

Compréhension des phénomènes impliqués dans l'inactivation des spores bactériennes par un procédé combinant haute pression et température

Fatima Fekraoui

▶ **To cite this version:**

Fatima Fekraoui. Compréhension des phénomènes impliqués dans l'inactivation des spores bactériennes par un procédé combinant haute pression et température. Génie des procédés. Université Bourgogne Franche-Comté, 2022. Français. NNT : 2022UBFCK100 . tel-04032310

HAL Id: tel-04032310
https://theses.hal.science/tel-04032310

Submitted on 16 Mar 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.

THÈSE DE DOCTORAT DE L'ÉTABLISSEMENT UNIVERSITÉ BOURGOGNE FRANCHE-COMTÉ

PRÉPARÉE A L'INSTITUT AGRO DIJON

Unité Mixte de Recherche **P**rocédés **A**limentaires et **M**icrobiologiques,
Laboratoire **P**rocédés **M**icrobiologiques et **B**iotechnologiques

Ecole doctorale n°554

Environnement - Santé

Doctorat Sciences des Aliments

Spécialité Biotechnologies Agro-alimentaires

Fatima FEKRAOUI

Compréhension des phénomènes impliqués dans l'inactivation des spores bactériennes par un procédé combinant Hautes Pressions et température

Thèse présentée et soutenue à Dijon, le 16 décembre 2022

Composition du Jury :

Mme Sandrine GUILLOU	Ingénieure de Recherche, SECALIM, ONIRIS, Nantes	Rapportrice
Mr Alain LARGETEAU	Ingénieur de Recherche, ICMCB, Bordeaux	Rapporteur
Mme Véronique BROUSSOLLE	Directrice de Recherche, UMR SQPOV, Avignon	Examinatrice
Mr Louis COROLLER	Professeur, LUBEM, Quimper	Président du jury
Mr Jean-Marie PERRIER-CORNET	Professeur, UMR PAM, Dijon	Directeur de thèse
Mme Hélène GERARD-SIMONIN	Maître de conférences, UMR PAM, Dijon	Co-directrice de thèse
Mme Stella PLANCHON	Docteur, CTPCA, Avignon	Invitée

REMERCIEMENTS

Je remercie l'Institut Carnot Qualiment pour le financement du projet sHPore, dans lequel s'inscrit cette thèse.

Je remercie Madame Sandrine Guillou ainsi que Monsieur Alain Largeteau d'avoir accepté d'être mes rapporteurs de thèse.

Mes remerciements s'adressent également aux membres de mon comité de thèse, Madame Véronique Broussolle et Monsieur Louis Coroller, pour nos échanges constructifs et leurs conseils avisés au cours des réunions annuelles. Je vous remercie d'avoir accepté d'examiner ce travail de thèse.

A mes directeurs de thèse, le Professeur Jean-Marie Perrier-Cornet et le Docteur Hélène Simonin, je vous remercie de m'avoir accueillie au laboratoire et d'avoir dirigé cette thèse. Jean-Marie, je vous suis reconnaissante de m'avoir initiée aux HP. Merci pour votre disponibilité, que ce soit pour nos discussions mais aussi pour votre aide au laboratoire sur l'équipement HP. Hélène, je te remercie pour ta bienveillance, ton soutien sans faille et ta disponibilité.

Je remercie le Docteur Nathalie Paniel et le Docteur Stéphane André pour leur implication dans le projet sHPore. Je remercie également le Docteur Stella Planchon d'avoir accepté de participer à mon jury de thèse.

Merci également au Docteur Hélène Licandro et au Docteur Cosette Granvalet pour leur aide lorsque nous avons travaillé sur la mise en place de mutants bactériens.

Un énorme merci au Docteur Pascale Winckler pour son aide sur le plateau Dimacell. Merci pour toutes les fois où tu m'as dépannée sur l'utilisation des équipements (notamment lorsque le microscope confocal en faisait des siennes !) et cela même à distance. Pascale, merci pour ton soutien !

Je tiens également à adresser un grand remerciement à tout le personnel du laboratoire PMB. Merci à Sylvie Moundanga pour son aide et sa gentillesse. Merci à Marie-Claire et Laetitia pour leur appui technique mais également pour leur bonne humeur au quotidien. Je remercie le Docteur Ambroise Marin pour sa

disponibilité et son aide en analyse d'images. Merci au Docteur Eric Ferret de m'avoir initiée à la modélisation.

Un grand merci à mes stagiaires Yakup Yilmaz et Olivia Auvy pour leur contribution à ces travaux de thèse.

Un merci particulier à mes collègues doctorants et post-doctorants de l'équipe PMB, mais également des autres équipes de l'UMR pour les bons moments partagés mais aussi pour leur écoute et soutien ! Je pense à Pauline et Jérémy, Emilie L. et Emilie B., Thibault. Edouard pour nos échanges sur les sporulés, mais également Estelle, Thierry, Chloé A., et bien sûr Axelle ! Une pensée particulière aux membres de la team spore, Mr Pacheco et Mr Dikec : Mme Fekraoui vous remercie pour votre présence, votre bonne humeur et votre soutien !

Je voudrais remercier chaleureusement quelques personnes rencontrées au cours de ma vie et qui ont contribué positivement, sûrement sans le savoir, à la réussite de mes études. Je pense à Monsieur Saïd Toukhi et à Houria de ma ville d'origine, Tinghir. A Monsieur Lombard, je vous serai éternellement reconnaissante pour le temps que vous m'avez accordé à mon arrivée en France pour ma bonne intégration. C'était en 2002, il y a 20 ans déjà, mais l'humanité dont vous avez fait preuve me marquera à jamais. Merci à Madame Catherine Dalle Nogare, Madame Piron, Monsieur Olivier Lacour. Une pensée chaleureuse pour Danièle Noirot, merci ! Je remercie également Annabel (Mme Guyon), Sonia et Laurent (Mr Buttin) pour m'avoir soutenu et pour avoir cru en moi.

Enfin, un grand merci à mes amis (pensée chaleureuse pour Sarah et Zoulikha) et à ma famille (à mes oncles et tantes, mes cousins et cousines, aussi bien Fekraoui que El Mamoun !). Une pensée chaleureuse à Aissa, mon grand-frère de cœur, ainsi qu'à Hanane : merci d'être là pour moi (et pour tous les petits plats ayant voyagé de Montpellier à Dijon). A mes petits loulous Joudia, Kinane et Dalal <3.

A mes grands-parents paternels, je vous suis reconnaissante pour votre soutien sans faille et pour tout ce que vous m'avez apporté et appris ! A ma grand-mère maternelle, merci d'être présente quotidiennement malgré les milliers de kilomètres qui nous séparent. Vos devises de vie « gue izme issiwidne orda itkde ! »

et « ghir tre, hate tssoulte a tafte » m'ont permis de me construire. A vous trois donc : adawne ikhlfe rabbi g dou3ate noun, adawne i3fo molana, igawne taghzi n la3mre !

A mes sœurs et à mon frère. Amal, la signification de ton prénom en dit long sur notre parcours ! Merci de m'avoir redonné espoir quand il le fallait, de m'avoir écouté et supporté. Lamia (tarcha9eyte inou, nad iss7itirne lahdate d tatssa awde g lo9te n tmourkissine), Salima (ilisse n baba nimi ghigh ad awigh lmoulikate ak n l3alam), Aymane (mimisse n mama, or ili madak ikssen amazoz ngh wakha t3awde tghzifte ar igna). Je suis fière d'être votre grande sœur et rien que pour ça, je vous remercie !

A special thanks to Mohamed, "zawja dialek" nimi ghor ta7lite !

Un merci ne suffirait pas pour exprimer ma gratitude à mes parents : Ahmed et Keltouma. Bien que nous ne vivions pas sur le même continent, vous êtes des parents exemplaires, toujours présents pour moi. Baba, tbditassente e tkawine nke g takhatarte wala tamzante, taghtassente afoss s lkhatre d trwi, ar aha tinite « ayna tramte, nawitid ! ghir hroumte day ! ». Mama, orchine tough awal agh aha tinite « ouna issbrne, orssar touraz » ; m9ar agh ifta zmane, sbre nem d tanoumi nem issde gmigh. Da tmnagh ad tftakhrem soyna skrgh doynane iwtgh sgue mad tssbrem adagh ifto lb7re.

A mon défunt Babalhaj : ak ir7am molana irz9agh sbre …

SYMBOLES & ABREVIATIONS

Abréviation	Nom complet
ADN	Acide désoxyribonucléique
AGFK	Asparagine, Glucose, Fructose, KCl
ANOVA	Analyse de la variance
ARN	Acide ribonucléique
ATP	Adénosine triphosphate
A_w	Activité de l'eau
Bodipy-C10	(p-alkyl-phenyl)-4,40-difluoro-4-bora-3a,4adiaza-s-indacene
Bodipy-C12	Meso-phenyl-4,4'-difluoro-4-bora-3a,4adiaza-s-indacene
$CaCl_2$	Chlorure de calcium
CaDPA	Acide dipicolinique chélaté au calcium
CFU	« Colonie Forming Unit », Unité Formant Colonie (UFC)
CLE	« Cortex Lytic Enzyme », Enzymes lytiques du cortex
D	Valeur de réduction décimale
D_T	Valeur de réduction décimale à la température T
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DO	Densité Optique
DTT	Dithiothréitol
FLIM	Microscopie en temps de vie de fluorescence, « Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy »
GR	Récepteur de Germination, « Germinant Receptor »
Gpr	Germination protéase
HCl	Chlorure d'hydrogène
HP	Haute Pression
HPSD	« High Pressure Super Dormant », spores superdormantes aux Hautes Pressions
IP	Iodure de Propidium, « Propidium iodide » (PI)
LB	Luria Broth
MAL	Résidus δ-lactames muramiques
MES	« 2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid »
NAM	Résidus d'acides N-acétyl-muramique

Pa	Pascal ; Mégapascal (MPa) ; Gigapascal (GPa)
PBS	Tampon phosphate salin
pH	Potentiel hydrogène
SASP	Small, acid-soluble spore proteins
SD	Super-dormant
TS	Tampon Tryptone sel
WT	« Wild Type », souche sauvage
Z	Augmentation de la température nécessaire pour réduire d'un log la valeur de D
2xSG	« Double strength Schaeffer's glucose »

TABLE DES MATIERES

Remerciements 3
Symboles & Abréviations 9
Table des matières 13
Table des illustrations 19
Introduction 2
Synthèse bibliographique 6
1. Les spores bactériennes et leurs résistances 8
1.1. Processus de sporulation 9
1.2. Structure et propriétés de résistance des spores bactériennes 11
1.3. Processus de germination 15
1.4. Hétérogénéité de la germination des spores et phénomène de superdormance 24
2. Les stratégies d'investigations des mécanismes d'inactivation des spores bactériennes 28
2.1. Suivi des marqueurs endogènes et exogènes des spores bactériennes 28
2.2. Modifications des propriétés des spores bactériennes 33
2.3. Modélisation des cinétiques d'inactivation des spores bactériennes 43
3. Les effets des pressions sur les spores bactériennes 48
3.1. Effet de la pression sur la structure des spores bactériennes 48
3.2. Effets des basses pressions sur les spores bactériennes 49
3.3. Effets des hautes pressions (>400 MPa) sur les spores bactériennes 52
3.4. Effets des pressions combinées à d'autres facteurs pour l'inactivation des spores bactériennes 54
3.5. Utilisation du procédé HP dans l'industrie agroalimentaire 58
Problématique & axes de recherche 60
Chapitre 1 64
Effets des traitements HP cycliques sur la germination et l'inactivation des spores bactériennes 64
1. Introduction et Objectifs 66
2. Cycling versus Continuous High Pressure treatments at moderate temperatures: Effect on bacterial spores? 67
2.1. Introduction 68
2.2. Materials and methods 70
2.3. Results and discussion 76
2.4. Conclusion 94
2.5. Funding sources 94
3. Conclusion du chapitre 1 95
Chapitre 2 96

Vers une investigation des mécanismes d'inactivation des spores bactériennes par les HP 96
1. Introduction et Objectifs 98
2. Démarche expérimentale 98
2.1. Préparation et conditionnement des spores à traiter 98
2.2. Plan d'expériences 98
2.3. Suivi des marqueurs 100
3. Résultats 102
3.1. Germination et inactivation des spores suite aux traitements étudiés 102
3.2. Caractérisation des spores par les marqueurs biologiques suite aux différents traitements d'étude 103
3.3. Suivis de la germination après les différents traitements d'étude 104
4. Discussion 125
5. Conclusion du chapitre 2 130
Chapitre 3 132
Mise en place d'une méthode de caractérisation de la viscosité des structures hydrophobes des spores bactériennes par imagerie de fluorescence FLIM 132
1. Introduction 134
2. Durée de vie de fluorescence 134
2.1. Principe 134
2.2. Techniques utilisées pour l'analyse des images FLIM 135
2.3. Systèmes d'acquisition des temps de vie de fluorescence 137
2.4. Calibration du système FLIM sur le microscope confocal 138
3. Utilisation d'un rotor moléculaire pour la caractérisation de la viscosité 139
3.1. Description du rotor moléculaire utilisé dans cette étude 141
3.2. Corrélation entre viscosité et temps de fluorescence du rotor moléculaire 142
3.3. Calibration du temps de vie du Bodipy-C10 en fonction de la viscosité 142
4. Application à la caractérisation de la viscosité des structures hydrophobes des spores bactériennes 150
4.1. Incorporation du rotor moléculaire dans les spores bactériennes 150
4.2. Analyse des mesures FLIM – apport des différentes méthodes 150
4.3. Spores PS533 (souche sauvage) et PS4150 (mutant sans manteau protéique) 150
4.4. Evolution des temps de vie de fluorescence du Bodipy-C10 dans les spores avant et après traitements en pression et température 155
5. Discussion 160
6. Conclusion du chapitre 3 161
Conclusion générale 162
Références 170

Annexes 190

Annexe 1 192

Annexe 2 193

Annexe 3 : Valorisations des travaux de thèse 194

* Communications écrites 194
* Communications affichées 194
* Communications orales 194

Annexe 4 : Enseignements 196

TABLE DES ILLUSTRATIONS

- ***Liste des Figures***

Figure 1 : Cycle de sporulation décrit chez B. subtilis (Leggett et al., 2012). _____ 10
Figure 2 : Structure schématique de la spore bactérienne. La taille des différentes structures n'est pas à l'échelle. Il est à noter que l'exosporium n'est pas retrouvé chez toutes les espèces bactériennes, notamment chez le modèle d'étude B. subtilis. _____ 11
Figure 3* : Représentation schématique de la revivification des spores de B. subtilis suite à un traitement thermique d'activation et à une induction de la germination par des éléments nutritifs. Cadres en pointillés : hypothèses retrouvées dans la littérature. _____ 15
Figure 4* : Localisation des protéines impliquées dans le processus de germination des spores de B. subtilis. Abréviations : P = protoplaste, MI = membrane interne ; Pc = paroi cellulaire ; Cx = cortex ; ME = membrane externe ; M = manteau. _____ 20
Figure 5 : Observation en microscopie électronique d'une spore de B. subtilis (coupe longitudinale) et mise en évidence des vésicules membranaires extrudées dans le noyau (zoom sur l'encadré en blanc). Abréviations : Co = noyau ; cm = membrane interne ; cx = cortex et ct = manteau. D'après (Laue et al., 2018).____ 20
Figure 6 : Observations en microscopie électronique à transmission d'une spore dormante (A) et d'une spore superdormante (B) isolée après un traitement HP (6 min, 150 MPa, 37°C), spores de B. subtilis. Abréviations : Co = protoplaste ; IM = membrane interne ; Cw = paroi cellulaire ; Cx = cortex ; OM = membrane externe ; ISC = enveloppe interne du manteau ; OSC = enveloppe externe du manteau. D'après (Delbrück, Zhang, Hug, et al., 2021). _____ 26
Figure 7 : Observations en microscopie à contraste de phase de spores de B. subtilis. (a) Spores dormantes réfringentes (phase « Bright »). (b) Spores germées (phase « Dark »). _____ 29
Figure 8 : Graphiques représentatifs de l'évolution en cytométrie en flux des états physiologiques des spores de B. subtilis traitées par HP à 150 MPa, 37°C. A) signal de fond. B) Spores non traitées et marquées au Syto16 et IP. C-F) Spores traitées HP et marquées au Syto16 et IP avec C) 3 min, D) 10 min, E) 20 min et F) 40 min de traitement. Les événements sont représentés sur un graphique de densité à l'échelle biexponentielle de Syto16 par rapport à IP. On distingue 4 sous-populations au cours du traitement correspondant aux spores dormantes (R1), spores germées (R2), spores germées présentant des dommages sublétaux partiels (R3), spores avec membrane altérée probablement « inactivées » (R4). D'après (Y. Zhang, Delbrück, et al., 2020).____ 32
Figure 9* : Définition graphique du paramètre D_T à partir d'une courbe de destruction. _____ 44
Figure 10* : Définition graphique du paramètre Z_T _____ 44
Figure 11* : Représentation schématique de la germination physiologique des spores de B. subtilis induite par les basses pressions. Abréviations : MI = membrane interne ; Cx = cortex. _____ 50
Figure 12* : Mécanismes d'induction de la germination des spores en fonction des barèmes du traitement sous pression conduisant à leur inactivation. Abréviations : P = pression ; T = température ; t = durée de traitement. _____ 55
Figure 13 : Characteristics of cycling and continuous HP treatments. Pressure recording is plotted as a black line and temperature as a gray one. _____ 74
Figure 14* : Inactivation model based on the spore germination sequence wherein D + HPSD represents the initial population composed of dormant (D) and superdormant spores (HPSD), G1 represents germinated spores at stage 1, G2 germinated spores at stage 2, and I inactivated spores by the treatment. k_1, k_2 and k_3 are model parameters (s^{-1}). _____ 75

* Les figures sont réalisées sur BioRender.com

Figure 15 : Inactivation of B. cereus spores in a suspension of infant milk after pressure treatments. Bar: 4 pulses × 5 min, 350 MPa, 38°C, with a time between pulses of 5 min. Dashed curve: continuous HP treatments for 5, 20, and 35 min. Error bars represent SD calculated from independent triplicates. _____ 77
Figure 16 : Effect of pulse number (1, 2, 3 or 5) on germination and inactivation of pressure treated B. subtilis spores. Bacillus subtilis spores were suspended in MES buffer solution and treated at 350 MPa, 40 °C, pulse holding time of 5 min, and time between pulses of 5 min. Curves: inactivation (black dashed curve) and germination (gray solid curve) of spores treated by continuous HP treatments. Bars: inactivation (dark gray bars) and germination (light gray bars) of spores treated by pressure cycling. Error bars represent SD calculated from independent triplicates; (*) indicate statistically significant difference ($p < 0.05$) between the equivalent continuous and cycling HP treatments. _____ 81
Figure 17 : Effect of pulse number (1, 2, 3, 4 or 5) on inactivation of pressure treated B. cereus spores. The black dashed curve represents inactivation of spores treated by continuous HP treatments. Gray columns represent inactivation of spores treated by pressure cycling. Bacillus cereus spores were suspended in TS buffer solution and treated at 300 MPa, 50 or 60 °C, pulse holding time of 5 min, time between pulses of 1 min. Error bars represent SD calculated from independent triplicates. _____ 82
Figure 18 : Effect of time between pulses (intercycles) on germination and inactivation of pressure-treated B. subtilis spores. 3 or 5 pulses × 5 min, 350 MPa, 40°C. Bars: inactivation (dark gray bars) and germination (light gray bars) of spores treated by pressure cycling. Error bars represent SD calculated from independent triplicates. _____ 85
Figure 19 : Effect of time between pulses (intercycles) on inactivation of pressure-treated B. cereus spores. 3, 4, or 5 pulses × 5 min, 400 MPa, 60°C. Error bars represent SD calculated from independent triplicates. _____ 85
Figure 20 : Inactivation of B. subtilis spores after pressure treatments using various compression and decompression rates. Curves: inactivation (black dashed curve) and germination (gray solid curve) of spores treated by continuous HP treatments. Bars: inactivation (dark gray bars) and germination (light gray bars) of spores treated by pressure cycling. 350 MPa, 40°C, 4 pulses of 5 min, with 5 min between pulses. **1**: CR = 17.5 $MPa.s^{-1}$, DR = 350 $MPa.s^{-1}$; **2**: CR = 2.5 $MPa.s^{-1}$, DR = 8.75 $MPa.s^{-1}$; **3**: CR = 1.17 $MPa.s^{-1}$, DR = 1.17 $MPa.s^{-1}$; **4**: CR = 1 $MPa.s^{-1}$, DR = 1 $MPa.s^{-1}$; **5**: CR = 0.58 $MPa.s^{-1}$, DR = 0.58 $MPa.s^{-1}$. _____ 87
Figure 21 : Evolution of the different stages of B. subtilis spore germination and inactivation as a function of holding time under continuous HP treatment (350 MPa, 40°C). Solid red curve represents calculated dormant spores (D); dashed blue curve represents calculated stage 1-germinated spores (G1); dotted yellow curve represents calculated stage 2-germinated spores (G2); and dash-dotted purple curve represents calculated inactivated spores (I). Solid purple dots represent experimentally inactivated spores (Iexp); empty red dots represent experimentally HPHT treated spores (NHPTexp). _____ 90
Figure 22 : Rate fitting for continuous HP treatments of B. subtilis spores (k_1, k_2 were obtained by optimization whereas k_3 was adapted from (Heinz & Knorr, 1996), in s^{-1}). Solid blue curve, dashed orange curve and dotted yellow curve represent k_1, k_2, and k_3 calculated rates, respectively._____ 91
Figure 23 : Evolution of the different stages of B. subtilis spore germination and inactivation as a function of pulses number (350 MPa, 40°C). Solid red curve represents calculated dormant spores (D); dashed blue curve represents calculated stage 1-germinated spores (G1); dotted yellow curve represents calculated stage 2-germinated spores (G2); and dash-dotted purple curve represents calculated inactivated spores (I). Purple dots represent experimentally inactivated spores (Iexp); red points represent experimentally HPHT-treated spores (NHPTexp). _____ 93

Figure 24* : Méthodes de caractérisation des spores de B. subtilis avant (t = 0) et après un traitement HP (t = HP). La caractérisation à t = G correspond au suivi de la germination des spores traitées HP. _____ 100
Figure 25 : Impact des traitements à différents barèmes de pression et de température sur la germination et l'inactivation des spores de B. subtilis PS533. Traitement **BPBT** : 20 minutes 300 MPa 40 °C. Traitement **HPBT** : 90 minutes 500 MPa 40 °C. Traitement **HPHT** : 2 minutes 500 MPa 70 °C. Traitement **TT** : 8 minutes 97 °C. La ligne pointillée rouge indique la limite de détection (LD). Les barres d'erreur correspondent aux écarts-types calculés à partir d'au moins 3 répétitions indépendantes. Les lettres représentent une différence significative ($p < 0,05$) obtenue avec le test de Tukey sur les données d'inactivation (lettres majuscules) et sur les données de germination (lettres minuscules). _____ 102
Figure 26 : Suivis de la chute de DO à 620 nm (A) et du marquage Syto/IP (B) après le traitement BPBT (t = BPBT) et suite à l'incubation post-traitement BPBT dans différents milieux de germination. Les barres d'erreur correspondent aux écarts-types calculés à partir des 6 répétitions réalisées. ____ 109
Figure 27 : A) Suivi des différents stades physiologiques après le traitement BPBT et après incubation des spores traitées BPBT dans les différents milieux de germination. B) Etat des spores après le traitement BPBT d'après l'évolution obtenue dans les différents milieux. _____ 110
Figure 28 : Suivi de la chute de DO à 620 nm (A) et du marquage Syto/IP (B) après le traitement HPBT (t = HPBT) et suite à l'incubation post-traitement HPBT dans les différents milieux de germination. Les barres d'erreur correspondent aux écarts-types calculés à partir des 6 répétitions réalisées. ____ 114
Figure 29 : A) Suivi des différents stades physiologiques après le traitement HPBT et après incubation des spores traitées HPBT dans les différents milieux de germination. B) Etat des spores après le traitement HPBT d'après l'évolution obtenus dans les différents milieux. _____ 115
Figure 30 : Suivi de la chute de DO à 620 nm (A) et du marquage Syto/IP (B) après le traitement HPHT (t = HPHT) et suite à l'incubation post-traitement HPHT dans différents milieux de germination. Les barres d'erreur correspondent aux écarts-types calculés à partir des 6 répétitions réalisées. ____ 119
Figure 31 : Suivi des différents stades physiologiques après le traitement HPHT et après incubation des spores traitées HPHT dans les différents milieux de germination. B) Etat des spores après le traitement HPHT d'après l'évolution obtenue dans les différents milieux. _____ 120
Figure 32 : Suivi de la chute de DO à 620 nm (A) et du marquage Syto/IP (B) après le traitement TT (t = TT) et suite à l'incubation post traitement TT dans différents milieux de germination. Les barres d'erreur correspondent aux écarts-types calculés à partir des 6 répétitions réalisées._____ 123
Figure 33 : Evolution des différents stades physiologiques suite au traitement TT et après l'incubation des spores traitées TT dans les différentes conditions de germination. _____ 124
Figure 34* : Synthèse de l'évolution des spores de B. subtilis pendant les traitements HP étudiés (flèche de couleur claire) et au retour à pression atmosphérique en incubation pendant 2 heures à 37 °C (flèche de couleur foncée). _____ 129
Figure 35 : Principe de la méthode TCSPC. **A)** Le détecteur mesure le temps d'arrivée de chaque photon après une impulsion laser. **B)** Les temps d'arrivées des photons sont ensuite regroupés dans un graphique de distribution._____ 135
Figure 36 : Exemples de courbes des résidus (différence entre les données expérimentales et le modèle exponentiel appliqué) obtenues suite à deux ajustements exponentiels du déclin de fluorescence, via le logiciel FLIMfit. _____ 136
Figure 37 : Représentation graphique du Phasor plot (Colyer et al., 2008). _____ 137

* Les Figures sont réalisées sur BioRender.com

Figure 38 : Projection graphique sur le Phasor plot du temps de vie de fluorescence de la fluorescéine (0,2 mM dans l'eau). Le temps de vie indiqué correspond à la tangente de l'angle, appelée taux phi (τ_ϕ). _____ 139
Figure 39 : **A)** Exemple de rotor moléculaire : le DCVJ. Le mouvement de rotation est indiqué par la flèche noire. **B)** Extension du diagramme de Jablonski pour les rotors moléculaires : sont présentées les deux voies de désexcitation (émission de fluorescence à partir de l'état LE ou relaxation non fluorescente à partir de l'état TICT) pour un retour à l'état fondamental. D'après (Haidekker & Theodorakis, 2010). _____ 140
Figure 40* : Voies de désexcitation d'un rotor moléculaire (Bodipy-R) en fonction de la viscosité de son microenvironnement (ici membranes). **A)** Désexcitation non fluorescente à partir de l'état TICT en environnement fluide. **B)** Désexcitation par émission de fluorescence à partir de l'état « plan » LE en environnement visqueux. _____ 140
Figure 41 : Formule chimique du Bodipy-C10 (Kuimova et al., 2008). La flèche rouge indique la rotation intramoléculaire du rotor favorisée lors d'une diminution de viscosité de son environnement. __ 141
Figure 42 : Evolution de la viscosité en fonction de la concentration en glycérol dans le mélange glycérol/méthanol, à 25 °C. N > 3 échantillons. _____ 143
Figure 43 : Distribution graphique des temps de vie de fluorescence du Bodipy-C10 dans les mélanges de glycérol/méthanol (nombre d'acquisitions analysées par condition : n > 3). _____ 145
Figure 44 : Courbes de calibration de la durée de vie de fluorescence du Bodipy-C10 en fonction de la viscosité des mélanges de glycérol/méthanol. _____ 147
Figure 45 : Distribution graphique des temps de vie de fluorescence du Bodipy-C10 dans une solution de glycérol à 80 % soumise à une rampe thermique de 15 à 53 °C (nombre d'acquisitions analysées par condition : n = 1). _____ 148
Figure 46 : Distribution graphique en Phasor plot de la fluorescence du Bodipy-C10 dans les spores de la souche sauvage (PS533) et du mutant dépourvu des protéines du manteau (PS4150) de B. subtilis. Seuls sont figurés les barycentres des différents points des spores analysées. _____ 154
Figure 47 : Distribution graphique Phasor de la fluorescence du Bodipy-C10 dans les spores de la souche PS533 **(A)** et dans les spores du mutants PS4150 **(B)** avant (témoin) et après traitement physique ou thermique. Traitement **TT** : 15 minutes à 121 °C ; Traitement **HPHT** : 500 MPa, 70 °C ; Traitement **HPBT** : 300 MPa, 40 °C ; Traitement **BPBT** : 300 MPa, 40 °C. Les traitements HPHT, HPBT et BPBT permettent une destruction d'un log de la population initiale. _____ 158
Figure 48 : Distribution graphique des temps de vie de fluorescence du Bodipy-C10 dans les spores PS4150 traitées HPHT (**A**). Dans cet exemple d'acquisition, la projection Phasor met en évidence trois populations de spores (vert, bleu, orange). A droite, l'indication de l'appartenance de chaque spore à une population dans l'image en intensité de fluorescence (**B**). _____ 159
Figure 49* : Distinction des différents stades physiologiques de la spore bactérienne grâce à la microscopie à contraste de phase et à la microscopie de fluorescence (double marquage Syto9/IP), suite à un traitement HP. Les spores traitées HP sont remises en suspension dans différentes conditions de germination (cadre orange) permettant de suivre l'évolution des spores dormantes ou partiellement germées suite au traitement HP (flèche orange). _____ 192
Figure 50 : Effet du traitement haute pression (15 minutes, 300 MPa) à différentes températures sur l'inactivation des spores de B. subtilis. _____ 193
Figure 51 : Effet du traitement thermique (6 minutes, 97 °C) combiné au traitement haute pression (15 minutes, 300 MPa) à différentes températures sur l'inactivation des spores de B. subtilis. _____ 193

* Les Figures sont réalisées sur BioRender.com

- ***Liste des Tableaux***

Tableau 1 : Exemples de mutants de B. subtilis étudiés pour mettre en évidence les mécanismes de résistance aux procédés de destruction._____ 35
Tableau 2 : Modifications des conditions de sporulation et impacts sur la structure et la résistance des spores de B. subtilis_____ 41
Tableau 3 : Impact des différents traitements d'étude sur les dénombrements UFC, la chute de DO, la réfringence et le marquage des spores au Syto9/IP. **BPBT** : 20 minutes, 300 MPa, 40 °C ; **HPBT** : 90 minutes, 500 MPa, 40 °C ; **HPHT** : 2 minutes, 500 MPa, 70 °C ; **TT** : 8 minutes, 97 °C. Pour chaque traitement, les valeurs indiquées correspondent aux moyennes de 6 répétitions indépendantes. Pour les observations en microscopie, le comptage est réalisé sur un nombre de spores supérieur à 500. _____ 103
Tableau 4 : Paramètres des équipements pour les acquisitions des temps de vie de fluorescence du Bodipy-C10. _____ 138
Tableau 5 : Temps de vie de fluorescence (ns) du Bodipy-C10 dans les mélanges glycérol/méthanol. τ_ϕ et τ correspondent aux temps de vie déterminés à température ambiante (25 °C) par l'analyse Phasor Plot et par l'analyse par ajustement exponentiel FLIMfit, respectivement. La viscosité calculée pour les différents mélanges également indiquée. _____ 145
Tableau 6 : Temps de vie de fluorescence (ns) et viscosités correspondantes du Bodipy-C10 dans une solution de glycérol à 80 % mesurés entre 15 et 53 °C. τ_ϕ et τ correspondent aux temps de vie déterminés par l'analyse Phasor Plot et par l'analyse par ajustement exponentiel (FLIMfit), respectivement._____ 148
Tableau 7 : Temps de vie de fluorescence du Bodipy-C10 dans les spores de B. subtilis déterminés par analyse FLIMfit. _____ 154

INTRODUCTION

Les spores bactériennes sont des formes dormantes mises en place par les bactéries lorsqu'elles sont confrontées à des conditions défavorables à leur croissance. Ces spores sont caractérisées par une composition structurale complexe leur conférant des propriétés de résistance aux stress environnementaux (physiques, chimiques et thermiques). Du fait de leur omniprésence dans l'environnement, les spores bactériennes se retrouvent dans les matières premières utilisées pour la production d'aliments qui peuvent alors permettre leur germination, c'est-à-dire leur retour à l'état végétatif. Les industries agro-alimentaires doivent donc veiller à réduire la présence de ces contaminants pour stabiliser les produits fabriqués et garantir leur sécurité sanitaire. Ces industries emploient des procédés de préservation des aliments pour éviter la présence de pathogènes ou de flores d'altération dans leurs produits ou tout au moins limiter leur développement.

L'utilisation de Hautes Pressions hydrostatiques (HP) est une technologie employée industriellement pour pasteuriser certains aliments : appliqué à froid, ce procédé permet de respecter les propriétés organoleptiques et nutritionnelles des produits, tout en éliminant par inactivation les flores pathogènes et d'altération sous formes végétatives.

Néanmoins, l'utilisation de cette technologie reste peu répandue à l'échelle industrielle du fait de son coût mais aussi de son manque d'efficacité sur l'inactivation des spores bactériennes. En effet, les spores semblent résister à des pressions allant jusqu'à 1000 MPa à température ambiante (28 °C). La pression semble par contre déclencher la germination des spores par des mécanismes différents selon le niveau de pression appliqué avant d'inactiver les spores germées. Cependant, il reste toujours des spores non germées qui résistent au traitement et qui peuvent donc germer et se développer pendant le stockage des produits.

Une optimisation de ce procédé, en développant une stratégie associant les HP à d'autres paramètres (notamment les cycles de pression, la température ou autres), pourrait permettre l'élimination des spores dans les matrices alimentaires. A l'heure actuelle, ces procédés ne sont pas mis en place à l'échelle industrielle car les résultats obtenus sont limités à des expériences de laboratoire encore diverses et contradictoires et les mécanismes d'inactivation des spores par les HP dans ces conditions restent encore hypothétiques.

C'est dans ce contexte que s'inscrit la thèse intitulée « Compréhension des phénomènes impliqués dans l'inactivation des spores bactériennes par un procédé combinant Hautes Pressions et température ». L'objectif est d'apporter des éléments de compréhension des mécanismes mis en jeu au cours de l'inactivation des spores par les HP combinées avec des traitements thermiques, appliqués de façon séquentielle ou simultanée. Ces éclairages pourraient contribuer à définir les conditions de traitement qui permettraient une stabilisation de la flore sporulée dans les matrices alimentaires.

Ces travaux de recherche sont présentés dans ce manuscrit. Celui-ci débute par une synthèse bibliographique pour étayer la lecture de cette thèse. Elle comprend notamment des informations générales sur les spores bactériennes, leur cycle de vie comportant la sporulation et la germination, ainsi que leur structure. Une attention particulière est portée aux spécificités des spores pouvant être exploitées dans des stratégies d'investigations, dans le cadre du développement de procédés de destruction. Les effets des HP sur les spores bactériennes et le développement industriel du procédé HP sont également présentés. A la fin de la synthèse bibliographique, les questions de recherche et les objectifs à l'origine de ce travail sont présentés. Les résultats de ces travaux de recherche ainsi que leur discussion sont présentés en trois chapitres, qui traitent respectivement de la caractérisation de l'effet de traitements HP cycliques sur les spores, l'investigation des mécanismes d'inactivation qui entrent en jeu et la mise en place d'une méthode de marquage biologique de pointe pour évaluer l'état membranaires des spores traitées par HP. Enfin, une conclusion générale est présentée.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Sommaire

1. Les spores bactériennes et leurs résistances 8

1.1. Processus de sporulation 9

1.2. Structure et propriétés de résistance des spores bactériennes 11

1.3. Processus de germination 15

1.4. Hétérogénéité de la germination des spores et phénomène de superdormance 24

2. Les stratégies d'investigations des mécanismes d'inactivation des spores bactériennes 28

2.1. Suivi des marqueurs endogènes et exogènes des spores bactériennes 28

2.2. Modifications des propriétés des spores bactériennes 33

2.3. Modélisation des cinétiques d'inactivation des spores bactériennes 43

3. Les effets des pressions sur les spores bactériennes 48

3.1. Effet de la pression sur la structure des spores bactériennes 48

3.2. Effets des basses pressions sur les spores bactériennes 49

3.3. Effets des hautes pressions (>400 MPa) sur les spores bactériennes 52

3.4. Effets des pressions combinées à d'autres facteurs pour l'inactivation des spores bactériennes 54

3.5. Utilisation du procédé HP dans l'industrie agroalimentaire 58

1. Les spores bactériennes et leurs résistances

Les spores constituent un problème majeur dans l'industrie alimentaire du fait de leurs résistances aux procédés de stabilisation des aliments. Ce sont principalement les espèces des genres *Bacillus* et *Clostridium* qui sont associés aux problèmes d'altérations des aliments et/ou de risque sanitaire. Pour le genre *Bacillus*, les principales espèces d'altérations sont *Bacillus coagulans* (bactérie lactique, responsable d'une acidification et d'un défaut d'arômes des produits), *Bacillus licheniformis*, *Bacillus pumilis* (tous deux responsables d'acidifications et de défaut d'arômes des produits), et *Bacillus subtilis* (Oomes et al., 2007). Pour le genre *Clostridium*, les espèces d'altérations sont *Clostridium sporogenes* (responsable d'altération de produit présentant une forte odeur de putréfaction), *Clostridium butyricum* (responsable d'éclatement de meules, d'acidification et de défaut d'arôme dans les fromages). Les altérations des produits alimentaires sont dues à la survie des spores aux procédés de décontaminations et à leur germination pour donner de nouvelles cellules végétatives pendant le stockage de produits finis.

D'autres espèces de ces deux genres bactériens représentent des risques sanitaires du fait de leur pathogénicité et de leur implication dans des cas d'intoxications alimentaires. C'est notamment le cas des espèces sporulées *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens* ou encore *Clostridium botulinum* (P. Setlow & Johnson, 2019; Wells-Bennik et al., 2016). Nous distinguons différentes origines d'intoxications alimentaires liées aux spores bactériennes :

- La consommation d'aliments contaminés par des spores pathogènes qui vont germer et se développer dans l'intestin.
- La consommation d'aliments contaminés par des cellules végétatives, suite à la germination des spores dans les produits. C'est le cas de cellules végétatives de *C. perfringens* qui une fois ingérées vont sporuler dans l'intestin et produire des toxines responsables de symptômes tels que la diarrhée, les crampes abdominales et les nausées.
- La consommation d'aliments contaminés par des toxines synthétisées suite à la germination des spores dans les produits. Par exemple, l'ingestion directe de la toxine botulique, produite par *C. botulinum* est à l'origine de la maladie du botulisme.

1.1. Processus de sporulation

Certaines bactéries appartenant au phylum des *Firmicutes*, plus précisément aux classes *Bacilli* et *Clostridia*, sont capables de former des spores (Al-Hinai et al., 2015). Les spores bactériennes résultent du processus de sporulation qui se met en place lorsque les conditions environnementales sont défavorables à la croissance bactérienne ou en présence de signaux déclencheurs. Les signaux déclencheurs de la sporulation sont propres à chaque genre bactérien. Ainsi, chez le genre *Bacillus*, c'est la carence nutritionnelle qui est à l'origine de l'entrée en sporulation. Concernant les Clostridies, la sporulation est initiée par la carence nutritionnelle mais d'autres facteurs tels que la production d'acides organiques et la présence d'oxygène ou d'agents chimiques peuvent contribuer à son déclenchement (Gauvry et al., 2017).

Le processus de sporulation est divisé en sept stades et est semblable chez toutes les espèces de bactéries sporulées (**Figure 1**) (Leggett et al., 2012). Dans un premier temps, le processus de division cellulaire est initié par la phosphorylation du facteur de transcription Spo0A, par le biais d'une cascade de kinases qui coordonne un système de phospho-relais (Higgins & Dworkin, 2012). Il s'agit du régulateur principal de la sporulation dont l'expression est également régulée par le facteur σ^H. Une fois activé, le facteur Spo0A régule l'expression des gènes impliqués dans la division cellulaire asymétrique, ainsi que des gènes impliqués dans l'activation des facteurs sigma spécifiques de la sporulation (σ^E, σ^F, σ^G et σ^K). Ces derniers facteurs sont impliqués dans les changements morphologiques de la spore, décrits dans les différents stades de sporulation présentés ci-dessous.

Au cours du stade II de sporulation, la cellule végétative se divise de manière asymétrique pour former deux compartiments séparés par un septum (**Figure 1**). Le petit compartiment constitue la préspore en formation. Au stade III de sporulation, la préspore est englobée par la membrane de la cellule mère. L'endospore ainsi formée possède deux membranes distinctes : la membrane interne, celle de la cellule fille, et la membrane externe, inversée et issue de la cellule mère. Au cours du stade IV, le cortex se forme entre les deux membranes suite à l'accumulation du peptidoglycane. La synthèse des couches externes se poursuit par la formation du manteau au cours du stade V. Au cours de ces deux derniers stades, la cellule mère produit en parallèle une molécule spécifique aux spores bactériennes : l'acide

dipicolinique (DPA). Le DPA s'accumule ensuite dans l'endospore sous forme chélatée avec le calcium (Ca^{2+}). Cette accumulation en acide dipicolinique chélaté au calcium (CaDPA) s'accompagne par une déshydratation du cœur de l'endospore. Des protéines SASP de type α/β (« small acid-soluble DNA-binding protein ») sont également synthétisées et saturent l'ADN afin de le protéger. La maturation de la spore a lieu au cours du stade VI durant lequel l'endospore acquiert ses propriétés de résistance à la chaleur et aux agents chimiques. Enfin, au stade VII, la spore mature est libérée par lyse de la cellule mère.

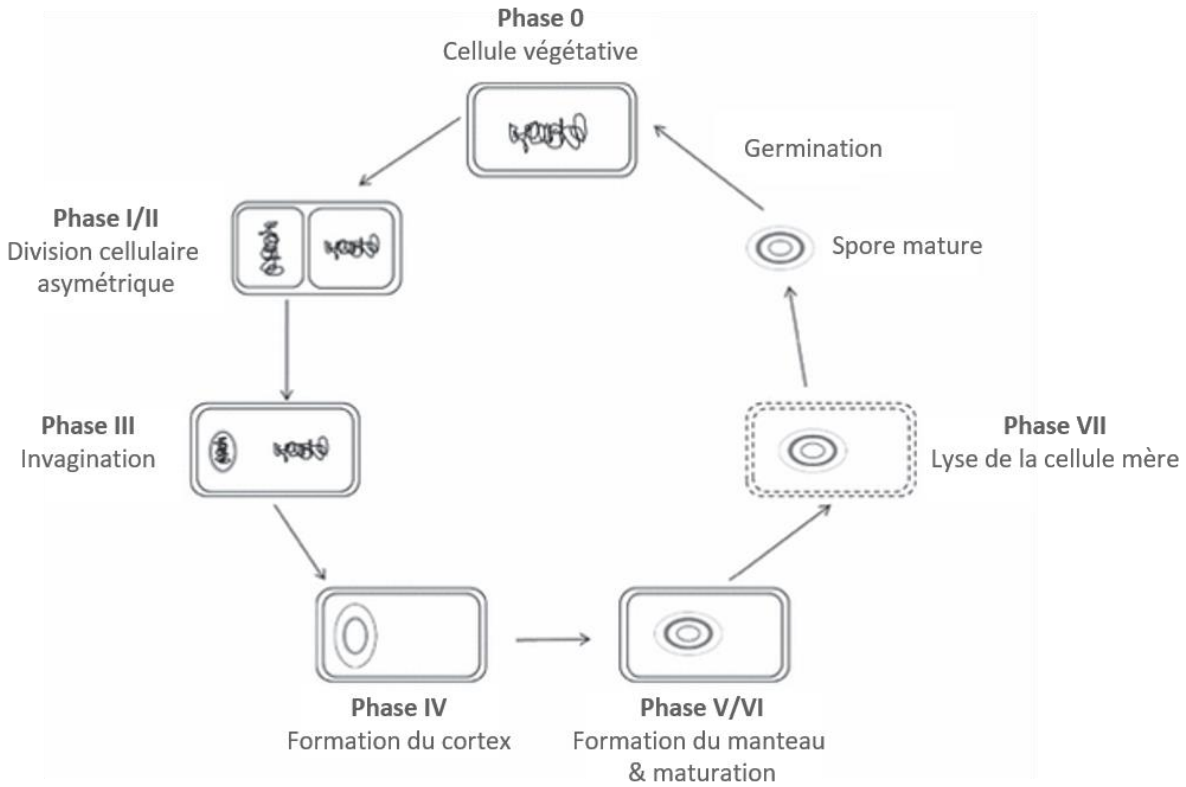


Figure 1 *: Cycle de sporulation décrit chez B. subtilis* (Leggett et al., 2012).

1.2. Structure et propriétés de résistance des spores bactériennes

Les spores bactériennes sont caractérisées par une composition structurale complexe et un nombre de constituants et de caractéristiques uniques, leur conférant des propriétés de résistance aux perturbations environnementales extrêmes. Une représentation schématique des différentes structures de la spore est présentée dans la **Figure 2**.

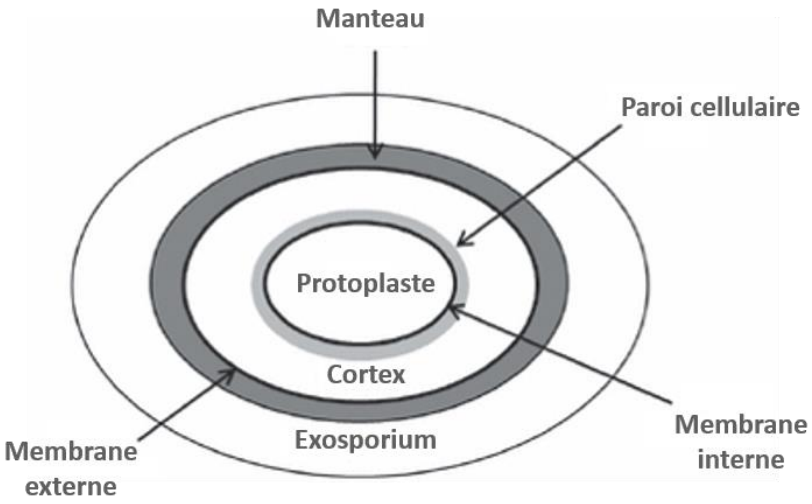


Figure 2 *: Structure schématique de la spore bactérienne. La taille des différentes structures n'est pas à l'échelle. Il est à noter que l'exosporium n'est pas retrouvé chez toutes les espèces bactériennes, notamment chez le modèle d'étude B. subtilis.*

Ainsi, de la couche la plus externe à la plus interne, nous distinguons :

1.2.1. L'exosporium

Retrouvé à la surface de certaines *Clostridia* et *Bacilli*, cette couche est principalement composée de protéines (43-52 %), de lipides (15-18 %) et de sucres (20-22 %). La composition de l'exosporium lui confère des propriétés d'adhérence et d'hydrophobicité mais elle n'intervient pas dans la résistance de la spore (Henriques & Moran, 2007). Cette couche externe n'est pas retrouvée chez toutes les espèces bactériennes. Par exemple, les spores de *B. subtilis* ne possèdent pas d'exosporium.

1.2.2. Le manteau

Sous l'exosporium se trouve le manteau. Cette couche est caractérisée par une diversité protéique représentant 50 à 80 % des protéines totales de la spore (Abhyankar et al., 2014). Le manteau des spores de *B. subtilis* est composé de deux couches : l'enveloppe interne et

l'enveloppe externe. En microscopie électronique, ces deux enveloppes se distinguent par l'aspect lamellaire et moins dense de la couche interne, tandis que la couche externe ne possède pas cette structure lamellaire et apparaît plus dense aux électrons (Leggett et al., 2012) (comme observé en **Figure 6**, **partie 1.4**). Le manteau sert de barrière protégeant le cortex contre les enzymes de dégradation du peptidoglycane (Nicholson et al., 2000). Ainsi, cette barrière physique semble empêcher l'accès des enzymes, tel que le lysozyme, aux couches internes. De par la présence de certaines enzymes dans cette structure, le manteau sert également de mécanisme de résistance contre de nombreux produits chimiques, tels que les agents oxydants (dioxyde de chlore, hypochlorite, ozone) (P. Setlow, 2006). Récemment, les protéines GerP ont été localisées dans le manteau de la spore bactérienne. Ces protéines semblent impliquées dans la germination mais pourraient également avoir un rôle structurel associé à la perméabilité de cette structure (A. Ghosh et al., 2018).

1.2.3. La membrane externe

La membrane externe localisée en dessous du manteau protéique est une structure importante lors de la formation de la spore (Popham, 2002). Cependant, la fonction précise de cette membrane n'est pas connue. Elle ne sert pas de barrière de perméabilité et elle ne constitue pas une barrière de protection puisque son retrait par lyse chimique n'a pas d'effet notable sur la résistance des spores aux radiations, à la chaleur, et aux agents chimiques (Nicholson et al., 2000).

1.2.4. Le cortex

Sous la membrane externe se trouve le cortex. Le cortex est composé de peptidoglycane, présentant des différences par rapport au peptidoglycane de la paroi de cellules végétatives. Ce peptidoglycane est notamment caractérisé par l'absence de chaînes latérales peptidiques au niveau des résidus d'acides N-acétyl-muramique (NAM). Celles-ci sont remplacées par des résidus δ-lactames muramiques (MAL), spécifiques aux spores (Popham, 2002; Popham et al., 1996). Le cortex est également caractérisé par la présence d'enzymes, SleB et CwlJ, requises lors du processus de germination. Ces enzymes permettent l'hydrolyse du cortex au niveau des résidus MAL. Concernant le rôle de cette structure, le cortex semble exercer une résistance mécanique permettant de maintenir le niveau de déshydratation du protoplaste et par conséquent l'état de dormance de la spore (Popham, 2002).

1.2.5. La paroi cellulaire

La paroi cellulaire située sous le cortex possède une structure similaire à la paroi des cellules végétatives (constituée de peptidoglycane). Elle n'intervient pas dans la résistance de la spore mais elle sert de paroi cellulaire à la spore germée en développement (P. Setlow, 2006). Outre le fait que la paroi cellulaire de la spore constitue la paroi de la cellule végétative émanant de la spore germée, cette structure semble être importante au cours du processus de sporulation puisqu'elle sert d'amorce pour la synthèse du peptidoglycane du cortex (Popham & Bernhards, 2015).

