus subtilis*. La première partie de ce projet s'est focalisée sur la molécule d'acide dipicolinique (DPA) qui est connue pour être impliquée dans la résistance des spores aux UV. Cependant des zones d'ombre restaient encore non élucidées. Il est notamment connu que cette molécule forme des photoproduits fluorescents (DPAP), qui étaient encore non identifiés au début de ce projet. Aucune information concernant le rôle de ces DPAP dans la résistance aux UVc n'était alors disponible. Au cours de ce projet un protocole a été établi pour suivre l'apparition des ces photoproduits directement à l'intérieur du protoplaste des spores. Une méthode a également été mise en place pour introduire artificiellement des DPAP dans des spores. Certains de ces DPAP semblent avoir des effets bénéfiques pour les spores, en augmentant leur taux de germination, leur croissance et leur résistance aux UVc.

Enfin, il semble que l'hydratation du DPA au moment de l'exposition aux UVc influence la formation des DPAP.

La seconde partie de ce projet a quant à elle été dédiée à la mise en place d'une exposition équivalente à de l'UVc directement sous microscope et l'observation directe des dégâts engendrés sur les spores. L'utilisation d'un laser pulsé infrarouge pour fournir une énergie équivalente à celle des UV a cependant révélé que les dégâts engendrés sont différents de ceux trouvés en UV. Étonnement, les spores ne sont que deux fois plus résistantes que les cellules végétatives face à cette exposition. Les premiers résultats montrent que le DPA ne semble ici par avoir de rôle significatif. Finalement, la dernière partie de ce projet a été consacrée à la mise au point d'un marquage des structures de la spore compatible avec des méthodes d'imagerie super résolue PALM/STORM.

**Title :** UV resistance of *Bacillus subtilis* spores - Role of DPA and characterisation by photonic microscopy

**Keywords :** bacterial spore, ultraviolet (UV), photochemistry, dipicolinic acid (DPA), photoproducts

**Abstract :** The aim of this project was to study the UVc resistance of *Bacillus subtilis* spores. The first part of this project focused on the dipicolinic acid molecule (DPA) which is known to be involved in the UV resistance of spores. However, some points remain unresolved. In particular, it is known that this molecule forms fluorescent photoproducts (DPAP), which were not identified at the beginning of this project. No information concerning the role of these DPAP in UVC resistance was available at that time. During this project, a protocol was established to follow the appearance of these photoproducts directly inside the spore core. A method was also set up to artificially introduce DPAP into the spores. Some of these DPAP seem to have beneficial effects for the spores, by increasing their germination rate, their growth and their resistance to UVc.

Finally, it seems that the hydration of DPA at the time of UVc exposure influences the formation of DPAP.

The second part of this project was devoted to setting up a UVc equivalent exposure directly under the microscope and directly observing the damage caused on the spores. Using a pulsed infrared laser to provide UV equivalent energy, however, revealed that the damage caused is different from that found in UV. Surprisingly, the spores were only twice as resistant as the vegetative cells to this exposure. The first results show that DPA does not seem to have a significant role here. Finally, the last part of this project was devoted to the development of a labeling of spore structures compatible with PALM/STORM super-resolved imaging methods.