1.2.6. La membrane interne

Contrairement à la membrane externe, la membrane interne constitue une forte barrière de perméabilité, y compris contre les molécules de petite taille telles que l'eau et la méthylamine (dont la masse molaire est de 31,05 g/mol). Ainsi, la membrane interne de la spore possède une perméabilité à l'eau pouvant être 100 fois moins importante à celle de la membrane d'une cellule végétative (Sunde et al., 2009). L'état de la membrane interne permet le maintien de l'état déshydraté du cœur de la spore (Popham, 2002). Cette caractéristique d'imperméabilité confère à la membrane un rôle clé dans la résistance des spores aux agents chimiques pouvant endommager l'ADN (Cortezzo & Setlow, 2005). Les agents oxydants entraînent une augmentation de la perméabilité de la membrane des spores bactériennes et ainsi la libération du CaDPA du protoplaste, comme cela a été démontré (Cortezzo & Setlow, 2005). Les mécanismes de destruction des spores par ces agents oxydants impliquent des dommages à la membrane interne mais le dommage exact causé sur la membrane interne n'est pas connu. L'étude sur des mutants bactériens dont la composition en acides gras insaturés a été changée montre des profils de résistances aux agents oxydants semblables à ceux des spores non modifiées. Cela a permis de démontrer qu'une oxydation des acides gras insaturés par ces agents oxydants n'est pas à l'origine des dommages causés à la membrane interne (Cortezzo et al., 2004; Cortezzo & Setlow, 2005).

La structure de la membrane interne est compacte avec une organisation très rapprochée des phospholipides et une mobilité très réduite (Cowan et al., 2004). En effet, des analyses biophysiques mettent en évidence l'état 1,3 à 1,6 fois plus comprimé des lipides dans la membrane interne par rapport à ceux de la membrane d'une cellule végétative malgré une

composition assez proche (Cowan et al., 2004; Leggett et al., 2012). La membrane interne de la spore possède une composition lipidique similaire à celle de la cellule végétative ; toutefois, une proportion de cardiolipides plus élevée a été observée chez la spore bactérienne (Griffiths & Setlow, 2009).

Outre ses propriétés de résistance, la membrane interne est également caractérisée par sa capacité de régulation de la germination. En effet, c'est au sein de cette structure que sont localisées les principales protéines impliquées dans le processus de germination, à savoir les récepteurs de germination (GR) et les canaux codés par l'opéron *spo*VA responsables de l'entrée du DPA dans la préspore et de sa sortie lors du processus de germination (P. Setlow, 2003). Lors de la germination, la membrane interne perd toutes ses propriétés spécifiques et devient ainsi la membrane plasmique de la nouvelle cellule végétative.

1.2.7. Le protoplaste

La structure la plus interne de la spore est appelée le protoplaste. Celui-ci contient le matériel génétique, les ribosomes, les ARN ainsi que les enzymes indispensables à l'émergence d'une nouvelle cellule viable lorsque les conditions redeviennent favorables. Le protoplaste est caractérisé par sa déshydratation. En effet, la teneur en eau représente 27 à 55 % du poids humide de la spore, conférant des propriétés de résistance à la chaleur humide. La faible perméabilité de la membrane interne, renforcée par la tenue mécanique du cortex, et l'accumulation du DPA dans le protoplaste (représentant 5 à 15 % du poids sec de la spore et plus de 20 % du poids du protoplaste) permettent de maintenir cette faible teneur en eau (P. Setlow, 2006). Les protéines SASP (représentant 5 à 10 % des protéines du noyau) saturent l'ADN sporal et le protègent notamment contre les rayonnements UV, les produits chimiques (peroxyde d'hydrogène, acide nitreux et formaldéhyde), la dessiccation et les rayonnements γ (P. Setlow, 1988, 1995). L'ensemble acide dipicolinique et protéines SASP permet une protection vis-à-vis de la chaleur humide (Paidhungat et al., 2000). De même, la dégradation des SASP au cours de la germination constitue une source de carbone et d'énergie pouvant être utilisée par la spore pour donner une cellule végétative (Moir & Smith, 1990).

1.3. Processus de germination

Lorsque les conditions redeviennent favorables à la croissance bactérienne, la spore redevient une cellule végétative par le processus de germination. C'est une fois germées que les spores bactériennes sont capables d'altérer les aliments et/ou bien de produire les toxines dans le cas des espèces toxi-infectieuses. Par conséquent, il est essentiel de comprendre le processus de germination pour pouvoir les inactiver. La germination des spores de *Bacillus* peut être induite par exposition à 1) des éléments nutritifs tels que les acides aminés, 2) des éléments non-nutritifs tels que CaDPA, le dodécylamine, des fragments de peptidoglycane, et 3) des traitements physiques telles que les hautes pressions ou encore l'abrasion (P. Setlow, 2014). Ce processus se déroule en plusieurs étapes (**Figure 3**) que nous détaillons ci-dessous et en se référant à la germination induite par des éléments nutritifs.

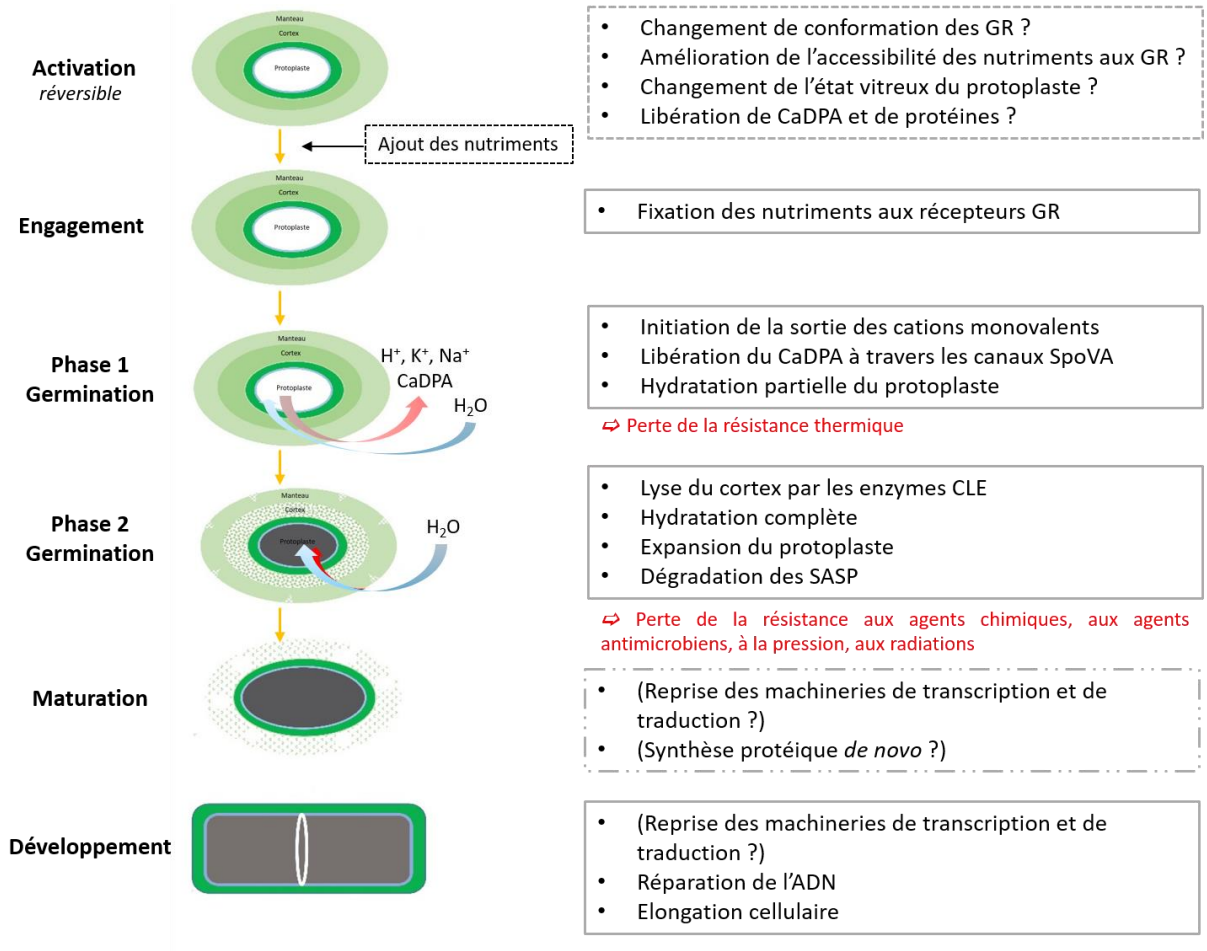


Figure 3 *: Représentation schématique de la revivification des spores de B. subtilis suite à un traitement thermique d'activation et à une induction de la germination par des éléments nutritifs. Cadres en pointillés : hypothèses retrouvées dans la littérature.*

1.3.1. L'activation

Tout commence par une étape d'activation, étape réversible et non indispensable, qui peut se faire par un changement de température (choc thermique de 30 minutes à 70 °C), un changement de pH (abaissement du pH) ou par exposition à un produit chimique (tel que le β-mercaptoéthanol) (P. Setlow, 2006, 2014). C'est l'activation par le traitement thermique qui a été la plus étudiée. Elle permettrait d'augmenter le taux de germination mais le mécanisme exact à l'origine de cette activation reste encore à élucider. Des hypothèses ont été émises à ce sujet : l'activation thermique permettrait un changement de conformation des récepteurs de germination les rendant plus réceptifs aux nutriments, ou bien elle permettrait une amélioration de l'accessibilité des récepteurs de germination par un mécanisme encore peu décrit (Luu et al., 2015; P. Setlow, 2014; P. Zhang et al., 2009). D'autres études en revanche ont suggéré le changement de l'état vitreux du noyau (Ablett et al., 1999) ou la libération du CaDPA et de protéines (Alimova et al., 2006) comme hypothèses à l'origine du mécanisme d'activation par le traitement thermique.

1.3.2. L'engagement

L'étape d'engagement est une étape irréversible et se produit en présence d'éléments nutritifs, d'éléments chimiques ou de conditions physiques particulières. Dans le cas de la germination par des éléments nutritifs, il faut une interaction entre les nutriments et les récepteurs GR, localisés au niveau de la membrane interne, pour initier le processus (P. Setlow, 2014).

Les spores de *B. subtilis* possèdent trois types de récepteurs GR fonctionnels : GerA, GerB, et GerK, comme illustrés dans la **Figure 4**. Ces protéines GR sont généralement constituées de 3 sous-unités A, B et C (par exemple GerAA, GerAB et GerAC), chacune codée par un opéron tricistronique exprimé dans la préspore pendant le stade tardif de sporulation. Des études expérimentales ont démontré que les sous-unités A et B sont des protéines intégrées dans la membrane interne, tandis que la sous-unité C est une lipoprotéine ancrée dans la membrane (Christie & Setlow, 2020; P. Setlow, 2014).

Chez les spores de *B. subtilis*, c'est le récepteur GerA qui est le plus abondant et qui permet de déclencher l'initiation de la germination lorsqu'elle est induite par les éléments nutritifs

tels que les acides aminés L-Valine et L-Alanine. Les récepteurs GerB et GerK sont quant à eux impliqués dans l'induction de la germination par le complexe AGFK (L-Asparagine, D-Fructose, D-Glucose et ions potassium) (P. Setlow, 2003). Une étude publiée en 2013 montre que les spores de *B. subtilis* contiennent près de 2500 récepteurs GR (environ 1100 molécules de GerAA et GerAC et environ 700 molécules de GerBC et GerKA) (Stewart & Setlow, 2013). Cependant, la quantité de récepteurs GR au sein des spores est très hétérogène et varie d'une spore à l'autre dans une même population.

Chez les espèces du genre *Bacillus*, une autre protéine est impliquée dans le processus de germination bien que sa conformation et sa composition diffèrent des autres récepteurs GR. Il s'agit de la protéine trimère GerD, également localisée dans la membrane interne et retrouvée en grande quantité (environ 3500-4000 molécules). Il semblerait que les protéines GerD forment un complexe avec les autres récepteurs GR, complexe appelé germinosome (Griffiths et al., 2011). En effet, en absence de ces protéines, les récepteurs GR sont dispersés dans la membrane interne. Cette protéine pourrait être impliquée dans la transduction du signal de germination des récepteurs GR aux autres composants impliqués dans le processus (notamment les protéines SpoVA). Il a été montré que les spores dépourvues de cette protéine GerD germent 10 fois plus lentement lorsqu'elles sont induites en germination par des éléments nutritifs (P. Setlow et al., 2017). De même, des analyses « western blot » montrent que les protéines GerD sont dégradées très rapidement après l'initiation de la germination (diminution de 50 % des protéines GerD dans les 15 première minutes), alors que le niveau des autres protéines impliquées dans la germination reste constant (Troiano et al., 2015).

La protéine GerP semble être importante pour l'initiation de la germination. Cette protéine est exprimée pendant la sporulation et est localisée dans le manteau. GerP serait impliquée dans le cheminement des éléments nutritifs à travers les couches externes de la spore (manteau, membrane externe, cortex, paroi) (A. Ghosh et al., 2018; P. Setlow et al., 2017). En effet, une mutation sur le gène codant pour cette protéine entraîne une diminution de la germination induite par les éléments nutritifs, probablement en raison de l'inaccessibilité des nutriments aux récepteurs GR (Butzin et al., 2012).

Cette initiation de la germination entraîne une série de changements de structure et de physiologie dont la perte de la résistance de la spore et le rétablissement des activités enzymatiques (Moir & Smith, 1990).

1.3.3. Les deux étapes de germination

La germination est très rapide à l'échelle d'une spore (30 secondes à 2 minutes), mais cela peut être plus long à l'échelle d'une population (jusqu'à 30 minutes) (Sinai et al., 2015). On distingue généralement deux phases dans le processus de la germination, qui se déroulent sans activité métabolique.

Au cours de la **phase 1** a lieu le relargage des cations monovalents (H^+, Na^+, K^+) par le transporteur GerN (probablement couplé aux récepteurs GR) (Thackray et al., 2001). Il est suivi par la libération du CaDPA, via les canaux SpoVA, qui sont sensibles à la modification de la tension membranaire (Tovar-Rojo et al., 2002). C'est l'opéron *spo*VA qui code pour 7 protéines membranaires : spoVAA, spoVAB, spoVAC, spoVAD, spoVAEa, spoVAEb et spoVAF (**Figure 4**). Quelques études rapportent une interaction physique entre les protéines SpoVA et les récepteurs GR dans la membrane interne (Vepachedu & Setlow, 2007), interaction à confirmer en utilisant des techniques de microcopie super-résolution. Les protéines SpoVA sont plus abondantes dans les spores que les protéines GR (jusqu'à 6 fois plus en quantité) (P. Setlow et al., 2017; Stewart & Setlow, 2013).

A la fin de cette phase, le protoplaste de la spore est réhydraté de manière partielle. La réhydratation partielle du protoplaste ne permet pas la mobilité lipidique complète dans la membrane interne, la mobilité des protéines et l'activation des enzymes (notamment les enzymes SASP) (Cowan et al., 2003). A ce stade, la spore perd ses propriétés de résistance thermique et devient de nouveau sensible à la chaleur (Luu & Setlow, 2014).

Certains auteurs ne distinguent pas l'étape d'engagement de la phase 1 de germination : la phase 1 de germination débute alors dès l'interaction des éléments nutritifs avec les récepteurs GR. Toutefois, la libération de cations monovalents représente le premier événement biochimique mesurable (Moir et al., 2002; P. Setlow, 2003).

La phase 2 est marquée par la lyse du cortex au niveau des résidus MAL par les enzymes lytiques du cortex (CLE) : SleB et CwlJ (**Figure 4**). L'enzyme CwlJ est synthétisée dans la cellule

mère au cours de la sporulation et est localisée dans le manteau et/ou le cortex de la spore. SleB est quant à elle synthétisée dans la préspore et dans la cellule mère pendant la sporulation (P. Setlow et al., 2017) ; elle est également localisée dans le manteau et/ou cortex mais aussi dans la partie supérieure de la membrane interne (Bagyan & Setlow, 2002; Chirakkal et al., 2002). Ces enzymes lytiques sont présentes sous forme inactive dans les spores. Les mécanismes moléculaires à l'origine de ce maintien d'inactivité ne sont pas connus, tout comme les mécanismes permettant de les activer au cours du processus de germination (P. Setlow, 2014). Cependant, il a été observé expérimentalement que le CaDPA exogène stimule l'activité de l'enzyme CwlJ. Ainsi, il se pourrait que la libération du CaDPA au cours de la phase 1 entraîne l'activation de cette enzyme (Paidhungat et al., 2001). Pour l'enzyme SleB, la pression exercée par le protoplasme lors de sa réhydratation pourrait être à l'origine de son activation (P. Setlow, 2014).

La lyse du cortex entraîne une expansion du volume initial du protoplaste d'environ 2 fois suite à une réhydratation complète de ce dernier, entraînant ainsi une levée de la dormance. La surface de la membrane interne est augmentée d'environ 1,3 fois sans synthèse lipidique *de novo* mais plutôt grâce à l'intégration de petites vésicules lipidiques dans la membrane interne (Laue et al., 2018). En effet, une récente étude a mis en évidence la présence de vésicules de même composition que la membrane interne et qui sont vraisemblablement incorporées dans la membrane interne en expansion au cours de la germination (**Figure 5**). Les protéines SASP sont dégradées suite à l'activation d'une enzyme spécifique appelée Gpr (« germination protease »), libérant l'ADN pour la transcription. A la fin de cette phase, la spore germée perd complètement ses propriétés de réfringence et de résistance à la pression, aux agents chimiques et antimicrobiens (H. Nguyen Thi Minh et al., 2010; P. Setlow, 2003).

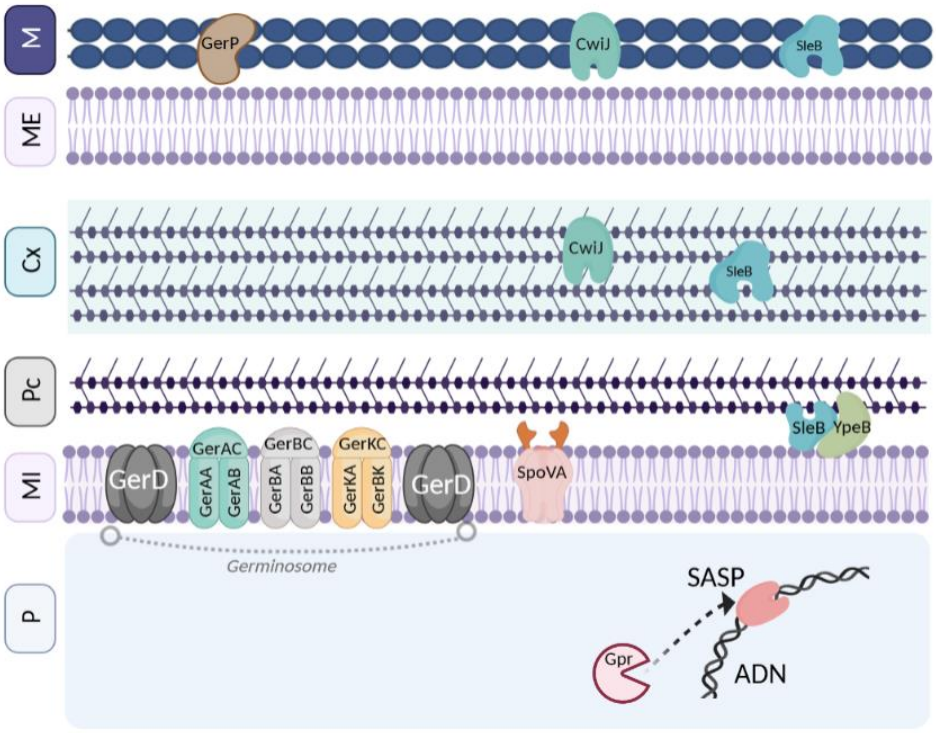


Figure 4 *: Localisation des protéines impliquées dans le processus de germination des spores de B. subtilis. Abréviations : P = protoplaste, MI = membrane interne ; Pc = paroi cellulaire ; Cx = cortex ; ME = membrane externe ; M = manteau.*

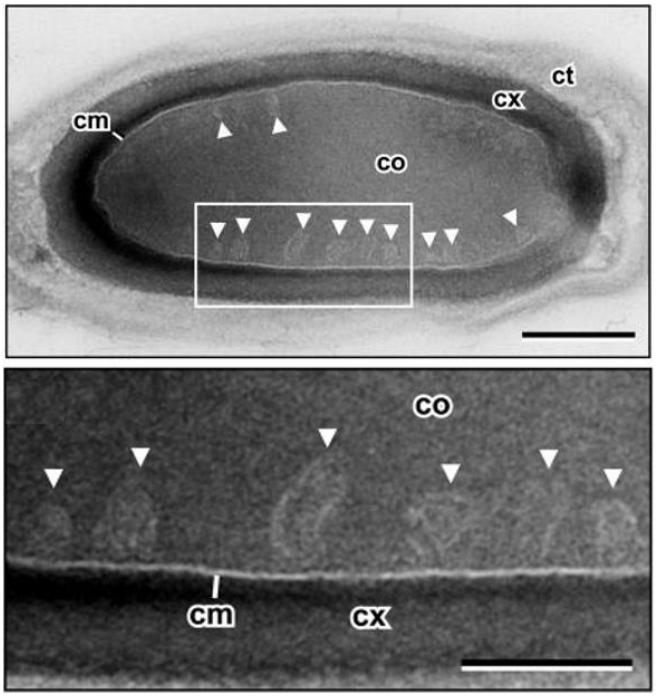


Figure 5 *: Observation en microscopie électronique d'une spore de B. subtilis (coupe longitudinale) et mise en évidence des vésicules membranaires extrudées dans le noyau (zoom sur l'encadré en blanc). Abréviations : Co = noyau ; cm = membrane interne ; cx = cortex et ct = manteau. D'après* (Laue et al., 2018).

1.3.4. Le développement

Jusqu'à récemment, il était communément admis que la revivification de la spore, correspondant à la levée de la dormance et à la reprise de croissance (appelée développement ou encore « Outgrowth »), était divisée en deux étapes. Dans une première étape, il y a la germination de la spore, constituée de deux phases, comme précédemment décrites ; puis le développement de la spore, durant lequel il y a synthèse de macromolécules (Moir, 2006; P. Setlow, 2003). Les premières études ont montré que la reprise de la machinerie génétique pendant le développement se déroulait comme suit :

- Dans les premières minutes du développement, il y a synthèse de l'ARN, à partir de nucléotides stockés dans la spore ou provenant de la dégradation d'anciens ARN (P. Setlow & Johnson, 2012).
- Ensuite, dans les 20 à 30 premières minutes du développement, il y a synthèse des protéines, à partir d'acides aminés provenant de la dégradation des SASPS qui se fait par l'endoprotéase Gpr. Cette endoprotéase est produite dans la préspore en même temps que les protéines SASP. Elle est sous forme inactive dans la spore jusqu'au moment de la dégradation des SASPs. Cependant, le mécanisme de transition de la forme inactive à la forme active n'est pas connu (P. Setlow, 2007).
- Enfin, après environ 45 minutes, on constate la synthèse de l'ADN (Santo & Doi, 1974).

En 2013, Segev et ses collaborateurs ont publié une étude sur les cinétiques moléculaires de la revivification des spores. Cette étude met en évidence l'existence d'une phase intermédiaire lors de la revivification. La phase de maturation (« ripening ») a lieu après la germination. Durant cette phase, on ne constate pas de changement morphologique mais plutôt des réorganisations moléculaires pour permettre la synthèse d'ARN ribosomal, la dégradation des protéines (Segev et al., 2013). Cette étude fait suite à celle publiée en 2012 qui démontre que le profil en ARN des spores est différent en fonction de l'âge des spores et de la température d'incubation (4 °C / 50 °C) (Segev et al., 2012). Ainsi, selon la température d'incubation des spores, celles-ci adoptent un comportement différent de conservation des ARN : pour des températures élevées, il y a dégradation des ARN pour faciliter la dormance des spores ; pour des températures basses, les ARN peuvent être transcrits.

En 2015, une étude globale sur le profil protéique synthétisé au cours de la revivification de la spore est publiée et montre qu'il y a 653 protéines qui sont nouvellement synthétisées et qui sont identifiées au cours de la revivification (Sinai et al., 2015). Ces protéines résultent d'une transcription *de novo* puisqu'en présence d'inhibiteurs de transcription, seulement 15 protéines nouvelles sont détectées. Les protéines synthétisées sont classées selon leur fonction et les auteurs ont reconstitué la chronologie moléculaire de ces synthèses protéiques. Les composants des machineries de transcription et de traduction ainsi que les protéines de réparation de l'ADN sont détectés comme nouvellement synthétisés dès les premières minutes de la maturation. Les protéines impliquées dans la biosynthèse des pyrimidines ainsi que les protéines impliquées dans la production de cofacteurs nécessaires pour certaines activités enzymatiques sont détectées plus tardivement au cours de la maturation. Cela suppose que toutes les transcriptions effectuées jusque-là reposent sur le réservoir de nucléotides initialement présents dans la spore et que la biosynthèse nucléotidique *de novo* débute seulement pendant la phase de maturation suite au rétablissement de la machinerie de traduction.

Autre résultat important de cette étude, il a été montré que la traduction protéique est essentielle pendant la germination pour le bon déroulement de cette dernière et pour le développement de la bactérie. En effet, alors que dans la littérature il a été montré que les spores sont capables de germer en présence d'inhibiteurs de synthèses de protéines et d'ARN (Steinberg et al., 1965), cette étude a montré que l'incubation des spores avec des antibiotiques tels que la lincomycine et la tétracycline (et induction de la germination par la L-alanine) entraine la non-germination des spores. Les antibiotiques sont des inhibiteurs de la traduction protéique et sans cette traduction, la germination n'a pas lieu ou alors elle est incomplète (c'est-à-dire que les spores perdent le CaDPA mais il n'y a pas de lyse du cortex).

Ainsi, l'ensemble de ces travaux montrent que, contrairement à ce qui était admis jusqu'alors, la synthèse protéique a lieu pendant la germination, de même que la traduction qui est essentielle au bon déroulement de la germination et à la reprise de croissance de la cellule végétative.

Cependant, ces résultats ont été fortement contestés par d'autres chercheurs. En effet, une étude publiée par Korza et ses collaborateurs démontre qu'il ne peut pas y avoir une reprise

de l'activité métabolique dans les spores dormantes et la synthèse protéique ne peut pas avoir lieu pendant la germination et être de surcroît essentielle à son bon déroulement. Pour le démontrer, ils ont procédé à une dégradation des ARN ribosomiques des spores, en les exposant à des températures élevées, pour inhiber la synthèse protéique. Ils ont constaté que la réduction des ARN ribosomiques n'impacte pas le taux de germination (suivi par quantification du CaDPA libéré), suggérant ainsi que la synthèse protéique n'est pas indispensable à la germination des spores (Korza et al., 2016).

Un commentaire publié en 2016 par Sinai et Ben-Yehuda critique la méthodologie employée pour avancer ces hypothèses (Sinai & Ben-Yehuda, 2016). Selon les auteurs, il n'y a aucune mesure de l'activité ribosomique et / ou de la synthèse protéique. De même, ces derniers ne prennent pas en considération les résultats précédemment publiés montrant que la synthèse ribosomique peut avoir lieu très tôt au cours de la germination.

Ces deux équipes adoptent donc un positionnement opposé quant à la question sur l'importance et le rôle de la synthèse protéique au cours de la germination. Comme suggérée par Boone and Driks en 2016, une étude combinant les méthodologies employées par ces deux équipes pourrait permettre de lever le doute quant à la synthèse protéique au cours de la germination (Boone & Driks, 2016).

Swarge et ses collaborateurs se sont intéressés à l'impact des conditions de sporulation (en milieu liquide *versus* milieu solide) et de la maturation des spores sur la synthèse protéique et la fluorescence de MalS-GFP, protéine décrite comme nouvellement synthétisée au cours de la germination et dont la fluorescence semblerait augmentée pendant la germination des spores. Les résultats de cette étude confirment l'impact des conditions de sporulation et de la maturation des spores sur la cinétique de germination. Cependant, l'expression de MalS-GFP et la synthèse protéique *de novo* restent inchangées au cours du processus de germination (Swarge et al., 2020).

1.4. Hétérogénéité de la germination des spores et phénomène de superdormance

Au sein d'une même population de spores, on peut constater différentes cinétiques de germination, quel que soit l'inducteur de la germination (Chen et al., 2006; Kong et al., 2014). Cette hétérogénéité est mesurée par la différence de durées entre l'induction de la germination et l'étape d'engagement (correspondant à la libération des cations) et/ou la phase 1 de germination (correspondant à la libération du CaDPA). L'hétérogénéité de la cinétique de germination peut dépendre de la quantité de récepteurs GR activés pour chaque spore. En effet, la variation de la quantité de récepteurs GR peut être déterminante pour l'engagement de la spore dans le processus de germination, puis par la suite pour la libération du CaDPA (Yi & Setlow, 2010; P. Zhang, Garner, et al., 2010).

L'hétérogénéité au sein d'une population de spores peut également se manifester par différentes cinétiques de destruction par un facteur physique. Celles-ci sont principalement dues aux variations des propriétés physiques et chimiques des spores à l'origine de leur résistance (Eijlander et al., 2011). En effet, on peut observer des différences au niveau des caractéristiques des spores telles que la teneur en eau ou la composition des structures externes (par exemple la structuration du manteau).

Enfin, il existe des spores superdormantes correspondant aux spores qui sont peu ou pas induites en germination après un processus intense d'induction de germination. Ainsi, il existe différentes catégories de spores superdormantes en fonction des inducteurs de germination : les spores superdormantes aux éléments nutritifs (appelées « Nutrient-SD spores »), les spores superdormantes aux pressions et les spores superdormantes aux éléments non-nutritifs tels que le CaDPA ou le dodécylamine. Il faut savoir que les spores superdormantes à un élément déclencheur de la germination ne sont pas superdormantes à tous les stimuli de germination. En effet, les spores superdormantes aux éléments nutritifs peuvent germer normalement en présence d'éléments non nutritifs tels que le CaDPA et le dodécylamine (S. Ghosh & Setlow, 2009). Ces spores peuvent également germer lorsqu'elles sont soumises à des traitements HP (150 MPa, 37 °C, et 500 MPa, 50 °C) (Wei et al., 2010).

Tous les mécanismes à l'origine de la superdormance des spores ne sont pas connus. Pour les spores superdormantes aux éléments nutritifs, dont le pourcentage varie entre 1 et 12 % au sein d'une population, plusieurs études montrent que ces celles-ci présentent une faible

quantité de récepteurs GR (6 à 10 fois moins) par rapport aux spores dormantes (Doona et al., 2014; S. Ghosh & Setlow, 2009). L'application d'un traitement thermique d'activation en amont de l'induction de la germination permet de diminuer la proportion de ces spores superdormantes probablement du fait d'une meilleure accessibilité de ces récepteurs suite au traitement.

De récentes études s'intéressent à l'isolement de cette catégorie de spores, notamment les spores superdormantes aux HP, afin de les caractériser pour mieux les maîtriser (Delbrück, Zhang, Hug, et al., 2021; Y. Zhang, Delbrück, et al., 2020). La proportion de spores superdormantes aux pressions dépend des conditions de traitement HP : le niveau de pression appliqué, la température de traitement, la durée de compression, ainsi que l'activité de l'eau (a_w) et le pH du milieu de traitement (Delbrück, Zhang, Hug, et al., 2021; Y. Zhang & Mathys, 2019). Par exemple, l'augmentation du temps de maintien sous pression (150 MPa, 37 °C) permet de diminuer la prévalence des spores superdormantes (Delbrück, Zhang, Hug, et al., 2021). La caractérisation de ces spores superdormantes aux pressions par rapport aux spores dormantes montre que : (1) il n'y a pas de différences structurelles significatives entre les deux types de spores observées en microscopie électronique en transmission (**Figure 6**) ; (2) il n'y a pas de modification génétique à l'origine de la superdormance des spores aux pressions puisque les spores superdormantes isolées peuvent être induites en germination lorsqu'elles sont exposées de nouveau au même traitement (150 MPa, 37 °C). En revanche, des analyses protéomiques ont récemment été réalisées sur ces spores superdormantes aux HP et ont montré des profils différents par rapport aux spores dormantes (Delbrück et al., 2022). Parmi les 52 protéines différemment exprimées entre les spores dormantes et les spores superdormantes aux HP, les auteurs se sont intéressés à 5 protéines en particulier (MinC, cse60, YhcN, SspK et YfkT) et ont procédé à la construction de mutants sans l'une de ces protéines. Ainsi, les spores superdormantes aux HP possèdent moins de lipoprotéines YhcN (2,5 fois moins) que les spores dormantes et le mutant sans cette protéine germe 5 à 6 fois moins que la souche WT. La protéine YhcN pourrait donc contribuer au phénomène de superdormance en HP (Alessia Delbrück, communication au congrès IFT, octobre 2021). Localisée dans la membrane interne, cette protéine pourrait intervenir dans le processus de germination et/ou de développement de la spore (Bagyan et al., 1998).

Les spores superdormantes présentent des propriétés de résistance plus accrues à différents procédés de destruction, notamment à la chaleur (S. Ghosh & Setlow, 2009). Elles peuvent contribuer au phénomène de « tailing » observé dans les cinétiques d'inactivation (Sevenich & Mathys, 2018) (développé dans la **partie 2.3**). D'un point de vue industriel, cette résistance accrue des spores SD peut rendre les traitements de stérilisation insuffisants (Y. Zhang & Mathys, 2019).

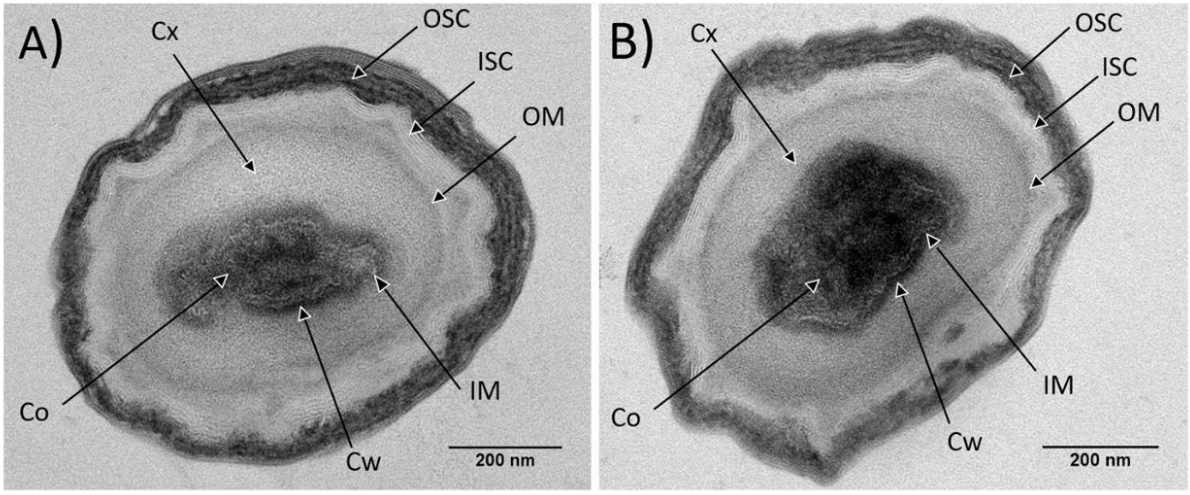


Figure 6 *: Observations en microscopie électronique à transmission d'une spore dormante (A) et d'une spore superdormante (B) isolée après un traitement HP (6 min, 150 MPa, 37°C), spores de B. subtilis. Abréviations : Co = protoplaste ; IM = membrane interne ; Cw = paroi cellulaire ; Cx = cortex ; OM = membrane externe ; ISC = enveloppe interne du manteau ; OSC = enveloppe externe du manteau. D'après* (Delbrück, Zhang, Hug, et al., 2021).

Ainsi, les spores bactériennes sont des formes de dormance issues du processus de sporulation, déclenché lorsque les conditions sont défavorables à la croissance bactérienne et en particulier pour *Bacillus* l'absence de source carbonée. Ces microorganismes inertes sont caractérisés par des propriétés intrinsèques uniques leur conférant des capacités de résistance aux stresses physiques, chimiques et thermiques :

- La structure en multicouches et la faible perméabilité de la membrane interne,
- La déshydratation du protoplaste et la présence d'une molécule spécifique, le DPA complexé au calcium,
- La protection de l'ADN par des protéines spécifiques appelées SASP.

Lorsque les conditions redeviennent favorables, les spores bactériennes retournent à l'état végétatif *via* le phénomène de germination, orchestré par des protéines spécifiques. Au sein d'une population de spores, l'induction de la germination est souvent hétérogène et celle-ci est dépendante des conditions de germination. Le phénomène de superdormance illustre cette hétérogénéité de la germination des spores et constitue une entrave aux stratégies d'inactivation des spores.

Un moyen d'inactiver les spores bactériennes consiste à endommager leur ADN, à porter atteinte à l'intégrité de la membrane interne, et/ou inactiver les protéines indispensables à leur revivification. Dans le chapitre suivant, nous nous intéressons aux spécificités des spores pouvant être exploitées pour mettre en évidence les mécanismes d'inactivation par les procédés de destruction.

2. Les stratégies d'investigations des mécanismes d'inactivation des spores bactériennes

Les spécificités et la structure unique des spores bactériennes participent à leur résistance aux différents traitements pouvant être mis en place dans un contexte de décontamination. Pour déterminer les mécanismes d'inactivation des spores bactériennes par différents traitements, ces propriétés peuvent être utilisées comme biomarqueurs. Un marqueur biologique, ou biomarqueur, est un indicateur d'un état physiologique donné. En d'autres termes, les marqueurs désignent les indicateurs pouvant être exploités, par dosage et/ou par observation, pour mettre en évidence l'avancement de la germination par exemple, ou encore les dommages structuraux liés à une inactivation des spores. Dans cette partie, les marqueurs de suivi de l'état de la spore ainsi que les techniques d'exploitation de ces marqueurs sont présentés.

2.1. Suivi des marqueurs endogènes et exogènes des spores bactériennes

2.1.1. Marqueurs endogènes

Parmi les biomarqueurs pouvant être utilisés pour suivre l'état de la spore, il y a certains marqueurs constitutifs de la spore tels que le DPA. Le DPA complexé au calcium représente 25 % du poids sec du noyau de la spore (B. Setlow et al., 2006), ce qui en fait le biomarqueur endogène le plus abondant chez la spore bactérienne. L'exploitation de ce biomarqueur (notamment sa sortie du protoplaste) grâce à différentes méthodes permet de détecter la première phase de la germination.

La microscopie à contraste de phase est par exemple utilisée pour caractériser l'état des spores (spores dormantes *versus* spores germées) et suivre leur germination. Cette technique de microscopie transforme de petits déphasages, dus aux différences entre l'indice de réfraction du spécimen observé et celui de l'environnement, en variation de contraste. Ainsi, les spores dormantes apparaissent claires en microscopie à contraste de phase (appelée phase « bright ») du fait de l'indice de réfraction élevé du noyau contenant notamment le CaDPA, alors que les spores germées apparaissent sombres avec la même technique (phase « dark ») (**Figure 7**). C'est la libération du CaDPA qui contribue principalement à la diminution de l'indice de réfraction du noyau de la spore et ainsi à la diminution de l'intensité de l'image en contraste de phase (Kong, Zhang, Setlow, et al., 2010). Cette technique a été largement utilisée pour

étudier les cinétiques de sporulation et de germination des spores individuelles de *Bacilli* et de *Clostridie* (Kong, Zhang, Setlow, et al., 2010; Pandey et al., 2013). Elle peut également être exploitée en combinaison avec d'autres techniques telles que la spectroscopie Raman pour suivre la dynamique de germination (Wang et al., 2017; P. Zhang et al., 2014; P. Zhang, Kong, et al., 2010). Pandey et ses collaborateurs (2013) ont développé un programme nommé « SporeTracker » qui permet un traitement automatisé d'images en contraste de phase afin d'analyser la germination et le développement de spores. Cet outil a notamment été exploité pour étudier l'effet d'un stress thermique sur l'induction de la germination et sur le développement de spores germées. Ainsi, cette étude montre qu'un stress thermique (10 minutes à 85 °C) diminue le taux de germination et de développement de spores de *B. subtilis*. Le temps nécessaire à l'induction de la germination est également augmenté (Pandey et al., 2013).

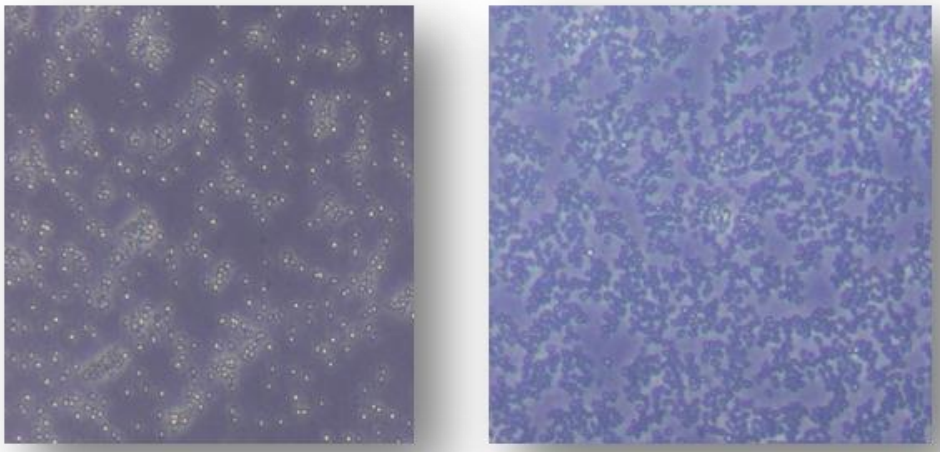


Figure 7 *: Observations en microscopie à contraste de phase de spores de B. subtilis. (a) Spores dormantes réfringentes (phase « Bright »). (b) Spores germées (phase « Dark »).*

La germination peut aussi être suivie par lecture de la densité optique à une longueur d'onde de 600 nm. En effet, la chute de la densité optique à 600 nm reflète un changement de l'indice de réfraction du protoplaste des spores bactériennes, qui intervient lors de la libération du CaDPA suivie de la réhydratation du protoplaste (Løvdal et al., 2012; Paidhungat & Setlow, 2014). Ainsi, dans des conditions optimales de germination, la perte du CaDPA s'accompagne d'une chute de la densité optique de 70 % par rapport à la densité optique initiale (Cabrera-

Martinez et al., 2003). Le suivi de la chute de densité optique ne permet pas d'indiquer si la lyse du cortex a lieu au cours du processus de germination (achèvement de la phase 2 de germination, suivi de l'expansion du protoplaste de la spore germée). Par conséquent, il convient de coupler la méthode de suivi de la densité optique avec l'observation en microscopie à contraste de phase afin d'évaluer le degré d'avancement de la germination (S. Ghosh, 2013).

Le DPA est une molécule dont la faible fluorescence native est largement renforcée par sa complexation avec les ions terbium, et de ce fait elle peut être dosée par spectrofluorimétrie (Hindle & Hall, 1999). Le CaDPA libéré au cours de la germination peut être dosé en mesurant l'intensité de fluorescence de la molécule en présence d'ions terbium. La technique couramment utilisée en laboratoire pour ce dosage repose sur la formation d'un complexe de DPA-Tb^{3+} pour mesurer l'intensité de fluorescence émise. Les longueurs d'ondes d'excitation et d'émission du complexe sont respectivement de 275 ± 2 nm et 545 ± 2 nm.

Il existe une méthode appelée « decoating » qui consiste à éliminer le manteau et la membrane externe des spores par voie chimique (utilisation de détergents et de dithiothréitol (DTT) à température et pH élevés) sans altérer leur viabilité (Bagyan et al., 1998). Les structures de résistance de la spore étant éliminées, l'effet des agents oxydants, tels que l'hypochlorite, le dioxyde de chlore, l'ozone ou encore le peroxyde d'hydrogène utilisés en industrie, peut être étudié. Cela a notamment permis d'identifier la membrane interne (Cortezzo et al., 2004) ainsi que les protéines du protoplaste (Moeller et al., 2011) comme cibles de ces traitements d'intérêt.

La dégradation du cortex est également un marqueur de l'état d'avancement de la germination. Certains traitements de destruction ciblent les enzymes CLE pour inactiver les spores. Les spores ainsi traitées sont bloquées en phase 1 de germination et ne peuvent pas dégrader leur cortex. Cependant, le traitement de ces spores avec du lysozyme va agir sur la dégradation du cortex et ainsi permettre l'achèvement de la germination et le développement des spores germées. Ainsi, la lyse du cortex par une enzyme exogène tel que le lysozyme permet de confirmer l'inactivation des enzymes CLE et de ce fait l'incapacité des spores à germer complètement ou l'inactivation de ces spores. Par exemple, l'étude de l'effet de l'hydroxyde de sodium (NaOH) montre que celui-ci agit principalement sur l'inactivation des

enzymes lytiques du cortex. En effet, l'ajout de lysozyme permet de débloquer la germination de spores traitées avec du NaOH (B. Setlow et al., 2002).

2.1.2. Marqueurs exogènes

Des marqueurs fluorescents peuvent être utilisés pour l'étude de la spore. Le marqueur Syto16 est par exemple couramment utilisé pour discriminer les spores dormantes des spores germées. Il possède la caractéristique de se fixer à l'ADN et à l'ARN des spores germées et d'augmenter sa fluorescence en cas de fixation. Seules les spores germées en phase 2 peuvent être marquées au Syto16 car la dégradation du cortex et la dégradation des protéines de saturation de l'ADN (protéines SASP) conditionnent sa capacité à pénétrer dans le noyau et à se fixer à l'ADN (Kong, Zhang, Yu, et al., 2010).

Le marqueur Syto16 est souvent couplé à l'utilisation du marqueur iodure de propidium (IP). Ce marqueur est un intercalant de l'ADN et de l'ARN ; il augmente fortement sa fluorescence en cas de fixation. C'est est un indicateur de la perte de l'intégrité de la membrane interne. En effet, le marqueur IP, du fait de son hydrophobicité, ne pénètre dans une cellule qu'en cas de perturbation de la perméabilité de la membrane interne, pouvant conduire à son inactivation (Stiefel et al., 2015). Ainsi, la combinaison des deux marqueurs permet, avec des spectres d'émission bien séparés, de distinguer les spores dormantes (marquage négatif au Syto16 et à l'IP), les spores germées (marquage positif au Syto16 seulement) et les spores inactivées (marquage positif à l'IP). Ceux-ci peuvent être exploités par microscopie ou cytométrie en flux pour étudier les effets d'un traitement physique ou chimique sur les structures des spores bactériennes (cortex et membrane), tout en suivant leur état physiologique.

L'exploitation de la cytométrie en flux en utilisant ces deux marqueurs a permis par exemple de caractériser l'état physiologique des spores traitées sous pression (**Figure 8**). Des études ont ainsi montré par cytométrie en flux que la pression entraîne la germination des spores et cette germination est dépendante du niveau de pression appliqué, de la température et de la durée de traitement (Black et al., 2005; Black, Wei, et al., 2007; Mathys et al., 2007; Y. Zhang, Delbrück, et al., 2020).

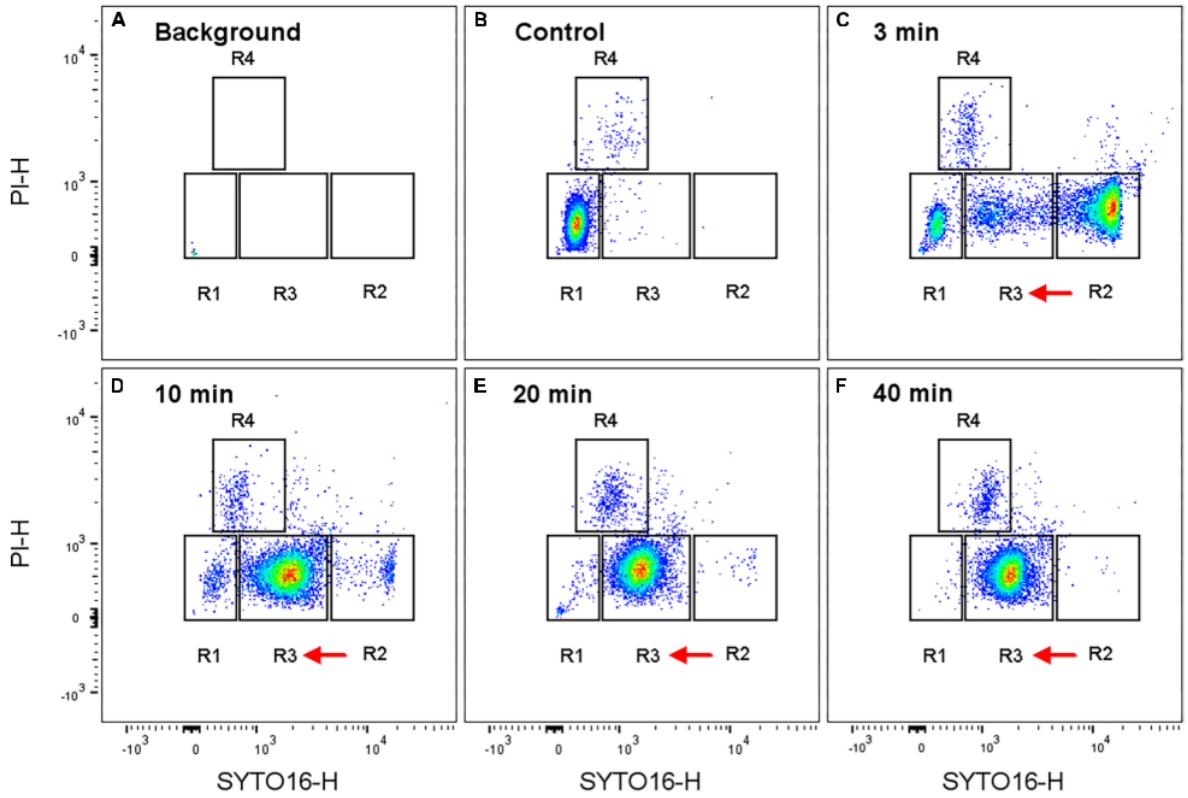


Figure 8 *: Graphiques représentatifs de l'évolution en cytométrie en flux des états physiologiques des spores de B. subtilis traitées par HP à 150 MPa, 37°C. A) signal de fond. B) Spores non traitées et marquées au Syto16 et IP. C-F) Spores traitées HP et marquées au Syto16 et IP avec C) 3 min, D) 10 min, E) 20 min et F) 40 min de traitement. Les événements sont représentés sur un graphique de densité à l'échelle biexponentielle de Syto16 par rapport à IP. On distingue 4 sous-populations au cours du traitement correspondant aux spores dormantes (R1), spores germées (R2), spores germées présentant des dommages sublétaux partiels (R3), spores avec membrane altérée probablement « inactivées » (R4). D'après* (Y. Zhang, Delbrück, et al., 2020).

2.2. Modifications des propriétés des spores bactériennes

2.2.1. Mutants bactériens

1291 mutants de *Bacillus subtilis* 168 sont recensés sur la base de données « *Bacillus* Genetic Stock Center ». Parmi ceux-ci, les spores mutantes, dépourvues d'une fonctionnalité, sont utilisées comme marqueurs pour étudier l'effet d'un traitement sur la germination et/ou l'inactivation mais également pour déterminer le rôle de certains composants dans la résistance des spores (**Tableau 1**).

Ainsi, l'utilisation de spores mutantes dépourvues de protéines SASP de type α et β a permis de corréler la présence de ces protéines à la résistance des spores aux stresses tels que les radiations UV, l'exposition à la chaleur sèche, et l'exposition aux agents chimiques (peroxyde d'hydrogène, formaldéhyde, acide nitreux) (Raju et al., 2006; P. Setlow, 2007). De même, l'utilisation de spores mutantes ne contenant pas de CaDPA a démontré le rôle de cette molécule dans la résistance des spores à la chaleur humide, à la dessiccation et à l'exposition au peroxyde d'hydrogène. Enfin, les spores ne présentant pas de systèmes de réparation de l'ADN sont plus sensibles aux UV et à certains produits chimiques que les souches sauvages. L'étude de mutants dépourvus de systèmes de réparation de l'ADN a également permis de caractériser les mécanismes d'inactivation des spores par des traitements utilisant un faisceau d'électrons (Y. Zhang, Huber, et al., 2020).

Tableau 1 *: Exemples de mutants de B. subtilis étudiés pour mettre en évidence les mécanismes de résistance aux procédés de destruction.*

Nom	Génotype	Caractéristiques phénotypiques	Conditions de germination	Référence
FB122	ΔsleB::spc ΔspoVF::tet	Mutant sans DPA et sans l'enzyme SleB	• Éléments nutritifs • CaDPA • « decoating » + lysozyme	(Paidhungat et al., 2001)
→ Les études portant sur les mutants sans DPA montrent que ces spores ont une teneur en eau plus élevée et une résistance à la chaleur humide significativement réduite, aussi bien pour les spores de *Bacillus* (P. Setlow, 2006) que les spores de *Clostridium* (Paredes-Sabja, Setlow, et al., 2008).				
FB111	ΔcwlJ::tet	Mutant sans l'enzyme d'hydrolyse du cortex CwlJ	• Éléments nutritifs • CaDPA	(Paidhungat et al., 2001)
FB112	ΔsleB::spc	Mutant sans l'enzyme d'hydrolyse du cortex SleB	• Éléments nutritifs • CaDPA	(Paidhungat et al., 2001)
FB113	ΔcwlJ::tet ΔsleB::spc	Mutant sans les enzymes d'hydrolyse du cortex SleB et CwlJ	• Éléments nutritifs : blocage en phase 1 • CaDPA : blocage en phase 1 • « Decoating » + lysozyme • Pression	(Paidhungat et al., 2001)
→ Les mutants sans l'une des deux enzymes CLE ont été principalement étudiés pour mettre en évidence les mécanismes d'activation de ces enzymes au cours de la germination. L'étude des mutants FB111 et FB113 a notamment mis en évidence un ralentissement de la libération du CaDPA au cours de la germination, et de ce fait le rôle clé de l'enzyme CwlJ sur la libération du CaDPA pendant la germination par du CaDPA exogène (Peng et al., 2009; B. Setlow et al., 2009).				
FB114	gerA::spc gerB:: cat gerK:: erm ΔsleB::tet	Mutant sans les récepteurs GR et sans l'enzyme SleB	• CaDPA • Pression	(Paidhungat et al., 2001)

FB115	gerA::spc gerB:: cat gerK:: erm ΔcwlJ::tet	Mutant sans les récepteurs GR et sans l'enzyme CwlJ	• CaDPA, • Pression	(Paidhungat et al., 2001)
→ Le mutant FB114 a mis en évidence que l'enzyme SleB n'est pas indispensable pour une germination complète par le CaDPA. En revanche, l'absence de l'enzyme CwlJ conduit à une absence de germination par le CaDPA chez le mutant FB115.				
PS4150	ΔgerE::spc ΔcotE::tet	Mutant délété d'une partie du manteau protéique	• Éléments nutritifs • CaDPA	(S. Ghosh et al., 2008)
KGB136	PS4150 ΔgerA::kan	Mutant sans le récepteur de germination gerA		(Griffiths et al., 2011)
→ L'étude de ce mutant a démontré la sensibilité du récepteur GerA à la pression par rapport à ses homologues GerB et GerK (Black et al., 2005).				
PS2318	ΔrecA Cm^r Ery^r	Mutant sans le système de réparation de l'ADN RecA		(B. Setlow & Setlow, 1996)
→ L'étude du mutant RecA a montré l'importance de ce système dans la résistance des spores aux radiations UV, à la chaleur, ainsi qu'à certains agents chimiques (Leggett et al., 2012; P. Setlow, 2006).				
PS356	*trpC2* Δ*sspA*^{e} Δ*sspB*^{e} Cm^{rf}	Mutant sans les protéines SASP α/β	Toutes conditions de germination	(Douki et al., 2005)
→ L'étude de ce mutant a permis de confirmer le rôle des SASP dans la protection de l'ADN des spores contre les traitements chimiques tels que le peroxyde d'hydrogène (Moeller et al., 2011), le formaldéhyde et l'acide nitreux (Loshon et al., 1999; Tennen et al., 2000). Ce mutant a également mis en évidence l'importance des SASP dans la résistance à la chaleur sèche (P. Setlow, 2006) et à la chaleur humide (Nicholson et al., 2000; P. Setlow, 2006). La même construction sans les protéines SASP a été réalisée sur l'espèce *Clostridium* et a confirmé l'implication de ces protéines dans la protection de l'ADN contre les traitements de destruction (Paredes-Sabja, Raju, et al., 2008; Raju et al., 2006).				

2.2.2. Modifications des conditions de sporulation

La modification des conditions de sporulation peut affecter les propriétés structurales et les propriétés de résistance des spores bactériennes, comme présenté dans le **Tableau 2** (Bressuire-Isoard et al., 2018; Melly et al., 2002; H. Nguyen Thi Minh et al., 2011; Rose et al., 2007).

- La température de sporulation

La température de sporulation a un effet sur la constitution des spores. Chez *B. subtilis*, il a été montré que l'augmentation de la température de sporulation entraîne une diminution de la teneur en eau du protoplaste (Melly et al., 2002). Les spores produites à des températures élevées sont plus résistantes aux traitements thermiques (chaleur humide) que leurs homologues produites à basses températures (Igura et al., 2003; Melly et al., 2002; H. Nguyen Thi Minh et al., 2011). La thermorésistance plus élevée observée pourrait être corrélée à cette diminution en eau du protoplaste lorsque la température de sporulation est augmentée. En revanche, la modification de la température de sporulation n'entraîne pas de changement de composition en DPA, ni de modifications structurales au niveau du cortex et des protéines SASP (Melly et al., 2002).

Au niveau structural, la température de sporulation semble avoir un effet sur la composition protéique du manteau des spores de *B. subtilis*. En effet, les spores produites à des températures élevées présentent moins de protéines CotA (Melly et al., 2002). Ces spores présentent également des différences significatives au niveau du peptidoglycane du cortex : la sporulation à des températures plus élevées conduit à la formation de spores présentant plus d'acide muramique réticulé au niveau des chaînes de peptidoglycane du cortex. Une étude publiée récemment montre que les spores de *B. subtilis* sont structurellement différentes, notamment au niveau de la structure et de la composition protéique du manteau, en fonction de la température de sporulation (25, 37 et 42 °C). Les auteurs suggèrent un mécanisme d'assemblage du manteau reposant sur la protéine CotH, produite au même niveau pour les trois températures de sporulation étudiées mais qui apparaît plus stable à basse température. Ainsi, CotH contrôle le passage d'une couche externe qui apparaît lamellaire et très dense aux électrons à basse température (constitué principalement de

protéines CotB/CotG) à une couche externe granulaire et épaisse (constitué de protéines CotC/CotU) à haute température de sporulation (Isticato et al., 2020).

Les propriétés membranaires peuvent également être impactées par une modification de la température de sporulation. Les spores produites à une température plus faible que la température optimale de croissance (23 °C *versus* 37 °C) présentent une modification dans la composition lipidique de la membrane interne (Cortezzo & Setlow, 2005), les rendant plus sensibles à la chaleur humide.

La résistance aux agents chimiques peut également être impactée par la température de sporulation. Chez *B. subtilis*, les spores produites à des températures élevées sont plus résistantes aux agents chimiques tels que le peroxyde d'hydrogène et le formaldéhyde (Melly et al., 2002).

Concernant la résistance aux agents physiques tels que les pressions, des études rapportent une diminution de la barorésistance des spores de *B. subtilis* lorsque la température de sporulation est augmentée (Igura et al., 2003; Margosch, Gänzle, et al., 2004).

Enfin, plusieurs études reportent un effet de la température de sporulation sur la germination des spores, potentiellement en lien avec leur structure ou leur composition protéique qui diffèrent en fonction de la température de sporulation. Ainsi, les spores produites à basse température (23 °C) sont induites en germination plus rapidement que les spores produites à température optimale (37 °C). A l'inverse, les spores produites à haute température (42 °C) sont induites en germination plus lentement (Isticato et al., 2020).

- Le milieu de sporulation

La composition du milieu utilisé pour la sporulation peut également affecter la composition et les propriétés de résistance des spores. La sporulation réalisée dans un milieu dépourvu de calcium conduit à la production de spores de plus petite taille que celle des spores produites en milieu standard. Ces spores ainsi produites sont également caractérisées par une baisse de la thermorésistance par rapport à celle des spores produites en milieu classique (H. Nguyen Thi Minh et al., 2011). De même, les spores produites en milieu initialement pauvre en nutriments sont caractérisées par une cinétique de germination moins rapide que celles des spores produites en milieu riche en nutriments (Doona et al., 2014).

Outre la composition du milieu de sporulation en elle-même, les caractéristiques des spores peuvent différer selon si elles sont produites en milieu liquide ou en milieu solide. En effet, une étude menée par Rose et ses collaborateurs (2007) a montré que les spores produites en milieu liquide sont plus sensibles au traitement thermique et aux agents chimiques que les spores produites en milieu solide. Les spores produites en milieu liquide sont capables de germer plus vite que celles produites en milieu solide (Rose et al., 2007).

- Le pH de la sporulation

Chez *B. subtilis*, le pH de sporulation a un effet sur la thermorésistance des spores : les spores produites à un pH élevé (pH 10) sont plus résistantes au traitement thermique que les spores produites à pH bas (pH4) (H. Nguyen Thi Minh et al., 2011).

Tableau 2 *: Modifications des conditions de sporulation et impacts sur la structure et la résistance des spores de B. subtilis*

Paramètre modifié	Propriétés de résistances impactées	Structures impactées	Références
Température de sporulation	Résistance thermique	• Composition du protoplaste (teneur en eau, teneur en CaDPA et composition minérale) • Composition lipidique de la membrane interne • Composition protéique du manteau	(Cortezzo & Setlow, 2005; Igura et al., 2003; Isticato et al., 2020; Melly et al., 2002; H. Nguyen Thi Minh et al., 2011)
	Résistance chimique	• Teneur en eau du protoplaste • Composition protéique du manteau • Réticulation des MAL du peptidoglycane	(Isticato et al., 2020; Melly et al., 2002)
	Résistance à la pression	• Composition minérale du protoplaste • Teneur en eau	(Igura et al., 2003; Margosch, Gänzle, et al., 2004; H. Nguyen Thi Minh et al., 2011)
Milieu de sporulation	Résistance thermique	• Taille de la spore • Composition minérale du protoplaste	(H. Nguyen Thi Minh et al., 2011)
	Résistance chimique	• Composition de la membrane interne • Composition protéique du manteau	(Rose et al., 2007)
		• Composition du protoplaste (teneur en eau et en CaDPA) • Quantité de récepteurs GR	

		• Composition protéique du manteau • Peptidoglycane du cortex	
pH du milieu de sporulation	Résistance thermique	• Composition minérale du protoplaste	(H. Nguyen Thi Minh et al., 2011)

2.3. Modélisation des cinétiques d'inactivation des spores bactériennes

En microbiologie, le dénombrement de microorganismes est systématiquement utilisé pour déterminer le nombre d'individus survivants suite à l'application d'un traitement de destruction. On obtient alors des courbes de survie représentant le nombre de survivants en fonction du temps d'exposition. Ces courbes de survie peuvent servir de base pour la modélisation de l'inactivation des microorganismes. Dans cette partie, nous nous intéressons aux modèles primaires utilisés pour la description des cinétiques d'inactivation des spores par un traitement de destruction.

2.3.1. Le modèle linéaire

Dans le modèle linéaire (cinétique de premier ordre), la courbe de survie microbienne suit une décroissance exponentielle dont l'équation est la suivante (**Eq. 1**) :

$$\frac{dN}{dt} = -k.N(t) \qquad (1)$$

Avec N(t) le nombre de survivants au temps t, et k la constante cinétique de décroissance (en s^{-1}).

L'intégration de l'équation précédente (**Eq. 2**) et sa projection sur une échelle logarithmique donnent l'équation suivante (**Eq. 3**) :

$$N(t) = N_0.e^{-kt} \qquad (2)$$

$$\log_{10}\frac{N(t)}{N_0} = -kt = -\frac{t}{D} \qquad (3)$$

Avec N_0 la population initiale et D le temps de réduction décimale avec $D = k^{-1}$.

Le paramètre D correspond au temps nécessaire pour réduire d'un log la population initiale, à une température donnée, représenté ci-dessous (**Figure 9**).

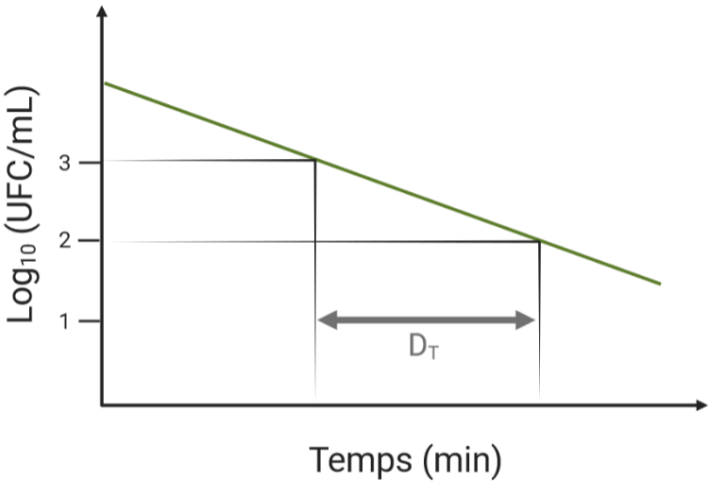


Figure 9 *: Définition graphique du paramètre D_T à partir d'une courbe de destruction.*

Le paramètre D est dépendant de la température. Cette dépendance est paramétrée par la valeur de Z, et définie par l'augmentation de la température nécessaire pour réduire d'un log la valeur de D (**Figure 10**). L'équation qui permet d'obtenir la valeur de la résistance thermique est la suivante (**Eq. 4**):

$$D(T) = D_{Tréf}\,10^{-\frac{T-T_{réf}}{Z_T}} \qquad (4)$$

Avec $T_{réf}$ la température de référence choisie, D_T et $D_{Tréf}$ les temps de réductions décimales obtenues à T et $T_{réf}$ et Z_T l'effet de la température (°C).

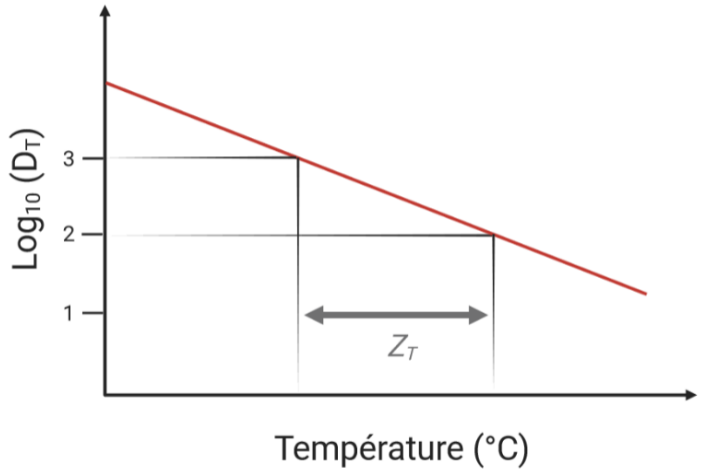


Figure 10 *: Définition graphique du paramètre Z_T*

Ainsi, le modèle cinétique de premier ordre ne nécessite que l'estimation d'un seul paramètre.

2.3.2. Les modèles non linéaires

Pour la destruction des spores bactériennes, les courbes de survie peuvent être non linéaires. Nous distinguons les courbes diphasiques avec deux cinétiques de destruction, les courbes avec une phase initiale de latence (appelée « épaulement »), et les courbes avec un ralentissement de la vitesse de destruction (appelée « queue » ou « trainée »). La cinétique d'inactivation des spores sous pression présente souvent un épaulement et une queue pour des temps de traitement longs. Des modèles non linéaires ou à réponses multiples s'appliquent alors pour décrire l'inactivation des spores pour les traitements à durée de maintien sous pression prolongée.

- Le modèle de Weibull

Le modèle de Weibull, souvent utilisé pour décrire l'inactivation des spores, repose sur le principe d'hétérogénéité de la résistance des spores face à un stress. Ainsi, la destruction ne suit pas une loi de premier ordre mais la loi présentée dans l'équation suivante (**Eq. 5**) :

$$\frac{N}{N_0} = e^{-\left(\frac{t}{\delta}\right)^p} \quad (5)$$

Avec δ le temps de la première réduction décimale et p le paramètre de forme qui varie suivant la forme concave ou convexe de la courbe de survie : concave ($p < 1$), convexe ($p > 1$) ou linéaire ($p = 1$).

Ainsi, la constante de forme est associée au type de population microbienne rencontrée qui est classée comme résistante (forme concave, $p < 1$), peu résistante (forme convexe, $p > 1$), ou homogène (linéaire, $p = 1$) (Van Boekel, 2002).

Ce modèle permet de prédire les conditions optimales pour une destruction des spores (par exemple pH et a_w au sein d'une matrice alimentaire) (Xu et al., 2021). Cependant, dans ce modèle, le profil de la température de traitement ainsi que les temps de montées et descente en pression (compression, décompression), dans le cas d'un traitement en pression, ne sont pas pris en compte.

- Les autres modèles

D'autres modèles non linéaires sont retrouvés dans la littérature concernant l'inactivation des spores. Les modèles de Gompertz et log-logistique décrivent des courbes sigmoïdales

asymétriques. La population résistante de spores décrite comme un effet de queue est représentée par l'asymptote de la fonction. Le moment d'inflexion dans le modèle de Gompertz et le moment du taux d'inactivation maximal dans le modèle log-logistique correspondent au moment de la transition entre la population stable et les stades d'inactivation.

L'inactivation des spores par un traitement physique peut nécessiter leur activation et / ou germination dans un premier temps (développé dans la **partie 3**). Le modèle « quasi-chemical » tient compte des étapes intermédiaires menant à l'inactivation des spores, c'est-à-dire des réactions décrivant les conversions d'un état physiologique à un autre avec des constantes de vitesses respectives.

De manière générale, souvent, seul l'effet des conditions de traitement est pris en compte. La prise en compte de l'influence des facteurs environnementaux et de traitement (tels que la variation de la température, le pH, l'activité de l'eau, les conditions de recouvrement et la composition des aliments) sur le taux d'inactivation microbienne est nécessaire. Le développement de modèles linéaires et non linéaires a simplifié le calcul du taux d'inactivation microbienne dans différentes conditions de traitement. Cependant, une attention accrue est nécessaire, notamment en ce qui concerne l'effet de la structure et de la composition des aliments. Cela permettrait aux producteurs d'avoir une vue d'ensemble de l'influence de leurs conditions de transformation sur la survie microbienne, et donc d'évaluer avec précision les performances de leurs procédés. De façon générale, la modélisation de la cinétique d'inactivation microbienne en tenant compte des différents facteurs pouvant affecter l'inactivation peut permettre de comprendre les mécanismes d'inactivation.

Pour l'étude des mécanismes d'inactivation des spores bactériennes par un traitement de destruction, il convient de suivre leur germination pour connaître le stade de germination auquel elles sont bloquées.

Certains traitements peuvent conduire à l'inactivation des spores sans induction de la germination. La réalisation d'un traitement de germination post-traitement de destruction permet alors de conclure sur l'inactivation des protéines impliquées dans la germination des spores.

Les mutants bactériens peuvent être exploités pour étudier les phénomènes d'inactivation par des traitements de destruction. De même, les conditions de sporulation sont déterminantes dans les propriétés structurales et de résistance des spores aux facteurs de stress. Ainsi, les spores mutées sur un élément ainsi que les spores produites dans différentes conditions de sporulation sont généralement étudiées pour connaître leurs propriétés de résistance à un stress.

Enfin, la modélisation peut être utilisée comme appui pour comprendre les mécanismes d'inactivation des spores bactériennes par des procédés de destruction.

3. Les effets des pressions sur les spores bactériennes

C'est en investiguant les mécanismes d'inactivation des spores bactériennes par le procédé HP que les chercheurs ont découvert que les pressions engendrent la germination des spores dans un premier temps. En effet, dans certaines conditions, il a été observé que l'inactivation des spores a lieu de manière plus rapide à des niveaux de pressions bas qu'à des niveaux de pressions plus élevés. Une première étude réalisée en 1970 a ainsi montré que les spores de *Bacillus* et *Clostridium* traitées par HP deviennent thermosensibles. Des analyses microscopiques montrent que ces spores ont subi des modifications structurales semblables à celles observées pendant la germination (passage en phase « dark » en microscopie à contraste de phase) (Sale et al., 1970). Ainsi, les pressions engendrent plutôt la germination des spores, par des mécanismes différents selon le niveau de pression appliqué. Nous distinguons les basses pressions (BP), correspondant aux pressions comprises entre 50 et 400 MPa, et les hautes pressions (HP), dont le barème est supérieur à 400 MPa. Les études portant sur les mécanismes d'induction de la germination par la pression ont été essentiellement réalisées sur les spores de *B. subtilis* du fait de la disponibilité des informations et des mutants de ce modèle d'étude.

3.1. Effet de la pression sur la structure des spores bactériennes

Il n'y a pas ou peu d'impact de la pression sur les spores bactériennes jusqu'à des pressions très élevées (> 2 GPa). En effet, la pression n'a pas d'impact sur les liaisons hydrogènes dans l'hélice de l'ADN, qui plus est l'ADN des spores est saturé par les protéines SASP le rendant très stable (Reineke & Mathys, 2020).

Les systèmes lipidiques sont affectés par la pression uniquement dans leur phase structurale (la pression oriente vers des phases ordonnées solides) et la propriété des bicouches lipidiques peut évoluer (changement de fluidité par exemple). Cependant, ces changements sont forcément limités par la membrane interne qui est déjà naturellement compactée. Les membranes des spores peuvent être des cibles des traitements HP. Si la membrane externe n'est pas indispensable pour la germination, la membrane interne a un rôle clé dans le développement de la nouvelle cellule végétative en plus de maintenir l'état déshydraté du protoplaste. La pression peut provoquer un changement de fluidité de la membrane interne,

ou la délocalisation des protéines membranaires, perturbant ses propriétés d'imperméabilité et résultant en une libération du DPA à travers les canaux SpoVA (Reineke & Mathys, 2020).

3.2. Effets des basses pressions sur les spores bactériennes

3.2.1. Induction de la germination physiologique

Pour des barèmes de pression compris entre 50 et 400 MPa et une température entre 30 et 50 °C, on parle d'induction de la germination physiologique des spores bactériennes (**Figure 11**) (Reineke & Mathys, 2020). Cette germination physiologique (GR-dépendante) semble être favorisée et optimale à une gamme de pression et de température comprise entre 100 et 200 MPa et entre 30 et 50 °C. En effet, l'application de BP aux spores de *B. subtilis* semble entraîner leur germination par une activation des récepteurs de germination localisés dans la membrane interne. De plus, les spores déficientes en tous leurs récepteurs GR ne germent pas lorsqu'elles sont traitées à 100 MPa contrairement aux spores sauvages (Paidhungat et al., 2002). L'étude de l'effet des BP sur la germination de différents mutants en récepteurs de germination (mutants déficients en un ou plusieurs récepteurs GR) a montré une sensibilité différente de ces récepteurs à la pression et par conséquent un pourcentage de germination différent selon le mutant considéré (Black et al., 2005; Cabrera-Martinez et al., 2003; Doona et al., 2014; Paidhungat et al., 2001; Paidhungat & Setlow, 2000). Le récepteur de germination GerA est ainsi plus sensible à la pression que ses homologues GerB et GerK : les spores possédant ce récepteur présentent un pourcentage de germination semblable à celui des spores de la souche sauvage. En d'autres termes, c'est le récepteur GerA qui contribue le plus à l'induction de la germination par la pression. De plus, il semblerait que la germination des spores sous pression soit d'avantage influencée par le type de récepteurs GR que par leur quantité. La délétion du récepteur GerA réduit considérablement la germination sous pression par rapport à la réduction de plus de 50 % du nombre total de récepteurs GR (Doona et al., 2014).

3.2.2. Événements post-induction de la germination physiologique

Suite à l'activation des récepteurs GR, la germination se poursuit avec les événements semblables à ceux de la germination induite par les nutriments, à savoir la libération du CaDPA par les canaux SpoVA, l'hydratation partielle du protoplaste, et la lyse du cortex par les enzymes CLE entraînant une hydratation complète du protoplaste (**Figure 12**). Pour des

pressions inférieures à 150 MPa, la dégradation des enzymes SASP a lieu (Black et al., 2005; Paidhungat et al., 2002). Ces spores germées sont caractérisées par une sensibilité au traitement par le peroxyde d'hydrogène et sont marquées par le Syto16, marqueur de l'ADN (Black et al., 2005; Wuytack et al., 1998; Y. Zhang & Mathys, 2019). En revanche, des pressions supérieures à 150 MPa peuvent entraîner sous certaines conditions une inactivation irréversible des enzymes CLE, ce qui aboutit en un blocage des spores en phase I de germination (Black, Wei, et al., 2007). Dans certains cas, cette inactivation des enzymes CLE est réversible, ce qui implique une faible destruction sous pression et une forte germination après retour à pression atmosphérique. L'inactivation des spores de *B. subtilis* passe ainsi de 3 à 6 log après 4 heures à pression atmosphérique (H. Nguyen Thi Minh et al., 2010).

Bien que le processus de germination par les BP soit identifié, le mécanisme d'activation des récepteurs GR n'est pas encore identifié. Deux hypothèses sont proposées à ce sujet dans la littérature. L'induction de la germination peut se faire par une modification directe de la conformation des récepteurs GR initiant ainsi la cascade de germination. Autrement, il pourrait s'agir d'une modification indirecte de la conformation des récepteurs GR suite à une modification des propriétés membranaires (Black et al., 2005; Doona et al., 2014).

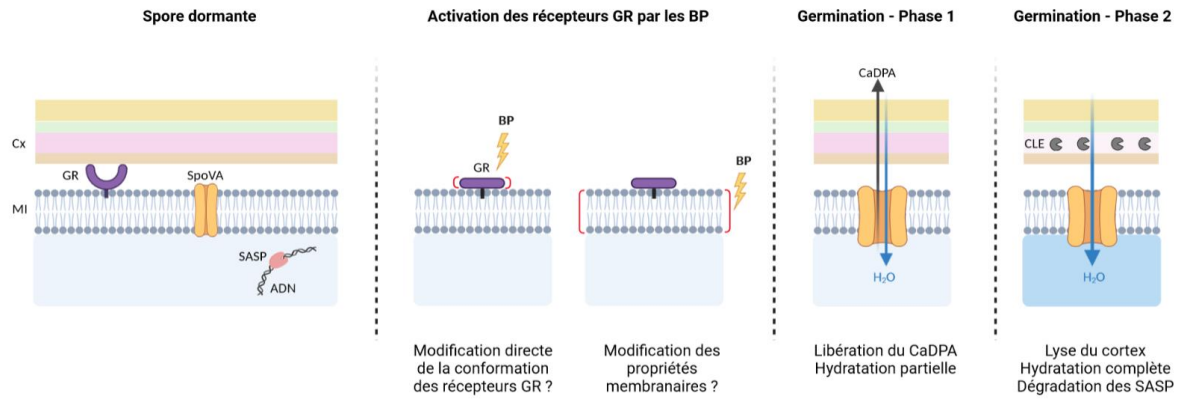


Figure 11 *: Représentation schématique de la germination physiologique des spores de B. subtilis induite par les basses pressions. Abréviations : MI = membrane interne ; Cx = cortex.*

3.2.3. Impact des conditions de sporulation sur la germination induite par les BP

Les spores produites en milieu riche en nutriments germent quatre fois plus vite sous pression que les spores produites en milieu pauvre (Doona et al., 2014). Une sporulation en milieu riche induit en effet une plus forte synthèse (trois à huit fois plus) des récepteurs GR (Ramirez-Peralta et al., 2012). La température de sporulation semble également importante dans la cinétique de germination sous BP. En effet, les spores produites à des températures élevées (44 °C) germent plus à 150-250 MPa (taux de germination multiplié par 5) que les spores produites à basses températures (23 °C) (Black et al., 2005). Cela pourrait s'expliquer par une synthèse plus élevée des récepteurs GR à des températures de sporulation plus hautes. De même, il a été mis en évidence que la composition en acides gras insaturés de la membrane interne diffère selon la température de sporulation : l'augmentation de la température de sporulation induit une diminution de la quantité d'acides gras insaturés conduisant à une baisse de la fluidité et de la perméabilité de la membrane interne (Cortezzo & Setlow, 2005). Un changement de fluidité membranaire ne peut être sans conséquence sur l'activation des récepteurs GR par la pression. Cependant, les connaissances sur la structure de la membrane interne et sur le mode d'action exact de ces récepteurs sont limitées pour émettre des hypothèses à ce sujet.

3.2.4. Induction de la germination des spores de Clostridium par les BP

La germination sous pression des spores de *Clostridium* est peu étudiée. Il a été montré que les spores de *C. perfringens* germent lorsqu'elles sont exposées aux BP. En revanche, les autres espèces dont les spores ne possèdent pas de récepteurs GR (*Clostridium difficile*, par exemple) ne sont pas induites en germination sous pression (Doona, Feeherry, Setlow, et al., 2016).

3.3. Effets des hautes pressions (>400 MPa) sur les spores bactériennes

Pour des barèmes de pression supérieurs à 400 MPa et une température comprise entre 50 et 60 °C, on parle d'induction de la germination non physiologique des spores bactériennes (**Figure 12**). Les spores délétées sur l'ensemble des récepteurs GR sont induites en germination lorsqu'elles sont exposées à des barèmes de pression de 550 MPa (Paidhungat et al., 2002). L'achèvement de la germination des spores nécessite la dégradation du cortex par au moins une des deux enzymes CLE. En effet, le traitement des spores déficientes en enzymes CLE avec une pression de 550 MPa provoque la libération du CaDPA contenu dans le protoplaste induisant ainsi leur germination ; cependant, ces spores sont bloquées en cours de germination du fait de l'absence de ces enzymes. En revanche, les spores déficientes en CaDPA ne germent pas lorsqu'elles sont soumises à une pression de 550 MPa (Black, Wei, et al., 2007). Ainsi, un tel traitement HP entraîne l'induction de la germination des spores par une libération du CaDPA. Le mécanisme à l'origine de la libération du CaDPA par les HP n'est pas connu. La libération du CaDPA pourrait être due à une action des HP sur l'activation des canaux protéiques de sortie de DPA localisés dans la membrane interne : les canaux SpoVA (Paidhungat et al., 2002). Une autre hypothèse émise par Marghosh et ses collaborateurs ainsi que par Black et ses collaborateurs se focalise davantage sur la libération du CaDPA qui serait liée à une augmentation de la perméabilité de la membrane interne par la création de pores membranaires ou par une action sur une protéine de cette membrane (Black, Wei, et al., 2007; Margosch, Gänzle, et al., 2004).

3.3.1. Événements post-induction de la germination non physiologique

L'induction de la germination non physiologique des spores se poursuit par une hydratation partielle du protoplaste mais cette germination n'est pas complète. En effet, même s'il y a dégradation du cortex par les enzymes CLE, les spores sont résistantes au traitement par le peroxyde d'hydrogène ou à un deuxième traitement HP (500 MPa, 40 °C) du fait de la non-dégradation des protéines SASP pendant le traitement HP (Wuytack et al., 1998). Une inactivation de la protéase Gpr pendant le traitement HP serait à l'origine de cette résistance. Un traitement thermique, indépendant du barème de pression, est nécessaire pour inactiver ces spores partiellement germées (Margosch, Gänzle, et al., 2004). Si les conditions du traitement HP endommagent les enzymes lytiques du cortex, les spores ne passent que très lentement au stade 2 de germination (Black, Setlow, et al., 2007).

Cependant, la plupart des études impliquant des spores traitées par HP et températures modérées (50 °C) montrent des inactivations significatives (1 à 4 log suivant les espèces), mais toujours partielles (Modugno et al., 2019). Les mécanismes conduisant la spore germée par HP à une spore inactivée sous pression ne sont, en général, pas ou peu décrits. Il est communément admis que la spore entamant sa germination sous pression va, en fonction de l'avancement de sa germination (et donc du temps de maintien sous pression), perdre sa résistance spécifique à la pression en même temps que sa résistance à d'autres traitements et donc se comporter comme une cellule végétative sous pression. Ces connaissances se basent sur la germination physiologique et non sur la germination induite sous pression. Il est probable, mais non démontré, que l'altération par la pression des propriétés membranaires de la spore en germination soit responsable de sa perte de viabilité au cours de la germination.

Certains travaux semblent montrer qu'un retour à pression atmosphérique avec un temps d'attente permettrait d'accélérer la germination de la spore et sa perte de résistance à la pression lors d'un second traitement HP (Hue Nguyen Thi Minh, 2011). Ce procédé semble être exploité dans les traitements cycliques.

3.3.2. Impact des conditions de sporulation sur la germination induite par les HP

Le taux de germination induit par les HP diminue de manière significative avec la diminution de la température de sporulation et l'augmentation de la concentration en sel dans le milieu de sporulation (Black, Wei, et al., 2007). Contrairement aux BP, l'augmentation de la température de sporulation (de 23 à 44 °C) induit une diminution du taux de germination (environ 4 fois moins) des spores par les HP.

3.3.3. Induction de la germination des spores de Clostridium par les HP

L'induction de la germination via la libération du CaDPA a également été observée chez les spores du genre *Clostridium*. Le traitement HP déclenche la libération du CaDPA dans les spores de *C. difficile* et de *C. perfringens* mais celui-ci n'induit pas la germination complète des spores de *C. difficile*, contrairement aux spores de *C. perfringens* (Doona, Feeherry, Setlow, et al., 2016). Si la libération du CaDPA précède la lyse du cortex chez les espèces du genre *Bacillus* et chez l'espèce *C. perfringens*, le déroulement de ces événements est différent chez *C. difficile*. En effet, pour cette dernière espèce, c'est la lyse du cortex par l'enzyme SleC qui précède la libération du CaDPA. L'action des HP sur la libération du CaDPA chez cette espèce

conduit donc à une résistance de ces spores aux traitements HP, du fait de la non-dégradation du cortex en amont de la libération du CaDPA.

3.4. Effets des pressions combinées à d'autres facteurs pour l'inactivation des spores bactériennes

3.4.1. Le traitement HP (600-800 MPa) combiné au traitement thermique (>60°C)

L'inactivation des spores bactériennes par le traitement HP combiné au traitement thermique a été étudiée chez différentes espèces bactériennes (Lopes et al., 2018). L'état de l'art montre une variabilité des résultats en fonction de l'espèce considérée, des conditions de traitement (barèmes HP et thermique, cinétiques de compression et de décompression …) et de la matrice utilisée pour la suspension des spores (tampon, matrice alimentaire).

Les mécanismes exacts d'inactivation des spores bactériennes par le traitement HP combiné au traitement thermique ne sont pas entièrement décrits (Heinz & Knorr, 1996). Cependant, les résultats des études réalisées laissent à penser que l'inactivation des spores est due à la perte de CaDPA dans un premier temps, conduisant à la perte de la résistance thermique des spores sous pression (Reineke, Ellinger, et al., 2013). La perte de la résistance thermique causée par l'hydratation du protoplaste suite à la libération du DPA semble être accélérée à des barèmes de pression et température élevés (P>500 MPa ; T>60 °C) par rapport au traitement thermique seul (Margosch, Ehrmann, et al., 2004; Mathys et al., 2009; Reineke et al., 2012; Reineke, Schlumbach, et al., 2013). Pour des températures de traitement supérieures à 90 °C, le traitement HP inactive de manière irréversible les enzymes telles que les enzymes CLE et l'enzyme Gpr indispensables au processus de germination.

Pour des barèmes de pression de 500-700 MPa et une température de traitement T > 90 °C, il y a une inactivation directe des spores bactériennes qui contourne le processus de germination (sans lyse du cortex et sans dégradation des protéines SASP). Les protéines impliquées dans la germination sont inactivées de manière irréversible, entrainant une incapacité des spores à entrer en germination (Ahn et al., 2007).

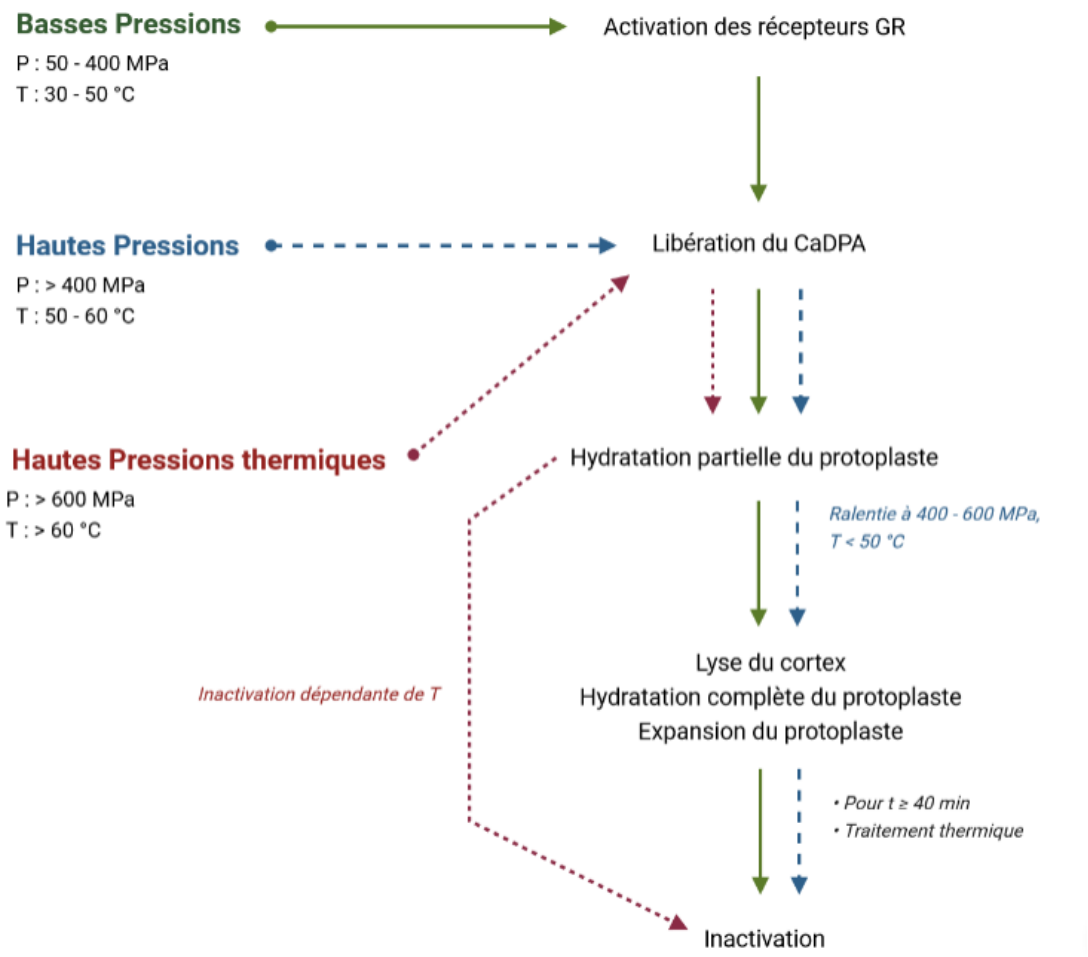


Figure 12 *: Mécanismes d'induction de la germination des spores en fonction des barèmes du traitement sous pression conduisant à leur inactivation. Abréviations : P = pression ; T = température ; t = durée de traitement.*

3.4.2. Le traitement HP combiné à l'utilisation d'agents antimicrobiens

Le traitement HP combiné à l'utilisation d'agents antimicrobiens ont un effet synergique sur l'inactivation des spores. L'inactivation des spores de *B. cereus*, *B. subtilis*, et *Alicyclobacillus acidoterrestris*, est ainsi plus importante lorsque le traitement HP est réalisé en présence de nisine par exemple (Black et al., 2008; Sokołowska et al., 2012). La nisine est une bactériocine produite par la bactérie lactique *Lactococcus lactis* contre les bactéries Gram positif. Elle est utilisée dans l'industrie alimentaire en prévention de la germination et du développement des spores (Delves-Broughton et al., 1996). Combinée au traitement HP, la nisine semble favoriser l'induction de la germination dans un premier temps puis l'inactivation des spores germées dans un deuxième temps (Black et al., 2008). L'action de la nisine est ciblée sur la perturbation de l'intégrité de la membrane interne des spores germées pour empêcher leur développement (Omardien et al., 2018). De récents travaux menés au laboratoire ont montré que l'application d'un traitement HP permet de sensibiliser les spores à la présence de la nisine (Modugno et al., 2019, 2020). Cette sensibilisation intervient dans les premières phases du processus de revivification des spores bactériennes (étapes d'activation ou d'initiation de la germination). En effet, la caractérisation structurale par spectroscopie infrarouge a mis en évidence pour la première fois des différences au niveau des profils protéiques entre les spores dormantes et les spores activées (par un traitement HP). Quelques études ont porté sur l'utilisation du lysozyme comme agent antimicrobien combiné au traitement HP pour l'inactivation des spores de *B. cereus* dans le lait. Néanmoins, cette enzyme antimicrobienne ne permet pas une augmentation de la sensibilité des spores au traitement HP (López-Pedemonte et al., 2003; Sokołowska et al., 2012).

Outres les deux conservateurs alimentaires naturels précédemment développés, les huiles essentielles végétales ont également fait l'objet d'une attention particulière en raison de leur action synergique avec le traitement HP pour l'inactivation des cellules végétatives (flores pathogènes et d'altération) (Gayán et al., 2012). En revanche, leur action est tout autre concernant l'inactivation des spores bactériennes traitées en HP. En effet, une étude menée par Corthouts et ses collaborateurs (2016) sur l'inactivation des spores de *B. cereus* par des traitements HP (200 et 400 MPa) combinés à l'utilisation des huiles essentielles (acide sorbique, cumin, Carvi…) démontre un effet négatif de ces huiles sur l'efficacité de l'inactivation des spores par le traitement HP. Les huiles essentielles étudiées semblent

inhiber partiellement voire complètement l'induction de la germination des spores par les traitements HP, les protégeant ainsi du procédé de décontamination (Corthouts & Michiels, 2016). La plupart des huiles essentielles examinées, excepté l'huile de graines de carotte, inhibent la germination induite par les nutriments et par les deux barèmes de pressions ; les auteurs suggèrent que cette germination est bloquée à un stade tardif, n'impliquant pas les récepteurs de germination et les canaux SpoVA. Une autre étude portant sur l'utilisation du carvacrol, un composé issu de l'huile essentielle d'origan, montre que celui-ci inhibe l'induction de la germination des spores de *B. cereus* soumises à un traitement HP de 5 minutes à 600 MPa (Luu-Thi et al., 2015). La présence de ce composé dans le milieu de pressurisation diminue l'inactivation des spores de 1,5 log (inactivation de 2,5 et de 1 log en absence et en présence de carvacrol respectivement).

3.4.3. Le traitement HP cyclique

Le traitement HP cyclique consiste en l'application de cycles successifs avec une phase de décompression entre ceux-ci. L'impact des paramètres du traitement HP cyclique (cinétiques de compression et de décompression, durée de compression, nombre de cycles, température) sur l'inactivation des cellules végétatives et des levures dans les matrices alimentaires a été largement étudié (Chapleau et al., 2006; Donsì et al., 2007; Noma et al., 2002; Rivalain et al., 2012). Cependant, des résultats contradictoires ont été rapportés notamment concernant l'effet des vitesses de compression et de décompression. De la même manière, quelques études se sont intéressées à l'application du traitement HP cyclique pour l'inactivation des spores bactériennes (Demazeau et al., 2018; Furukawa et al., 2000; Hayakawa et al., 1994; Obaidat et al., 2015; Ratphitagsanti et al., 2009). Le traitement HP cyclique semble plus efficace que le traitement HP continu pour l'inactivation des spores de *B. subtilis* (200, 300 and 400 MPa, 25, 35, 45 and 55 °C), *G. stearothermophilus* (400 and 600 MPa, 70 °C) et *B. amyloliquefaciens* (600 MPa, 105 °C) (Furukawa et al., 2003; Hayakawa et al., 1994; Ratphitagsanti et al., 2009). Les décompressions rapides durant le traitement HP cyclique (200 MPa, 75 °C) augmentent l'inactivation des spores de *G. stearothermophilus* probablement par perméabilisation (Hayakawa et al., 1998). Cependant, une autre étude menée sur les spores de *B. amyloquefaciens* démontre que les cinétiques de compression lentes (3,75 MPa/s; 5,7 log d'inactivation) sont plus efficaces en termes de destruction que les cinétiques rapides (18,06 MPa/s; 1 log inactivation) pour des traitements cycliques réalisés à 600 MPa, 105 °C

(Ratphitagsanti et al., 2009). Récemment, une étude publiée par Demazeau et ses collaborateurs (2018) met en avant un traitement HP cyclique (350 MPa, 38 °C) permettant une inactivation totale (6 log) des spores de *B. cereus* inoculés dans une matrice de lait infantile. D'un point de vue théorique, l'utilisation des cycles de pression permettrait une induction de la germination des spores dans un premier temps, puis une inactivation des spores germées dans un second temps. Cependant, les différentes études portant sur l'inactivation des spores par les traitements HP cycliques montrent des résultats disparates. L'explication de ces différentes constations n'est pas évidente mais l'utilisation de différents équipements (propriétés des matériaux), la maîtrise de la température pendant le traitement (notamment l'échauffement adiabatique durant les compressions) et l'absence de comparaison avec les traitements HP continus de même durée pourraient contribuer à l'hétérogénéité des résultats et des conclusions. Les fluctuations de la température sont déterminantes, notamment lorsque des barèmes de pression élevés sont combinés à des températures élevées, pour obtenir une inactivation efficace des spores bactériennes.

3.5. Utilisation du procédé HP dans l'industrie agroalimentaire

La demande des consommateurs pour des produits alimentaires moins transformés, « sains » et à durée de conservation prolongée a propulsé le développement du procédé HP. Les applications commerciales disponibles aujourd'hui concernent des barèmes entre 200 et 600 MPa, à des températures réfrigérées ou modérées (<40 °C), et pour des durées de traitement inférieures à 15 minutes. Ces applications concernent principalement des produits à pH acide « low-acid food product » (pH<4,6), pouvant être conservés à température réfrigérée pour limiter le développement des spores bactériennes.

Concernant les aliments aujourd'hui traités par le procédé HP, nous retrouvons principalement les boissons et jus de fruits (24 %), les produits à base de guacamole (18 %), les produits carnés (19 %), les produits à base de poisson (7 %) et les produits laitiers (2 %). Le procédé HP s'applique également aux repas prêts à consommer (2 %), les aliments pour bébés (1 %) ou encore aux produits d'alimentation animale (1 %) (source : www.hiperbaric.com).

Les avantages d'une utilisation du procédé HP en industrie sont :

- ✓ Préservation des qualités organoleptique et nutritionnelle des aliments,
- ✓ Pas d'ajout de produits chimiques (conservateurs …),
- ✓ Pressurisation homogène du produit,
- ✓ Pressurisation sur produits finis (emballés) limitant le risque de contamination post-traitement,
- ✓ Augmentation de la durée de conservation des aliments traités par les HP.

Le procédé HP est une technologie alternative aux traitements thermiques pour l'inactivation des microorganismes pathogènes et d'altération dans les matrices alimentaires tout en conservant leurs propriétés organoleptiques et nutritionnelles.

Cependant, la destruction des spores bactériennes constitue un frein au développement industriel de ce procédé. En effet, les pressions induisent la germination des spores, qui par la suite peuvent être inactivées par un deuxième traitement (HP cycliques, traitement thermique, utilisation d'agents antimicrobiens).

Il est donc indispensable de bien connaitre la germination et les étapes qui sont déclenchées, accélérés ou ralenties et celles qui sont impactées par les HP.

PROBLEMATIQUE & AXES DE RECHERCHE

L'étude bibliographique présente la spore bactérienne comme une structure complexe issue du processus de sporulation, mis en place par les bactéries lorsqu'elles sont confrontées à des conditions défavorables à leur croissance. La faible hydratation du protoplaste, la faible perméabilité moléculaire et bien d'autres spécificités, confèrent à la spore une forte résistance aux stress environnementaux. L'état de dormance de la spore bactérienne n'est pas immuable. En effet, en présence de conditions favorables, cette forme retourne à l'état végétatif par le processus de germination, qui implique de nombreuses machineries protéiques et moléculaires. Au sein d'une population sporale, l'hétérogénéité de la germination et le phénomène de superdormance contribuent à la survie des spores bactériennes, portant ainsi atteinte aux stratégies de destruction des spores mises en place pour contrer les problèmes de sécurité ou d'altération alimentaires.

L'état de l'art montre que de nombreuses études exploitent les propriétés intrinsèques de la spore, telle que la molécule CaDPA, pour comprendre ses mécanismes de résistances aux facteurs physiques, thermiques et chimiques. Une modification des propriétés de la spore, de par des constructions génétiques par exemple, contribue également à la compréhension de ces mécanismes.

Bien qu'il présente un fort potentiel pour la préservation des propriétés organoleptiques et nutritionnelles des aliments et pour la décontamination des flores végétatives pathogènes et d'altération alimentaires, l'application industrielle du procédé HP reste limitée du fait de son manque d'efficacité sur les spores bactériennes. La littérature décrit d'avantages une induction de la germination des spores bactériennes par la pression hydrostatique que leur inactivation. Les mécanismes d'induction de la germination diffèrent selon la pression appliquée et de nombreuses interrogations persistent sur ces mécanismes. Néanmoins, les hypothèses émises dans la littérature reposent sur le rôle et les propriétés de la membrane interne dans l'induction de la germination.

Dans ce travail de thèse, nous avons cherché à comprendre les mécanismes mis en jeu au cours de l'inactivation des spores de *B. subtilis* par les traitements HP et thermiques. L'étude bibliographique soulève différentes questions en lien avec ces mécanismes d'inactivation par les traitements HP :

- En quoi les traitements HP cycliques et leurs mécanismes sporicides sont plus efficaces que les traitements HP continus ?
- Quels sont les effets des traitements HP sur les récepteurs de germination GR, les canaux SpoVA et sur les enzymes lytiques du cortex CLE ?
- Ces récepteurs GR et ces enzymes CLE peuvent-ils constituer des cibles potentielles des traitements HP pour l'inactivation des spores bactériennes ?
- La structure et/ou la fluidité de la membrane interne est-elle impactée par les traitements HP ?

Les axes de ce travail de thèse sont présentés en trois chapitres. Dans le premier chapitre, nous nous sommes intéressés aux effets du traitement HP cyclique sur la germination et l'inactivation des spores bactériennes. L'efficacité de ce traitement HP cyclique est comparée à celle du traitement HP continu. Le deuxième chapitre est dédié à l'investigation des mécanismes d'inactivation de spores par différents traitements HP et thermiques. Des marqueurs intrinsèques et extrinsèques des spores sont exploités pour suivre l'état physiologique des spores traitées par la pression. Différents traitements HP et thermiques sont étudiés et les mécanismes impliqués dans l'inactivation des spores par chacun de ces traitements sont discutés. Quel que soit le traitement HP étudié, il semble que l'atteinte à la perméabilité membranaire soit la condition *sine qua non* à l'inactivation des spores. Ainsi, le dernier axe de ce travail est consacré au développement d'une méthode de suivi de la fluidité des structures hydrophobes de la spore et notamment celle de la membrane interne.

CHAPITRE 1

EFFETS DES TRAITEMENTS HP CYCLIQUES SUR LA GERMINATION ET L'INACTIVATION DES SPORES BACTERIENNES

Sommaire

1. Introduction et Objectifs 66

2. Cycling versus Continuous High Pressure treatments at moderate temperatures: Effect on bacterial spores? 67

2.1. Introduction 68

2.2. Materials and methods 70

2.3. Results and discussion 76

2.4. Conclusion 94

2.5. Funding sources 94

3. Conclusion du chapitre 1 95

1. Introduction et Objectifs

L'utilisation des traitements HP cycliques est décrite dans la littérature comme une stratégie permettant d'améliorer l'inactivation des spores bactériennes. Réalisés à basse température (proche de la température ambiante), ces traitements favoriseraient la germination des spores lors des premiers cycles de pression puis l'inactivation des spores germées lors des cycles suivants. Nous avons étudié l'impact des différents paramètres du traitement HP cyclique sur la germination et l'inactivation des spores bactériennes. Pour déterminer l'efficacité du traitement HP cyclique, nous avons réalisé un traitement témoin qui consiste en l'application d'un traitement HP continu en un seul cycle et dont la durée totale de compression correspond aux temps cumulés du traitement HP cyclique. Enfin, un modèle mathématique reposant sur la cinétique de germination des spores est développé pour comprendre les mécanismes d'inactivation par les traitements HP cycliques.

Ce chapitre de thèse a fait l'objet d'une publication scientifique, acceptée dans le journal « Innovative Food Science and Emerging Technologies ».

Fatima Fekraoui, Éric Ferret, Nathalie Paniel, Olivia Auvy, Clara Chamontin, Stéphane André, Hélène Simonin, Jean-Marie Perrier-Cornet, (2021) : « Cycling versus Continuous High Pressure treatments at moderate temperatures: Effect on bacterial spores? ». https://doi.org/10.1016/j.ifset.2021.102828

2. Cycling versus Continuous High Pressure treatments at moderate temperatures: Effect on bacterial spores?

***Abstract**:*

The advantage of using high pressure (HP) cycling treatment compared with continuous HP treatment was investigated for the inactivation of bacterial spores. The effects of parameters such as pulse number, pressure level, treatment temperature, compression and decompression rates, and time between pulses were evaluated. For this purpose, *Bacillus subtilis* and *B. cereus* spores (10^8 and 10^6 CFU/mL respectively) were suspended in 2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid (MES) buffer solution, tryptone salt (TS) buffer solution, or infant milk and treated by HP cycling at 300–400 MPa, at 38–60 °C, for 1–5 pulses. Pressure cycling reduced the number of viable spores by 1.8 and 5.9 log respectively for *B. subtilis* and *B. cereus* species. Continuous HP treatments were performed at the same pressure and temperature for similar treatment durations. Our results showed that the spore inactivation ratio was correlated with the cumulative exposure time to pressure rather than to effects of the cycling process. Greater spore inactivation caused by HP cycling was observed only when faster compression and decompression rates were applied, probably due to adiabatic heating. A three-step kinetic model was developed, which seemed to support our hypothesis regarding the mechanisms of inactivation by pressure cycling and continuous HP treatments.

***Industrial relevance**:*

The resistance of bacterial spores to HP limits the industrial applications to refrigerated food products. In this study, we investigated the use of pressure cycling as a means to improve spore baroinactivation at moderate temperatures (T < 60 °C). We showed that cycling pressure does not significantly increase bacterial spore inactivation in comparable treatment duration, but certainly increases material fatigue in HP vessels. Thus, under moderate temperature, cycling pressure treatment is not industrially relevant.

Keywords:

Bacterial spore; Germination; Inactivation; High Pressure; Cycling pressure; Kinetic model.

2.1. Introduction

Members of the genera *Bacillus* and *Clostridium* can form endospores, named hereafter as spores, primarily when nutrient sources are depleted, or are exposed to environmental stresses such as accumulation of organic acids, exposure to oxygen and chemicals agents that affect bacterial growth (Al-Hinai et al., 2015; Gauvry et al., 2017). Bacterial spores are metabolically dormant forms that display great resistance to various stresses such as heat, chemical agents, and physical processes (P. Setlow, 2006). Because of these extreme resistance properties, bacterial spores can be involved in food spoilage and foodborne illness (André et al., 2017). Spoilage due to sporeforming bacteria causes high economic losses in food and feed industry. Food spoilage is characterized by variation of the physicochemical properties (texture, odor, pH and/or gas production) depending on food matrices when spores return to vegetative state. For shelf-stable products, high temperatures and/or long holding time thermal treatments are necessary to inactivate spores in food sterilization processes (Wells-Bennik et al., 2016). However, such treatments can decrease the nutritional value and sensory properties of food. Otherwise, the use of hurdle technologies can increase the shelf-life of refrigerated food products.

Among alternative soft technologies, the high-pressure (HP) processing is an established food processing technique for inactivating vegetative forms of pathogenic and spoilage bacteria and maintaining food quality (Sevenich & Mathys, 2018). However, the destruction of spores by HP processing remains a challenge because of the high resistance of spores to pressure. HP is known to initiate spore germination, causing their inactivation under pressure, but fails to induce germination and inactivation of the entire spore population in order to provide food sterilization. The effect of HP on spore germination is dependent on the pressure level, holding time, and temperature range (Reineke, Mathys, et al., 2013). At lower pressures (< 300 MPa) and temperatures around 30–50 °C, physiological germination by the activation of nutrient germinant receptors (GR) arises in *Bacillus* spores, which is similar to nutrient-triggered germination (Black et al., 2005; Delbrück, Zhang, Heydenreich, et al., 2021; Lenz & Vogel, 2015; Reineke, Mathys, et al., 2013; Y. Zhang, Delbrück, et al., 2020). At higher pressures (> 400 MPa), *Bacillus* spore germination is induced by the opening of channels that allow the loss of dipicolinic acid (DPA) (Black, Wei, et al., 2007; Lenz & Vogel, 2015; Margosch, Gänzle, et al., 2004; Paidhungat et al., 2002; Reineke, Mathys, et al., 2013). Mechanisms of HP induction of

Clostridia spore germination are almost similar to *Bacillus* species, except for *Clostridium* species lacking GR such as *Clostridium difficile* (Doona, Feeherry, Ross, et al., 2016; P. Setlow et al., 2017).

HP treatment (> 600 MPa) combined with higher temperatures (> 60 °C) increase the ratio of spore inactivation (Reineke et al., 2011). In this case, spore inactivation mechanisms remain hypothetical, but inactivation seems clearly related to DPA release, core hydration, and temperature inactivation of heat-sensitive germinated spores. Even at such temperatures, DPA release is probably related to germination induction. Essential oils, such as carvacrol, which are known to inhibit spore germination, are able to protect spores from high-pressure high-temperature inactivation (Corthouts & Michiels, 2016; Luu-Thi et al., 2015).

HP cycling treatment consists of applying several successive pressure pulses with decompression phases between them. The effects of pressure cycling parameters (compression and decompression rates, number of pulses, pressure holding time, and temperature) has been extensively studied for vegetative bacteria and for yeast inactivation in foods (Chapleau et al., 2006; Donsì et al., 2007; Noma et al., 2002; Rivalain et al., 2012). However, contradictory conclusions have been reported, especially regarding the influence of compression and decompression rates.

In the same way, several groups have been interested in the application of pressure cycling as a means to improve spore inactivation (Demazeau et al., 2018; Furukawa et al., 2000; Hayakawa et al., 1994; Obaidat et al., 2015; Ratphitagsanti et al., 2009). Pressure cycling was more effective than continuous pressure in terms of spore inactivation of *Bacillus subtilis* (200, 300 and 400 MPa, 25, 35, 45 and 55 °C), *Bacillus stearothermophilus* (400 and 600 MPa, 70 °C) and *B. amyloliquefaciens* (600 MPa, 105 °C) (Furukawa et al., 2003; Hayakawa et al., 1994; Ratphitagsanti et al., 2009). Rapid decompression during pressure cycling (200 MPa, 75 °C) can increase *B. stearothermophilus* spore inactivation by permeabilization (Hayakawa et al., 1998). On the other hand, Ratphitagsanti et al. (2009) studied the effects of compression rate on the inactivation of *B. amylolequefaciens* spores and observed greater inactivation with slow compression (3.75 MPa/s; 5.7 log inactivation) than for rapid compression (18.06 MPa/s; 1 log inactivation) at a pressure level of 600 MPa at 105 °C. Recently, Demazeau et al. (2018)

established an HP cycling process (350 MPa, 38 °C) that can inactivate 6 log (CFU/mL) of *B. cereus* spores inoculated into breast milk.

The objective of this study was to clarify the specific effects of HP cycling treatment and to identify treatment parameters that optimize bacterial spore inactivation in *B. cereus* and *B. subtilis* species, a pathogenic food spoilage spore and a model spore respectively. The HP inactivation curve is the result of several dynamical processes that give rise to a nonlinear response. The application of nonlinear models, such as the quasi-chemical kinetic (QCK) model, based on a two-step mechanism: conversion of dormant spores to germinated spores and then to inactivated spores, has been described in recent reviews (Doona et al., 2017; Doona, Feeherry, Ross, et al., 2016). We used an equivalent approach to model the kinetics of cycling pressure inactivation of *B. subtilis* spores using 1–5 pulses at 350 MPa and 40 °C. Our purpose was to identify the causes and mechanisms of inactivation in order to assess the industrial interest of HP cycling treatments for the inactivation of bacterial spores.

2.2. Materials and methods

2.2.1. Strains and spore productions

Bacillus subtilis PS533 (Department of Molecular, Microbial, and Structural Biology, University of Connecticut Health Center, USA) is a wild-type strain, a derivative of the isogenic strain PS832. PS533 carries the plasmid pUB110, which encodes resistance to kanamycin. *Bacillus subtilis* cells were resuscitated from frozen glycerol stock on LB medium with kanamycin (Luria Broth, 15 $g.L^{-1}$, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France; bacteriological agar type E, 15 $g.L^{-1}$, Biokar, Beauvais, France). Spores were prepared at 37 °C in 2 × Schaeffer's-glucose liquid medium. A preculture was used to inoculate the medium at a ratio of 1:10 in a baffled flask before incubation at 37 °C. Spore suspensions were purified as described by (P. Setlow, 2018) and appeared to contain >95% dormant spores by phase contrast microscopy. Spores were then stored at 4 °C in sterile distilled water for a maximum of 1 month until use.

For this study, a strain of *B. cereus* KBAB4 from the collection of INRAE's was also used. Suspensions of *B. cereus* spores were prepared according to the French Standard Method NF T 72–231 as summarized below. *Bacillus cereus* suspensions were incubated at 37 °C in brain heart infusion (BHI; Biokar Diagnostics). The sporulation steps consisted of the use of

sporulation medium (10 $g.L^{-1}$ beef extract, 2 $g.L^{-1}$ yeast extract, 0.04 $g.L^{-1}$ $MnSO_4 \cdot H_2O$, and 15 $g.L^{-1}$ agar) and incubation for 2–5 days at 37 °C. Sporulation was monitored by phase contrast microscopy, and spores were harvested when >95% of the bright phase spores were observed. Spores were harvested by flooding the agar surface with sterile distilled water before being transferred to a sterile centrifugation tube. Spore suspensions were centrifuged (4000 ×g, 20 min, 4 °C), the pellet was washed three times and finally resuspended in 20 mL of sterile distilled water. A heat treatment (80 °C for 10 min) was performed and spores were suspended in 0.2-µm filtered 70% ethanol (filter: cellulose acetate, Sartorius, Dourdan, France; ethanol: Elvetec, Nemours, France) for 1 h in order to inactivate vegetative cells. Spores were then washed three times by successive centrifugation (3600 ×g, 15 min, 4 °C) and suspended in sterile distilled water at 4 °C. Spores were counted by pouring 1 mL of each suspension onto BHI agar plates (Biokar Diagnostics) according to the French standard NF V 08–602. *Bacillus cereus* was incubated at 37 °C for 48 h. The concentration of the final spore suspensions was standardized at 10^7 CFU/mL, and suspensions were stored at 4 °C for a maximum of 1 month.

2.2.2. Spore preparations for HP treatment

For each experiment, *B. subtilis* spores were suspended in a pressure-stable 2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid (MES, Sigma Aldrich) buffer solution to obtain a final spore concentration of approximately 10^8 spores/mL. MES buffer solution was chosen for HP experiments because its pH varies slightly with pressure and temperature ($\Delta pKa/°C = -0.011$; pH varies from 5.5 to 6.5 between 10 and 1000 MPa at 25 °C) (Bruins et al., 2007). One mL of the spore suspension was transferred to a sterile polyethylene pipet (Dominique Dutscher, Issy-les-Moulineaux, France). For experiments on *B. cereus*, samples were prepared by a 90% dilution of the initial spore suspensions in tryptone salt (TS) buffer solution (Biokar Diagnostics). Then, each spore suspension (0.5 mL) in TS was heat-sealed into polyethylene pouches (polyethylene transfer pipet, Dominique Dutscher).

Bacillus subtilis spores were then treated with HP in a Top Industrie HP vessel of 20 cm^3 (Top Industrie, Vaux le Penil, France). Experiments on *B. cereus* spores were performed using a different HP machine. This instrument was a 600-MPa HP vessel of 30 cm^3 (Top Industrie). Both HP systems were equipped with a double-jacket, and water served as the pressure-

transmitting fluid. The internal temperature of the pressure chamber was maintained using a water bath (Minisat 240, Huber, Germany) connected to the double wall of the pressure chamber and monitored using a Pt100 thermocouple (Top Industrie). The water bath temperature was set to limit adiabatic heating. The pressure and temperature during HP treatment were also recorded using InstruNet World (iW) software (GW Instruments, Charlestown, USA).

For each strain, zero-time samples were taken to determine initial spore concentrations before treatment. Pouches were placed in the HP vessel 5 min before treatment to allow the temperature to equilibrate. The samples were then treated at the desired pressure-temperature couple and immediately immersed in iced water.

2.2.3. Enumeration of HP-treated spores

After HP treatment, spores were serially diluted 1/10 in PBS and aliquots were plated on LB medium for *B. subtilis* spores or on BHI medium for *B. cereus* spores. To determine heat-sensitive *B. subtilis* spores, HP-treated spores were heated at 80 °C for 10 min to inactivate HP-germinated spores. After heat treatment, pressure and heat-treated (HPHT) spores were serially diluted in PBS and spotted onto LB medium. Plates were incubated at 37 °C until colonies appeared, which were then counted.

Inactivation and germination were expressed as follow:

$$Inactivation = log_{10}\left(\frac{N_0}{N_{HP}}\right)$$

$$Germination = log_{10}\left(\frac{N_{HP}}{N_{HPT}}\right)$$

N_0: initial live spore concentration as given by colony-forming unit (CFU/mL), N_{HP}: HP-treated spores (live spore concentration after HP treatment), and N_{HPT}: HPHT-treated spores (live spore concentration after HP and HT treatments).

2.2.4. HP treatment characteristics

HP cycling treatments were characterized by the pressure level (350 MPa for *B. subtilis*; 300, 350, or 400 MPa for *B. cereus*), the pulse number (between 1 and 5 pulses) with a pulse holding time of 5 min, and the time between pulses (0, 1, 5 min). These cycling treatments were also

characterized by the compression rate (CR) to reach the target pressure and the decompression rate (DR) to return to atmospheric pressure (*B. subtilis*: CR = 2.5 MPa.s^{-1}, DR = 2.5 MPa.s^{-1} unless otherwise stated; *B. cereus*: CR = 2.5 MPa.s^{-1}, DR < 3 s). Temperature of the treatment during the plateau (40 °C for *B. subtilis*; 38, 50, and 60 °C for *B. cereus*) was strictly controlled so that the temperature variation was ±3 °C. For the treatment of *B. subtilis* spores with rapid compression and decompression rates, the temperature variation was greater but did not exceed 8 °C.

Continuous HP treatments were characterized by (1) a compression, (2) a pressure holding time and (3) a decompression, for a total duration corresponding to pressure cycling treatments including times between pulses, compression, and decompression times. Characteristics of both treatments are presented in **Figure 13**.

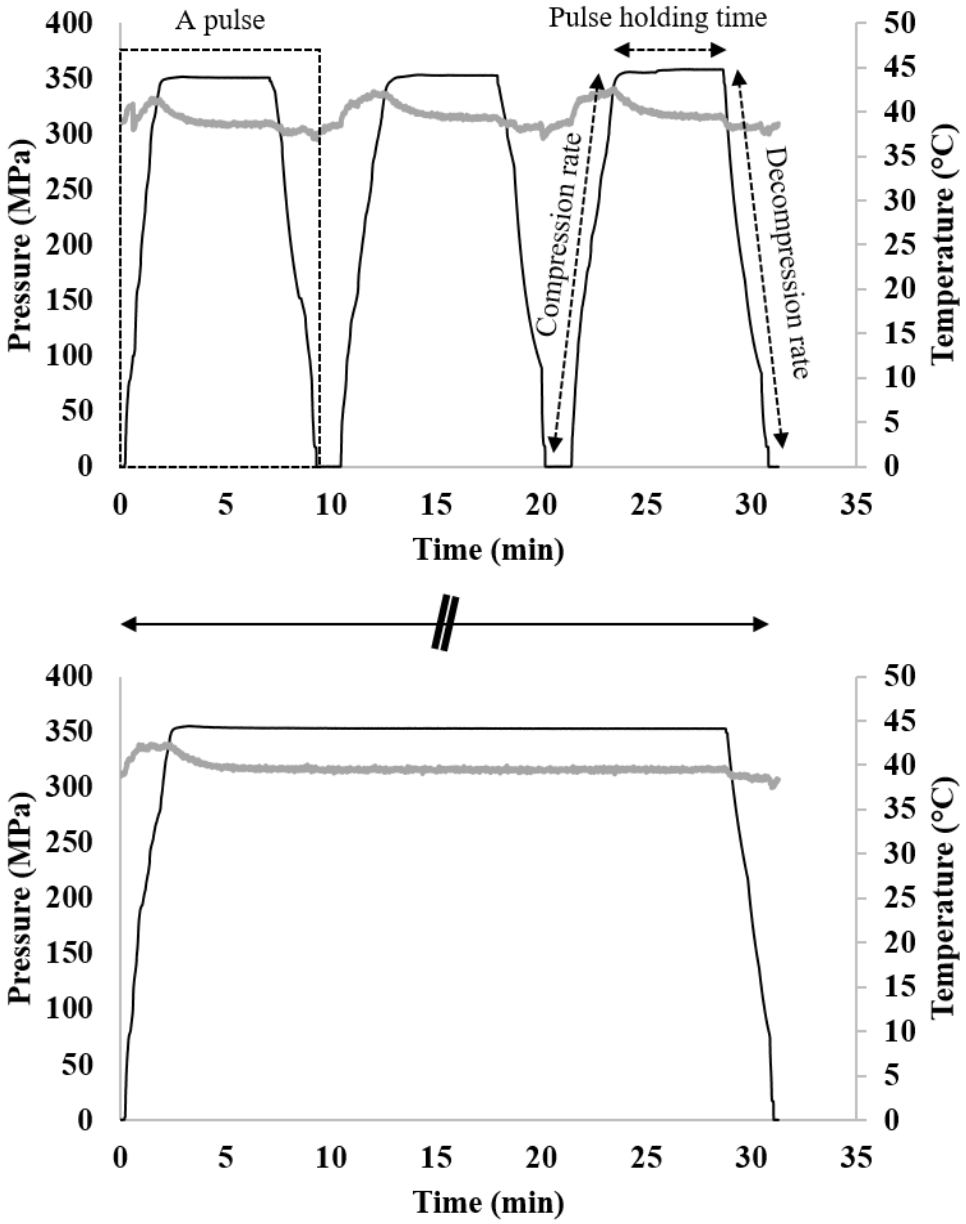


Figure 13 *: Characteristics of cycling and continuous HP treatments. Pressure recording is plotted as a black line and temperature as a gray one.*

2.2.5. Statistical analysis and modeling approaches of spores' inactivation

All experiments were performed in triplicate. A bilateral analysis of variance (ANOVA) comparing continuous and cycling HP treatments was systematically performed using R v.3.5.1 software (R Studio Team (2016)). p-Values below 0.05 were classified and termed as significantly different in the text and highlighted with a star index.

A quasi-chemical kinetic model was used to represent the non-linear dynamics of *B. subtilis* spore inactivation by HP treatment at 350 MPa, 40 °C, with 1–5 pulses. Similar to the approach developed by (Doona, Feeherry, Ross, et al., 2016), this model is based on a simplified mechanism with successive stages describing the germination sequence responsible for spore inactivation by the HP process. Each transition follows first-order kinetics characterized by a parameter k_i [i = 1–3] (s^{-1}). In the proposed mechanism (**Figure 14**), HP treatment induces the conversion of dormant spores (D) to germinated spores at stage 1 (G1), followed by germinated spores at stage 2 (G2), which can be inactivated by pressure treatment (I). Spores that never germinate on the timescale of the experiment are considered to be HP superdormant spores (HPSD), as described by (Delbrück, Zhang, Hug, et al., 2021).

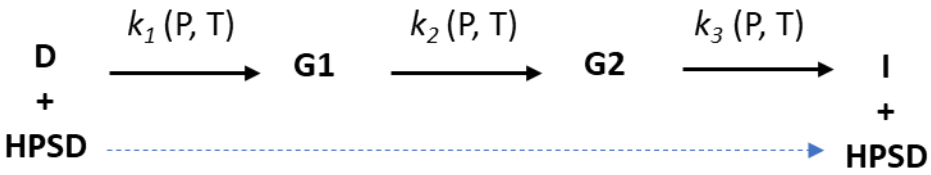


Figure 14 *: Inactivation model based on the spore germination sequence wherein D + HPSD represents the initial population composed of dormant (D) and superdormant spores (HPSD), G1 represents germinated spores at stage 1, G2 germinated spores at stage 2, and I inactivated spores by the treatment. k_1, k_2 and k_3 are model parameters (s^{-1}).*

The set of ordinary differential equations (ODEs) used was (**6**):

$$(6) \quad \begin{cases} \frac{dD}{dt} = -k_1 D \\ \frac{dG1}{dt} = k_1 D - k_2 G1 \\ \frac{dG2}{dt} = k_2 G1 - k_3 G2 \\ \frac{dI}{dt} = k_3 G2 \end{cases}$$

The k_1, k_2, and k_3 rates refer to the three steps described in **Figure 14** and behave differently depending on the pressure (P) and temperature (T) during HP treatment. This pressure dependence was obtained by optimization and based on references in the literature (Heinz & Knorr, 1996; Pandey et al., 2013). Because k_1, k_2, and k_3 depend on pressure, the model is non-linear when these parameters vary. Therefore, we obtained a nonlinear ODE system. Model optimization was carried out using MATLAB® software R2018a (The Mathworks, Inc., Natick,

Massachusetts, USA) from the experimental data (N_{HP} and N_{HPT}) obtained with HP continuous treatments. MATLAB was used for numerical integration of the previous ODE system and model optimization. Unconstrained multivariate optimization was used to minimize the sum of squared deviations (SSD) between the model and experimental data. The accuracy of the model fit was assessed using the minimization of this sum of squared deviations.

From the experimental data (N_0, N_{HP}, and N_{HPT}, refer to **Section 2.2.3**), the initial conditions and the values of D, G1, G2, and I were deduced for different experimental times as follows (***7***):

$$(7) \quad \begin{cases} D = N_{HP} - HPSD \\ G1 + G2 = N_{HP} - N_{HPT} \\ I = N_0 - N_{HP} \end{cases}$$

The model parameters to be optimized were $k_1(P,T)$ and $k_2(P,T)$ kinetics, and HPSD.

2.3. Results and discussion

2.3.1. Application of pressure cycling on B. cereus spores in infant milk

A first set of experiments was intended to reproduce the successful treatment proposed by (Demazeau et al., 2018) and to compare this with continuous HP treatment. The conditions were maintained as close as possible to those of the original protocol.

Bacillus cereus spores were suspended in infant milk (10^6 spores/mL) (Gallia Calisma®, Limonest, France) and treated at 350 MPa, 38 °C, 4 pulses of 5 min, with 5 min between pulses. Three continuous HP treatments were assessed as controls:

- a single HP treatment of 5 min;
- a single HP treatment of 20 min corresponding to the total duration under pressure of the cyclic treatment (d = 4 × 5);
- a single HP treatment of 35 min corresponding to the total duration of the cycling treatment including times between pulses (d = 4 × 5 + 3 × 5).

The results displayed in **Figure 15** show that increasing the holding time at 350 MPa on continuous treatment led to higher inactivation from 1 to 4 log for treatments of 5 and 35 min, respectively. At the same pressure, it appeared that the use of a cycling treatment increased spore inactivation to 4.4 log versus 4.0 log for a continuous treatment of 35 min

with no significant difference ($p > 0.05$). As the increase was not significant, it appears that the efficiency is due to the total duration of the treatment and not to the use of pressure cycling treatment. Under similar conditions, Demazeau and co-workers (Demazeau et al., 2018) obtained total inactivation of *B. cereus* spores (initial population of 1.5×10^6 spores / mL) inoculated in breast milk, which represents a minimum inactivation ratio of 6.18 log. These differences may be explained by the different treatment methods, strains, and cultivation conditions. However, Demazeau et al. did not perform continuous HP treatment as a control. In our study, the cycling pattern employed did not significantly increase HP efficiency, which is important for *B. cereus*. Further experiments were performed on *B. subtilis* spores with varying cycling parameters to clarify whether the cycling pattern could significantly increase the efficiency of HP treatment on bacterial spore inactivation.

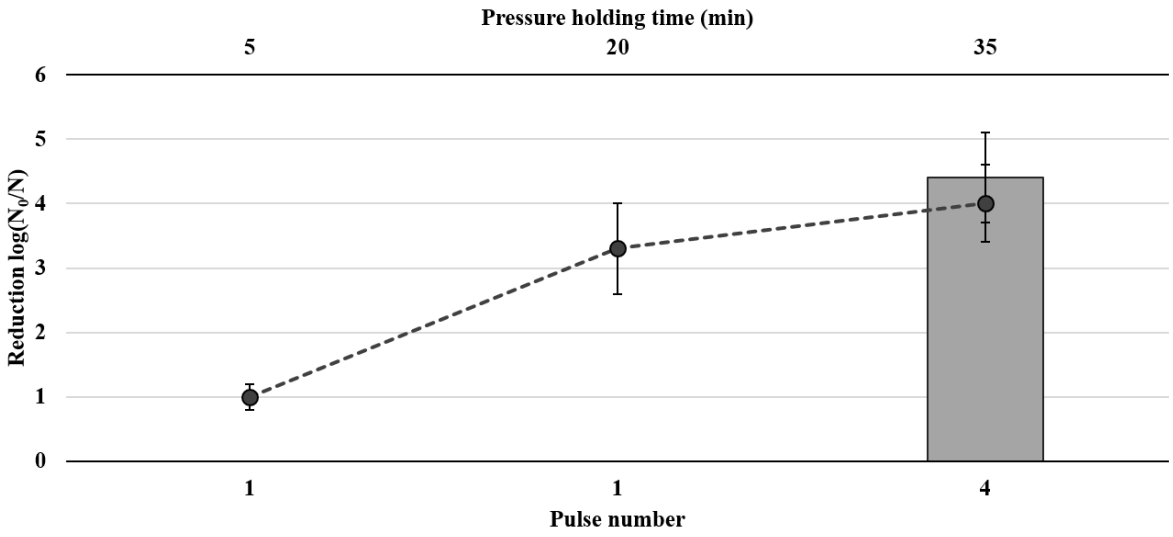


Figure 15 *: Inactivation of B. cereus spores in a suspension of infant milk after pressure treatments. Bar: 4 pulses × 5 min, 350 MPa, 38°C, with a time between pulses of 5 min. Dashed curve: continuous HP treatments for 5, 20, and 35 min. Error bars represent SD calculated from independent triplicates.*

2.3.2. Effect of pulses number on spore inactivation-germination

Germination and inactivation of *B. subtilis* spores were evaluated after pressure cycling with an increase in pulse number (from 1 to 5) at 350 MPa for 5 min at 40 °C, with a time between pulses of 5 min. The inactivation of *B. cereus* spores was also evaluated for the same increase in pulse number at 300 MPa, with a pulse holding time of 5 min and a time between pulses of 1 min at 50 and 60 °C. Germination was not measured with *B. cereus*. The results are presented

in **Figure 16** for *B. subtilis* and those for *B. cereus* in **Figure 17**. Cycling treatment results were plotted in columns as a function of pulse number, while control continuous HP treatments were plotted with dots and lines as a function of treatment time. The time of each control continuous HP treatment was chosen to correspond exactly to the complete time of the cycling treatment (pulses and time between pulses). Thus, for one pulse, the cycling and continuous HP treatments were the same. Spore inactivation is plotted in dark gray columns (or black dashed line for the continuous HP treatment). For *B. subtilis*, spore germination after the same pressure treatment evaluated by heat treatment (80 °C, 10 min) is also represented (see **Section 2.2.3**).

First, regarding the effect of pulse number, inactivation of *B. subtilis* spores was higher when the number of pulses was increased (**Figure 16**). This inactivation reached 1.82 log for a treatment at 350 MPa at 40 °C, with 5 pulses of 5 min. At the same time, spore germination ratio decreased with increasing pulse number from 1.33 log for 1 pulse to 0.08 log for 5 pulses. The first pressure pulse was sufficient to induce a significant proportion of spores to germinate (1.5 log). Then, the subsequent pressure pulses inactivated the germinated spores. **Figure 16** compares pressure cycling treatments versus continuous HP treatments with holding times corresponding to the total duration of each pressure cycling treatment. Similarly, with cycling treatment, inactivation of *B. subtilis* spores increased with holding time ($p < 0.05$) (1.76 log after 68 min of treatment), whereas the ratio of germinated spores decreased at the same time. Pressure cycling treatment appeared to be more efficient for *B. subtilis* spore inactivation with only 2 or 3 pulses ($p < 0.05$). For five pulses, no significant difference was observed with continuous HP treatments ($p > 0.05$). Under these conditions (350 MPa, 40 °C), inactivation seems limited to approximately 2 log, regardless of the time and the process (cycling or not). This was confirmed in an experiment carried out over a prolonged period (115 min 350 MPa 40 °C, *B. subtilis* spore inactivation 1.9 log, data not shown).

As shown in **Figure 17**, *B. cereus* spores were less resistant than *B. subtilis* spores, and inactivation from 2.7 to 5.8 log was obtained for treatment at 300 MPa and 50 or 60 °C for 5 to 29 min. However, inactivation of *B. cereus* at 50 °C exhibited the same trend. There was an effect of treatment time and pulse number on spore inactivation with or without cycling pattern ($p < 0.05$). There was no cycling effect regardless of the number of pulses ($p > 0.05$).

At 60 °C, spore inactivation was accelerated by 4.6 log after the first pulse of 5 min, while only 2.7 log were achieved at 50 °C. Increasing the number of pulses and/or treatment time did not increase the extent of inactivation ($p > 0.05$). There was no cycling effect at 60 °C ($p > 0.05$), as observed earlier at 50 °C. Interestingly, increasing the temperature from 50 to 60 °C greatly accelerated the treatment effect but did not increase the maximum inactivation (5.84 at 50 °C vs. 5.4 at 60 °C) on *B. cereus* spores.

Thus, the results presented in **Figure 16** and **Figure 17** based on these two species (*B. subtilis* and *B. cereus*) demonstrated that increasing the number of pulses caused an increase in spore inactivation, whereas continuous HP treatments resulted in similar inactivation (for pulse numbers >3 for *B. subtilis* spores). The cycling effect, if it exists, would compensate for the time between pulses. However, other studies have already observed a cycling effect; Furukawa et al. increased pulses with the same treatment time (30 min) at 25, 35, and 45 °C and observed cycling and a pulse number effects on *B. subtilis* spores, especially at 35 °C (Furukawa et al., 2003). The inactivation ratios obtained were higher than those of the present results (up to 6 log at 400 MPa, 45 °C, 30 min), probably due to a more sensitive bacterial strain. It is interesting to note that 25 min of treatment was the only treatment where a cycling effect (two pulses) was observed, as in the present results. An increase in spore inactivation with pulse number has also been observed for *Geobacillus stearothermophilus* (Hayakawa et al., 1994) and *A. acidoterrestris* (Sokołowska et al., 2012). Demazeau et al. (2018) claimed to inactivate all spore populations (> 4 log) of *B. cereus* in breast milk with four pulses of 5 min at 350 MPa and 38 °C. No comparison with continuous HP treatment was performed. Conversely, Obaidat et al. (2015) compared the inactivation obtained by pressure cycling (50 pulses of 90 s, 80 MPa, 38 °C) to those obtained by continuous pressure (85 min at 80 MPa, 38 °C) for the same exposure time to pressure and obtained the same inactivation of *B. subtilis* spores (1.91 log for cyclic treatment and 2.22 for continuous treatment).

Thus, our data suggest that, during an HP cycling treatment, the increase in spore inactivation with the number of pulses could be due to the cumulative exposure time to pressure rather than to the effect of the cycling process itself.

It is established that moderate HP treatment (< 350 MPa at temperatures <50 °C) can activate germination receptors (GRs) and induce physiological germination of *Bacillus* spores (Black et

al., 2005). These two stages characterize the germination process of *Bacillus* spores. Initially, GR activation leads to the release of Ca-DPA via SpoVA channels, resulting in partial protoplasm rehydration (stage 1) and loss of heat resistance. Ca-DPA excretion triggers progression into stage 2 of germination, which consists of hydrolysis of the cortex by Cortex Lytic Enzymes (CLEs). At the end of stage 2, the protoplasm is entirely hydrated (P. Setlow, 2014) and the spores lose their resistance to radiation, chemicals, and pressure.

In this study, 95% (1.33 log) of *B. subtilis* spores germinated after one HP pulse (**Figure 16**). Subsequent pulses or more time under pressure for continuous treatments had a greater effect on inactivation of germinated spores than on germination itself. Cycling treatment does not seem to accelerate germination nor affect the germination ratio or the superdormant population.

Bacillus cereus was more efficiently sensitized by pressure; approximately 5 log of spores were inactivated at 50 °C after two pulses for a cycling treatment or after equivalent continuous HP treatment. At 60 °C, spores were inactivated after the first pulses probably because 60 °C is lethal for germinated spores at stage 1, whereas at 50 °C, germinated spores need to reach stage 2 to be affected by pressure treatment. The maximum spore inactivation, which represents the ability of pressure to induce germination, lay between 5 and 6 log and depended neither on temperature nor cycling pattern.

Bacillus subtilis is a mesophilic organism producing spores with a higher resistance to temperature than *B. cereus* which is a psychrotrophic species (Amador Espejo et al., 2014). This resistance difference could be attributed to GR activity and/ or triggering capacity although the germination mechanisms are the same for both species (Garcia et al., 2010). This could also explain the difference in pressure resistance among species of *Bacillus* (Kong et al., 2014; Margosch, Gänzle, et al., 2004). Moreover, Rose et al. demonstrated a link between the sporulation conditions and the germination and resistance properties: spores produced in liquid media germinate more rapidly and show greater sensitivity to heat and chemical treatments than spores produced on plates (Rose et al., 2007). In our study, *B. cereus* spores were produced on solid media but remain more sensitive to pressure than *B. subtilis* spores produced in liquid media.

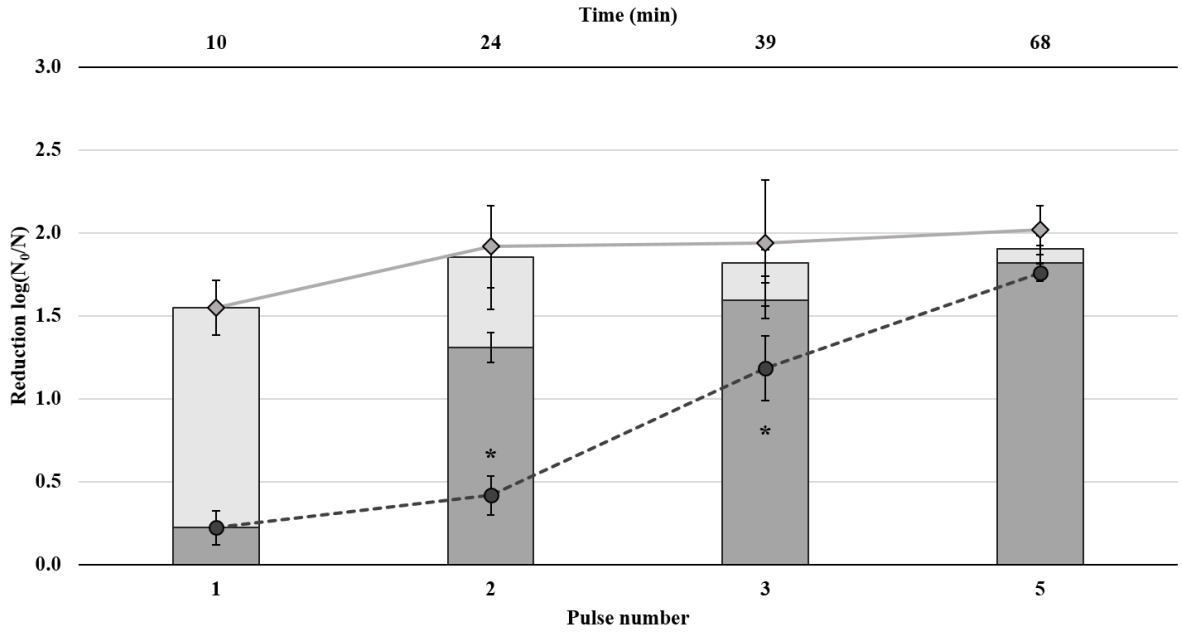


Figure 16 *: Effect of pulse number (1, 2, 3 or 5) on germination and inactivation of pressure treated B. subtilis spores. Bacillus subtilis spores were suspended in MES buffer solution and treated at 350 MPa, 40 °C, pulse holding time of 5 min, and time between pulses of 5 min. Curves: inactivation (black dashed curve) and germination (gray solid curve) of spores treated by continuous HP treatments. Bars: inactivation (dark gray bars) and germination (light gray bars) of spores treated by pressure cycling. Error bars represent SD calculated from independent triplicates; (*) indicate statistically significant difference ($p < 0.05$) between the equivalent continuous and cycling HP treatments.*

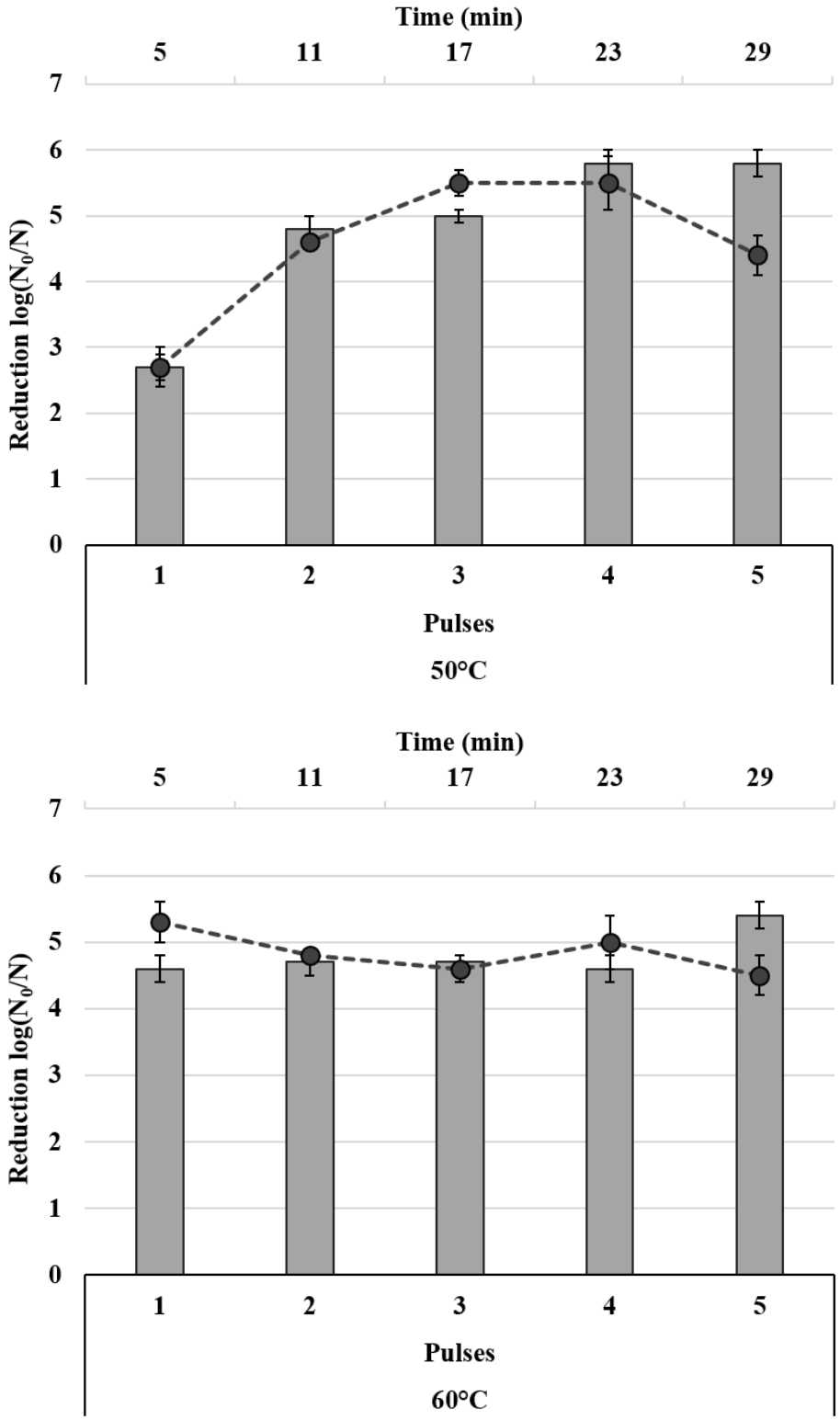


Figure 17 *: Effect of pulse number (1, 2, 3, 4 or 5) on inactivation of pressure treated B. cereus spores. The black dashed curve represents inactivation of spores treated by continuous HP treatments. Gray columns represent inactivation of spores treated by pressure cycling. Bacillus cereus spores were suspended in TS buffer solution and treated at 300 MPa, 50 or 60 °C, pulse holding time of 5 min, time between pulses of 1 min. Error bars represent SD calculated from independent triplicates.*

2.3.3. Effect of time between pulses on spore inactivation-germination

Another parameter specific to cycling treatment is the time at atmospheric pressure between pulses. The effect of this parameter has rarely been tested in previous studies and is relatively short (i.e., 5 min (Sokołowska et al., 2012) or not documented (Furukawa et al., 2003; Hayakawa et al., 1994) and could play a role in spore germination.

Bacillus subtilis PS533 spores were treated by pressure cycling at 350 MPa, at 40 °C, with 3 pulses of 5 min each, or 5 pulses of 5 min each, with different times between pulses (0, 1, and 5 min). The results are shown in **Figure 18**. As observed earlier, spore inactivation increased with increasing pulses number regardless of the time between pulses ($p < 0.05$). However, longer holding times between pulses (1 and 5 min) did not result in greater spore inactivation ($p > 0.05$).

Bacillus cereus spores were also treated by pressure cycling at 400 MPa, at 60 °C, with 3, 4, or 5 pulses of 5 min each, and with different times between pulses of 0, 1, and 5 min (**Figure 19**). As for *B. subtilis* spore inactivation, longer holding times between pulses did not result in greater spore inactivation for the first treatment tested (3 pulses): between 4.8 and 5.1 log inactivation. For both treatments of 4 and 5 pulses, higher inactivation (5.8–5.9 log) was observed when the time between pulses applied was 5 min ($p < 0.05$).

For both species, increasing the time between pulses did not seem to increase spore inactivation in this study (except for *B. cereus* spores, for longer treatments (4 or 5 pulses) and longer time between pulses (5 min)). Perhaps the time between HP pulses was not sufficient to allow greater germination ratios. In fact, a longer time (1 h) at atmospheric pressure has previously been reported to greatly enhance *B. subtilis* spore germination and inactivation ratios (H. Nguyen Thi Minh et al., 2010). In the latter study, maintaining spores at atmospheric pressure for 60 min between two pulses (350 MPa) allowed 4.5 log inactivation, whereas the absence of an intercycle led to an inactivation of only 2 log. Several studies have previously employed two HP treatments: the first at moderate pressure (100–400 MPa) and the second at higher pressure (> 500 MPa) with a prolonged period between the two treatments (30–60 min) to stimulate germination and enhance inactivation (Capellas et al., 2000; Mills et al., 1998; Wuytack et al., 1998). An extended time at atmospheric pressure (> 60 min) or a long time at moderate pressure (210 min at 60 MPa) (Capellas et al., 2000) could stimulate the

transition from stage 1 to stage 2 of germination and therefore increase the inactivation of germinated spores in subsequent pressure treatment.

In our case, we increased the time between pulses by a few minutes to remain within reasonable industrial processing conditions. It would be necessary to increase the time between pulses to highlight this phenomenon.

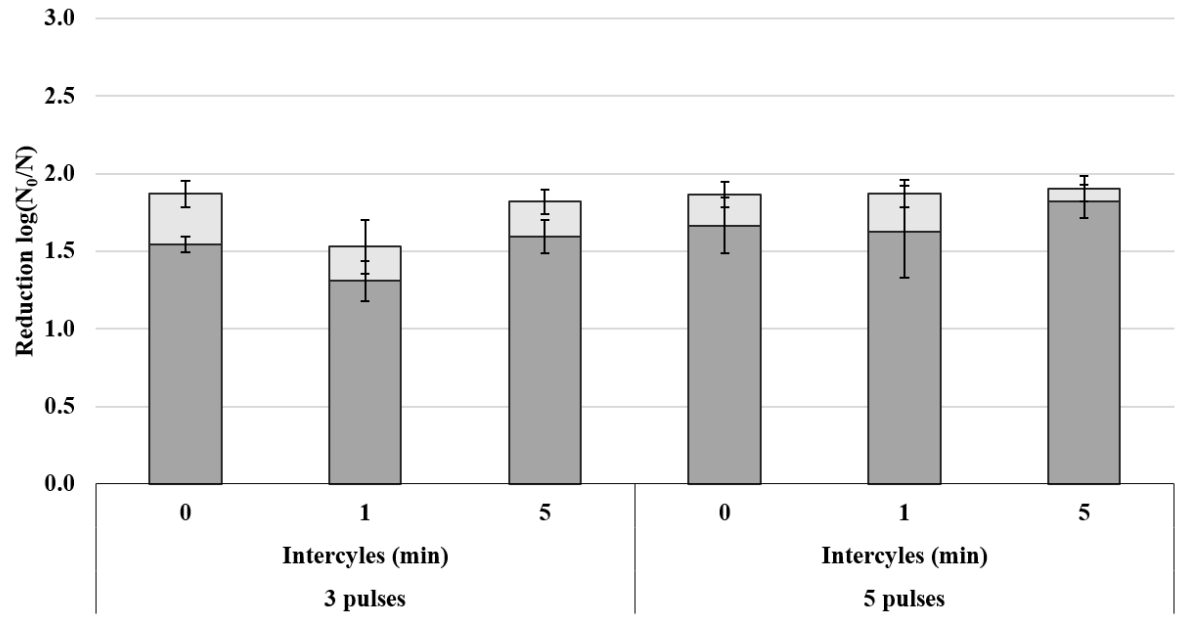


Figure 18 *: Effect of time between pulses (intercycles) on germination and inactivation of pressure-treated B. subtilis spores. 3 or 5 pulses × 5 min, 350 MPa, 40°C. Bars: inactivation (dark gray bars) and germination (light gray bars) of spores treated by pressure cycling. Error bars represent SD calculated from independent triplicates.*

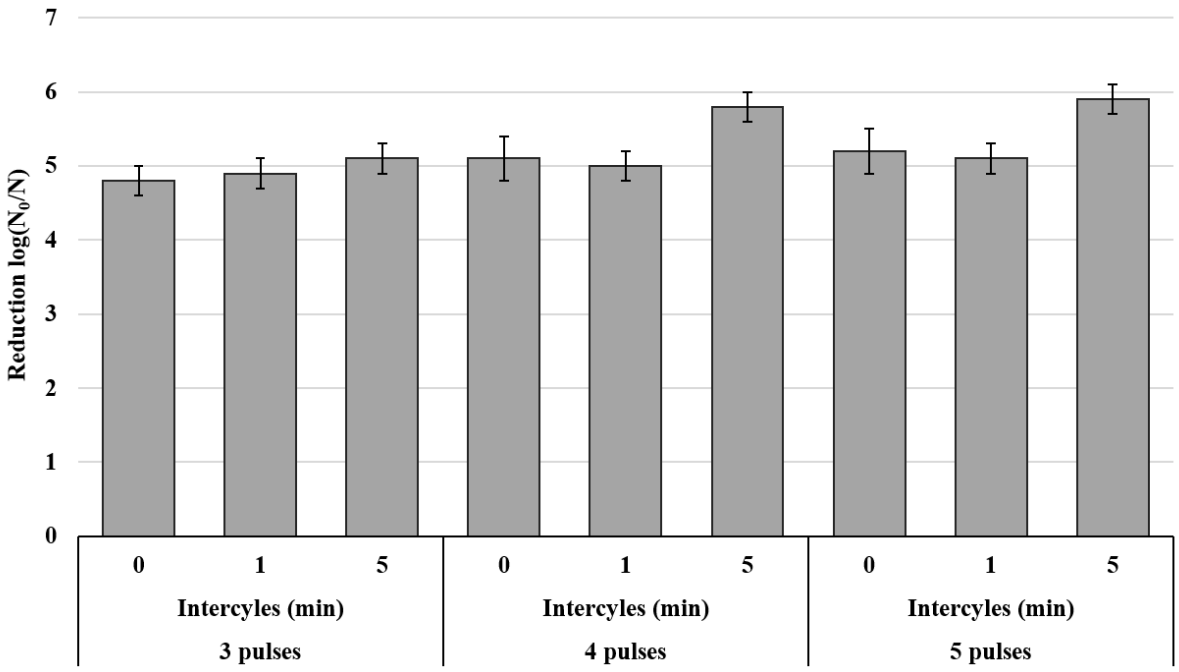


Figure 19 *: Effect of time between pulses (intercycles) on inactivation of pressure-treated B. cereus spores. 3, 4, or 5 pulses × 5 min, 400 MPa, 60°C. Error bars represent SD calculated from independent triplicates.*

2.3.4. Effect of compression and decompression rates on pressure cycling inactivation of B. subtilis spores

Germination and inactivation of *B. subtilis* spores were evaluated after pressure cycling (350 MPa, 40 °C, 4 pulses of 5 min, with 5 min between pulses) with varying compression and decompression rates. Continuous HP treatments were also performed with the same variations in compression and decompression rates to evaluate the importance of these parameters on the cyclic effect.

The results presented in **Figure 20** reveal a slight increase (approximately 0.4 log) in spore inactivation for slow pressure rates (kinetics 4–5) or the highest pressure rate tested (kinetics 1) for pressure cycling treatment. As expected for the continuous treatment, longer treatment (for slow kinetics) led to greater inactivation, whereas germination ratios remained almost constant. This longer time under pressure can also explain the greater inactivation ratios observed for slow cycling kinetics (4–5). Considering only the time under pressure, greater rates would give shorter time under pressure and thus lower inactivation, which is effectively observed except for kinetics 1. This compression rate effect requires a compression >17.5 MPa/s, that is, 350 MPa in 20 s. This pulse effect was only observed with cyclic treatment because control samples that were pressurized in the same manner exhibited only weak inactivation (0.52 log) related to the short treatment time (36 min).

The higher inactivation of spores with slow compression rates has already been observed in several studies: for *B. subtilis* at 600 MPa/ 60–80 °C (maximum compression rate 15 MPa/s, (Syed et al., 2012)) or *B. amyloliquefaciens* at 600 MPa/60–105 °C (maximum compression rate 18 MPa/s, (Ratphitagsanti et al., 2009)). It is generally postulated that a lower compression rate leads to a longer time under pressure, and hence, greater inactivation. Moreover, a slow compression rate allows stimulation of spore germination, which is enhanced at moderate pressure levels (between 80 and 200 MPa). Our results seem to confirm these two hypotheses, with an increase in spore inactivation and an increase in germination ratio (inactivation after heat treatment) with slow compression and decompression.

The rapid compression effect on spore inactivation observed in this study could be related to the adiabatic compression heat, which is limited by rapid heat diffusion in the stainless-steel

HP cylinder (in our case, 8 °C). As mentioned in the Material and Methods section, only for this condition, adiabatic heating could not be limited to less than +3 °C. In the literature, temperature increases of samples resulting from rapid compression are rarely recorded and depend mainly on experimental parameters (compression rate, pressurization medium, volume, etc.). In previous studies (Luu-Thi et al., 2015; Syed et al., 2012), specific experimental conditions led to a lower temperature immediately after compression for fast compression and thus with no fast compression inactivation effect on spores. Conversely, in changing compression medium characteristics, Robertson and co-workers (Robertson et al., 2008) observed an increase in *Bacillus* spore inactivation with increasing adiabatic compression heat at the same compression rate. At the compression rate used (< 200 MPa/s), effects of compression kinetics are mainly due to adiabatic compression heat; higher compression or decompression rates are necessary to cause mechanical perturbations of spores, as previously observed with gas release (Colas de la Noue et al., 2012).

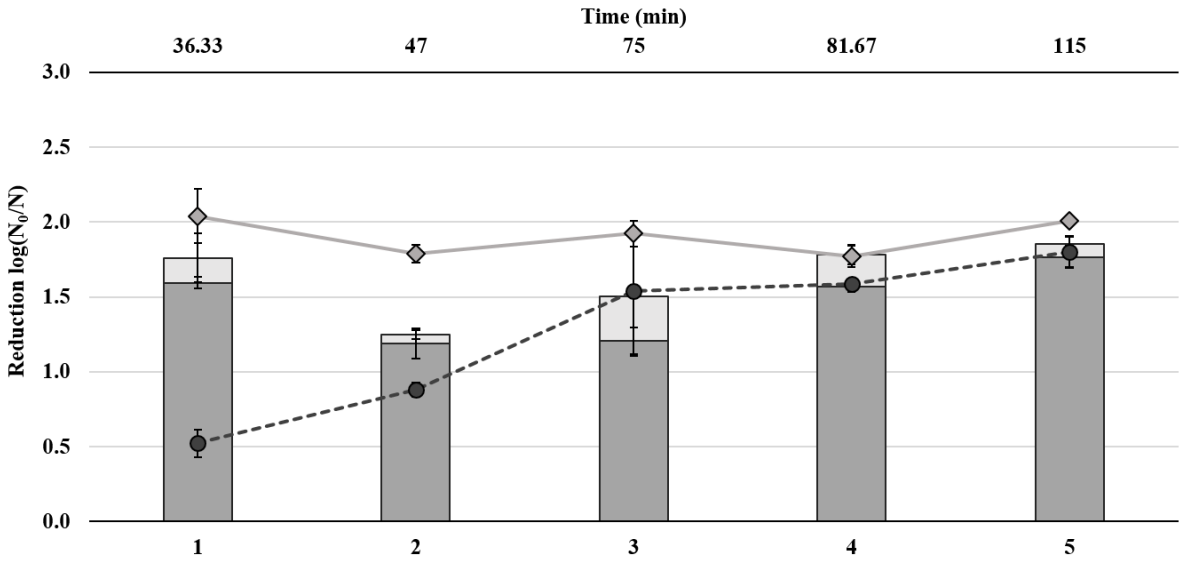


Figure 20 *: Inactivation of B. subtilis spores after pressure treatments using various compression and decompression rates. Curves: inactivation (black dashed curve) and germination (gray solid curve) of spores treated by continuous HP treatments. Bars: inactivation (dark gray bars) and germination (light gray bars) of spores treated by pressure cycling. 350 MPa, 40°C, 4 pulses of 5 min, with 5 min between pulses.* ***1****: CR = 17.5 MPa.s^{-1}, DR = 350 MPa.s^{-1};* ***2****: CR = 2.5 MPa.s^{-1}, DR = 8.75 MPa.s^{-1};* ***3****: CR = 1.17 MPa.s^{-1}, DR = 1.17 MPa.s^{-1};* ***4****: CR = 1 MPa.s^{-1}, DR = 1 MPa.s^{-1};* ***5****: CR = 0.58 MPa.s^{-1}, DR = 0.58 MPa.s^{-1}.*

2.3.5. Modeling of B. subtilis spores germination and inactivation by HP

Inactivation kinetics models are commonly used to describe spore inactivation by HP treatment. In this study, inactivation kinetic modeling seems essential to compare the phenomena involved in spore inactivation between continuous and cycling HP treatments.

Different modeling approaches have been proposed in the literature for spore inactivation. For thermal treatments, a first-order kinetic model was used to model spore inactivation, giving rise to a linear function with the rate constant k as the slope. For HP treatments, spore inactivation depends on the kinetics of several successive processes, and thus requires models that are more complex. Reineke et al. (2012) applied a two-step kinetic model based on a simple differential chemical equation (dormant spore → germinated spore → inactivated spore) to develop a second-order model for high-pressure, high-temperature spore inactivation (Reineke et al., 2012). It is commonly assumed that *Bacillus* spore germination occurs in two stages (P. Setlow, 2003). The transition from stage 1 to stage 2 of germination is mainly based on enzymatic reactions. In the first stage of germination, spores release DPA and become sensitive to heat. In the second stage, the external layers are degraded by CLE enzymes, allowing the rapid swelling of spores and their subsequent sensitization to other stresses (H. Nguyen Thi Minh et al., 2010; P. Setlow, 2003). Here, we chose a three-step kinetic model to highlight the two stages of spore germination at the origin of spore inactivation. We further varied the model parameters according to pressure and pressure pulses.

Based on the literature, the following hypotheses concerning the pressure dependence of these rates were formulated:

- k_1 was assessed for pressure-induced spore germination. Because of the lack of data concerning germination kinetics at different pressures, germination kinetics was considered to be 0 at atmospheric pressure, increased linearly with pressure up to 200 MPa, and remained constant at pressures >350 MPa. The k_1 value at this interval (200–350 MPa) was optimized for this model.

- k_2 was attached to a transformation that is essentially governed by CLE enzymes. These enzymatic reactions may be modified under pressure. Pressure was not necessary for this transformation, but it could modulate its kinetics. A simple thermodynamic model is chosen as follows:

  $\frac{\partial lnk_2}{\partial P} = -\frac{\Delta V}{RT}$

  Considering ΔV RT to be a constant. Thus, only two points are necessary. The k_2 value at atmospheric pressure (4.7×10^{-3} s^{-1}) was calculated from the literature (Pandey et al., 2013) and k_2 at 350 MPa was obtained from optimization. This parameter and its variations were adjusted during optimization, with a value at atmospheric pressure deduced from the literature.
- k_3 describes the inactivation of germinated spores. Stage 2-germinated spores became sensitive to lethal perturbations due to the increase in core water, similar to vegetative forms. Considering stage 2-germinated spores as vegetative bacteria, k_3 was adapted from a model presented in the literature (Heinz & Knorr, 1996) and was not adjusted in this study.

In a first step, model optimization was performed on continuous HP treatments with variable durations (from 8 min to 4 h at 350 MPa and 40 °C) in order to minimize the sum of squared deviations (SSD) between the model and experimental data (the optimal value of the criterion 1.89×10^7 is relevant according to the population level and variations). The results displayed in **Figure 21** show an accelerated decrease in dormant spores as well as a shoulder and tailing formation. As dormant spore numbers decreased, the maximum amount of spore germination was deduced from modeling, corresponding to stage 1-germinated spores. Pressure holding did not allow stage 1-germinated spores to reach stage 2. Experimental data are also presented in this figure, corresponding to the dormant spores (NHPTexp) and inactivated spores (Iexp). The resulting model correctly translated the evolution of D and I populations. It could also predict the evolution of the G1 and G2 populations, which have not been measured experimentally.

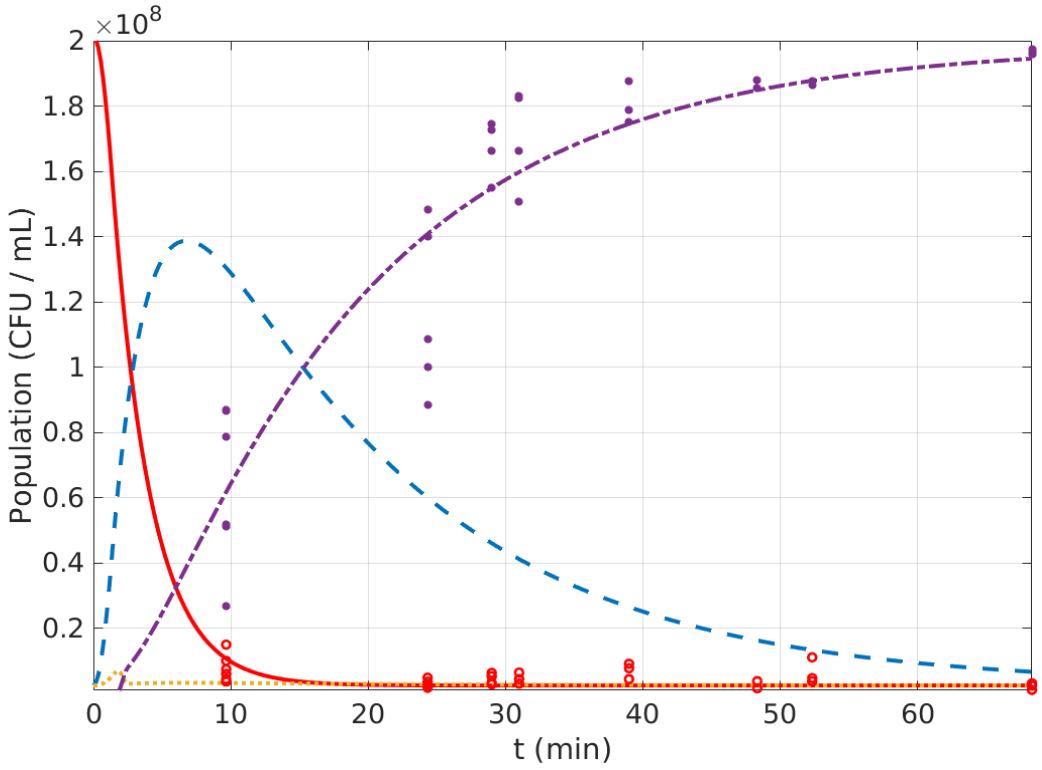


Figure 21 *: Evolution of the different stages of B. subtilis spore germination and inactivation as a function of holding time under continuous HP treatment (350 MPa, 40°C). Solid red curve represents calculated dormant spores (D); dashed blue curve represents calculated stage 1-germinated spores (G1); dotted yellow curve represents calculated stage 2-germinated spores (G2); and dash-dotted purple curve represents calculated inactivated spores (I). Solid purple dots represent experimentally inactivated spores (Iexp); empty red dots represent experimentally HPHT treated spores (NHPTexp).*

Then, k_1 and k_2 were calculated for each pressure variation over time. Optimal values of k_1 and k_2 were obtained, as shown in **Figure 22**. A slight decrease in k_2 with pressure was observed, supporting an increase in reaction ΔV, which is consistent with the hydrolysis reaction. The k_1 value at 350 MPa is also consistent with the kinetics of DPA leakage measured at the same pressure and temperature (4.6×10^{-3} s^{-1} at 300 MPa at 40 °C for *B. subtilis* PS832) (Reineke et al., 2012).

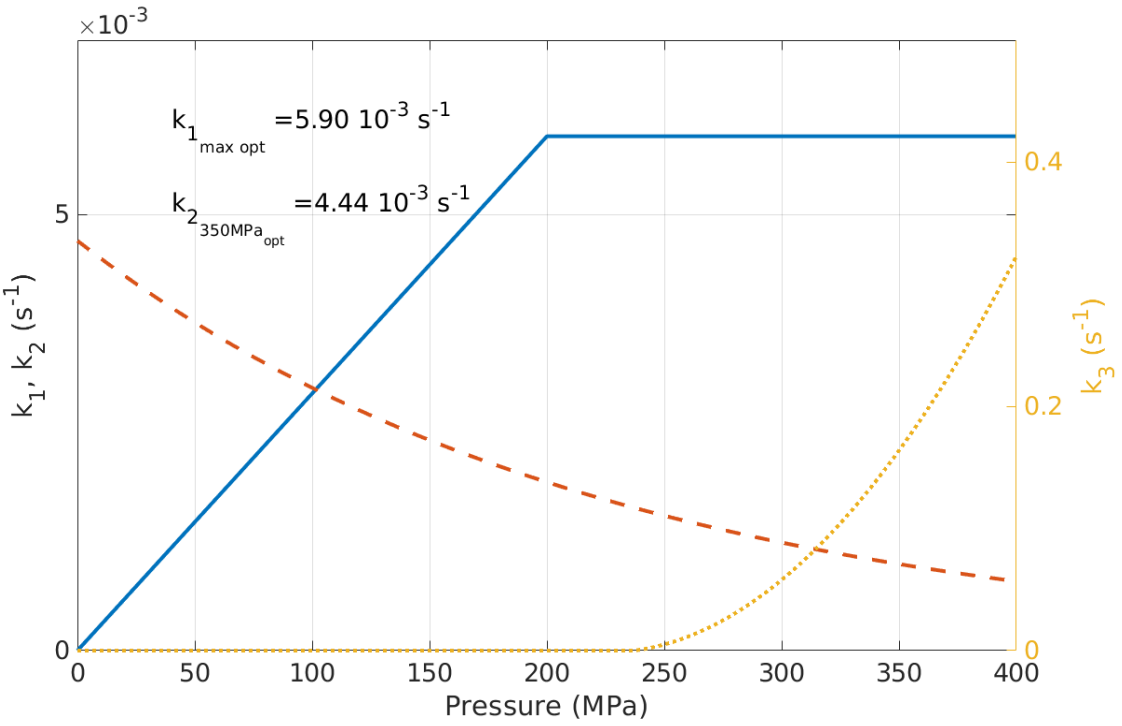


Figure 22 *: Rate fitting for continuous HP treatments of B. subtilis spores (k_1, k_2 were obtained by optimization whereas k_3 was adapted from* (Heinz & Knorr, 1996)*, in s^{-1}). Solid blue curve, dashed orange curve and dotted yellow curve represent k_1, k_2, and k_3 calculated rates, respectively.*

For HP treatment at moderate temperatures, some spores remain resistant regardless of the time employed. It is well known that some spores which are called “super dormant” (SD) are not able to germinate with nutrients, probably because they have very low GR levels (Stewart & Setlow, 2013). High-temperature treatment or chemical germination is generally necessary to induce germination. A relationship between SD spores in nutrients, presence of GR, and resistance to moderately high pressure exists but is largely dependent on GR (Doona et al., 2014). Similarly, high pressure/moderate temperature-resistant spores could be termed as HPSD (Delbrück, Zhang, Hug, et al., 2021). To fit the normalized experimental data, the HPSD

values needed to be adjusted. The optimized HPSD level (2.10×10^6 spores/mL) was consistent with the experimentally obtained HPSD value (4.98×10^6 spores/mL) from experiments with a long holding time at a given pressure and temperature level.

Finally, using these rates, it was possible to stimulate spore germination and inactivation by HP cycling treatment (**Figure 23**). The previous model allows simulation by solving the ODEs for all experimental conditions: pressure variation regardless of the number of cycles, time between pulses, and CR and DR variations. **Figure 23** shows that the experimental data fit well with the predicted data, which supports our hypotheses regarding the mechanisms of inactivation under HP cycling. Germination induction was maximal within the first pulse. An increase in the number of pulses had no apparent effect on germination induction. The amount of stage 2-germinated spores was slightly higher for the first two times between pulses, indicating that CLEs may be inactive under HP. For the subsequent times between pulses, the abundance of stage 2-germinated spores decreased, perhaps due to the low level of germination induction (stage 1-germinated spores).

The fact that the model does not fit well for the greatest compression rate experimental data is consistent with the dependence of the model parameters on temperature elevation during such treatment. In fact, adiabatic heating is responsible for a deviation of +8 °C under such conditions, whereas k_1, k_2, k_3, and HPSD were optimized at 40 °C only.

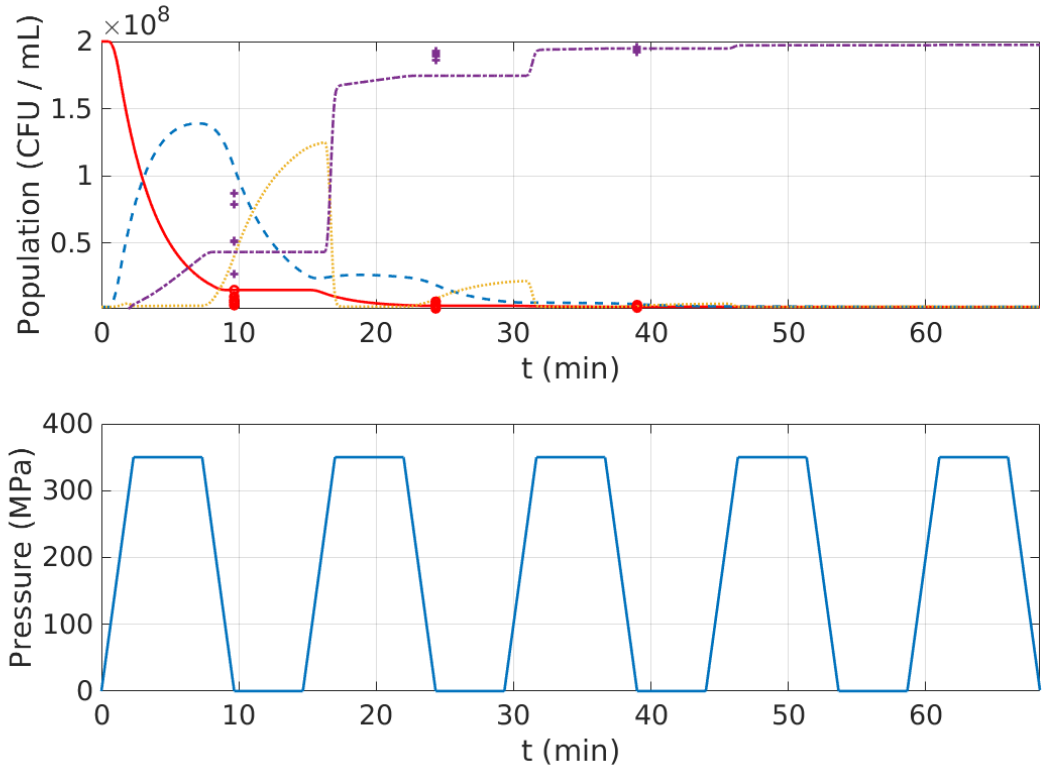


Figure 23 *: Evolution of the different stages of B. subtilis spore germination and inactivation as a function of pulses number (350 MPa, 40°C). Solid red curve represents calculated dormant spores (D); dashed blue curve represents calculated stage 1-germinated spores (G1); dotted yellow curve represents calculated stage 2-germinated spores (G2); and dash-dotted purple curve represents calculated inactivated spores (I). Purple dots represent experimentally inactivated spores (Iexp); red points represent experimentally HPHT-treated spores (NHPTexp).*

2.4. Conclusion

In this study, inactivation of *B. cereus* and *B. subtilis* spores was measured after HP cycling under varying conditions and compared with equivalent continuous HP treatments. We observed that inactivation was mainly related to the pressure holding time. HP cycling had only a marginal effect on inactivation, probably due to germination acceleration in the first cycles and adiabatic heating for rapid compression rates. The design of a three-step kinetics model supports our hypothesis regarding the mechanisms involved in spore inactivation. Further investigations focusing on temperature implementation in the model could allow a better understanding of spore germination and inactivation mechanisms. In the same way, further experiments involving quantification of the released DPA and observation of cortex lysis by CLEs could lead to a comprehensive physiological characterization of HP-treated spores. Finally, further studies focusing on a better understanding of HPSD spores and their variations in pressure and temperature are relevant in order to improve spore inactivation by HP treatment. From an industrial point of view, the cycling treatment does not seem to reduce treatment duration while inducing a quicker fatigue of the HP equipment. Moreover, commercial HP applications available currently work at ambient temperature.

2.5. Funding sources

This work was supported by funds from the Carnot Institute Qualiment® as part of the sHPore project.

3. Conclusion du chapitre 1

En comparaison avec le traitement HP continu, cette étude montre que l'inactivation des spores par le traitement HP cyclique est principalement due au temps de maintien sous pression plutôt qu'à l'effet du traitement cyclique lui-même. Nous observons une induction de germination de 90 % de la population au cours du premier cycle HP. Les spores germées en phase 1 évoluent vers la phase 2 de germination au cours des deux premiers intercycles avant d'être inactivées par la pression.

Ces constats montrent clairement un faible intérêt de l'utilisation industrielle du traitement HP cyclique par rapport au traitement HP continu dans les conditions testées. En effet, cela n'aurait pour conséquence que l'usure de l'équipement HP. En revanche, le modèle mathématique développé pourrait permettre une optimisation des barèmes de pression et de température à appliquer industriellement. Pour cela, une meilleure compréhension de l'état physiologique des spores HPSD nous semble indispensable pour cibler cette population par la pression. Cela pourrait se faire en combinant la pression et la température pour diminuer la prévalence de cette population.

Dans le chapitre suivant, nous proposons une caractérisation physiologique complète des spores traitées par HP pour comprendre les mécanismes d'inactivation de celles-ci par la pression.

CHAPITRE 2

VERS UNE INVESTIGATION DES MECANISMES D'INACTIVATION DES SPORES BACTERIENNES PAR LES HP

Sommaire

1. Introduction et Objectifs 98

2. Démarche expérimentale 98

2.1. Préparation et conditionnement des spores à traiter 98

2.2. Plan d'expériences 98

2.3. Suivi des marqueurs 100

3. Résultats 102

3.1. Germination et inactivation des spores suite aux traitements étudiés 102

3.2. Caractérisation des spores par les marqueurs biologiques suite aux différents traitements d'étude 103

3.3. Suivis de la germination après les différents traitements d'étude 104

4. Discussion 125

5. Conclusion du chapitre 2 130

1. Introduction et Objectifs

L'objectif de cette étude est de comprendre les mécanismes d'inactivation des spores bactériennes par les traitements sous pression. Pour cela, plusieurs traitements à différents barèmes de pression et de température sont mis en place de façon à permettre une réduction décimale de la population initiale de spores bactériennes. Différents biomarqueurs sont utilisés pour caractériser les spores après les traitements d'études. Enfin, une analyse de la germination des spores suite aux différents traitements d'études met en évidence l'état physiologique des spores traitées.

2. Démarche expérimentale

2.1. Préparation et conditionnement des spores à traiter

Les spores de *B. subtilis* PS533 sont produites selon le protocole décrit dans le Chapitre 1, section « Matériels et Méthodes » (**cf. 2.2.1**). Les spores suspendues dans l'eau à une concentration finale de 10^8 spores/mL sont conditionnées et traitées HP comme décrit précédemment. La montée en pression et la dépressurisation se font à des vitesses de 4 et 15 $MPa.s^{-1}$ respectivement. L'échauffement adiabatique pendant la montée en pression n'excède pas +3 °C par rapport à la température consigne. Trois répétitions techniques sont réalisées avec deux réplicats biologiques pour chaque traitement, soit un total de six jeux de données par traitement.

2.2. Plan d'expériences

Dans un premier temps, l'objectif est de déterminer différents traitements HP pour l'étude des mécanismes d'inactivation des spores par la pression, grâce à différents biomarqueurs mis en place. Nous avons choisi de définir des barèmes permettant une inactivation d'un log de la population initiale afin de mettre en évidence les premiers mécanismes létaux et sublétaux pour différents types de traitements combinés HPT.

Les essais sont réalisés à 300 et 500 MPa pour tenir compte des deux types d'induction de la germination des spores par la pression, décrits dans la littérature. Ainsi, à 300 MPa, l'induction de la germination se ferait par activation des récepteurs GR. A 500 MPa, l'induction de la germination se ferait majoritairement par libération du CaDPA via les canaux protéiques

SpoVA. Nous nommons basses pressions (BP) et hautes pressions (HP) les traitements réalisés à 300 MPa et 500 MPa respectivement dans la suite du texte.

De la même façon, nous définissons deux gammes de températures de traitement nommées par la suite basse température (BT) et haute température (HT). Des premiers essais de traitement ont été réalisés à 20 °C mais les résultats ne montrent pas d'effet sur la viabilité des spores. Ainsi, nous avons opté pour une température de 40 °C pour les traitements à basse température. Cette température de traitement n'induit pas d'inactivation thermique sur les spores, permettant ainsi d'interpréter les résultats comme étant l'effet de la pression. Pour le traitement HP combiné à haute température, la température de 70 °C est retenue car elle permet de mimer une pasteurisation (température de cuisson des aliments) et ne peut à elle-seule affecter les spores.

Les traitements à définir sont les suivants :

- Un traitement Basses Pressions (BP) + Basse Température (BT) : traitement **BPBT**
- Un traitement Hautes Pressions (HP) + Basse Température (BT) : traitement **HPBT**
- Un traitement Hautes Pressions (HP) + Haute Température (HT) : traitement **HPHT**
- Un traitement thermique de réduction décimale (traitement **TT**) est également mis en place afin de comparer les mécanismes d'inactivation des spores par la pression et par la chaleur.

Ainsi, pour déterminer les barèmes adéquats, les spores suspendues dans l'eau distillée sont soumises aux traitements suivants :

- Traitement **BPBT** : 300 MPa, 40 °C, entre 20 et 60 min
- Traitement **HPBT** : 500 MPa, 40 °C, entre 30 et 90 min
- Traitement **HPHT** : 500 MPa, 70 °C, entre 1 et 5 minutes
- Traitement **TT** : 97 °C, entre 5 et 15 minutes

Suite aux différents traitements d'étude, les spores traitées sont observées en microscopie à contraste de phase pour caractériser leur réfringence. Un double marquage Syto9 et IP est également réalisé sur ces spores pour caractériser le stade de germination auquel elles se situent et pour statuer sur la perméabilisation de la membrane interne. La $DO_{\lambda=620\ nm}$ de la suspension de spores est mesurée avant et après le traitement d'intérêt. La DO mesurée après

traitement est ramenée en pourcentage de la DO initiale (avant traitement) pour en déduire la chute de DO au cours du traitement. Enfin, les spores traitées sont placées dans des conditions d'induction de la germination. La germination de ces spores est suivie par la chute de $DO_{\lambda=620\ nm}$. La **Figure 24** représente les méthodes de caractérisation en 3 étapes (A, B, C) mises en œuvre pour chaque traitement d'étude.

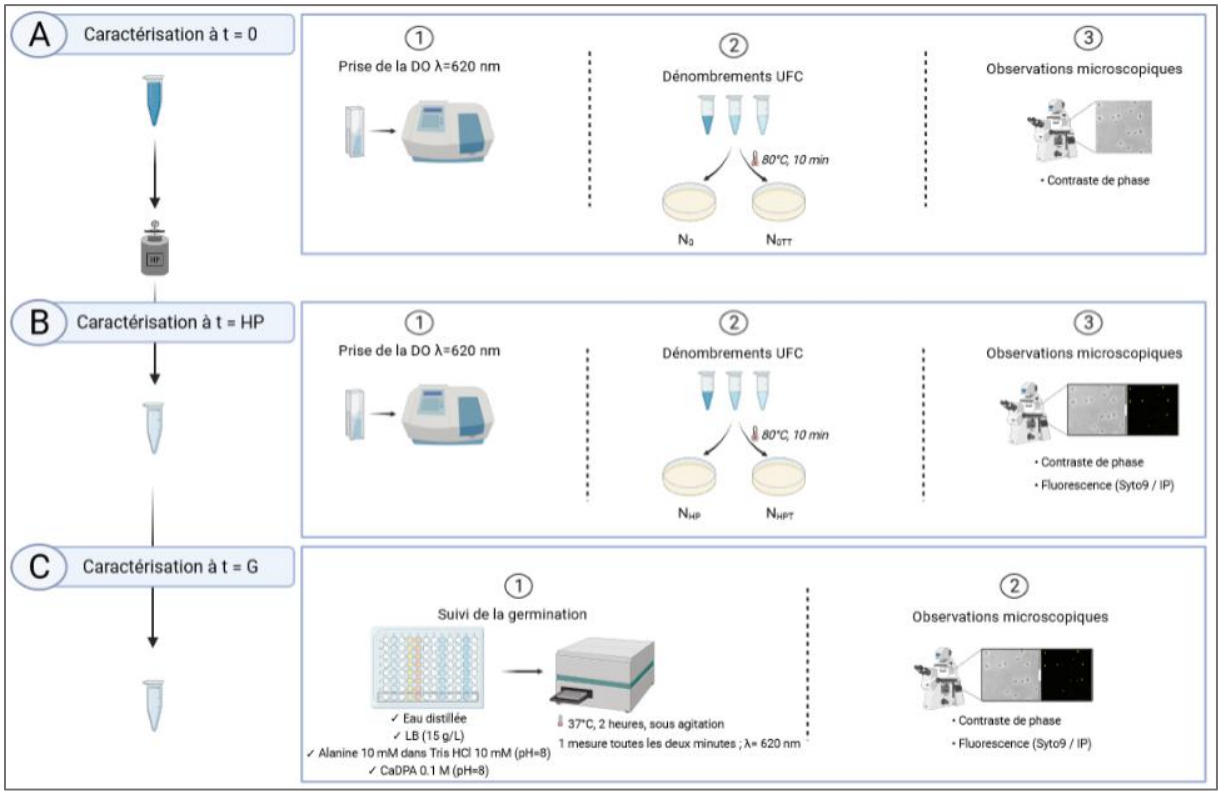


***Figure 24** : Méthodes de caractérisation des spores de B. subtilis avant (t = 0) et après un traitement HP (t = HP). La caractérisation à t = G correspond au suivi de la germination des spores traitées HP.*

2.3. Suivi des marqueurs

2.3.1. Chute de la densité optique pendant le traitement HP

Le suivi de la densité optique (DO) est réalisé en utilisant un lecteur de plaque (Multiskan FC, Thermo Scientific), et en mesurant l'absorption à une longueur d'onde de 620 nm. Pour le suivi de la chute de DO, les résultats sont exprimés en pourcentage de la DO initiale. Un aliquot de l'échantillon traité est dilué au dixième dans l'eau avant de procéder à quatre mesures de la DO de cet échantillon dilué. La valeur du blanc est retranchée avant de calculer la moyenne de la DO de l'échantillon.

2.3.2. Conditions de germination post traitement HP

Pour le suivi de la germination après le traitement HP, la suspension de spores est diluée au demi dans les milieux suivants :

- Eau distillée
- Milieu nutritif LB à 15 $g.L^{-1}$
- L-alanine à 10 mM dans le tampon Tris-HCl 10 mM à pH = 8
- CaDPA à 0,1 M à pH = 8

Pour chaque échantillon traité HP, deux suivis de germination (deux répétitions) sont réalisés pour chaque condition de germination. La germination est réalisée en microplaque sous agitation, à 37 °C. Le suivi de la germination est réalisé par le suivi de la chute de la DO initiale, en réalisant une mesure toutes les deux minutes, pour une durée totale de deux heures.

2.3.3. Observations en microscopie

- Microscopie à contraste de phase

L'observation en microscopie à contraste de phase permet de suivre la germination des spores, passage de la phase « bright » à la phase « dark », témoignant de leur entrée en phase 1 de germination. L'acquisition d'images se fait sur un microscope confocal Nikon C1Si Eclipse TE 2000 U avec la caméra Andor iXon DU885K. Un objectif x100 à contraste de phase et à immersion à huile est utilisé.

- Microscopie à fluorescence

Deux marqueurs fluorescents sont utilisés et exploités en microscopie confocale pour suivre la germination et la perméabilisation des spores après traitement HP. Le marqueur Syto9 est utilisé comme indicateur de la germination et le marqueur IP comme indicateur de l'intégrité membranaire.

Les spores sont marquées avec le Syto9 (solution mère à 5 mM dans du DMSO, Invitrogen) et avec l'IP (solution mère à 1 mg/mL dans l'eau, Invitrogen) à une concentration finale de 0,5 µM et 15 µM, respectivement. Les spores marquées sont placées à l'obscurité pendant 15 minutes avant de procéder aux observations microscopiques. Les images en fluorescence sont acquises sur le microscope confocal en utilisant un deuxième objectif à immersion à huile PlanApo x100 (Nikon, Japon). Une diode laser à 485 nm est utilisé pour l'excitation des sondes

fluorescentes. Les longueurs d'onde d'émission sont de 500 nm pour le Syto9 et de 620 nm pour l'IP.

3. Résultats

3.1. Germination et inactivation des spores suite aux traitements étudiés

Les barèmes retenus, permettant une inactivation d'un log de la population initiale de spores bactériennes, sont présentés dans la **Figure 25**.

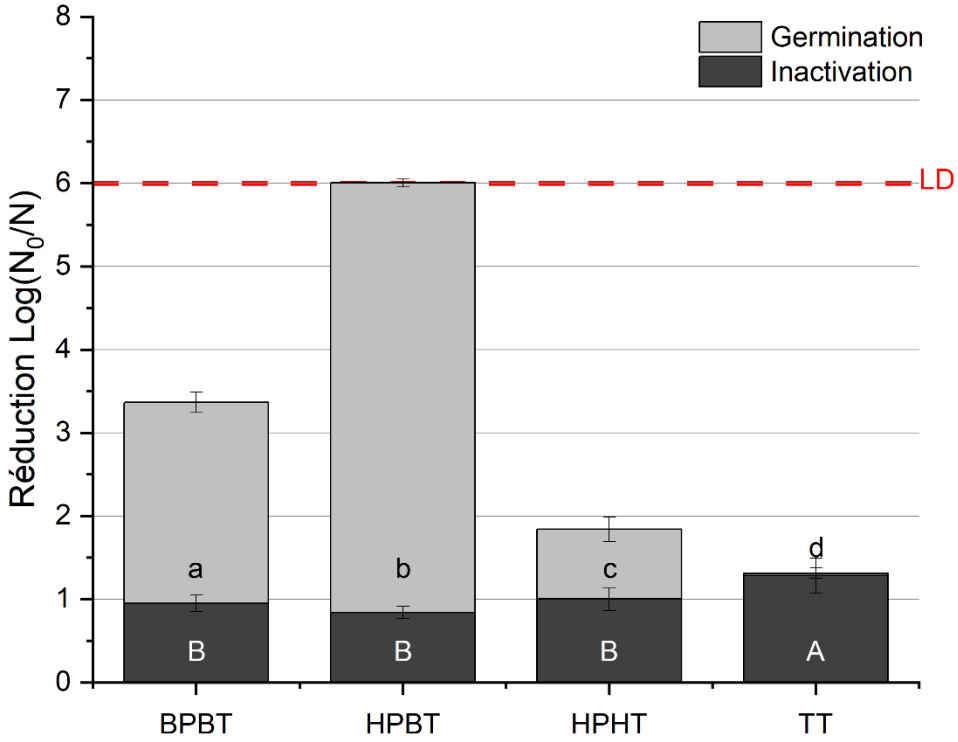


Figure 25 *: Impact des traitements à différents barèmes de pression et de température sur la germination et l'inactivation des spores de B. subtilis PS533. Traitement* ***BPBT*** *: 20 minutes 300 MPa 40 °C. Traitement* ***HPBT*** *: 90 minutes 500 MPa 40 °C. Traitement* ***HPHT*** *: 2 minutes 500 MPa 70 °C. Traitement* ***TT*** *: 8 minutes 97 °C. La ligne pointillée rouge indique la limite de détection (LD). Les barres d'erreur correspondent aux écarts-types calculés à partir d'au moins 3 répétitions indépendantes. Les lettres représentent une différence significative ($p < 0,05$) obtenue avec le test de Tukey sur les données d'inactivation (lettres majuscules) et sur les données de germination (lettres minuscules).*

L'inactivation des spores est du même ordre de grandeur pour les trois barèmes de pression retenus (entre 0,84 et 1,00 log). Pour le traitement thermique, l'inactivation est significativement plus élevée (1,28 log) tout en restant du même ordre de grandeur. En revanche, nous constatons que ces traitements n'induisent pas le même taux de germination

(p<0,05), avec une totalité de spores germées dénombrables suite au traitement HPBT. Pour le traitement thermique retenu, l'inactivation est légèrement plus élevée (1,28 log) et il n'y a pas de spores germées dénombrées suite au traitement. Pour rappel, la germination est évaluée par un traitement thermique (10 min à 80 °C) non létal pour les spores dormantes mais létal pour les spores germées pendant le traitement HP qui perdent leur propriété de résistance à la chaleur.

3.2. Caractérisation des spores par les marqueurs biologiques suite aux différents traitements d'étude

Les résultats obtenus pour les 4 traitements d'étude sont présentés dans le **Tableau 3**. Les taux de germination et d'inactivation précédemment présentés en log de spores/mL (Figure 2), sont également rappelés dans ce tableau (en pourcentage). Pour rappel, la germination des spores après le traitement étudié est déterminée par un traitement thermique (10 minutes à 80 °C) permettant d'inactiver les spores germées par la pression.

Tableau 3 *: Impact des différents traitements d'étude sur les dénombrements UFC, la chute de DO, la réfringence et le marquage des spores au Syto9/IP.* ***BPBT*** *: 20 minutes, 300 MPa, 40 °C ;* ***HPBT*** *: 90 minutes, 500 MPa, 40 °C ;* ***HPHT*** *: 2 minutes, 500 MPa, 70 °C ;* ***TT*** *: 8 minutes, 97 °C. Pour chaque traitement, les valeurs indiquées correspondent aux moyennes de 6 répétitions indépendantes. Pour les observations en microscopie, le comptage est réalisé sur un nombre de spores supérieur à 500.*

	UFC		**Chute DO (%)**	**Réfringence (%)**		**Fluorescence (%)**	
	Inactivation (%)	Germination[1] (%)	λ = 620 nm	Phase "Bright"	Phase "Dark"	Syto9 positif	IP positif[2]
BPBT	88,8	99,6	45	0	100	86	70
HPBT	85,6	100	38	2	98	42	31
HPHT	90,0	85,5	39	3	97	57	50
TT	94,8	6,3	3	98	2	3	3

1 Un traitement thermique de 10 minutes à 80 °C est réalisé pour inactiver les spores germées par HP et ainsi déterminer le pourcentage de germination parmi les spores survivantes au traitement étudié. **2** Toutes les spores IP positives sont aussi Syto9 positives. Certaines spores sont Syto9 positives mais pas IP positives.

Le traitement BPBT entraîne une chute de DO de 45 %, correspondant à la chute la plus élevée des différents traitements d'étude. Le traitement HP entraîne une chute de DO comprise entre

38 et 39 %, quelle que soit la température de traitement (40 ou 70 °C). Les observations en microscopie à contraste de phase des spores traitées montrent que celles-ci perdent leurs propriétés de réfringence et passent en phase « dark », aussi bien pour les traitements HP que pour le traitement BP. Pour le traitement TT, nous constatons une très faible chute de DO (seulement 3 %) et les spores demeurent en phase « bright ». La chute de DO et la perte des propriétés de réfringence sont attribuées à la sortie du DPA et donc à la germination des spores : une fois le processus de germination débuté, il est théoriquement irréversible, les spores bactériennes perdent donc une grande partie de leur contenu en ions (notamment le CaDPA) et leur protoplaste est partiellement réhydraté.

Pour vérifier la germination des spores au cours des traitements BPBT, HPBT, HPHT et TT, un marquage au Syto9, indicateur de la germination en phase 2, est réalisé. 86 % des spores traitées en BPBT sont marquées au syto9. Pour les traitements HPBT et HPHT, le taux de marquage est de 42 et 57 % respectivement. Le faible marquage des spores au Syto9 bien que celles-ci apparaissent germées en microscopie à contraste de phase (phase « dark ») pourrait s'expliquer par une lyse incomplète du cortex bloquant les spores en phase 1 de germination. Les spores traitées TT ne sont en revanche pas marquées au Syto9, confirmant une absence d'induction de la germination par ce traitement thermique. Les spores marquées au Syto9 sont également marquées à l'IP. Le marquage à l'IP témoigne d'une altération de la perméabilité de la membrane interne des spores. Ainsi, les spores germées puis inactivées pendant les traitements d'étude (BPBT, HPBT et HPBT) semblent altérées au niveau de leur membrane interne. Il apparaît en revanche que les spores traitées TT sont capables de retenir leur CaDPA au cours du traitement ; celles-ci ne sont pas induites en germination et ne sont pas marquées par l'IP. Les mécanismes d'inactivation par le traitement thermique semblent donc clairement différents de ceux mis en œuvre par le traitement haute pression.

3.3. Suivis de la germination après les différents traitements d'étude

Nous nous interrogeons sur l'état physiologique des spores après les différents traitements d'étude et sur leur capacité de germination dans différentes conditions afin de déterminer si leur inactivation est due à une altération de leurs propriétés de germination. Pour cela, les spores traitées sont remises en suspension dans des milieux de germination spécifiques (germination GR-dépendante : L-alanine et milieu nutritif LB ; germination GR-indépendante :

CaDPA). Pour réaliser le suivi de la germination, la chute de la densité optique à 620 nm est mesurée au cours du traitement de germination (incubation sous agitation pendant 2 heures à 37 °C). A la fin de la germination, les spores sont observées en microscopie à contraste de phase et en microscopie de fluorescence suite au double marquage Syto9/IP. Les résultats sont présentés séparément pour les différents traitements de l'étude.

Pour déterminer l'état physiologique des spores après le traitement d'étude (BPBT, HPBT, HPHT ou TT), nous nous basons sur les observations microscopiques en contraste de phase et en fluorescence pour émettre les hypothèses suivantes :

(1) Les spores marquées au Syto9 et à l'IP suite au traitement étudié sont des spores germées en phase 2 dont la membrane est perméabilisée : elles sont considérées comme des spores « G2 inactivées ».
(2) Les spores seulement marquées au Syto9 suite au traitement étudié sont des spores germées en phase 2 : elles sont considérées comme des spores « G2 non inactivées ».
(3) Les spores apparaissant en phase « dark » et qui ne sont pas marquées au Syto9 correspondent aux spores germées en phase 1 : elles sont nommées « G1 ».
(4) Les spores apparaissant en phase « bright » et qui ne sont pas marquées au Syto9 correspondent aux spores dormantes : elles sont nommées « D ».

Si les spores **(1)** sont incapables de former des colonies sur boîte, les spores décrites en **(2)**, **(3)** et **(4)** ne sont pas forcément capables de former des colonies sur boîte. Ces spores **(2)**, **(3)** et **(4)** sont susceptibles d'évoluer au cours de l'incubation dans les conditions d'induction de la germination, permettant de statuer sur leur viabilité après un nouveau double marquage Syto9/IP. Ainsi, ces hypothèses sont émises concernant les spores **(2)**, **(3)** et **(4)** :

- Les spores **(2)** peuvent se comporter de différentes manières :
    - Le maintien de l'intégrité membranaire (IP négatif) dans toutes les conditions de germination testées témoigne de leur viabilité (dénombrables en UFC).
    - La perte de l'intégrité membranaire (IP positif) lors de l'incubation dans des conditions non nutritives (eau, alanine, CaDPA) indique que ce sont des spores « G2 blessées », capables de former des colonies que dans des conditions nutritives optimales.

- Les spores **(3)**, germées « G1 », sont susceptibles de se comporter de trois manières :
    - Le retour à pression atmosphérique (incubation pendant 2 heures dans l'eau) les conduit spontanément au passage en stade 2 de germination (Syto9 positif) et témoigne du bon fonctionnement des enzymes CLE.
    - L'incubation dans des conditions d'induction de la germination leur permet d'évoluer vers le stade 2 de germination (Syto9 positif) ; ces spores sont partiellement bloquées et inductibles par l'apport de nouveaux germinants.

    → Dans les deux cas précédents, le marquage IP apporte l'information sur leur viabilité.

    - Quelles que soient les conditions d'incubation post-traitement HP, ces spores demeurent non marquées au Syto9 et à l'IP ; témoignant de leur blocage irréversible en phase 1.
- Les spores **(4)**, caractérisées comme « D », peuvent évoluer comme suit :
    - L'apport de nouveaux germinants permet leur germination (Syto9 positif) et selon la présence ou non d'éléments nutritifs (condition LB), ces spores peuvent évoluer jusqu'au développement.
    - Ces spores demeurent dormantes (apparaissant en phase « bright » et sans marquage fluorescent) quelles que soient les conditions d'incubation post-traitement HP, témoignant de leur inactivation irréversible par le traitement HP ou thermique.

Une illustration schématisée de cette démarche est présentée en **Annexe 1**.

3.3.1. Suivi de la germination après le traitement BPBT

Les résultats du suivi de la germination sur les spores traitées en BPBT (traitement de 20 minutes à 300 MPa, à 40 °C) sont présentés dans la **Figure 26**. Le graphique **26A** représente la chute de DO (calculée par rapport à la DO initiale) directement après traitement BPBT (t = BPBT) et après incubation de 2 heures à 37 °C dans les différentes conditions de germination. Le graphique **26B** reprend les résultats de marquage aux Syto9/IP dans ces mêmes conditions.

Lors de la germination des spores bactériennes, le passage vers la phase 1 s'accompagne d'une forte perte de la réfringence et d'une chute de la DO qui sont principalement dues à la libération du CaDPA et à l'hydratation du protoplaste. Le passage vers la phase 2 s'accompagne d'une plus légère diminution de la réfringence et de la DO, dues à la lyse du cortex et du manteau. En présence d'éléments nutritifs, les spores germées peuvent poursuivre leur croissance (augmentation de volume cellulaire et division), aboutissant à une augmentation de la DO.

Suite au traitement BPBT, nous observions une germination de la quasi-totalité (99.6 %) des spores traitées (**Tableau 3**). L'incubation de ces spores dans des milieux contenant des inducteurs de germination ne devrait donc pas entraîner de nouvelles spores en germination. Pourtant, nous observons une évolution des spores dans ces conditions.

Ainsi, l'incubation des spores traitées dans l'eau pendant 2 heures à 37 °C ne conduit pas à une variation de la chute de DO (43 % contre 45 % après traitement BPBT). Cependant, nous constatons une augmentation des spores marquées au Syto9 (+6 %). Une proportion des spores traitées BPBT sont donc en phase 1 de germination à la fin du traitement et la lyse du cortex a lieu au retour à pression atmosphérique, permettant la pénétration du marqueur Syto9 (passage en phase 2).

Concernant l'incubation des spores dans les milieux induisant une germination GR-dépendante (en milieu nutritif LB ou en présence de L-alanine), nous constatons une faible augmentation de la chute de DO suite au traitement de germination par rapport à la chute de DO après le traitement BPBT (+7 % et +4 % pour le LB et l'alanine respectivement). Le pourcentage de spores marquées au Syto9 n'est pas augmenté après ces traitements de germination. Ainsi, il semblerait qu'il n'y ait pas d'induction de la germination de nouvelles

spores pendant le traitement de germination GR-dépendante mais une poursuite de la germination qui ne se produit pas lorsque les spores sont incubées dans l'eau seule. Pour les spores induites en germination de manière GR-indépendante (en présence de CaDPA), nous n'observons pas d'augmentation de la chute de la DO malgré un taux de marquage Syto9/IP plus élevé. Cependant, cette variation de DO pourrait être due à la présence de cristaux dans la suspension de spores. En effet, nous avons observé, dans cette condition expérimentale, la formation de cristaux lors de l'ajout du mélange équimolaire des solutions de $CaCl_2$ et de DPA aux spores traitées BPBT, pouvant fausser la mesure de DO.

Ensuite, nous pouvons observer que 70 % des spores sont marquées à l'IP suite au traitement BPBT. Nous constatons une augmentation du pourcentage de spores marquées par l'IP (entre 14 et 19 %) suite à l'incubation des spores dans l'eau, et dans les tampons contenant les germinants non nutritifs L-alanine ou CaDPA. Pour la condition de germination en milieu nutritif, il n'y a pas de variation du pourcentage de spores marquées par l'IP. Il semble donc y avoir des spores germées en phases 1 et 2, qui en absence d'éléments nutritifs ne peuvent maintenir leur intégrité membranaire (spores blessées ou altérées).

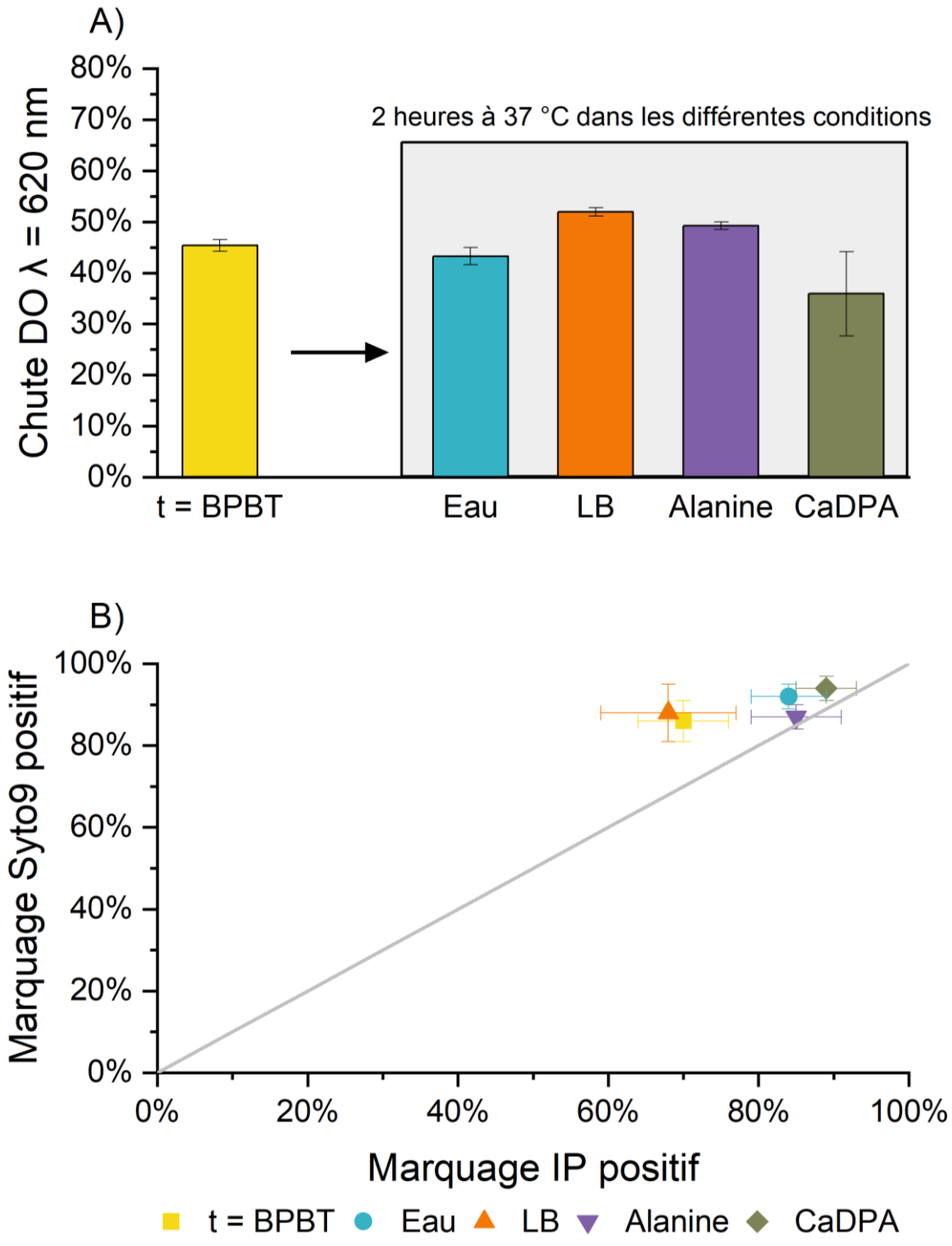


Figure 26 *: Suivis de la chute de DO à 620 nm (A) et du marquage Syto/IP (B) après le traitement BPBT (t = BPBT) et suite à l'incubation post-traitement BPBT dans différents milieux de germination. Les barres d'erreur correspondent aux écarts-types calculés à partir des 6 répétitions réalisées.*

A partir des résultats UFC et des comptages de marquage de Syto9/IP après le traitement BPBT et après les différents traitements de germination, nous pouvons déterminer les pourcentages de spores dormantes (**D**), germées en phase 1 (**G1**) ou en phase 2 (**G2**), et nous les séparons en fonction de leur devenir dans les différentes conditions de germination. La **Figure 27** reprend ces résultats.

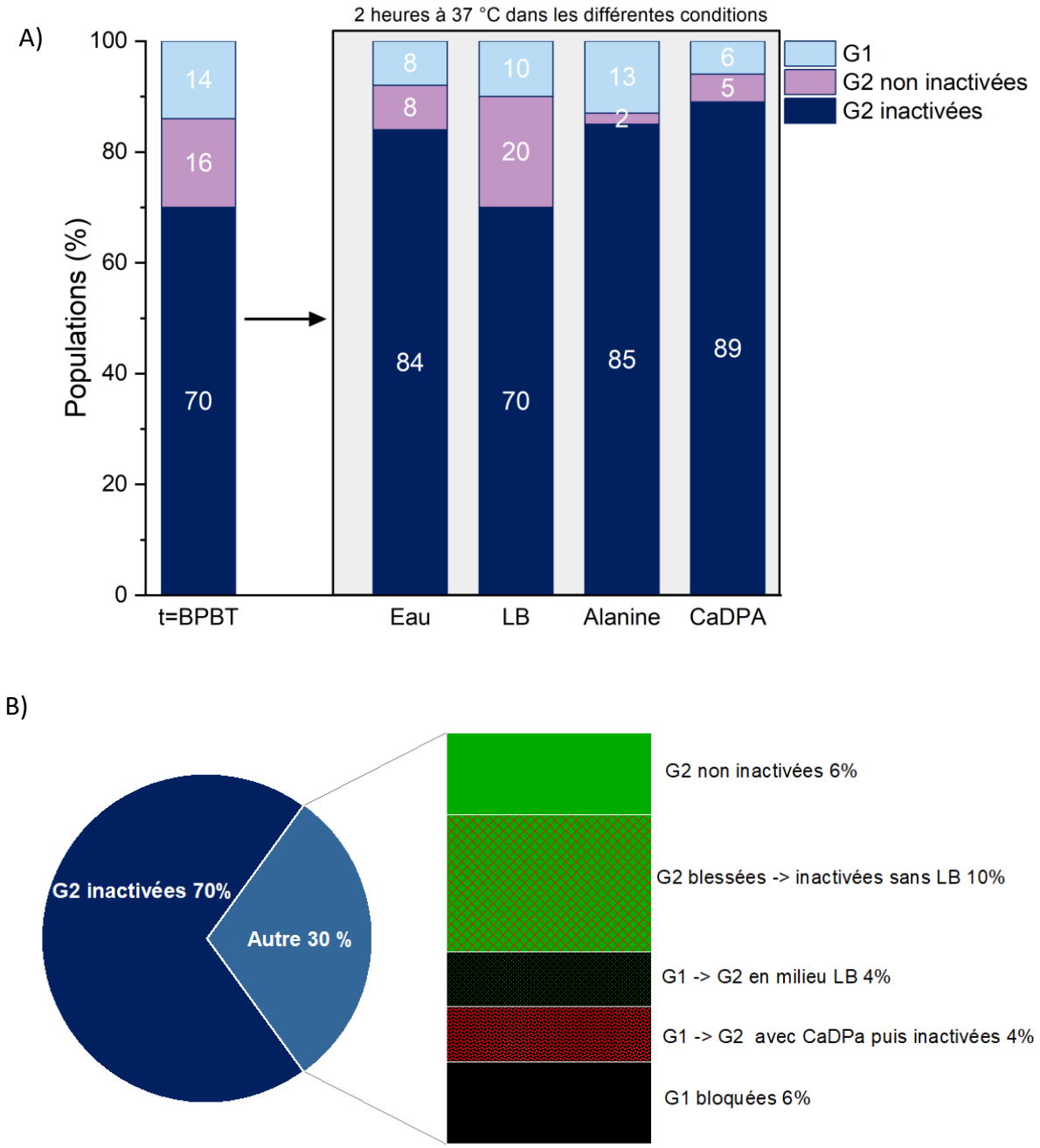


***Figure 27** : A) Suivi des différents stades physiologiques après le traitement BPBT et après incubation des spores traitées BPBT dans les différents milieux de germination. B) Etat des spores après le traitement BPBT d'après l'évolution obtenue dans les différents milieux.*

En dessous de 400 MPa, l'induction de la germination des spores par la pression est documentée dans la littérature comme résultant de l'activation des récepteurs de germination (Black et al., 2005; Delbrück, Zhang, Heydenreich, et al., 2021; Paidhungat et al., 2002). Dans certaines conditions de pression et de température, le passage de la phase 1 vers la phase 2 de germination est possible. C'est ce que nous observons dans le cas du traitement BPBT correspondant à un traitement de 20 minutes à 300 MPa, 40 °C : une grande majorité des spores sont induites en germination pendant le traitement (nous observons moins d'une spore dormante sur 1000 individus comptés). Au retour à pression atmosphérique, nous comptons 70 % des spores marquées au Syto9 et à l'IP correspondant à des spores germées en phase 2 dont la membrane est altérée. Parmi les spores restantes (30 %), 16 % des spores sont marquées au Syto9 seulement et correspondent aux spores « germées en phase 2 et non inactivées ». Parmi ces 16 %, une proportion de 5 % n'est pas perméable à l'IP en milieu non nutritif (CaDPA) et reste donc vivante. Le reste, proportion de 10 %, devient perméable à l'IP en milieu non nutritif et est donc inactivée. Cette dernière catégorie de spores est semblable aux spores « blessées », décrites dans la littérature avec le terme « injured spores ». Ce terme se réfère aux spores partiellement inactivées par un traitement de destruction, capables de revenir à un état physiologique normal lorsqu'elles sont placées dans des conditions favorables.

Concernant les 14 % de spores restantes, celles-ci ne sont pas dormantes car toutes les spores apparaissent en « phase dark » en microscopie à contraste de phase. Il semble donc que ces spores soient germées en phase 1 (non marquées au Syto9 et à l'IP). Si nous nous intéressons au devenir de ces spores en fonction du milieu de germination, on voit que 4 % passent en phase 2 en milieu nutritif et se développent. Les 10 % restantes sont bloquées en phase 1, mais parmi elles, 4 % sont susceptibles de poursuivre leur germination en présence de CaDPA. Pour ces spores, le CaDPA endogène est libéré pendant le traitement BP, mais il ne semble pas avoir activé les enzymes CLE pour initier la lyse du cortex. La présence du CaDPA exogène induit alors l'activation de ces enzymes pour achever la phase 2 de germination.

Au vu des résultats présentés ci-dessus, il est possible de conclure que le traitement BPBT (20 minutes, 300 MPa, 40 °C) induit la germination des spores avant leur inactivation sous pression. La très grande majorité des spores sont germées en phase 2 (70 %), correspondant au stade de lyse du cortex. Les enzymes de lyse du cortex sont donc fonctionnelles sous

pression pour ces spores. Parmi les spores non inactivées par le traitement, certaines semblent blessées et un milieu non optimal ne permettra pas leur développement. De même, une proportion de spores est germée en phase 1 seulement (14 %). Cependant, la plupart de ces spores (10 %) ne peuvent poursuivre la germination (potentiellement dû à une altération des enzymes lytiques du cortex ou à la nécessité d'un apport exogène en CaDPA).

3.3.2. Suivi de la germination après le traitement HPBT

Les résultats du suivi de germination suite au traitement HPBT (traitement de 90 minutes à 500 MPa, 40 °C) sont présentés dans la **Figure 28**.

Tout d'abord, nous constatons une faible variation de la DO (chute de 38 %) et un faible taux de marquage Syto9/IP (42 % de spores marquées au Syto9) suite au traitement HPBT par rapport au traitement précédent (BPBT), conséquence d'une germination moins avancée.

Suite à l'incubation des spores dans l'eau stérile pendant une durée de 2 heures à 37 °C, le pourcentage de spores marquées au Syto9 augmente à 72 % (contre 42 % suite au traitement HPBT). En parallèle, il y a une faible augmentation de la chute de DO pendant cette incubation (chute de 37 à 40 %). Cela laisse penser qu'une proportion de spores sont germées en phase 1 au cours du traitement HPBT mais celles-ci sont incapables de lyser leur cortex pendant le traitement à 500 MPa et/ou au retour à pression atmosphérique. Les enzymes CLE de dégradation du cortex semblent cependant redevenir fonctionnelles après le retour à pression atmosphérique pendant l'incubation des spores germées à 37 °C.

Concernant l'incubation des spores traitées HPBT dans les milieux pouvant induire la germination GR-dépendante, nous observons une augmentation de la chute de DO à 50 et 56 % pour les conditions de germination en présence de L-alanine et en milieu nutritif LB respectivement. Le pourcentage de spores marquées au Syto9 augmente pareillement à 89 et 95 %. Ainsi, une proportion des spores traitées HPBT sont induites en germination après le traitement hyperbare, témoignant du fonctionnement des récepteurs GR et des enzymes CLE. Une augmentation de la chute de DO (47 %) et une augmentation du pourcentage de spores marquées au Syto9 (99 %) sont observées lors de l'incubation des spores traitées HPBT en présence de CaDPA. Il semble donc que les canaux SpoVA et les enzymes CLE soient fonctionnels sur toutes les spores en cours de germination après le traitement HP.

Enfin, si nous nous intéressons à la perméabilisation de la membrane interne au cours de la germination des spores traitées HPBT, nous constatons que les spores germées sont majoritairement marquées à l'IP (>89 % dans les trois conditions de germination). L'induction de la germination post-traitement hyperbare s'accompagne donc d'une perméabilisation de la membrane interne des spores et d'une probable inactivation de celles-ci.

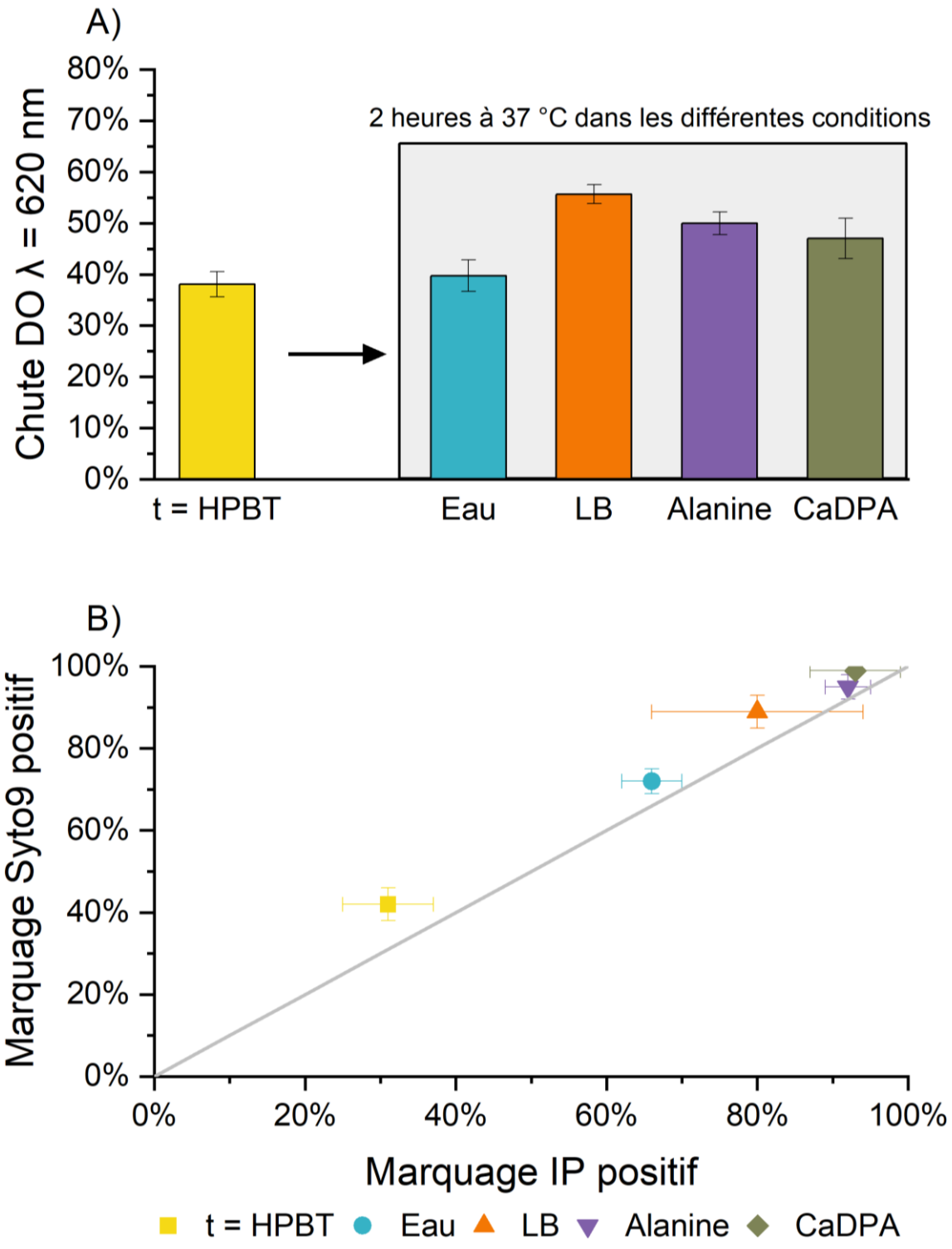


Figure 28 *: Suivi de la chute de DO à 620 nm (A) et du marquage Syto/IP (B) après le traitement HPBT (t = HPBT) et suite à l'incubation post-traitement HPBT dans les différents milieux de germination. Les barres d'erreur correspondent aux écarts-types calculés à partir des 6 répétitions réalisées.*

La même démarche que pour le traitement précédent est adoptée pour déterminer les pourcentages de spores dormantes (**D**), germées en phase 1 (**G1**) ou en phase 2 (**G2**), et inactivées et ainsi suivre leur évolution au cours du traitement d'étude. La **Figure 29** reprend ces résultats.

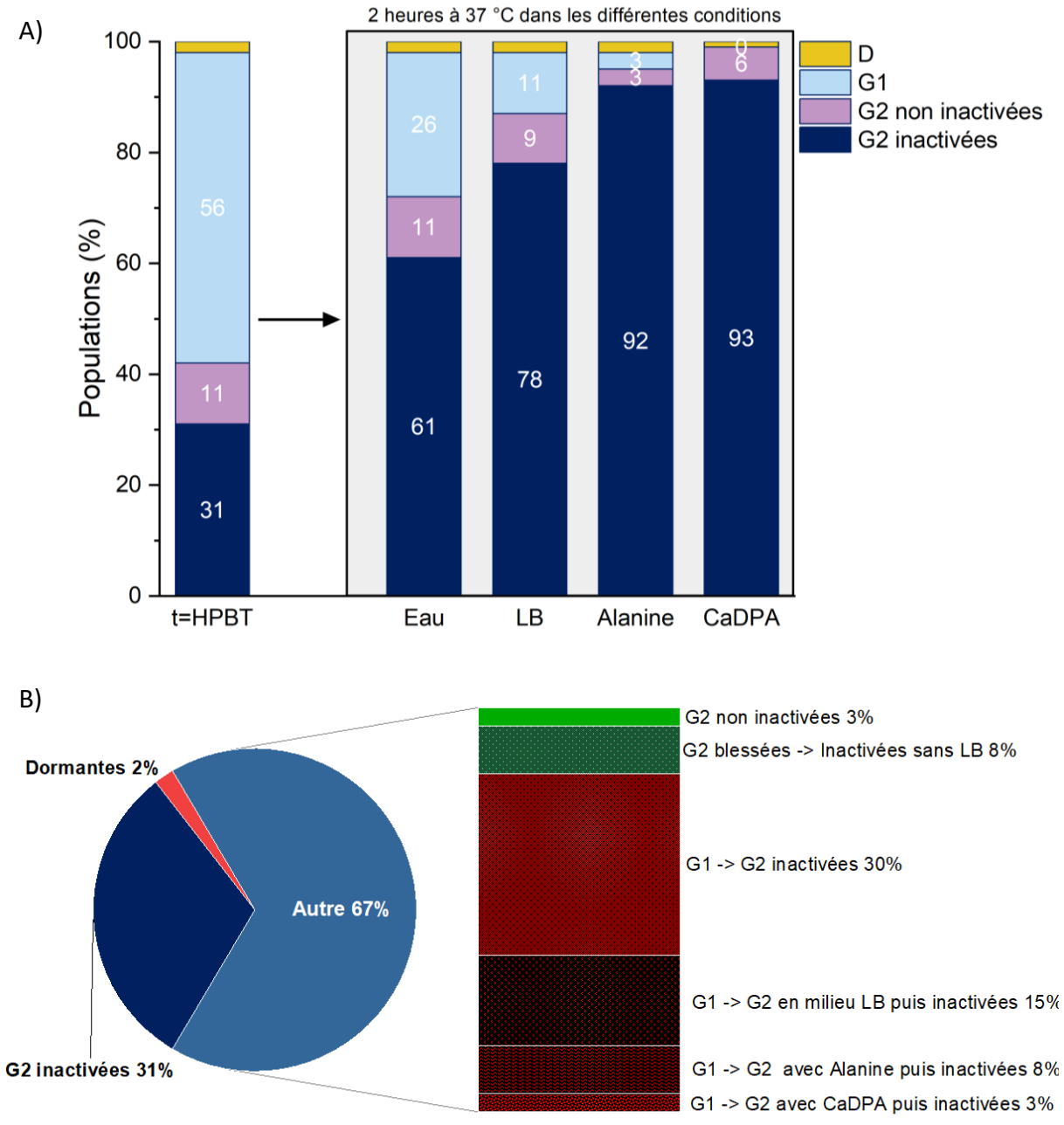


Figure 29 *: A) Suivi des différents stades physiologiques après le traitement HPBT et après incubation des spores traitées HPBT dans les différents milieux de germination. B) Etat des spores après le traitement HPBT d'après l'évolution obtenus dans les différents milieux.*

Au retour à pression atmosphérique, 31 % des spores sont germées en phase 2 et possèdent la membrane perméabilisée à l'IP : elles correspondent aux spores nommées « G2 inactivées ». 2 % des spores demeurent en phase « bright », dormantes, (nommées « D » ici) suite au traitement d'intérêt et sont retrouvées tout au long de l'étude quel que soit l'inducteur de la germination post-traitement HPBT. Leur comportement s'apparente aux spores SD aux éléments nutritifs décrites dans la littérature (S. Ghosh & Setlow, 2009; Y. Zhang & Mathys, 2019). En effet, en présence de CaDPA (inducteur non nutritif de la germination), leur nombre diminue à 1 %. Les spores SD aux éléments nutritifs présentent moins de récepteurs GR, cibles des traitements BP pour l'induction de germination, ce qui pourrait expliquer la résistance de ces spores aux traitements à pression modérée (Doona et al., 2014). Le reste des spores, 11 %, sont germées en phase 2 et possèdent une membrane intacte puisque non marquées à l'IP : elles correspondent aux spores « G2 non inactivées » pendant le traitement HPBT. Ainsi, 56 % des spores restantes sont considérées comme germées « G1 » car elles apparaissent en phase « dark » en microscopie à contraste de phase mais elles ne sont pas marquées au Syto9. Le suivi de cette catégorie de spores en phase G1 montre qu'elles peuvent ou non poursuivre leur germination en phase G2, en fonction des conditions de milieu. Cependant, ces spores semblent toutes inactivées dès qu'elles atteignent ce stade 2 de germination.

Suite à l'incubation des spores, en suspension dans l'eau, pendant 2 heures à 37 °C, 30 % des spores germées « G1 » évoluent vers la phase 2 de germination. En présence d'éléments nutritifs dans le milieu de germination (LB), ce sont 45 % des spores G1 qui passent en phase 2 de germination. Enfin, en présence d'alanine comme inducteur de la germination GR-dépendante, 53 % des spores G1 évoluent en phase G2. Tout se passe comme si pour une partie des spores l'induction faite par le traitement haute pression était partielle et nécessitait la présence de germinants GR-dépendants pour poursuivre le processus. Cet état est tout à fait atypique et non décrit dans la littérature car on considère en général qu'une fois enclenché, le processus de germination est irréversible et il se poursuit sauf blocage spécifique. L'induction de germination par les récepteurs GR étant en début de processus, ceux-ci ne sont pas censés intervenir une fois la germination entamée.

Enfin, en présence de CaDPA exogène comme inducteur de la germination, la totalité des spores G1 évoluent en phase G2 de germination mais elles sont perméabilisées à l'IP et donc vraisemblablement inactivées.

Le traitement HPBT (90 minutes, 500 MPa, 40 °C) induit la germination des spores avant leur inactivation. Les spores inactivées dénombrées sur boîte (86 %) correspondent aux spores germées en phase 2 dont la membrane est altérée (31 %) et aux spores germées et bloquées en phase 1 (56 %), contrairement au traitement BPBT. Un retour à pression atmosphérique permet de débloquer les enzymes CLE et facilite le passage en phase 2 de germination. Pour une proportion de spores, la présence d'inducteurs de la germination tels que le milieu nutritif LB, l'alanine ou le CaDPA, va faciliter cette transition : pour 26 % des spores, l'induction faite par le traitement HP semble insuffisante pour l'achèvement de la germination sous pression et au retour à pression atmosphérique et un deuxième traitement d'induction de la germination semble nécessaire pour qu'elles poursuivent leur germination. Nous observons ainsi que toutes les spores germées en phase 1 et bloquées sont inductibles en phase 2 de germination. Cependant, cette transition s'accompagne systématiquement d'une perméabilisation de la membrane interne. Par conséquent, l'application du traitement HP semble induire la phase G1 (sortie de CaDPA) et s'accompagne d'une altération de la spore qui n'est visible qu'après passage à la phase G2. Le traitement HP à 500 MPa a aussi pour conséquence de retarder ou de bloquer temporairement la lyse du cortex et le passage à la phase G2 chez certaines spores. Cette activation est moins importante qu'à BP car il reste des spores dormantes (cohérent avec les valeurs UFC de germination). Il est possible que les spores G2 non marquées à l'IP soient « blessées » car leur nombre se réduit dans certaines conditions de germination post traitement HPBT (11 % en eau, 9 % en milieu LB, 6 % en milieu CaDPA, 3 % en milieu alanine).

3.3.3. Suivi de la germination après le traitement HPHT

Les résultats du suivi de germination suite au traitement HPHT (traitement de 2 minutes à 500 MPa, à 70 °C) sont présentés dans la **Figure 30**.

Dans l'ensemble, les résultats obtenus sont similaires à ceux du traitement précédent HPBT. En effet, nous observons la même chute de DO pour les deux traitements HP (38 % à BT, 39 % à HT). De même, la même chute de DO est observée entre les deux traitements HP dans les différentes conditions de germination post traitement HP. Après traitement HPHT, nous observons cependant un taux de marquage Syto9/IP plus élevé que lorsque le même traitement est réalisé à BT.

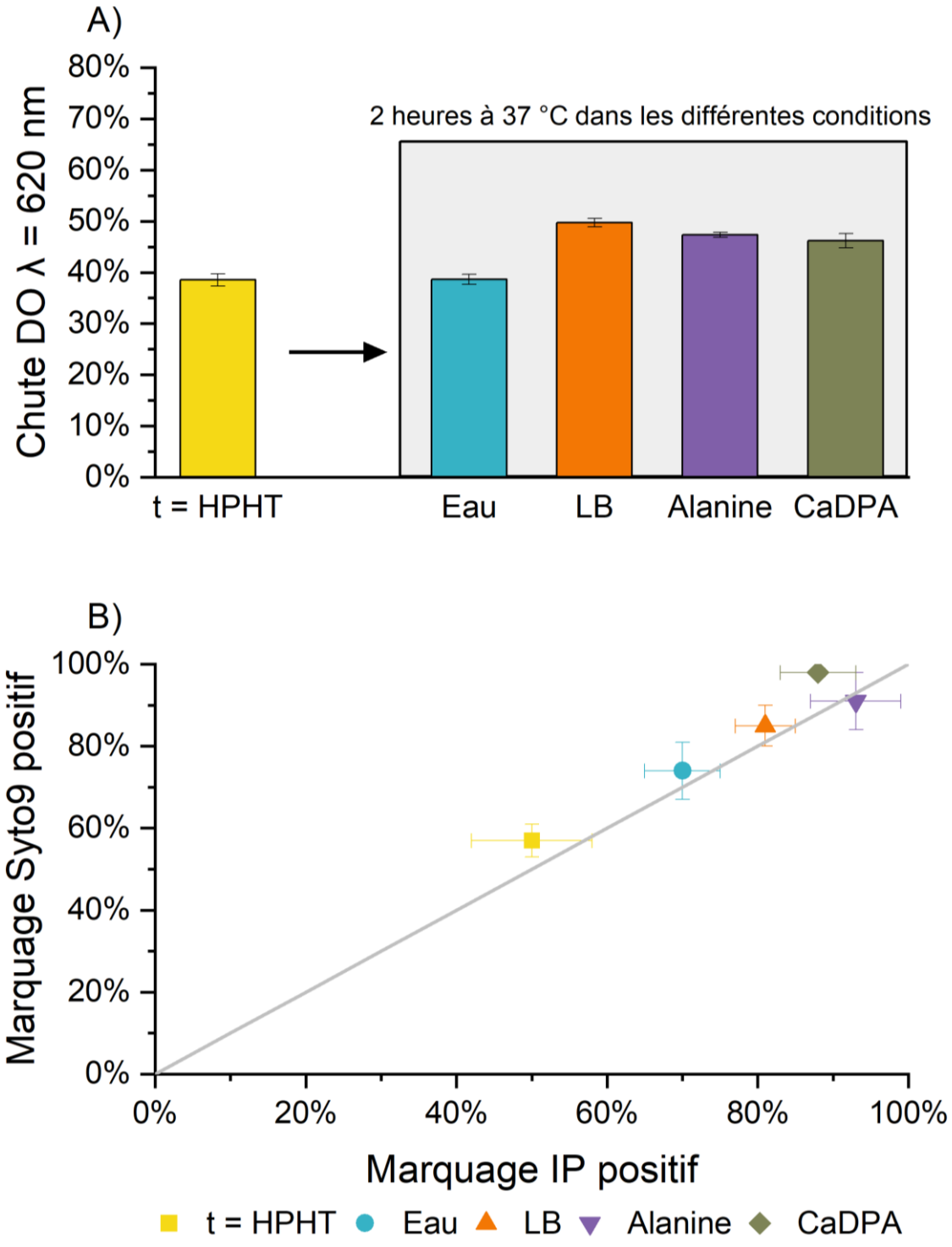


Figure 30 *: Suivi de la chute de DO à 620 nm (A) et du marquage Syto/IP (B) après le traitement HPHT (t = HPHT) et suite à l'incubation post-traitement HPHT dans différents milieux de germination. Les barres d'erreur correspondent aux écarts-types calculés à partir des 6 répétitions réalisées.*

Nous avons également représenté l'évolution des différents stades physiologiques des spores bactériennes traitées HPHT puis placées dans différentes conditions de germination. Les résultats sont présentés dans la **Figure 31**.

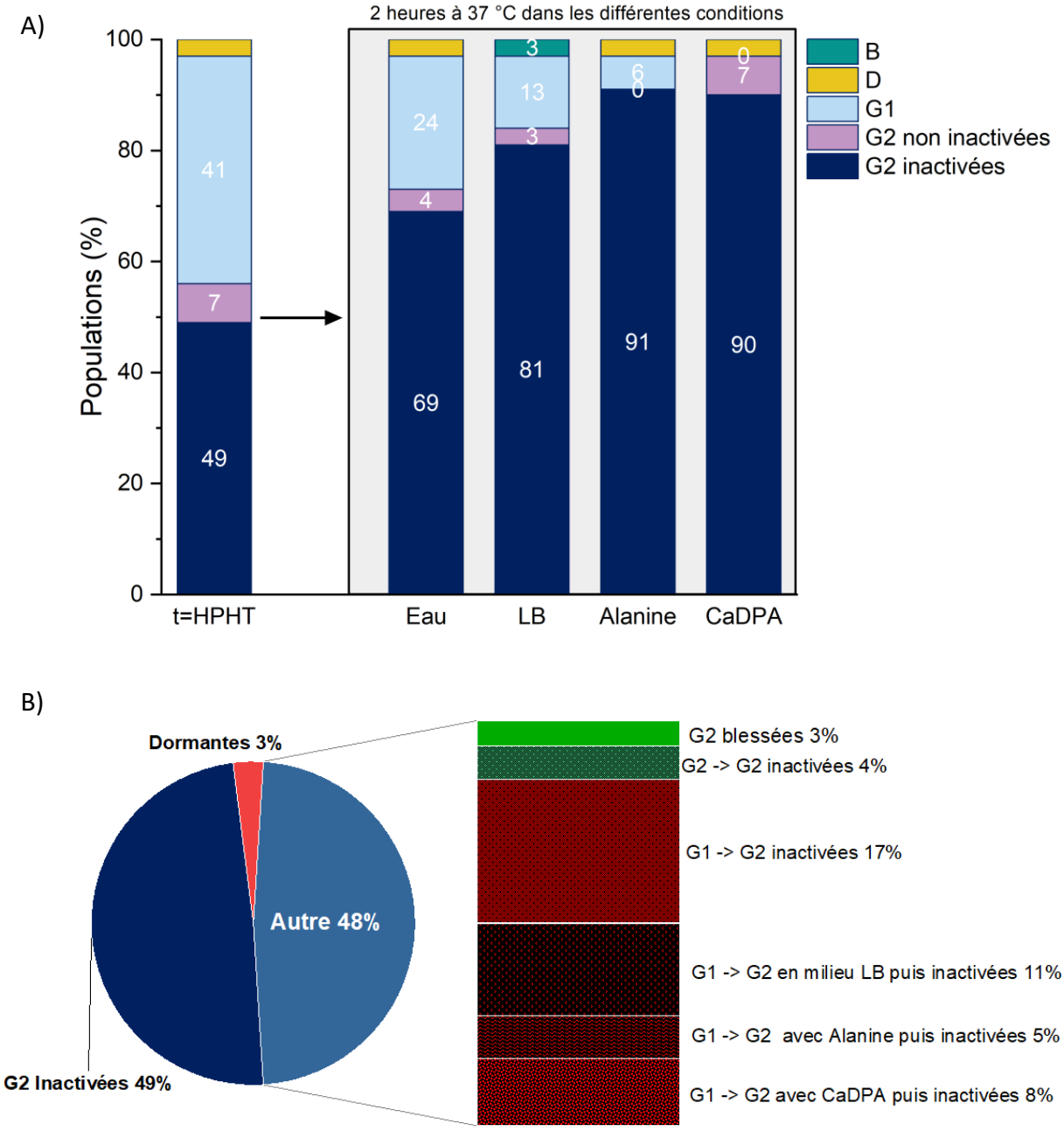


***Figure 31** : Suivi des différents stades physiologiques après le traitement HPHT et après incubation des spores traitées HPHT dans les différents milieux de germination. B) Etat des spores après le traitement HPHT d'après l'évolution obtenue dans les différents milieux.*

La comparaison des **Figures 29 et 31** montre une répartition des différents états physiologiques des spores qui est assez comparable entre les deux traitements HP à BT et à HT. A la différence avec le traitement HPBT, nous observons un taux de marquage à l'IP plus élevé suite au traitement HPHT (49 % contre 31 %). Dans les deux cas, nous observons la présence de spores dormantes suite aux traitements HP (3 %). Le reste des spores traitées HPHT est majoritairement représenté par des spores non marquées au Syto9, apparaissant en phase « dark » en microscopie à contraste de phase, et qui sont donc en phase G1 (41 %). Si nous nous intéressons au devenir de ces spores G1 dans les différentes conditions de germination post traitement HPHT, nous observons, comme pour le traitement précédent, que ces spores peuvent passer en phase G2 dans l'eau (17 %) ou en présence d'inducteurs de la germination (25 %) mais semblent toutes inactivées puisque marquées à l'IP. Les spores en phase G2 non marquées par l'IP sont peu nombreuses : 7 % immédiatement après le traitement HPHT. Ces spores sont cependant inactivées suite à une incubation de 2 heures à 37 °C en milieu nutritif (4 %) ou non nutritif (3 %).

Ainsi, il semble que le fait de réaliser le traitement HP à 70°C ne change pas radicalement le profil d'altération du traitement HP ; par contre, le traitement est nettement plus rapide (2 min à 70 °C au lieu de 90 minutes à 40 °C). Contrairement au traitement BPBT, il reste des spores dormantes qui semblent résistantes au barème HP quelle que soit la température de traitement. L'induction de la germination en phase G2 est moins efficace à HP (42 % à BT et 56 % à HT) que à BP (86 %). Les enzymes de lyse du cortex ne semblent pas affectées de façon irréversible par le traitement HP car nous observons un passage du stade G1 à G2 grâce au CaDPA contrairement au traitement BP où il reste 6 % de spore bloquées en G1. En revanche, toutes les spores en phase G1, même si elles poursuivent leur germination, sont systématiquement perméabilisées signe d'une altération lors du traitement. Cette altération peut être thermique pour le procédé HPHT car une spore en phase G1 devient sensible thermiquement. Mais ce n'est pas le cas lors du traitement HPBT qui présente la même altération des spores en phase G1. Il y a donc une altération par la haute pression des spores en phase G1.

3.3.4. Suivi de la germination après le traitement TT

Les résultats du suivi de germination suite au traitement TT (traitement de 8 minutes à 97 °C) sont présentés dans la **Figure 32**.

Suite au traitement thermique de 8 minutes à 97 °C, nous observons que les spores restent en phase « bright », ne sont pas marquées au Syto9 et la DO de la suspension ne varie pas (**Tableau 3**). L'incubation des spores dans l'eau stérile pendant 2 heures à 37 °C ne les fait pas évoluer vers un stade de germination.

En revanche, l'incubation des spores traitées TT en présence des inducteurs de la germination GR-dépendante conduit à la germination d'une proportion de ces spores (passage des spores en phase « dark », légère augmentation de la chute de DO, augmentation de spores marquées au Syto9 de 14 et 26 % pour l'alanine et le milieu nutritif LB respectivement).

Lorsque les spores traitées TT sont suspendues dans le CaDPA et incubées pendant 2 heures à 37 °C, le taux de germination est plus important : 50 % des spores passent en phase « dark » et 55 % de ces spores sont marquées au Syto9. La chute de la DO au cours de ce traitement de germination GR-indépendante est plus importante qu'en présence des inducteurs de la germination GR-dépendante.

Pour le traitement TT, nous observons une concordance entre le pourcentage de spores en phase « dark » et le pourcentage de spores marquées au Syto9 suite aux traitements de germination.

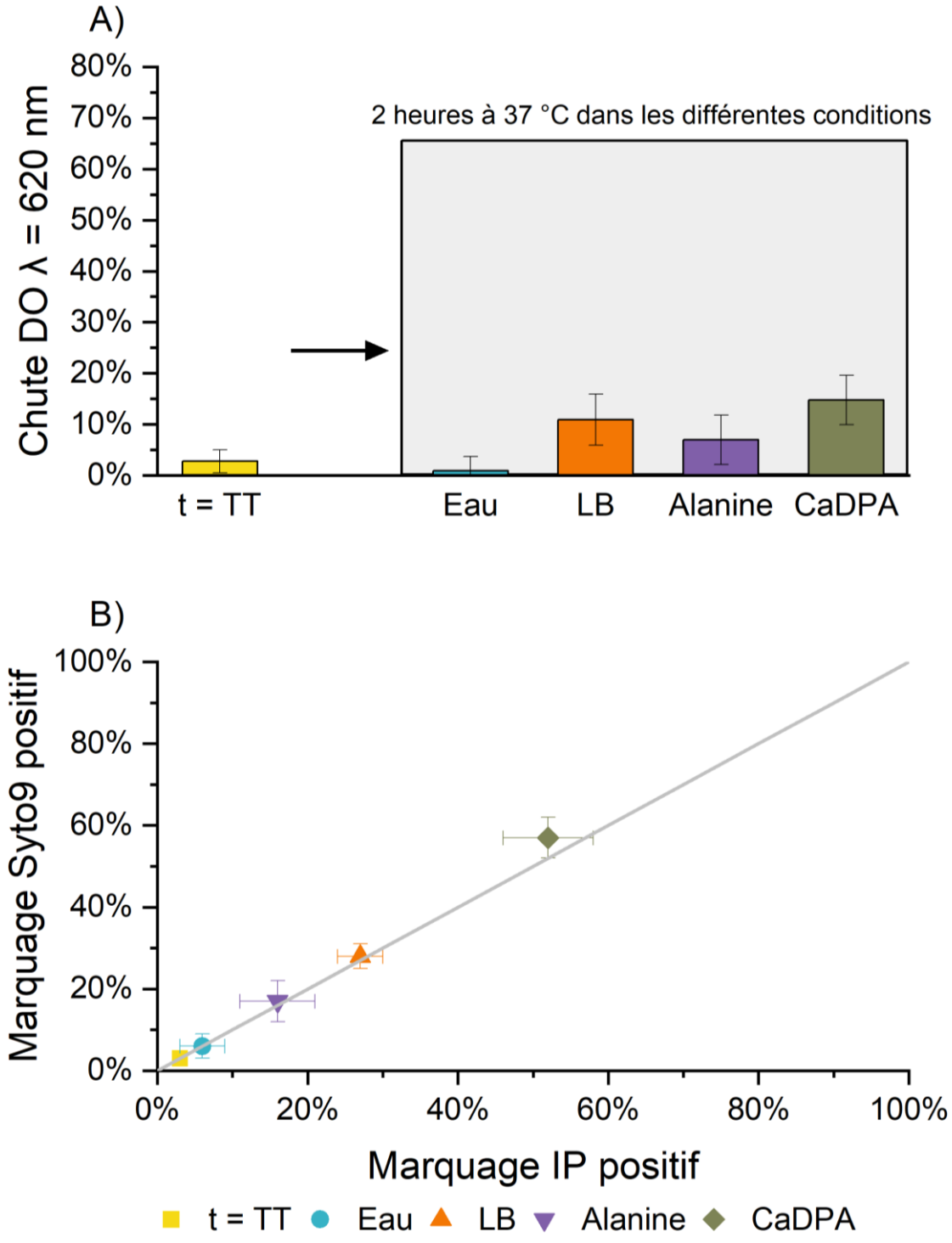


Figure 32 *: Suivi de la chute de DO à 620 nm (A) et du marquage Syto/IP (B) après le traitement TT (t = TT) et suite à l'incubation post traitement TT dans différents milieux de germination. Les barres d'erreur correspondent aux écarts-types calculés à partir des 6 répétitions réalisées.*

Concernant l'évolution des différents stades physiologiques déterminés par calcul (**Figure 33**), nous ne constatons pas d'évolution suite à l'incubation dans l'eau des spores traitées, pendant 2 heures à 37 °C. Les spores peuvent être induites en germination en présence d'éléments nutritifs (LB) et non nutritifs (Alanine et CaDPA). Ainsi, en présence de LB, ce sont 27 % des spores dormantes qui sont induites en phase 2 de germination, contre 15 % en présence d'alanine. En présence de CaDPA, 53 % des spores dormantes sont induites en phase 2 de germination. Nous constatons que le passage en phase 2 de germination s'accompagne systématiquement d'une perméabilisation à l'IP.

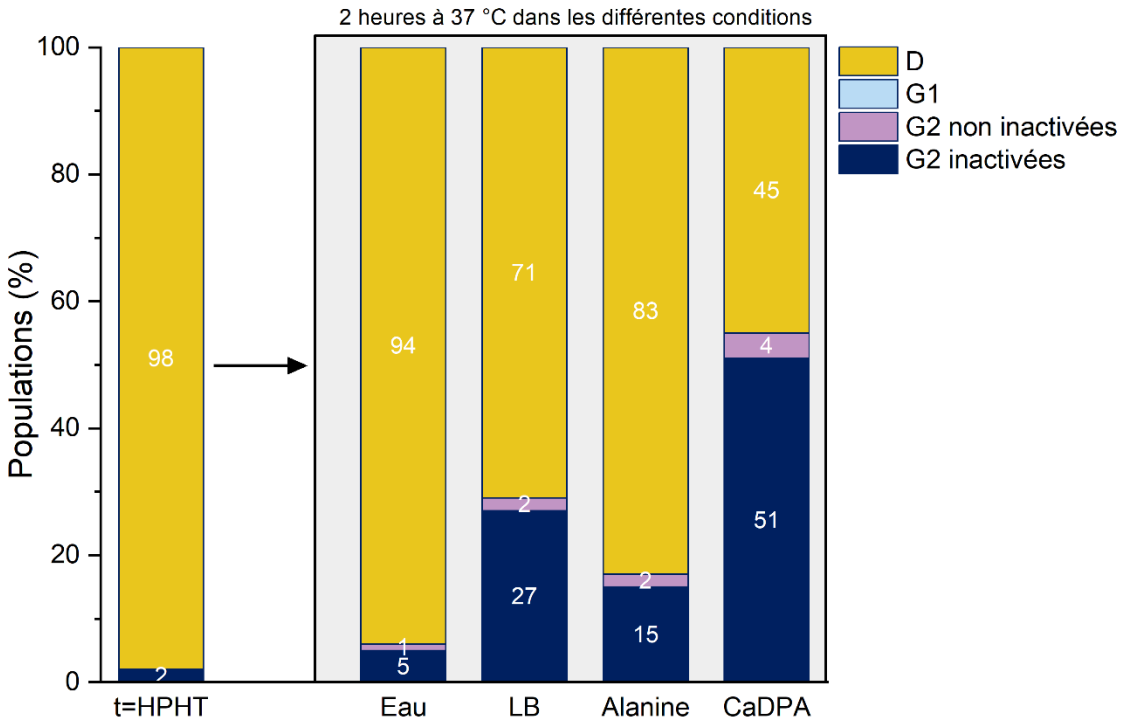


***Figure 33** : Evolution des différents stades physiologiques suite au traitement TT et après l'incubation des spores traitées TT dans les différentes conditions de germination.*

4. Discussion

Les spores bactériennes perdent progressivement leurs propriétés de résistances au cours du phénomène de germination. Ce phénomène est fortement impliqué dans la destruction des spores par des procédés physiques tels que les traitements HP. Les mécanismes d'induction de la germination par la pression diffèrent selon les barèmes de pression et de température appliqués. Nous distinguons la germination dite « physiologique », qui se fait par activation des récepteurs GR et se poursuit par la libération du CaDPA et la lyse du cortex, de la germination dite « non physiologique » provoquée par une libération directe du CaDPA avant la lyse du cortex (Black et al., 2005; Black, Setlow, et al., 2007; Delbrück, Zhang, Heydenreich, et al., 2021).

Les traitements BP et HP conduisent donc à la libération du CaDPA puis à la lyse du cortex par les enzymes CLE, deux événements majeurs dans la perte de la résistance thermique des spores.

Globalement, nos résultats montrent une bonne corrélation entre les taux de germination et d'inactivation obtenus par dénombrements et par marquage fluorescent. Un schéma reprenant l'évolution des spores pendant les traitements sous pression et suite à leur incubation dans des conditions de germination est présenté en **Figure 34**. Les deux barèmes étudiés dans le cadre de ces travaux (300 et 500 MPa) conduisent à la germination (au moins jusqu'au stade 1) de la quasi-totalité de la population de spores de *B. subtilis*, comme en témoignent la chute de la DO et le passage en phase « dark » observés en microscopie à contraste de phase. A BP, les spores évoluent jusqu'au stade 2 de germination sous pression, c'est-à-dire jusqu'à la dégradation du cortex par les enzymes CLE (86 % de spores marquées au Syto9). A HP, si toutes les spores ont atteint le stade 1 de germination, seulement 42 % évoluent vers le stade 2 sous pression, et 30 % supplémentaires l'atteignent au retour à pression atmosphérique (traitement HPBT). Le même phénomène est observé pendant le traitement HPHT mais semble accéléré en comparaison au traitement à BT (56 % des spores évoluent vers le stade 2 sous pression et 17 % supplémentaires l'atteignent au retour à pression atmosphérique). Les conditions des traitements HP (40 et 70 °C) semblent limiter le passage en stade 2 de germination de l'ensemble de la population et ces conditions pourraient

inhiber partiellement les enzymes CLE, comme reporté dans une précédente étude (Black, Wei, et al., 2007).

Cependant, de nouvelles observations se dégagent du suivi des différents états physiologiques des spores traitées lorsqu'elles sont placées dans de nouvelles conditions de germination.

Nous observons une proportion de spores germées en stade 1 pendant le traitement sous pression (germination partielle), capables de passer en stade 2 en présence d'inducteurs de la germination (milieu nutritif LB, L-alanine et CaDPA) : ces spores sont bloquées partiellement et nécessitent une nouvelle induction de la germination (désignées comme spores « inductibles » sur le schéma). Si ce phénomène est observé à faible proportion pour le traitement BPBT (8 % de spores), il est plus répandu lors du traitement HP (26 et 24 % de spores pour les traitements HPBT et HPHT respectivement). A notre connaissance, cette induction de germination partielle n'est pas décrite dans la littérature. En revanche, l'induction de la germination des spores par la pression est décrite comme irréversible : les spores poursuivent la germination au retour à pression atmosphérique, même en absence d'éléments nutritifs (Kong et al., 2014; Y. Zhang, Delbrück, et al., 2020). Le phénomène de germination partielle étant plus observé à 500 MPa, nous pouvons penser que lors de la libération du CaDPA du protoplaste des spores, les enzymes de lyse du cortex ne sont probablement pas activées par le CaDPA du fait d'une modification de leur conformation par la pression. En absence de lyse du cortex, les spores retiennent une quantité de CaDPA. Une nouvelle induction de la germination pourrait alors être nécessaire pour procéder à la libération totale du CaDPA et à la lyse du cortex (comme en témoignent les augmentations de chutes de DO dans ces conditions de germination post traitement HP).

Cependant, la transition de ces spores vers le stade 2 de germination s'accompagne systématiquement d'une pénétration du marqueur IP dans le protoplaste, probablement du fait d'un changement de perméabilité de la membrane interne. Ainsi ces spores, que nous identifions comme bloquées en stade 1 de germination, sont probablement altérées au niveau de la membrane interne au cours du traitement sous pression. La lyse du cortex par les enzymes CLE entraîne une expansion du noyau suite à l'absorption d'eau (J. Liang et al., 2014; P. Setlow et al., 2017). Pour permettre cette augmentation de volume, il y a une augmentation de la surface de la membrane interne d'environ 1,3 fois en absence d'ATP et d'une nouvelle

synthèse de phospholipides (Christie & Setlow, 2020). L'expansion de la membrane interne pourrait se faire par l'intégration de vésicules membranaires situées en dessous de cette structure (Laue et al., 2018). Les mécanismes à l'origine de cette intégration ne sont pas connus mais ils pourraient impliquer une ou plusieurs protéines lors de la germination de la spore. Ainsi, dans le cadre de notre étude, l'absence d'expansion des spores suite à l'aboutissement du stade 2 de germination pourrait être due à une inactivation par la pression de la ou des protéine(s) impliquée(s) dans la fusion des vésicules membranaires.

Une proportion de spores traitées BPBT sont germées en phase 2 et ne sont pas marquées à l'IP suite au traitement sous pression : nous les avons désignées par le terme « spores germées en stade 2 blessées ». En effet, l'incubation de ces spores dans des conditions nutritives pendant 2 heures à 37 °C permet de les préserver contre la perméabilisation à l'IP. En revanche, une incubation dans des conditions non nutritives (eau, L-alanine, CaDPA) conduit à la perméabilisation de la membrane interne de ces spores. Les spores blessées nécessitent plus de temps pour se réparer, se traduisant par un temps de latence plus long avant le développement des cellules germées. La récupération dans des conditions sous-optimales est plus difficile, conduisant à leur inactivation. Dans le cadre du traitement BPBT, les spores sont germées en stade 2 et il y a dégradation des protéines SASP (qui ont un rôle dans la saturation de l'ADN). La dégradation des SASP expose directement l'ADN au barème de pression appliqué. Nous pouvons donc supposer que les spores blessées présentées ici correspondent à des spores endommagées au niveau du matériel génétique, nécessitant un temps de réparation de l'ADN dans des conditions optimales (conditions nutritives LB) avant leur possible développement.

Pour le traitement HP, nous observons un pourcentage de spores germées en stade 2 pendant le traitement plus élevé à HT qu'à BT, bien que la durée du traitement HPHT soit très courte (2 minutes à 500 MPa, compression en < 2 minutes). Il semblerait que le passage du stade 1 au stade 2 soit accélérée à plus haute température pour le barème de 500 MPa. L'étude de Black et al., 2006 montre que la germination des spores, mesurée par la quantification du CaDPA libéré, est favorisée sur une gamme de températures comprises entre 60 et 80 °C à 500 MPa. Ainsi, dans notre étude, nous pouvons supposer que le traitement HPHT favorise la libération du CaDPA en une durée courte, permettant une activation des enzymes de lyse du

cortex pour le passage en stade 2 de germination. Les spores germées sont inactivées par le traitement thermique. Les travaux de Reineke reportent également cette observation : pour des barèmes P>400-600 MPa et T>50-60 °C, il y a une accélération de la germination et de l'inactivation des spores (Reineke et al., 2011, 2012).

Contrairement aux traitements sous pression, le traitement thermique (6 minutes à 97 °C) n'induit pas la germination des spores avant leur inactivation, comme le montrent l'absence de chute de DO et le maintien de la phase « bright » des spores traitées. Nous constatons que les spores traitées thermiquement peuvent germer en présence d'inducteurs de la germination. Cependant, ces spores germées post traitement thermique sont perméabilisées à l'IP. Les mécanismes de résistance des spores aux traitements thermiques impliquent principalement les protéines SASP, permettant une saturation de l'ADN sporal (P. Setlow, 2007, 2013; P. Setlow & Johnson, 2012). Une dénaturation de ces protéines par le traitement thermique engendre alors des dommages létaux à l'ADN.

Après traitement physique, certaines spores apparaissant inactivées peuvent évoluer en stade 2 de germination lorsqu'elles sont placées dans les conditions de germination étudiées. Toutefois, ces spores n'atteignent pas le stade de développement. Quelques études ont montré la germination mais pas de développement post traitement étudié (He et al., 2018). D'un point de vue sécurité alimentaire, la présence de ces spores, même en grand nombre, ne représente pas un risque de développement bactérien. Cependant, cela peut représenter un risque en présence d'espèces pathogènes productrices de toxines.

Enfin, il convient de s'intéresser aux spores superdormantes dans le cadre de ces travaux. Ces spores représentent une proportion non négligeable au sein de la population (1 à 12 %) et les mécanismes à l'origine de la superdormance ne sont pas élucidés du fait de la difficulté à isoler ces spores SD (S. Ghosh et al., 2008; S. Ghosh & Setlow, 2009; Wei et al., 2010; Y. Zhang & Mathys, 2019). Dans cette étude, nous observons que toutes les spores ne sont pas induites en germination par les traitements hyperbares à 300 et 500 MPa, probablement du fait de la présence des spores SD aux traitements HP. Cependant, cette population est trop faible (moins de 1 %) pour être étudiée avec cette méthode. Il faudrait séparer et concentrer cette sous-population afin de pouvoir l'étudier.

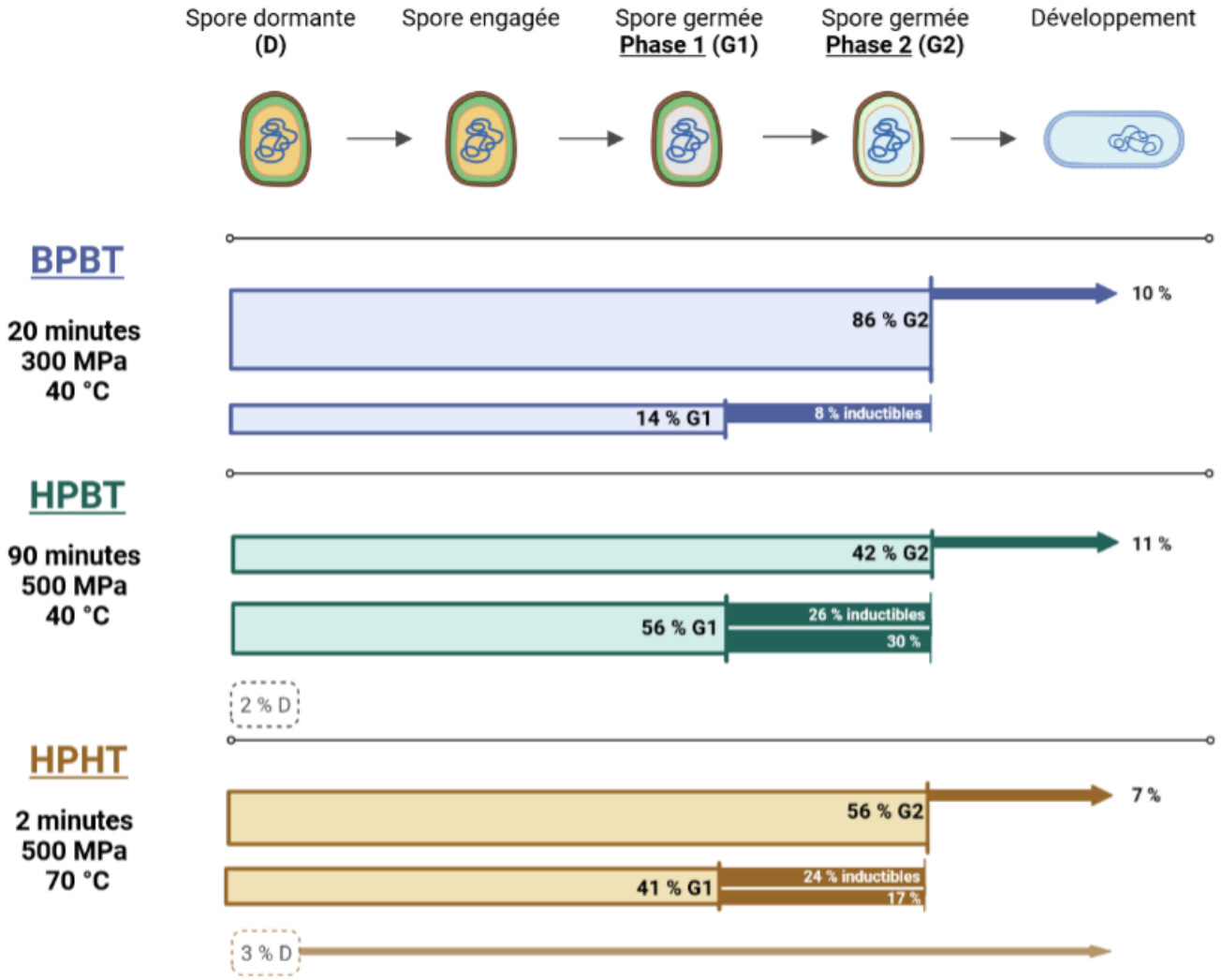


Figure 34 *: Synthèse de l'évolution des spores de B. subtilis pendant les traitements HP étudiés (flèche de couleur claire) et au retour à pression atmosphérique en incubation pendant 2 heures à 37 °C (flèche de couleur foncée).*

5. Conclusion du chapitre 2

Dans cette étude, des traitements à différents barèmes de pression et de température ont été mis en place pour détruire un log de spores de la population initiale. Les marqueurs retenus pour le suivi de ces spores post-traitement ont permis de mettre en évidence des mécanismes d'altérations selon le barème de pression appliqué. Nos résultats montrent clairement une induction de germination jusqu'au stade 2 dans le cas du traitement BPBT (20 minutes, 300 MPa, 40 °C). En revanche, pour les traitements HPBT (90 minutes, 500 MPa, 40 °C) et HPHT (2 minutes 500 MPa, 70 °C), l'induction de germination se fait majoritairement jusqu'au stade 1. Une plus faible proportion de spores est capable d'évoluer jusqu'au stade 2 de germination pendant le traitement HP.

Quel que soit le barème appliqué, nous constatons que les spores germées en stade 1 pendant le traitement sous pression sont capables d'évolution en stade 2 au retour à pression atmosphérique (en présence ou non d'inducteurs de la germination). Cependant, tout comme pour les spores germées en stade 2 pendant le traitement, nous constatons que ces spores subissent un changement de perméabilité au niveau de la membrane interne, conduisant à leur inactivation.

Du fait du changement de perméabilité observé, nous pouvons penser que cette membrane interne constitue la cible des traitements sous pression. La membrane interne de la spore bactérienne est caractérisée par une viscosité élevée, lui conférant des propriétés de résistance remarquables, qui revient à une viscosité normale lors de la germination (Loison et al., 2013). Par ailleurs, pour les cellules végétatives, la membrane cellulaire est connue pour être la cible des traitements HP, de par la perturbation de la fluidité membranaire. Ainsi, il serait intéressant d'étudier l'évolution de la fluidité membranaire après les traitements sous pression (**Chapitre 3**).

CHAPITRE 3

MISE EN PLACE D'UNE METHODE DE CARACTERISATION DE LA VISCOSITE DES STRUCTURES HYDROPHOBES DES SPORES BACTERIENNES PAR IMAGERIE DE FLUORESCENCE FLIM

Sommaire

1. Introduction 134

2. Durée de vie de fluorescence 134

2.1. Principe 134

2.2. Techniques utilisées pour l'analyse des images FLIM 135

2.3. Systèmes d'acquisition des temps de vie de fluorescence 137

2.4. Calibration du système FLIM sur le microscope confocal 138

3. Utilisation d'un rotor moléculaire pour la caractérisation de la viscosité 139

3.1. Description du rotor moléculaire utilisé dans cette étude 141

3.2. Corrélation entre viscosité et temps de fluorescence du rotor moléculaire 142

3.3. Calibration du temps de vie du Bodipy-C10 en fonction de la viscosité 142

4. Application à la caractérisation de la viscosité des structures hydrophobes des spores bactériennes 150

4.1. Incorporation du rotor moléculaire dans les spores bactériennes 150

4.2. Analyse des mesures FLIM – apport des différentes méthodes 150

4.3. Spores PS533 et PS4150 150

4.4. Evolution des temps de vie de fluorescence du Bodipy-C10 dans les spores avant et après traitements en pression et température 155

5. Discussion 160

6. Conclusion du chapitre 3 161

1. Introduction

Des résultats de l'étude précédente (**Chapitre 2**), nous constations une perméabilisation de la membrane interne de par la pénétration du marqueur IP, signe d'une altération de cette structure suite aux traitements BP et HP. Nous nous sommes donc intéressés à l'étude de cette structure, plus précisément à l'étude de la fluidité membranaire par l'utilisation d'un rotor moléculaire, le Bodipy-C10 et l'exploitation de l'imagerie en temps de vie de fluorescence (FLIM). L'analyse du temps de vie de fluorescence du rotor permet la mesure de la viscosité de l'environnement de la sonde. En effet, le temps de vie de fluorescence de cette sonde est corrélé à la viscosité de son environnement. Ce temps de vie de fluorescence peut être mesuré par la méthode FLIM, en microscopie confocale. Il correspond au temps pour lequel les molécules restent à l'état excité avant de revenir à l'état fondamental. Le Bodipy-C10 possède une structure hydrophobe et s'insère donc naturellement au niveau des structures hydrophobes des microorganismes. Cette sonde est donc utilisée pour mesurer la viscosité des membranes cellulaires par exemple. Loison et al., (2013, 2016) ont exploité la technique combinant l'utilisation d'un rotor moléculaire, le Bodipy-C12, et l'imagerie FLIM pour étudier la viscosité des structures membranaires des spores de *B. subtilis* (Loison et al., 2013, 2016). La viscosité membranaire des cellules végétatives *d'Escherichia coli* a également été étudiée par d'autres équipes (Mika et al., 2016).

2. Durée de vie de fluorescence

2.1. Principe

La « Fluorescence-Lifetime Imaging Microscopy » (FLIM) est un ensemble de techniques d'imagerie de fluorescence, basé sur l'acquisition d'un paramètre photophysique : le temps de vie de fluorescence. Ce paramètre, noté τ, correspond au temps moyen pendant lequel une molécule fluorescente réside dans son état excité avant de revenir vers son état fondamental par émission d'un photon. Le temps de vie est influencé par les interactions que peut avoir la molécule avec son environnement local, celle-ci étant parfois appelée de ce fait « sonde environnementale » fluorescente. Selon la molécule utilisée, la durée de vie de fluorescence peut être sensible au pH, à la température, à la viscosité locale… Le principe de la méthode de mesure de ce paramètre utilisée pour ce travail de thèse est appelé TCSPC (« Time Correlated Single Photon Counting »). Le TCSPC consiste à exciter le fluorophore avec une série

d'impulsions laser courtes et d'enregistrer, pour chaque événement détecté, le délai entre l'excitation et l'émission (**Figure 35-A**). L'ensemble des délais mesurés permet de construire un histogramme de déclin de fluorescence (**Figure 35-B**) pour chaque pixel de l'image, ou pour un groupement de pixels (ROI – « Region Of Interest »). Cet histogramme de déclin peut être analysé via différentes méthodes permettant de déduire la mesure du paramètre « durée de vie de fluorescence ».

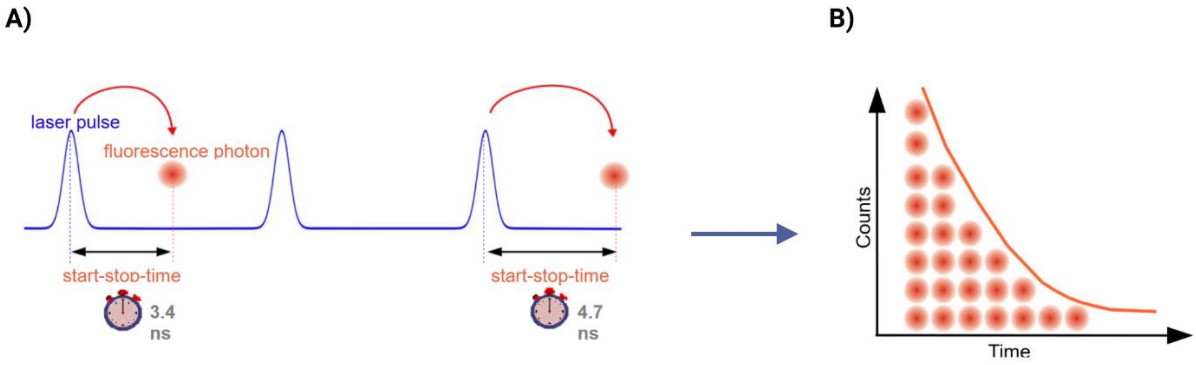


Figure 35 *: Principe de la méthode TCSPC.* ***A)*** *Le détecteur mesure le temps d'arrivée de chaque photon après une impulsion laser.* ***B)*** *Les temps d'arrivées des photons sont ensuite regroupés dans un graphique de distribution.*

2.2. Techniques utilisées pour l'analyse des images FLIM

Une fois les histogrammes de déclin de fluorescence obtenus, nous pouvons obtenir la valeur du ou des temps de vie de fluorescence issus de différentes zones d'intérêt de plusieurs manières. Deux méthodes différentes sont comparées dans ce chapitre.

2.2.1. Ajustement exponentiel du déclin de fluorescence

La première est réalisée par ajustement mathématique, en utilisant des fonctions exponentielles, via le logiciel FLIMfit 5.1.1 (Imperial College London, (Warren et al., 2013)). Dans ce type d'analyse, le nombre d'exponentielles choisi pour réaliser l'ajustement est défini par l'expérimentateur, ce qui est une source possible de biais. Ce nombre est adapté en fonction de la courbe des résidus, qui représente l'écart entre la valeur modélisée et la valeur expérimentale. Pour que l'ajustement soit considéré comme acceptable, les résidus doivent être faibles et dispersés de façon homogène autour de 0, soit une valeur du CHISQ ($\chi 2$) autour de 1 (**Figure 36**). Chaque facteur exponentiel est alors interprété comme la contribution d'une

population de fluorophore inséré dans un environnement local particulier, donnant un temps de vie qui lui est caractéristique.

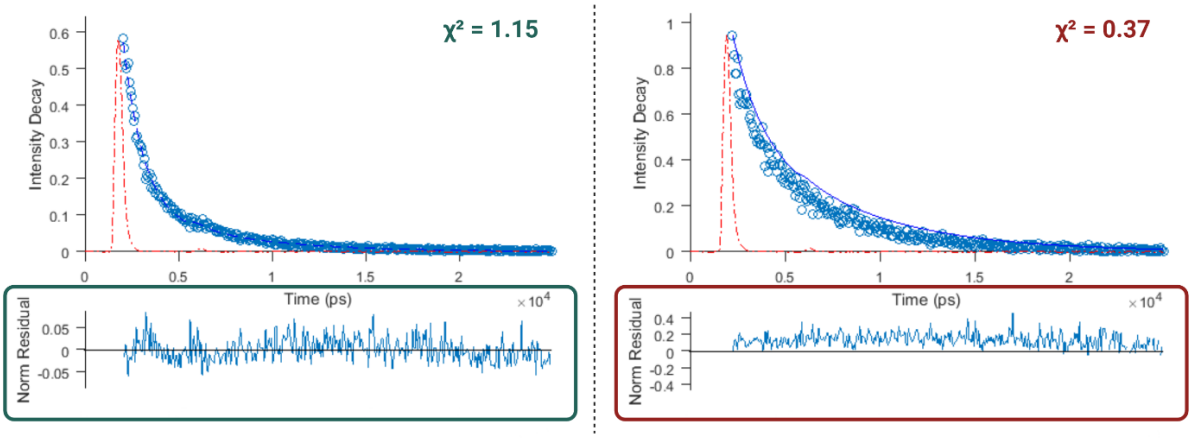


Figure 36 *: Exemples des courbes des résidus (différence entre les données expérimentales et le modèle exponentiel appliqué) obtenues suite à deux ajustements exponentiels du déclin de fluorescence, via le logiciel FLIMfit.*

2.2.2. Projection graphique du déclin de fluorescence

La seconde méthode utilise une représentation graphique des temps de vie, appelée représentation Phasor plot (Leray et al., 2012). Cette analyse est réalisée en utilisant le logiciel MAPI version 3.2. Un des objectifs de ce travail est d'évaluer l'apport de cette méthode d'analyse des mesures de durée de vie par rapport à l'analyse en ajustement exponentiel, plus conventionnelle, qui a été utilisée lors de précédents travaux au laboratoire (Loison et al., 2013). Le Phasor plot est une approche permettant d'obtenir une représentation graphique de la décroissance de fluorescence de chaque pixel de l'image (résultant d'un ou plusieurs temps de vie) dans un espace vectoriel à deux dimensions. Dans cette représentation, les déclins de fluorescence provenant d'une sonde avec un temps de vie unique (modélisable par une décroissance monoexponentielle si on utilise la première méthode d'analyse) sont projetés sur le demi-cercle tandis que les décroissances provenant de plusieurs temps de vie (modélisables par une décroissance multiexponentielle) sont projetées à l'intérieur du demi-cercle, comme nous pouvons le voir sur la **Figure 37** avec les points bleu et orange respectivement. Pour un point sur le cercle, plus ce point est proche des coordonnées (1,0), plus son temps de vie est faible et plus il s'en écarte, plus son temps de vie augmente. Le grand intérêt de cette représentation est qu'il est possible de trouver la contribution des différents temps de vie qui composent un signal, par combinaison linéaire de temps de vie de référence

connus. Par exemple, un point M composé de deux temps de vie de fluorescence et donc se trouvant à l'intérieur du cercle, est caractérisé par ses coordonnées g, s et son angle ϕ. Il se trouve sur la droite joignant les deux points du cercle représentant les deux temps de vie impliqués (τ_1 et τ_2). La proportion de chaque temps de vie est donnée par la distance du point M de chaque point du cercle (par exemple pour τ_1, $f_1/(f_1+f_2)$. L'angle ϕ permet de déterminer un temps de vie moyen τ_ϕ du point considéré :

$\tau_\phi = \frac{1}{\omega}\tan(\phi)$, avec ω la fréquence de pulsation du laser utilisé.

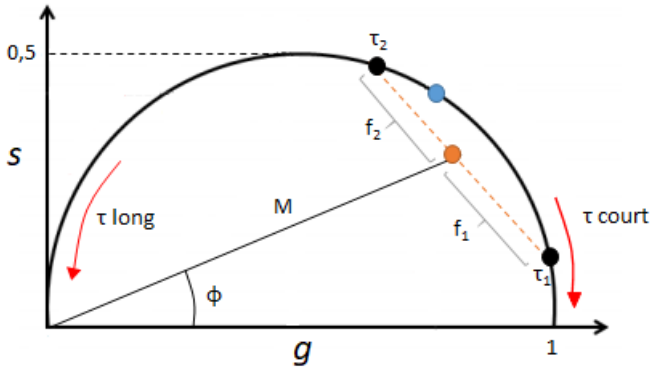


Figure 37 *: Représentation graphique du Phasor plot* (Colyer et al., 2008).

2.3. Systèmes d'acquisition des temps de vie de fluorescence

L'acquisition de la fluorescence des échantillons marqués est réalisée sur un microscope confocal Nikon C1Si Eclipse TE 2000 U, équipé du système FLIM (LSM kit, Picoquant, Allemagne). Un objectif à immersion à huile x100 est utilisé (Nikon, Japon). La longueur d'onde d'excitation du Bodipy-C10, sonde utilisée dans le cadre de ce travail (présenté dans le paragraphe 3.2), est de 488 nm, et son spectre d'émission entre 500 et 600 nm avec un pic d'émission à 510 nm. Le système d'acquisition FLIM consiste quant à lui en une diode laser pulsée (485 nm, 40 MHz) et un détecteur SPAD (« Single-Photon Avalanche Diode ») devant lequel se trouve un filtre de 520 ± 35 nm. Les acquisitions sont réalisées en 512 x 512 pixels, avec une résolution de 64 ps. La durée d'acquisition de chaque image est de trois minutes, durée correspondant à une acquisition supérieure à 10000 photons par point pour avoir suffisamment de signal pour réaliser un ajustement exponentiel du déclin de fluorescence. Les paramètres d'acquisitions des observations sont synthétisés dans le **Tableau 4**. Un système Peltier est utilisé pour contrôler la température durant les acquisitions.

Tableau 4 *: Paramètres des équipements pour les acquisitions des temps de vie de fluorescence du Bodipy-C10.*

Microscope confocal	
Objectif	x 100, immersion à huile, ouverture numérique NA = 1,40
Longueur d'onde d'excitation	488 nm
Longueur d'onde d'émission	500 – 600 nm
Acquisitions FLIM	
Longueur d'onde d'excitation (Laser pulsé)	485 nm ; 40 MHz
Zoom	X4
Taille des images	512 pixels
Filtre	520 / 35 nm
Résolution (temps)	64 ps
Durée d'acquisition	3 minutes

2.4. Calibration du système FLIM sur le microscope confocal

Dans un premier temps, une vérification du système FLIM installé sur le microscope confocal (plateforme d'imagerie Dimacell) est réalisée. Pour cela, nous avons mesuré le temps de vie de fluorescence connu d'une sonde fluorescente : la fluorescéine. La fluorescéine est diluée dans l'eau à une concentration de 0,2 mM. L'acquisition du temps de vie de fluorescence de la sonde est alors réalisée avec les paramètres présentés dans le **Tableau 4**.

La représentation graphique du temps de vie de la fluorescéine sur l'espace vectoriel à deux dimensions du Phasor plot met en évidence une projection sur le demi-cercle, confirmant le temps de vie monoexponentiel de celle-ci (**Figure 38**). La déduction du temps de vie à partir de cette analyse donne un taux phi de 3,93 $\pm$ 0,22 ns, conformément à ce qui est retrouvé dans la littérature (4,05 ns) (Colyer et al., 2008). L'analyse FLIMfit du déclin de fluorescence de ces mêmes acquisitions permet d'obtenir un temps de vie de fluorescence de 4,13 ns, avec un χ^2 de 1,01. Les deux analyses sont donc en bon accord sur cette mesure de calibration utilisant un fluorophore connu en solution.

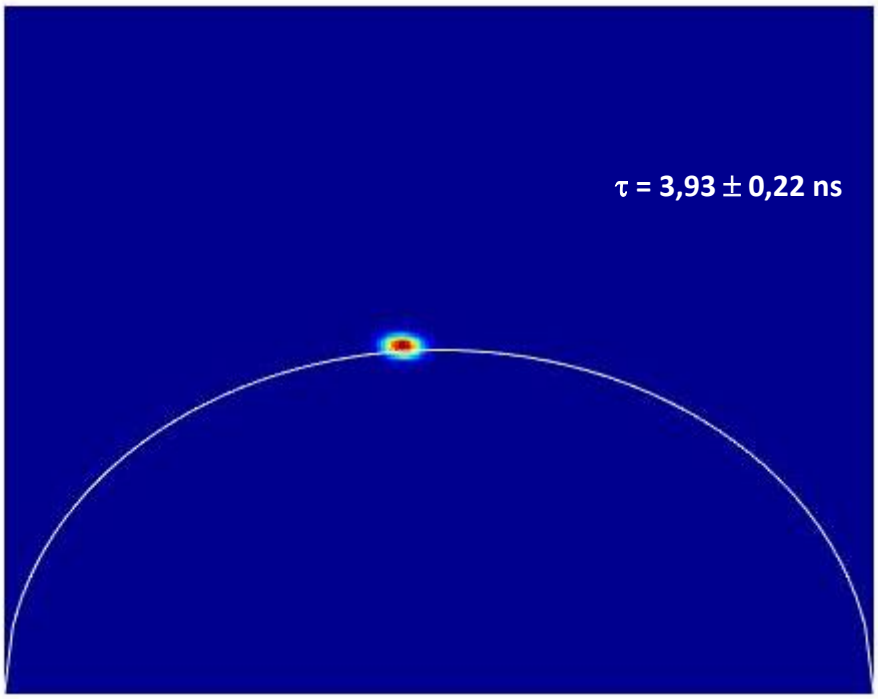


Figure 38 *: Projection graphique sur le Phasor plot du temps de vie de fluorescence de la fluorescéine (0,2 mM dans l'eau). Le temps de vie indiqué correspond à la tangente de l'angle, appelée taux phi (τ_ϕ).*

3. Utilisation d'un rotor moléculaire pour la caractérisation de la viscosité

Un rotor moléculaire est un fluorophore capable de subir un mouvement intramoléculaire de rotation à l'état excité (« twisted intra-molecular charge transfer », TICT) suite à une excitation. Un exemple de rotor moléculaire est présenté en **Figure 39-A** : il s'agit du 4-(Dicyanovinyl) Julolidine (DCVJ). Lors du passage à l'état excité TICT, il y a un transfert d'électron entre un groupement donneur et un groupement accepteur (**Figure 39-B**). Ce transfert d'électron entraîne une torsion intramoléculaire du rotor ; le retour à l'état d'énergie fondamental se fait sans émission de photon. En revanche, en présence d'un environnement visqueux, le passage à l'état de torsion TICT est défavorisé. Le rotor moléculaire demeure alors à l'état « plan » (« planar localy excited », LE) : le retour à l'état fondamental se fait par émission de fluorescence à partir de l'état « plan » (**Figure 39-B**). De ce fait, un environnement visqueux de la sonde favorise l'état « plan », comme illustré dans la **Figure 40,** entraînant une élévation du rendement quantique de fluorescence et de la durée de vie.

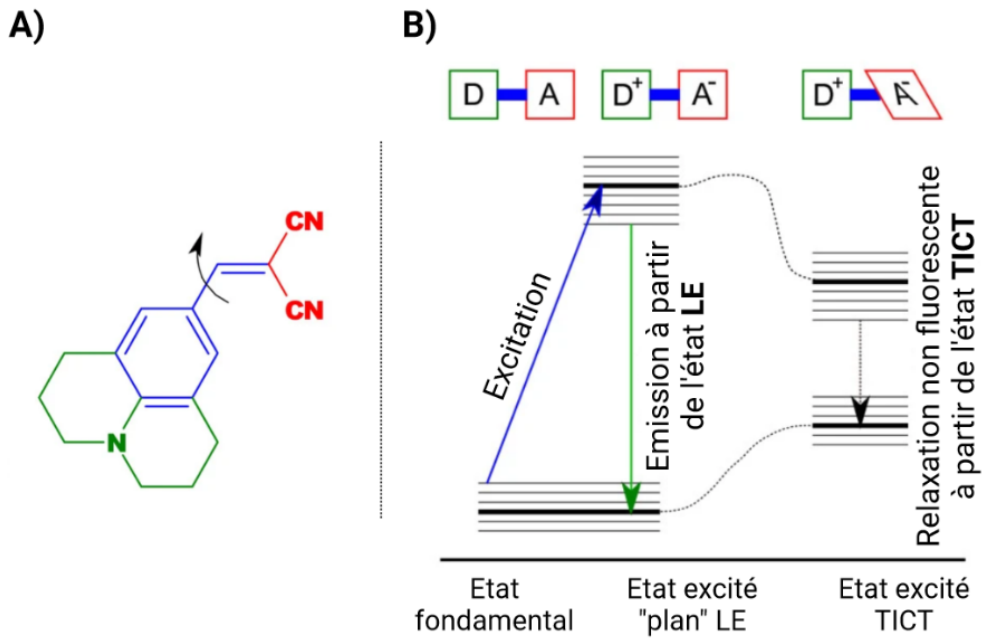


Figure 39 *: **A)** Exemple de rotor moléculaire : le DCVJ. Le mouvement de rotation est indiqué par la flèche noire. **B)** Extension du diagramme de Jablonski pour les rotors moléculaires : sont présentées les deux voies de désexcitation (émission de fluorescence à partir de l'état LE ou relaxation non fluorescente à partir de l'état TICT) pour un retour à l'état fondamental. D'après* (Haidekker & Theodorakis, 2010)*.*

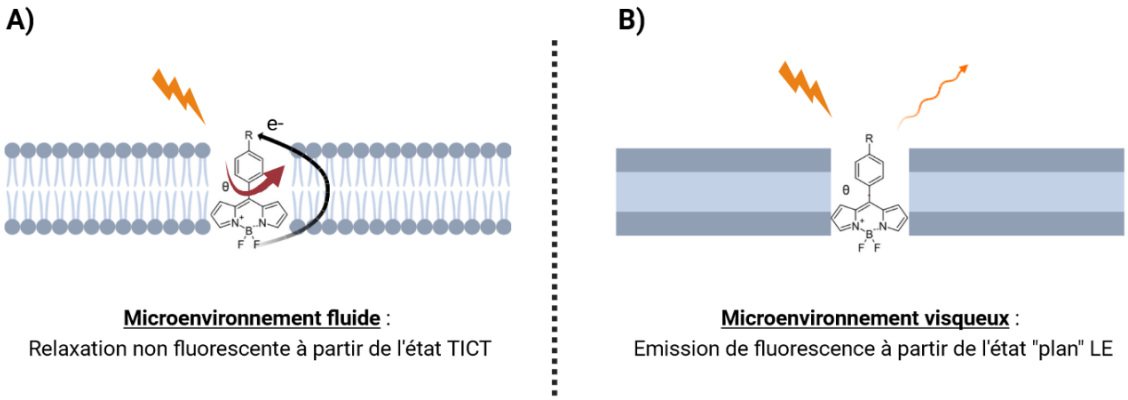


Figure 40 *: Voies de désexcitation d'un rotor moléculaire (Bodipy-R) en fonction de la viscosité de son microenvironnement (ici membranes). **A)** Désexcitation non fluorescente à partir de l'état TICT en environnement fluide. **B)** Désexcitation par émission de fluorescence à partir de l'état « plan » LE en environnement visqueux.*

3.1. Description du rotor moléculaire utilisé dans cette étude

Le rotor moléculaire utilisé dans cette étude, le Bodipy-C10 (**Figure 41**), a été généreusement fourni par Marina Kuimova de l'Imperial College London, qui en maitrise la synthèse (Kuimova et al., 2008). La chaîne carbonée ($C_{10}H_{21}$) favorise la localisation de la sonde dans les structures hydrophobes telles que les bicouches lipidiques des membranes de microorganismes (Levitt et al., 2009; Wu et al., 2013). La sensibilité du Bodipy-C10 à une gamme de 20 à 1000 cP en fait un bon capteur de viscosité dans ces structures hydrophobes lors d'applications biologiques (Levitt et al., 2009). Par ailleurs, le temps de vie du Bodipy-C10 est indépendant de la concentration utilisée et de la température (Kuimova et al., 2008; López-Duarte et al., 2014).

La solution mère de Bodipy-C10 est préparée à une concentration de 1 $mg.mL^{-1}$ dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) puis est stockée à -20 °C. Le spectre d'absorption du Bodipy-C10 présente un pic maximum à 498 nm et son spectre d'émission montre un pic à 510 nm.

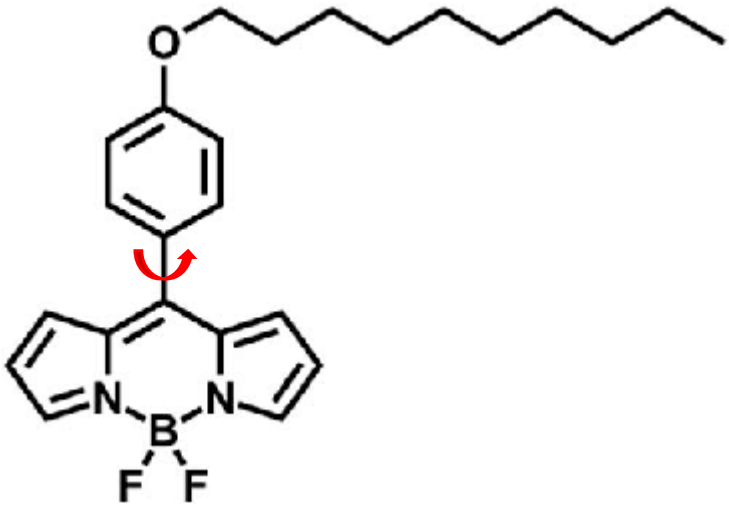


***Figure 41** : Formule chimique du Bodipy-C10* (Kuimova et al., 2008)*. La flèche rouge indique la rotation intramoléculaire du rotor favorisée lors d'une diminution de viscosité de son environnement.*

3.2. Corrélation entre viscosité et temps de fluorescence du rotor moléculaire

Le rendement quantique de fluorescence (ϕ_f) et le temps de vie de fluorescence (τ_f) des rotors moléculaires sont dépendants de la viscosité (η) et sont décrits par l'équation de Förster-Hoffmann (**Eq. 8**), où z et α sont des constantes (Levitt et al., 2009; Valeur, 2001) :

$$\phi_f = z\,\eta^{\alpha} \qquad (8)$$

Sachant que le rendement quantique d'un fluorophore peut être relié au temps de vie de fluorescence par les constantes de vitesses radiative (k_r) et non radiative (k_{nr}), comme dans l'équation suivante (**Eq. 9**) :

$$\phi_f = \frac{k_r}{k_r + k_{nr}} = k_r \tau_f \qquad (9)$$

La dépendance du temps de vie de fluorescence du rotor moléculaire à la viscosité s'exprime alors par l'équation (**Eq. 10**) :

$$\tau_f = z k_r^{-1} \eta^{\alpha} \qquad (10)$$

En prenant le logarithme de l'équation précédente, la projection logarithmique de τ_f en fonction de η donne une droite selon l'équation suivante (**Eq. 11**) :

$$\log \tau_f = \alpha \log \eta + \log\left(\frac{z}{k_r}\right) \qquad (11)$$

Cette équation (**Eq. 11**) va permettre, via une étape de calibration, d'associer les mesures de temps de vie de fluorescence microscopiques (τ_f) avec des valeurs de viscosité macroscopiques (η).

3.3. Calibration du temps de vie du Bodipy-C10 en fonction de la viscosité

3.3.1. Viscosité des mélanges glycérol/méthanol

Dans un premier temps, des mélanges de glycérol/méthanol (Sigma Aldrich) à différentes concentrations (de 0 à 90 % de glycérol) sont préparés afin de disposer d'une gamme de solutions de viscosité croissante.

La viscosité des mélanges est mesurée à température ambiante (25 °C) à l'aide d'un rhéomètre (MCR 302 Anton Paar), équipé d'un cône plat de 50 mm de diamètre et d'une ouverture de 100 µm. L'évolution de la viscosité en fonction de la concentration en glycérol est présentée en **Figure 42**.

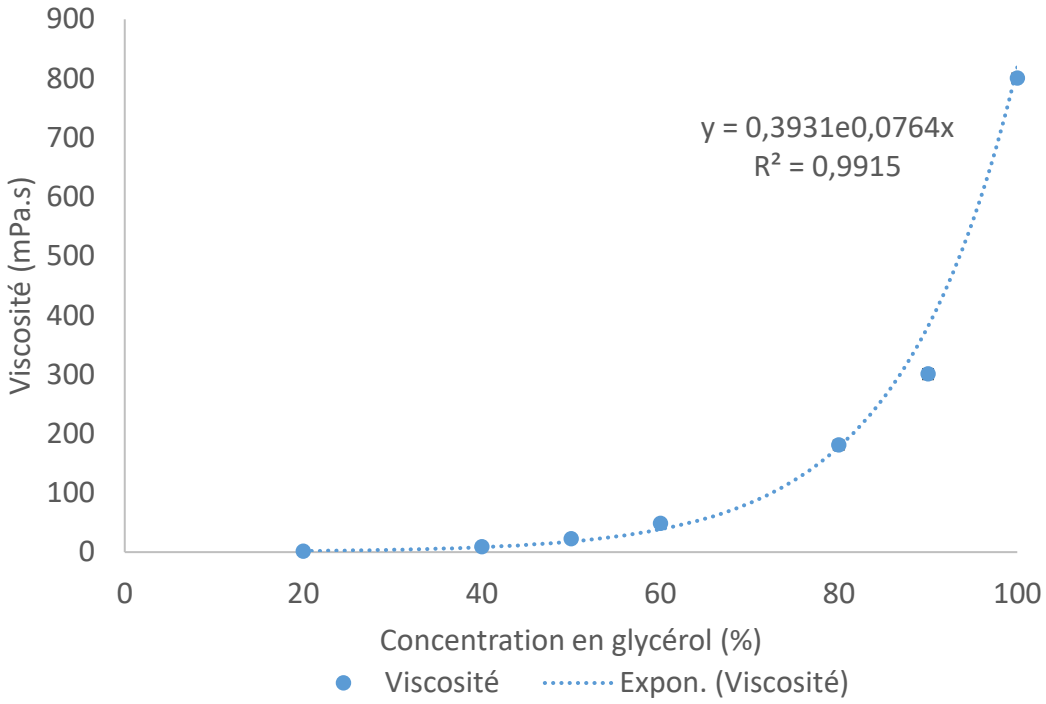


Figure 42 *: Evolution de la viscosité en fonction de la concentration en glycérol dans le mélange glycérol/méthanol, à 25 °C. N > 3 échantillons.*

Nous constatons une augmentation de la viscosité lorsque la concentration en glycérol dans les suspensions augmente : de 1,37 à 800,70 mPa.s pour les échantillons à 20 % et 100 % en glycérol, respectivement.

Une calibration du temps de vie de fluorescence du rotor Bodipy-C10 en fonction de la viscosité du milieu est ensuite réalisée, à l'aide de ces mélanges de viscosité croissante. Le rotor moléculaire Bodipy-C10 est ajouté à une concentration finale de 4,3 µM. L'acquisition des temps de vie de fluorescence du rotor moléculaire est réalisée par la méthode d'acquisition présentée dans le **paragraphe 2.3**.

3.3.2. Temps de vie du Bodipy-C10 dans les mélanges glycérol/méthanol

Le temps de vie du Bodipy-C10 dans les mélanges glycérol/méthanol de concentration croissante en glycérol est mesuré à température ambiante, à l'aide du système FLIM. Les mesures sont analysées par ajustement exponentiel et en représentation Phasor plot.

Pour l'analyse par ajustement exponentiel (FLIMfit), un ajustement monoexponentiel est réalisé pour chaque pixel ; ce choix est justifié par des valeurs de χ^2 obtenues proches de 1 ($0,8 < \chi^2 < 1,2$). Le facteur χ^2 permet de confirmer l'adéquation de la modélisation réalisée

avec le déclin de fluorescence. Les valeurs des temps de vie sont présentées dans le **Tableau 5**. Assez logiquement, nous constatons une augmentation du temps de vie de fluorescence lorsque la concentration en glycérol dans le mélange augmente.

La **Figure 43** présente la projection des temps de vie de fluorescence du Bodipy-C10 sur le demi-cercle Phasor, en fonction de la concentration en glycérol. Nous pouvons constater que la projection des temps de vie de fluorescence du Bodipy-C10 dans les mélanges glycérol/méthanol est sur le demi-cercle universel. Cela confirme que le Bodipy-C10 possède un déclin de fluorescence monoexponentiel dans ces mélanges homogènes. De plus, nous constatons également dans cette représentation en Phasor le déplacement de la projection des temps de vie de fluorescence avec la concentration en glycérol, depuis une au-dessus de la coordonnée [1 ; 0] (temps de vie courts) vers la coordonnée [0,5 ; 0,5] (temps de vie longs). Les valeurs des temps de vie τ_ϕ, obtenus en Phasor en fonction de la concentration en glycérol dans les mélanges, sont également présentées dans le **Tableau 5**.

Quelle que soit la méthode d'analyse, les mesures de durée de vie de fluorescence du Bodipy-C10 dans ces mélanges de différentes viscosités confirment l'augmentation du temps de vie de fluorescence du rotor avec l'augmentation de la viscosité du milieu (Kuimova, 2012). Pour des viscosités importantes, nous constatons une différence entre les temps de vie obtenus par ajustement et ceux issus de l'analyse en Phasor. Cet écart (5 à 15 %) est plus grand que celui obtenu pour la fluorescéine (5 %) mais dans le même sens (temps Phasor plus court). Il existe des biais dans chacune des techniques étudiées (Ranjit et al., 2018). Cependant, ces erreurs sont systématiques. Il est aussi possible qu'une contribution minoritaire du temps court provienne d'une dimérisation du fluorophore ; cette dimérisation peut dépendre du solvant (communication personnelle M. Kuimova). Elle n'est pas visible par analyse par ajustement (hypothèse d'un ajustement mono-exponentiel) mais elle est perceptible par analyse Phasor (pas de modèle à priori).

***Tableau 5** : Temps de vie de fluorescence (ns) du Bodipy-C10 dans les mélanges glycérol/méthanol. τ_φ et τ correspondent aux temps de vie déterminés à température ambiante (25 °C) par l'analyse Phasor Plot et par l'analyse par ajustement exponentiel FLIMfit, respectivement. La viscosité calculée pour les différents mélanges également indiquée.*

Glycérol (%)	Viscosité mesurée (mPa.s)	Temps de vie τ_ϕ (ns)	Temps de vie τ (ns)
0	0,39	$0,38 \pm 0,01$	$0,36 \pm 0,01$
20	1,81	$1,09 \pm 0,04$	$1,13 \pm 0,04$
40	8,35	$1,30 \pm 0,02$	$1,38 \pm 0,01$
60	38,49	$1,55 \pm 0,03$	$1,63 \pm 0,02$
80	177,38	$2,04 \pm 0,13$	$2,30 \pm 0,06$
90	380,81	$2,33 \pm 0,08$	$2,73 \pm 0,07$

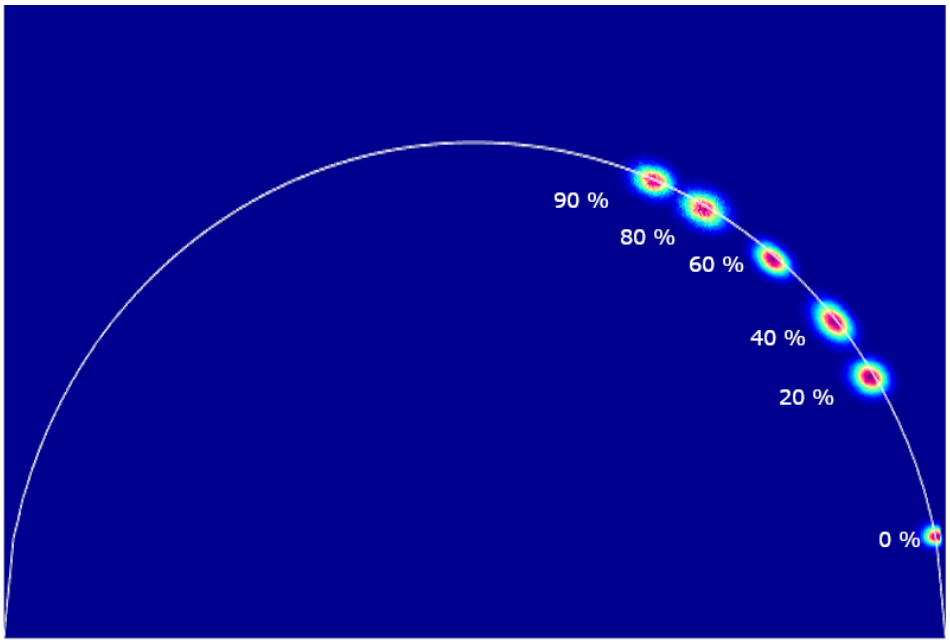


***Figure 43** : Distribution graphique des temps de vie de fluorescence du Bodipy-C10 dans les mélanges de glycérol/méthanol (nombre d'acquisitions analysées par condition : n > 3).*

3.3.3. Calibration viscosité et temps de vie du Bodipy-C10

Les résultats du paragraphe précédent permettent de tracer le logarithme de la durée de vie de fluorescence (obtenu par les deux méthodes d'analyse) en fonction du logarithme de la viscosité (**Figure 44**). En reprenant **l'équation (11)**, établie au **Paragraphe 3.2**, nous pouvons déterminer les paramètres de calibration viscosité/durée de vie de fluorescence, grâce à un ajustement linéaire.

Ainsi, à partir de cette équation (**Eq. 11**), la courbe de calibration logarithmique entre le temps de vie du rotor moléculaire Bodipy-C10 et la viscosité du mélange glycérol/méthanol permet d'établir les relations suivantes (**Eq. 12**) et (**Eq. 13**) pour déterminer la viscosité en fonction du temps de vie de fluorescence, déterminé par les deux méthodes d'analyse, dans nos conditions expérimentales :

$$\log \eta = \frac{\log \tau \ + 0{,}0101}{0{,}1644} \qquad (12)$$

$$\log \eta = \frac{\log \tau_{\phi} \ + 0{,}0122}{0{,}1422} \qquad (13)$$

Avec η est la viscosité en mPa.s, τ_{ϕ} et τ correspondent aux temps de vie déterminés par l'analyse Phasor Plot et par l'analyse par ajustement exponentiel FLIMfit, respectivement. Ces coefficients sont différents de ceux obtenus dans la littérature ; ces différences pouvant s'expliquer par des conditions analytiques très différentes (mesure en spectroscopie, fréquence d'impulsions …).

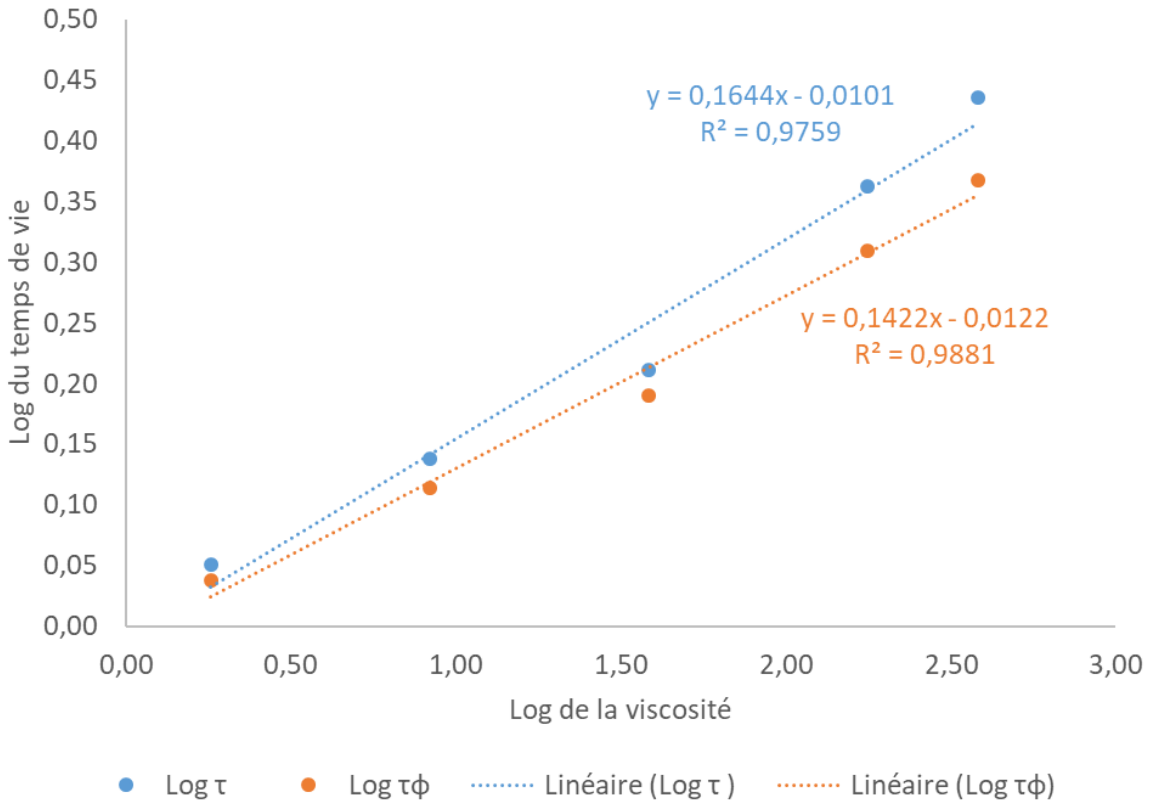


Figure 44 *: Courbes de calibration de la durée de vie de fluorescence du Bodipy-C10 en fonction de la viscosité des mélanges de glycérol/méthanol.*

3.3.4. Application in vitro : mesure de la viscosité du glycérol 80 % - effet de la température

Dans un deuxième temps, nous nous sommes intéressés à la variation des temps de vie de fluorescence du Bodipy-C10 dans une solution de glycérol à 80 % en fonction de la température. Les acquisitions de fluorescence sont réalisées sur une gamme de températures comprises entre 12 et 53 °C. La représentation Phasor (**Figure 45**) montre une distribution des temps de vie proches du demi-cercle, indiquant des temps de vie probablement monoexponentiels. Le déplacement des points sur le demi-cercle du Phasor montre une diminution des temps de vie lorsque la température augmente. Cela est cohérent avec une diminution de la viscosité du glycérol lorsque la température augmente. L'analyse par ajustement exponentiel (FLIMfit) montre également cette diminution des temps de vie lorsque la température augmente (**Tableau 6**). En parallèle, nous constatons comme précédemment une différence systématique entre les temps de vie obtenus par les deux

méthodes : les temps de vie τ obtenus par ajustement exponentiel sont plus longs que ceux obtenus par l'analyse Phasor (τ_ϕ), avec un écart de 12 %.

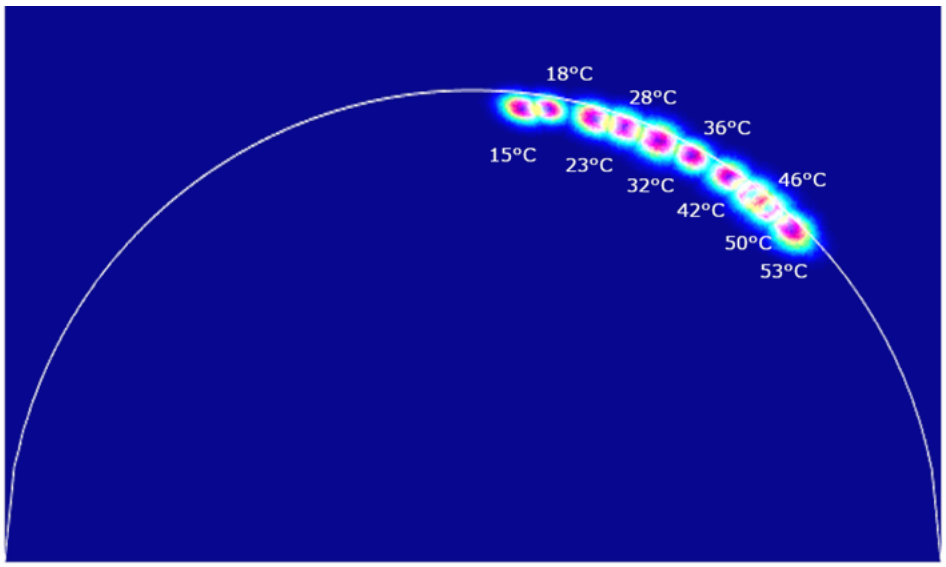


Figure 45 *: Distribution graphique des temps de vie de fluorescence du Bodipy-C10 dans une solution de glycérol à 80 % soumise à une rampe thermique de 15 à 53 °C (nombre d'acquisitions analysées par condition : n = 1).*

Tableau 6 *: Temps de vie de fluorescence (ns) et viscosités correspondantes du Bodipy-C10 dans une solution de glycérol à 80 % mesurés entre 15 et 53 °C.* τ_ϕ *et* τ *correspondent aux temps de vie déterminés par l'analyse Phasor Plot et par l'analyse par ajustement exponentiel (FLIMfit), respectivement.*

Température (°C)	Temps de vie τ_ϕ (ns)	Viscosité calculée à partir de l'équation (Eq. 13) (mPa.s)	Temps de vie τ (ns)	Viscosité calculée à partir de l'équation (Eq. 12) (mPa.s)
12	3,18	4159	3,59	2741
17	3,02	2893	3,44	2114
23	2,72	1386	3,10	1123
28	2,54	856	2,88	717
32	2,34	481	2,65	432
36	2,14	257	2,42	249
42	1,93	124	2,19	136
46	1,77	68	2,01	80
50	1,69	49	1,91	59
53	1,53	24	1,68	27

Cette calibration réalisée sur une seule concentration en glycérol (80 %) semble montrer une liaison légèrement différente entre temps de vie et viscosité que celle obtenue pour les différentes concentrations. Cette différence pourrait s'expliquer par une contribution de la

température au temps de vie du fluorophore. Cependant, cette hypothèse est en contradiction avec la bibliographie sur cette sonde (Vyšniauskas et al., 2015), qui montre que la température influe très peu sur le temps de vie mesuré du Bodipy-C10. Une autre hypothèse pour expliquer cet écart viendrait de l'écart entre la mesure de température (thermocouple à l'intérieur de la goutte) et la mesure de fluorescence (liquide à l'interface avec la lame microscopique). Cette lame est chauffée par un système Peltier afin de faire varier la température de la goutte. Du fait des déperditions, il existe un gradient thermique entre la goutte et l'interface. Le reste des expérimentations se faisant à température ambiante et dans une autre configuration (sonde à l'intérieur des spores), ces effets dus au dispositif expérimental et à la température n'ont pas été poursuivis.

4. Application à la caractérisation de la viscosité des structures hydrophobes des spores bactériennes

4.1. Incorporation du rotor moléculaire dans les spores bactériennes

Pour le marquage des spores, le rotor moléculaire est incorporé dans le milieu de sporulation, 2 heures après l'inoculation. Le marquage se fait une à concentration finale de 4,3 µM (pour une concentration finale de l'ordre de 10^8 spores/mL), comme précédemment mis au point au laboratoire (Loison et al., 2013). Les acquisitions de fluorescence sont réalisées au moins 7 jours après la production et la purification des spores. Pour cela, 4 µL de la suspension de spores sont déposés sur une boîte d'observation (u-Dish, Biovalley) ; une fine couche d'agarose (15 g/L) est déposée sur les spores afin de les immobiliser.

4.2. Analyse des mesures FLIM – apport des différentes méthodes

Les précédents travaux sur les mesures de viscosité par FLIM au laboratoire utilisaient une analyse en ajustement exponentiel, avec un choix de modélisation mono ou biexponentiel en fonction de la qualité de l'ajustement obtenu (contrôlé par la valeur de χ^2) (Loison, 2013). Dans la présente étude, le Phasor Plot apporte à la fois une représentation permettant d'appréhender de manière graphique la distribution des temps de vie de fluorescence du Bodipy-C10 dans les spores, sans nécessiter d'hypothèses sur le choix du nombre d'exponentielles, comme c'est le cas pour l'analyse par ajustement. L'intérêt de l'analyse par ajustement exponentiel est que cette dernière reste plus facilement quantitative que l'approche en Phasor dans des cas simples (environnement homogène). Un ajustement biexponentiel suppose que la sonde fluorescente est placée dans deux environnements distincts, dont on peut en quantifier les viscosités caractéristiques. L'équation de calibration (**Eq.12**) établie **partie 3.3.3** permet de faire le lien entre les valeurs de durée de vie de fluorescence du rotor moléculaire issues de l'ajustement multiexponentiel et les valeurs de viscosité.

4.3. Spores PS533 (souche sauvage) et PS4150 (mutant sans manteau protéique)

Les spores de la souche sauvage PS533 et du mutant PS4150 de *B. subtilis*, marquées au Bodipy-C10, sont observées en microscopie confocale puis en FLIM. Dans un premier temps, les acquisitions de fluorescence du rotor moléculaire sont exploitées en représentation Phasor

(logiciel MAPI). La représentation Phasor obtenue en prenant uniquement le barycentre du nuage de points de chaque souche est présentée dans la figure ci-dessous (**Figure 46**).

Dans une première analyse, nous constatons une projection des pixels à l'intérieur du demi-cercle, témoignant d'une décroissance multiexponentielle de la fluorescence du rotor moléculaire dans les spores. Cela signifie que plusieurs temps de vie de fluorescence du Bodipy-C10 coexistent dans les spores de *B. subtilis*. A priori, seuls deux types de structures hydrophobes, les membranes et le manteau protéique, sont susceptibles d'être marquées par le Bodipy-C10 au sein des spores, aussi bien pour la souche sauvage que pour le mutant délété des protéines du manteau (Loison et al., 2013). De ce fait, deux temps de vie de fluorescence caractéristiques pour le Bodipy-C10 dans les spores peuvent être supposés. Pour les spores du mutant PS4150, dont le manteau protéique est incomplet, nous constatons que le barycentre se rapproche des temps de vie de fluorescence long. A l'inverse, pour les spores de la souche sauvage PS533, nous observons que le barycentre de rapproche des temps de vie courts (plus à droite sur le Phasor Plot).

Une analyse par ajustement exponentiel (FLIMfit) est ensuite réalisée sur ces acquisitions de fluorescence pour obtenir les temps de vie de fluorescence du rotor dans les structures hydrophobes des spores PS533 et PS4150. Un ajustement biexponentiel donne des valeurs de χ^2 satisfaisantes (proches de 1). Cela est cohérent avec l'hypothèse de deux types d'environnements hydrophobes dans lesquels le Bodipy-C10 peut s'insérer : le manteau et les membranes. Les résultats des mesures de durée de vie de fluorescence sont présentés dans le **Tableau 7**.

Nous obtenons ainsi deux temps de vie de fluorescence, attribués à deux environnements marqués au sein de ces spores. Pour les spores PS533, le temps de vie long est de l'ordre de 5,35 ns (τ_1) et le temps de vie court de l'ordre de 1,65 ns (τ_2), correspondant à un environnement plus fluide. Ces valeurs sont cohérentes avec celles obtenues par la représentation Phasor. Pour les spores du mutant PS4150, le temps de vie long est de l'ordre de 5,72 ns, le court de 2,04 ns.

Un travail de thèse précédemment réalisé au laboratoire a permis d'associer les temps de vie de fluorescence d'un rotor moléculaire, le Bodipy-C12, aux structures de la spore bactérienne

(Loison, 2013). Ainsi, dans cette précédente étude, l'analyse biexponentielle réalisée sur les spores PS533 aboutissait à l'obtention d'un temps de vie long variant de 3 à 5,5 ns, attribué au Bodipy-C12 dans les membranes et un temps de vie court de 1,1 ± 0,3 ns, attribué au Bodipy-C12 dans le manteau. Cette même étude ne mettait en évidence qu'un seul temps de vie de fluorescence de 3,9 ± 0,2 ns pour les spores PS4150. Les spores PS4150 présentant un manteau incomplet, le temps de vie unique mesuré avait été attribué à celui des membranes. Les résultats obtenus dans le cadre de l'étude présentée ici sont cohérents avec ceux précédemment obtenus lors de la thèse de P. Loison pour les spores de la souche sauvage. De manière similaire, nous associerons le temps de vie long aux membranes interne et externe de la spore. Le temps de vie court est quant à lui associé aux structures protéiques (essentiellement le manteau).

Pour les spores du mutant PS4150, les deux analyses réalisées (projection Phasor et modélisation par ajustement exponentiel FLIMfit) aboutissent à l'obtention de deux temps de vie de fluorescence (5,72 et 2,04 ns), soit deux environnements marqués, contrairement à ce qui a été précédemment observé au laboratoire. Ces temps de vie semblent coexister en proportions égales. Il est cependant intéressant de noter que la valeur moyenne obtenue (3,88 ns) n'est pas significativement différente de celle de l'étude antérieure (3,9 $\pm$ 0,2 ns). Rappelons que le mutant PS4150 produit des spores avec un manteau incomplet, mais pas complètement absent, par suppression des séquences codant pour les protéines cotE et gerE du manteau. Nous proposons donc que comme pour la souche PS533, ce temps de vie court soit associé au manteau protéique pour les spores PS4150. Notons que la contribution de ce temps de vie court passe de 73 % pour la souche PS533, à 50 % pour la souche PS4150, en cohérence avec une structure de manteau dégradée.

Nous constatons que le temps de vie long est plus élevé pour les spores PS4150 que pour les spores PS533 : cette différence pourrait s'expliquer par l'absence de membrane externe dans le cas des spores PS4150 (S. Ghosh et al., 2008; Knudsen et al., 2016). Cette membrane externe étant beaucoup moins contrainte que la membrane interne, sa viscosité attendue est moindre. Elle impacte donc le temps de vie des membranes des spores de PS533 en le réduisant.

Les temps de vie de fluorescence diffèrent cependant en partie entre les deux études pour les spores de la souche sauvage et de la souche mutante. Le Bodipy-C10 et le Bodipy-C12 possédant des propriétés photophysiques identiques et ne différant que par la longueur de leur chaîne carbonée (Kuimova et al., 2008; Polita et al., 2020), le changement de molécule n'est probablement pas en cause. Plusieurs réalignements du système FLIM entre les deux études ainsi que le choix d'une analyse sur un champ plus large (plusieurs spores par image) pourraient plus vraisemblablement expliquer cette différence. Cela souligne l'intérêt de faire une calibration viscosité/durée de vie sur le système utilisé, avec la méthode d'analyse employée pour la présente étude, plutôt que d'utiliser des valeurs de la littérature, établies sur un système différent, avec une analyse différente.

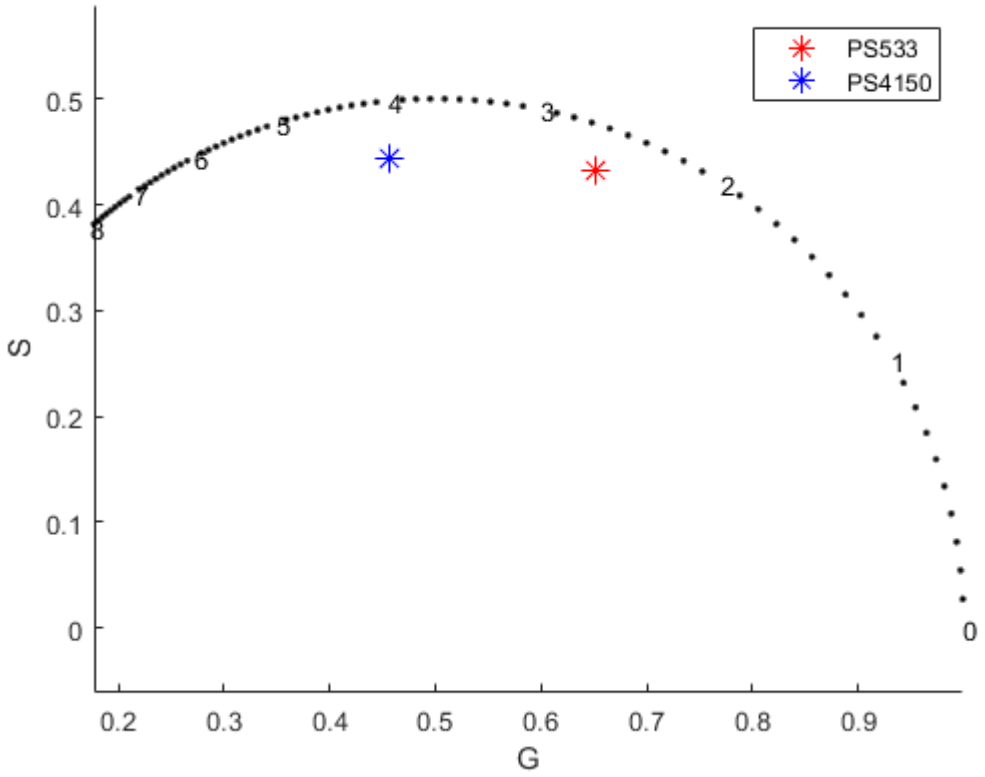


Figure 46 *: Distribution graphique en Phasor plot de la fluorescence du Bodipy-C10 dans les spores de la souche sauvage (PS533) et du mutant dépourvu des protéines du manteau (PS4150) de B. subtilis*. Seuls sont figurés les barycentres des différents points des spores analysées.

Tableau 7 *: Temps de vie de fluorescence du Bodipy-C10, dans les spores de la souche sauvage (PS533) et du mutant dépourvu de protéines du manteau (PS4150) de B. subtilis, déterminés par analyse FLIMfit. β_1 et β_2 correspondent aux contributions des deux temps de vie (intensités fractionnelles).*

	PS533 Wild-type pUB110 Km^r	**PS4150** ΔgerE::spc ΔcotE::tet
τ_1 (ns)	5,35 ± 0,29	5,72 ± 0,29
β_1 (%)	27 ± 4	48 ± 6
τ_2 (ns)	1,65 ± 0,24	2,04 ± 0,12
β_2 (%)	73 ± 4	52 ± 4
χ^2	1,15	0,82

4.4. Evolution des temps de vie de fluorescence du Bodipy-C10 dans les spores avant et après traitements en pression et température

Nous avons ensuite étudié l'évolution des temps de vie de fluorescence du Bodipy-C10 dans les spores de la souche sauvage PS533 et du mutant PS4150, suite à des perturbations physiques (température, pression), décrits dans le chapitre précédent. Les spores de la souche PS533 et du mutant PS4150 marquées au Bodipy-C10 sont soumises à des traitements thermiques et sous pression, avant de procéder à l'acquisition de fluorescence du rotor moléculaire. Pour chaque traitement testé, plusieurs acquisitions de fluorescence sont réalisées. Ces mesures sont ensuite traitées en Phasor Plot uniquement, l'ajustement mathématique à deux exponentielles (FLIMfit) ne donnant pas de résultats interprétables.

Le logiciel MAPI a été utilisé pour déterminer la projection Phasor des temps de vie des spores PS533 ou PS4150 soumises aux différents traitements (**Figure 47, A et B** respectivement). Pour rappel, les points représentés à l'intérieur du demi-cercle indiquent la présence simultanée sur une même localisation (pixel) de plusieurs temps de vie de fluorescence pouvant correspondre à plusieurs structures marquées par le Bodipy-C10 au sein des spores bactériennes.

4.4.1. Cas des spores PS533

Suite aux différents traitements, les temps de vie de fluorescence du Bodipy-C10 se déplacent dans la représentation Phasor par rapport à la condition contrôle (témoin), comme représentés sur la **Figure 47-A**.

Suite aux traitements HPHT (500 MPa, 70 °C), HPBT (500 MPa, 40 °C) et BPBT (300 MPa, 40 °C), nous observons que les temps de vie de fluorescence du Bodipy-C10 dans les spores traitées évoluent vers des temps de vie longs. Cette évolution sur l'axe des abscisses (g) du Phasor semble suggérer une réduction dans la contribution du signal provenant du manteau protéique (diminution de la proportion du signal du manteau), ou une augmentation globale du temps de vie. Cette augmentation, en lien direct avec l'augmentation de la viscosité de la membrane interne, est d'autant plus surprenante étant donné la compacité de cette dernière. L'augmentation apparente du temps de vie constatée pourrait donc provenir de la perte des protéines du manteau et/ou du délitement de la membrane externe qui sont tous les deux des phénomènes liés à la germination.

Pour le traitement thermique TT (15 minutes, 121 °C), les temps de vie de fluorescence du Bodipy-C10 dans les spores traitées évoluent au contraire vers le temps de vie court, attribué au manteau protéique, indiquant un possible effet de relocalisation du Bodipy-C10 vers un manteau toujours présent, mais ayant probablement été modifié par dénaturation des protéines lors du traitement thermique.

4.4.2. Cas des spores du mutant PS4150

Les acquisitions de fluorescence du Bodipy-C10 dans les spores de *B. subtilis* PS4150 avant et après traitements physiques et thermiques sont également analysées par projection Phasor Plot (**Figure 47-B**). Les résultats se différencient de ceux observés précédemment pour la souche PS533. Une différence majeure est l'apparition de groupements de temps de vie de fluorescence distincts pour une même condition de traitement, semblant caractériser une hétérogénéité de réponses parmi les spores (traitement HPHP – 3 populations de spores différentes et TT – 2 populations de spores différentes), comme illustré dans la **Figure 48**. En comparaison, la représentation Phasor indiquait une réponse homogène des spores PS533 (un seul point localisé par condition). Il est possible que la présence du manteau sur les spores PS533, avec son propre temps de vie qui constitue 75 % du signal, masque ces différences.

Pour les spores du mutant PS4150, toutes les conditions traitées voient les temps de vie de fluorescence se déplacer vers la droite par rapport au témoin non traité, indiquant des temps de vie de fluorescence inférieurs à ceux de la population de la condition témoin (évolution sur l'axe des abscisses (g)). Contrairement aux spores PS533, les spores PS4150 possèdent un manteau protéique très réduit et probablement une membrane externe quasi-inexistante (S. Ghosh et al., 2008; Knudsen et al., 2016). En absence des signaux de ces structures, la membrane interne semble être le contributeur principal du signal et son déplacement vers des temps de vie courts indique une fluidification probable de cette membrane.

Que ce soit pour les spores de la souche PS533 ou pour les spores du mutant PS4150, les temps de vie de fluorescence du Bodipy-C10 après traitement HP semblent converger vers un point identique, pouvant correspondre au temps de vie de fluorescence de spores germées par HP. Pour le confirmer, il serait intéressant de comparer ces temps de vie avec ceux de spores germées par des inducteurs de germination classiques (L-alanine et CaDPA pour obtenir des spores germées en phase 2).

Suite au traitement thermique TT (15 minutes à 121 °C) des spores PS4150, deux populations sont observées. L'une est similaire à la sous-population de spores ayant démarré la germination des conditions HPBT et BPBT, l'autre déplacée vers les temps de vie courts. Nous supposons que cette population reflète les spores inactivées. Comme dans le cas des spores PS533, nous proposons que le déplacement vers les temps de vie courts est dû à un effet de dénaturation des protéines lors du traitement thermique. La nature initialement dégradée du manteau de la souche mutante PS4150, pourrait expliquer que l'effet est plus réduit que pour les spores PS533.

Pour le traitement HPHT (500 MPa, 70 °C), trois populations de spores se distinguent. Parmi ces trois populations, une population possède des temps de vie de fluorescence proches de la condition témoin, et il est possible qu'il s'agisse de spores dormantes, peu atteintes par le traitement (la durée du traitement étant courte < 5 minutes). Une seconde population est commune avec les conditions HPBT et BPBT : il peut s'agir de spores ayant germé. Enfin, une troisième population s'approche de la condition traitement thermique, avec un déplacement vers le temps de vie le plus faible, et ces spores sont supposées inactivées.

Ainsi, l'analyse des déclins de fluorescence du Bodipy-C10 dans les spores bactériennes par la méthode Phasor permet de distinguer ici différentes populations de spores suite aux traitements physiques et thermiques. Nous supposons qu'il s'agit des différents stades physiologiques dans lesquels se trouvent les spores après ces traitements : spores dormantes, spores germées et spores inactivées.

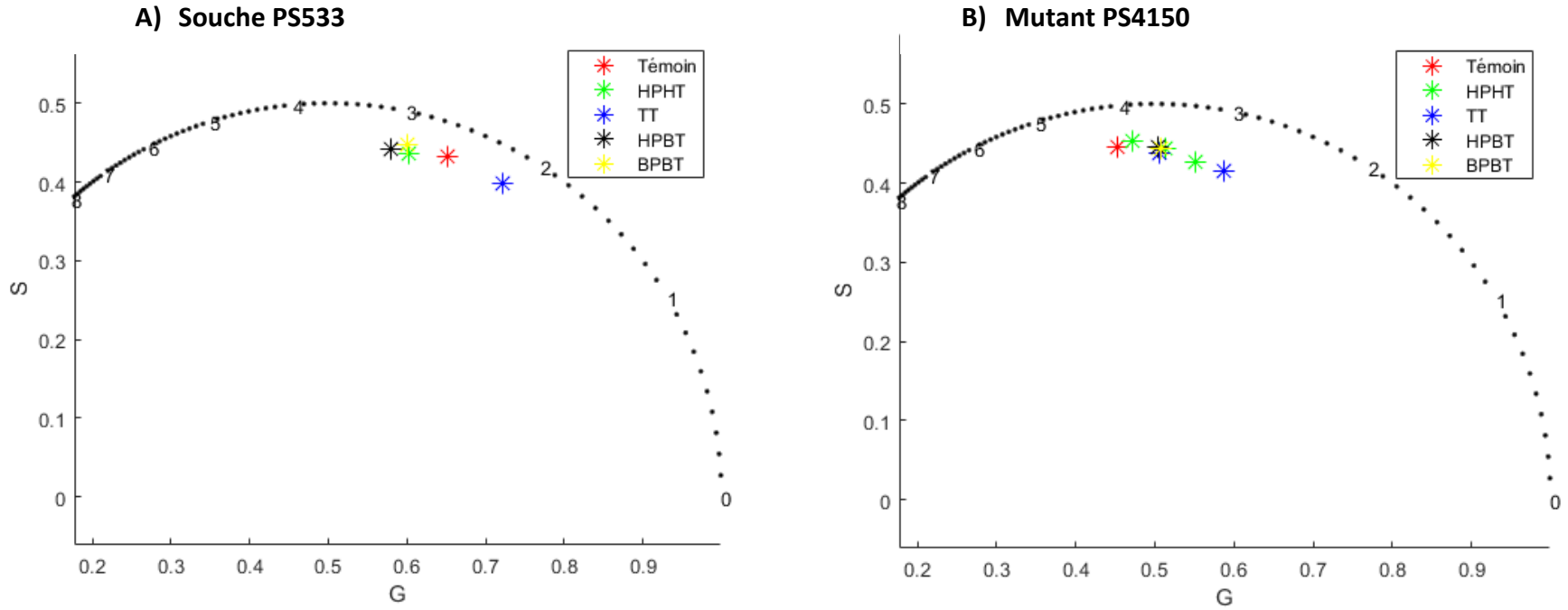


Figure 47 *: Distribution graphique Phasor de la fluorescence du Bodipy-C10 dans les spores de la souche PS533* ***(A)*** *et dans les spores du mutants PS4150* ***(B)*** *avant (témoin) et après traitement physique ou thermique. Traitement* ***TT*** *: 15 minutes à 121 °C ; Traitement* ***HPHT*** *: 500 MPa, 70 °C ; Traitement* ***HPBT*** *: 300 MPa, 40 °C ; Traitement* ***BPBT*** *: 300 MPa, 40 °C. Les traitements HPHT, HPBT et BPBT permettent une destruction d'un log de la population initiale.*

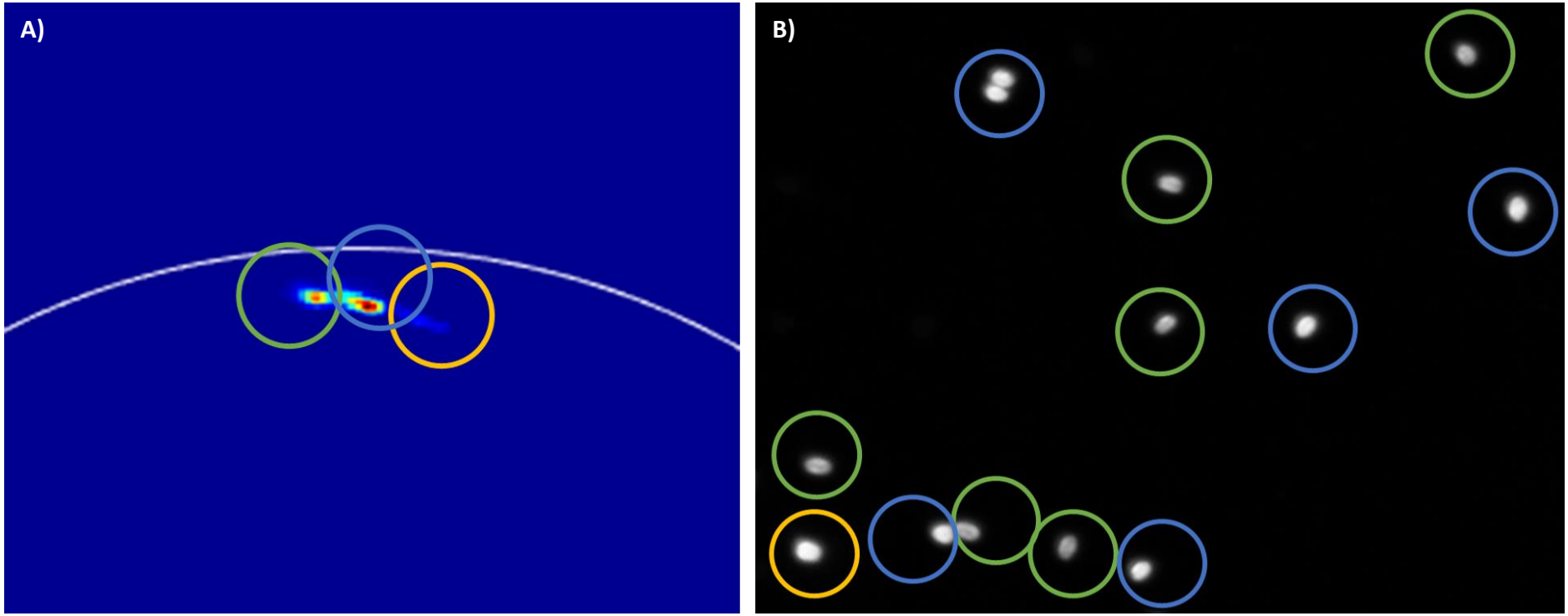


Figure 48 *: Distribution graphique des temps de vie de fluorescence du Bodipy-C10 dans les spores PS4150 traitées HPHT (**A**). Dans cet exemple d'acquisition, la projection Phasor met en évidence trois populations de spores (vert, bleu, orange). A droite, l'indication de l'appartenance de chaque spore à une population dans l'image en intensité de fluorescence (**B**).*

5. Discussion

La spore bactérienne est caractérisée par une faible perméabilité, notamment de par la présence de la membrane interne qui possède une faible perméabilité aux molécules de petite taille. Si la composition lipidique de la membrane interne est semblable à celle de la membrane plasmique d'une cellule végétative (Leggett et al., 2012), sa structure exacte et les propriétés lui conférant cette faible perméabilité ne sont pas encore totalement comprises. La molécule CaDPA du noyau ainsi que le manteau protéique semblent également jouer un rôle important dans la perméabilité de la membrane interne (Kanaan et al., 2022). La présence du cortex, structure de forte résistance mécanique, contribue à la stabilisation de la membrane interne dans un état compressé (Cowan et al., 2004). La viscosité de cette membrane a été reportée comme deux fois plus importante que celle d'une cellule végétative (Loison, 2013). Le processus de germination entraîne une diminution de la viscosité de la membrane interne pour retrouver la fluidité d'une membrane classique.

Cette étude avait pour objectif de suivre la viscosité membranaire des spores bactériennes soumises à différents traitements physiques et thermiques. Les traitements étudiés entraînent une modification de la membrane interne puisque nous observions une augmentation de sa perméabilité (sortie du DPA et pénétration du marqueur IP), d'après les résultats du chapitre précédent.

L'approche analytique par la projection Phasor, approche permettant de s'affranchir de l'ajustement exponentiel du déclin de fluorescence, met en évidence une évolution différente des temps de vie de fluorescence entre les traitements sous pression et les traitements thermiques (**Figure 47**). Cela laisse penser à des phénomènes cellulaires différents selon le traitement appliqué (pression ou thermique). Cependant, nous observons peu de différences entre les traitements sous pression (BPBT, HPBT, HPHT), autre que le phénomène implique la germination. En effet, nous avions observé précédemment (**Chapitre 2**) la germination des spores suite aux traitements BPBT, HPBT et HPHT. Ici, les temps de vie de fluorescence du Bodipy-C10 dans les spores traitées (PS533 et PS4150) sont localisés au même endroit sur la projection Phasor. Une particularité se dégage du traitement HPHT pour les spores PS4150, traitement court, où nous observons un temps de vie proche de la condition témoin, probablement du fait que toutes les spores ne sont pas encore induites en germination. De

même, un effet thermique est observé pour ce traitement avec un temps de vie de fluorescence caractéristique d'un état physiologique de spores proche de celles traitées thermiquement (15 minutes à 121 °C).

6. Conclusion du chapitre 3

Les expérimentations portant sur la calibration entre le temps de vie de fluorescence du Bodipy-C10 en fonction de la viscosité de son environnement ont permis de vérifier 1) l'utilisation de l'équipement confocal avec le système FLIM, 2) le déclin de fluorescence monoexponentiel du Bodipy-C10 dans un environnement homogène, 3) les méthodes d'analyse des temps de vie de fluorescence (FLIMfit et MAPI). Nous constatons une augmentation du temps de vie de fluorescence du Bodipy-C10 lorsque la concentration en glycérol augmente, confirmant l'évolution du temps de vie de fluorescence en fonction de la viscosité du milieu. Cette calibration a permis l'obtention de l'expression permettant de convertir le temps de vie de fluorescence du Bodipy-C10 en une mesure de la viscosité de son environnement, propre à nos conditions expérimentales.

Nos résultats analytiques montrent un marquage par le Bodipy-C10 de plusieurs structures hydrophobes au sein des spores, à la fois de la souche sauvage (PS533), mais également du mutant présentant peu de manteau protéique (PS4150). Nous avons attribué le temps de vie long aux membranes et le temps de vie court au manteau protéique de la spore. La quasi-disparition du manteau protéique sur les spores PS4150 nous a permis de mettre en évidence une augmentation des temps de vie de fluorescence, la membrane interne ayant une plus forte incidence sur le signal moyen dans cette forme. Suite aux traitements HP sur les spores PS4150, la baisse des temps de vie témoignent d'une fluidification de la membrane au cours et après les traitements sous pression.

Nos expérimentations avec le Bodipy-C10 montrent qu'il est possible de voir des variations de temps de vie différentes suite à un traitement HP ou à un traitement thermique des spores.

CONCLUSION GENERALE

Parmi les techniques émergentes de préservation des aliments, le procédé de stabilisation par HP hydrostatiques présente un fort potentiel d'utilisation par les industries agro-alimentaires. Appliqué à froid, ce procédé HP offre l'avantage de respecter les propriétés organoleptiques et nutritionnelles des produits traités puis conservés à froid, tout en entrainant une inactivation significative des flores végétatives pathogènes et d'altération. L'élargissement de l'application de ce procédé à d'autres produits alimentaires repose sur l'efficacité du traitement HP sur les bactéries sous forme sporulée.

Le projet sHPore, financé par l'Institut Carnot Qualiment et dans lequel s'inscrit cette thèse, avait pour objectif ambitieux de proposer des traitements HP utilisables industriellement et permettant une maîtrise des spores bactériennes. Pour y parvenir, les travaux de cette thèse avaient pour objectif de comprendre les mécanismes clés à l'origine de l'inactivation des spores bactériennes, en exploitant les propriétés intrinsèques mais également des marqueurs externes de suivi des spores. Les spores de *Bacillus subtilis* ont été utilisées comme modèle d'étude.

L'inactivation de la spore bactérienne par la pression débute inéluctablement par l'induction de sa germination (Reineke, Mathys, et al., 2013). Une fois germée, la spore bactérienne devient sensible à la température (dès le stade 1), à la pression (à partir du stade 2), mais également à la présence d'agents antimicrobiens (Luu & Setlow, 2014; P. Setlow, 2003). Le traitement HP cyclique consiste en un enchaînement de cycles de pression (composé d'une compression, d'un temps de maintien et d'une décompression) pour induire la germination de la spore dans un premier temps, avant de procéder à son inactivation au cours des cycles suivants. Dans le cadre de ces travaux de thèse, nous nous sommes intéressés à l'efficacité et aux mécanismes sporicides du procédé HP cyclique, en comparaison avec le procédé HP continu. Quelle que soit la modalité étudiée, nous avons constaté une inactivation maximale de 2 log de spores à 350 MPa. La modalité cyclique, avec un retour à pression atmosphérique entre les compressions, ne contribue pas à une accélération de la germination des spores par (1) une transition des spores germées du stade 1 vers le stade 2 ni par (2) une induction de nouvelles spores en germination au cours des cycles suivants. Ces observations sont confirmées par une étude similaire, pour un traitement HP cyclique à 150 MPa, 40 °C (Delbrück, 2022). Aux barèmes de pression et de température étudiés, ces travaux de thèse mettent en évidence l'importance du temps cumulé d'exposition à la pression plutôt qu'à

l'effet cyclique du traitement HP. L'étude approfondie de l'effet de chaque paramètre du traitement HP cyclique a permis d'alimenter une base de données pour le développement d'un modèle mathématique pour le suivi de la cinétique de germination et d'inactivation des spores par la pression. Ce modèle confirme nos hypothèses suivantes sur les mécanismes d'inactivation par la pression cyclique. Les spores induites en stade 1 de germination (90 % de la population) au cours du premier cycle de pression évoluent en stade 2 lors des deux premiers intercycles. L'activité des enzymes CLE pour la transformation du stade 1 vers le stade 2 semble donc inhibée pendant la compression pour la pression étudiée (350 MPa). L'échauffement adiabatique au cours du traitement cyclique avec des vitesses de compression et de décompression rapides contribue à l'amélioration de l'inactivation des spores, probablement par une inactivation directe des spores induites en phase 1 de germination.

Pour améliorer l'efficacité du traitement HP cyclique, il est possible d'envisager une augmentation de la durée entre les cycles et/ou une augmentation de la température pour une amélioration de la germination et de l'inactivation des spores. Des résultats publiés récemment vont dans ce sens avec une efficacité du traitement HP cyclique (5,8 log) par rapport au traitement HP continu (4,6 log) lorsque celui-ci est réalisé à 60 °C au lieu de 40 °C (Mok et al., 2022). Cependant, une variation de ces paramètres (durée, température) entraîne une augmentation inévitable des coûts d'énergie et de maintenance des équipements HP.

Dans le cadre de nos expérimentations HP (P < 600 MPa et T < 80 °C), la voie majoritaire d'inactivation des spores par HP reste l'induction en germination. Cependant, toutes les spores ne sont pas induites en germination par la pression pour atteindre une destruction totale de la population. C'est notamment le cas des spores superdormantes HPSD qui sont réfractaires à l'induction de la germination par la pression. Nos résultats de dénombrements après traitements HP montrent que ces spores HPSD représentent une proportion inférieure à 1 % de la population totale. De récents travaux se sont intéressés à l'isolement et à la caractérisation des spores HPSD (Delbrück, 2022). Les spores HPSD isolées ne diffèrent pas des spores dormantes en termes de teneur en eau ou en CaDPA, réfutant ainsi l'hypothèse d'une diminution de la teneur en eau ou d'une augmentation de la teneur en DPA pour expliquer leur résistance. De même, aucune différence structurelle n'est observée entre les spores HPSD et les spores dormantes, que ce soit au niveau de la taille générale des spores ou de l'épaisseur de leur cortex. Des analyses protéomiques ont mis en évidence le rôle de

certaines protéines dans l'induction de la germination par les traitements HP, notamment la protéine YhcN dont l'absence réduit considérablement le taux de germination. Si de faibles niveaux de récepteurs GR peuvent favoriser la présence de spores HPSD (Doona et al., 2014), ces protéines nouvellement identifiées comme influençant la germination par la pression pourraient également contribuer à la superdormance des spores vis-à-vis d'un traitement HP. Cependant, une faible expression de récepteurs GR (et potentiellement des autres protéines nouvellement identifiées comme impliquées) ne peut expliquer à elle seule le phénomène de superdormance aux HP. En effet, les spores HPSD sont induites en germination lorsqu'elles sont soumises à un deuxième traitement HP (de même barème que le premier traitement HP qui a permis de les isoler) (Delbrück, Zhang, Hug, et al., 2021). Ainsi, il semblerait qu'il n'y ait pas une cause permanente à l'origine de la superdormance : de nombreux facteurs semblent être impliqués. Pour limiter la présence de ces spores, il serait intéressant d'envisager la réalisation d'un pré-traitement thermique en amont du traitement HP de façon à induire l'étape d'activation et à améliorer le taux de germination. Des expérimentations préliminaires réalisées dans le cadre de cette thèse ont montré l'efficacité de cette stratégie mais elles nécessitent d'être approfondies. En effet, la réalisation d'un traitement thermique en amont du traitement HP (300 ou 500 MPa) entraîne une augmentation du taux d'inactivation des spores de *B. subtilis* (**Annexe 2**). La littérature suggère une modification réversible des récepteurs GR à l'origine de l'étape d'activation, favorisant la germination (Luu et al., 2015). Une étude récemment réalisée au laboratoire a montré que l'état physiologique de spores « activées », précisément leur configuration protéique, est semblable à celui de spores germées (Modugno et al., 2020).

Dans la deuxième étude de ces travaux, un suivi de l'état physiologique des spores traitées en pression et/ou température a été réalisé. Différents barèmes de pression (300 et 500 MPa) et de température (40 et 70 °C) ont été étudiés avec une caractéristique commune : les traitements réalisés entraînent une inactivation d'un log de la population initiale. Il ressort de cette étude que les barèmes de pression testés entraînent la germination de la quasi-totalité des spores traitées. De ce fait, le traitement par la pression hydrostatique n'entraine pas une inactivation des récepteurs GR et des canaux SpoVA qui pourrait expliquer l'inactivation des spores.

Cependant, des différences sont observées entre les deux barèmes réalisés. Les spores germées en basses pressions (300 MPa) atteignent le stade 2 de germination avant leur inactivation. *A contrario*, les spores traitées en hautes pressions (500 MPa) sont germées en stade 1. Le traitement HP, là encore, semble limiter le passage en stade 2, du fait d'une inhibition partielle des enzymes CLE. En effet, la lyse du cortex est observée pour ces spores au retour à pression atmosphérique ou en présence d'inducteurs de la germination post-traitement HP. Nos résultats confirment donc la réversibilité de l'inhibition des enzymes CLE. Par conséquent, les traitements HP n'entrainent pas un blocage irréversible des enzymes CLE à l'origine de l'inactivation des spores.

Un changement de perméabilité membranaire (marquage IP) est observé aussi bien chez les spores germées puis inactivées pendant le traitement HP que chez les spores germées partiellement puis placées dans des conditions de germination post-traitement HP. Ce constat laisse penser que l'inactivation des spores par la pression est liée à la perte de l'intégrité membranaire.

L'utilisation de l'imagerie en temps de vie de fluorescence sur des spores marquées au Bodipy-C10 est une approche permettant de suivre la viscosité de leurs structures hydrophobes. A l'aide de cette méthode, nous avons suivi la variation des temps de vie de fluorescence dans les spores avant et après traitements HP. Les résultats de cette étude montrent une baisse des temps de vie de fluorescence du Bodipy-C10 dans les spores traitées. Cette baisse des temps de vie reflète une baisse de la viscosité membranaire suite aux traitements par la pression. Il serait intéressant de suivre la viscosité membranaire de spores en germination (phases 1 et 2) afin de comparer la variation de viscosité observée ici et d'attribuer cette variation à un phénomène de germination ou à un effet de la pression. Cependant, la manière dont la pression provoquerait ce changement de fluidité membranaire n'est pas élucidée et nécessite d'être étudiée davantage. L'hypothèse avancée ici est l'inactivation par la pression de la protéine responsable de l'intégration des vésicules pour l'expansion membranaire. Cela pourrait également provenir d'une rupture des couches externes (manteau et membrane externe) par la pression, qui a pour conséquence un changement de perméabilité de la membrane interne (Sale et al., 1970).

Ainsi, bien qu'elle joue un rôle fondamental pour la germination et la résistance des spores, la membrane interne demeure mystérieuse pour la communauté scientifique travaillant sur les spores bactériennes. Il serait intéressant de mettre en place un marquage protéique de la membrane interne avec une sonde fluorescente (GFP, MeOS) et d'exploiter la technique de microscopie super-résolution pour suivre les changements structuraux au cours d'un traitement par la pression. L'utilisation de cette technique a récemment permis la visualisation de la membrane interne et des germinosomes (Breedijk et al., 2020; Wen et al., 2019). L'installation d'une cellule HP à enclumes de diamant reliée à l'équipement microscopique favoriserait l'observation des changements membranaires en temps réel au cours du traitement HP.

Finalement, ces travaux de thèse confirment l'induction de la germination des spores avant leur inactivation, comme décrit dans la littérature. A l'inverse, l'inactivation des spores par le traitement thermique se déroule sans induction de germination au préalable. Une amélioration de l'inactivation des spores par la pression implique donc une induction efficace de la germination. Précédemment, nous avons proposé la réalisation d'un pré-traitement thermique pour favoriser l'induction de la germination au cours du traitement HP. D'autres traitements peuvent être proposés en combinaison avec le traitement HP, pouvant optimiser le procédé HP. L'utilisation de fragments de peptidoglycane combinée au traitement HP à température modérée augmente de manière synergique la germination des spores, y compris des spores superdormantes, et ainsi leur inactivation (D. Liang et al., 2021).

Germination et inactivation des spores par la pression semblent donc conjointement liées à la membrane interne. Plusieurs questions reposant sur la membrane interne restent à élucider :

- Quel est le rôle de la membrane interne dans l'étape d'activation des spores, en amont de la germination ? Existe-t-il un lien entre le phénomène de superdormance des spores HPSD et cette étape d'activation par les hautes pressions ?
- Comment la pression affecte les récepteurs GR et les canaux SpoVA localisés au niveau de la membrane interne pour une induction de la germination des spores par les basses et hautes pressions ?
- Comment la pression affecte la perméabilité de la membrane interne pour une inhibition du développement des spores au retour à pression atmosphérique ?

- La composition protéique et les mécanismes moléculaires de la membrane interne des spores HPSD diffèrent-ils de ceux des spores dormantes ?

Des éléments de réponse à ces interrogations permettront une compréhension plus large des mécanismes d'inactivation des spores par la pression, en se basant sur *B. subtilis* comme modèle d'étude. Cependant, il sera nécessaire d'élargir ces recherches aux autres espèces, notamment aux *Clostridies*, dont les mécanismes de germination sont différents.

REFERENCES

Abhyankar, W., de Koning, L. J., Brul, S., & de Koster, C. G. (2014). Spore proteomics: The past, present and the future. *FEMS Microbiology Letters*, *358*(2), 137-144. https://doi.org/10.1111/1574-6968.12568

Ablett, S., Darke, A. H., Lillford, P. J., & Martin, D. R. (1999). Glass formation and dormancy in bacterial spores. *International Journal of Food Science & Technology*, *34*(1), 59-69. https://doi.org/10.1046/j.1365-2621.1999.00240.x

Ahn, J., Balasubramaniam, V. M., & Yousef, A. E. (2007). Inactivation kinetics of selected aerobic and anaerobic bacterial spores by pressure-assisted thermal processing. *International Journal of Food Microbiology*, *113*(3), 321-329. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.08.012

Al-Hinai, M. A., Jones, S. W., & Papoutsakis, E. T. (2015). The Clostridium Sporulation Programs: Diversity and Preservation of Endospore Differentiation. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *79*(1), 19-37. https://doi.org/10.1128/mmbr.00025-14

Alimova, A., Katz, A., Gottlieb, P., & Alfano, R. R. (2006). Proteins and dipicolinic acid released during heat shock activation of Bacillus subtilis spores probed by optical spectroscopy. *Applied Optics*, *45*(3), 445-450. https://doi.org/10.1364/AO.45.000445

Amador Espejo, G. G., Hernández-Herrero, M. M., Juan, B., & Trujillo, A. J. (2014). Inactivation of Bacillus spores inoculated in milk by Ultra High Pressure Homogenization. *Food Microbiology*, *44*, 204-210. https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.06.010

André, S., Vallaeys, T., & Planchon, S. (2017). Spore-forming bacteria responsible for food spoilage. *Research in Microbiology*, *168*(4), 379-387. https://doi.org/10.1016/j.resmic.2016.10.003

Bagyan, I., Noback, M., Bron, S., Paidhungat, M., & Peter Setlow. (1998). Characterization of yhcN, a new forespore-specific gene of Bacillus subtilis. *Gene*, *212*(2), 179-188. https://doi.org/10.1016/S0378-1119(98)00172-3

Bagyan, I., & Setlow, P. (2002). Localization of the cortex lytic enzyme CwlJ in spores of Bacillus subtilis. *Journal of Bacteriology*, *184*(4), 1219-1224. https://doi.org/10.1128/jb.184.4.1219-1224.2002

Black, E. P., Koziol-Dube, K., Guan, D., Wei, J., Setlow, B., Cortezzo, D. E., Hoover, D. G., & Setlow, P. (2005). Factors Influencing Germination of Bacillus subtilis Spores via Activation of Nutrient Receptors by High Pressure. *Applied and Environmental Microbiology*, *71*(10), 5879-5887. https://doi.org/10.1128/AEM.71.10.5879-5887.2005

Black, E. P., Linton, M., McCall, R. D., Curran, W., Fitzgerald, G. F., Kelly, A. L., & Patterson, M. F. (2008). The combined effects of high pressure and nisin on germination and inactivation of Bacillus spores in milk. *Journal of Applied Microbiology*, *105*(1), 78-87. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03722.x

Black, E. P., Setlow, P., Hocking, A. D., Stewart, C. M., Kelly, A. L., & Hoover, D. G. (2007). Response of Spores to High-Pressure Processing. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *6*(4), 103-119. https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2007.00021.x

Black, E. P., Wei, J., Atluri, S., Cortezzo, D. E., Koziol-Dube, K., Hoover, D. G., & Setlow, P. (2007). Analysis of factors influencing the rate of germination of spores of Bacillus subtilis by very high pressure. *Journal of Applied Microbiology*, *102*(1), 65-76. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.03062.x

Boone, T., & Driks, A. (2016). Protein synthesis during germination: Shedding new light on a classical question. *Journal of Bacteriology*, *198*(24), 3251-3253. https://doi.org/10.1128/JB.00721-16

Breedijk, R. M. P., Wen, J., Krishnaswami, V., Bernas, T., Manders, E. M. M., Setlow, P., Vischer, N. O. E., & Brul, S. (2020). A live-cell super-resolution technique demonstrated by imaging germinosomes in wild-type bacterial spores. *Scientific Reports*, *10*(1), 1-12. https://doi.org/10.1038/s41598-020-62377-1

Bressuire-Isoard, C., Broussolle, V., & Carlin, F. (2018). Sporulation environment influences spore properties in Bacillus: Evidence and insights on underlying molecular and physiological mechanisms. *FEMS Microbiology Reviews*, *42*(5), 614-626. https://doi.org/10.1093/femsre/fuy021

Bruins, M. E., Matser, A. M., Janssen, A. E. M., & Boom, R. M. (2007). Buffer selection for HP treatment of biomaterials and its consequences for enzyme inactivation studies. *High Pressure Research*, *27*(1), 101-107. https://doi.org/10.1080/08957950601082573

Butzin, X. Y., Troiano, A. J., Coleman, W. H., Griffiths, K. K., Doona, C. J., Feeherry, F. E., Wang, G., Li, Y. Q., & Setlow, P. (2012). Analysis of the effects of a gerP mutation on the germination of spores of Bacillus subtilis. *Journal of Bacteriology*, *194*(21), 5749-5758. https://doi.org/10.1128/JB.01276-12

Cabrera-Martinez, R. M., Tovar-Rojo, F., Ramana Vepachedu, V., & Setlow, P. (2003). Effects of overexpression of nutrient receptors on germination of spores of Bacillus subtilis. *Journal of Bacteriology*, *185*(8), 2457-2464. https://doi.org/10.1128/JB.185.8.2457-2464.2003

Capellas, M., Mor-Mur, M., Gervilla, R., Yuste, J., & Guamis, B. (2000). Effect of high pressure combined with mild heat or nisin on inoculated bacteria and mesophiles of goat's milk fresh cheese. *Food Microbiology*, *17*(6), 633-641. https://doi.org/10.1006/fmic.2000.0359

Chapleau, N., Ritz, M., Delépine, S., Jugiau, F., Federighi, M., & de Lamballerie, M. (2006). Influence of kinetic parameters of high pressure processing on bacterial inactivation in a buffer system. *International Journal of Food Microbiology*, *106*(3), 324-330. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.09.009

Chen, D., Huang, S. S., & 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), 6936-6941. https://doi.org/10.1021/ac061090e

Chirakkal, H., O'Rourke, M., Atrih, A., Foster, S. J., & Moir, A. (2002). Analysis of spore cortex lytic enzymes and related proteins in Bacillus subtilis endospore germination. *Microbiology*, *148*(8), 2383-2392. https://doi.org/10.1099/00221287-148-8-2383

Christie, G., & Setlow, P. (2020). Bacillus spore germination: Knowns, unknowns and what we need to learn. *Cellular Signalling*, *74*. https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2020.109729

Colas de la Noue, A., Espinasse, V., Perrier-Cornet, J.-M., & Gervais, P. (2012). High gas pressure: An innovative method for the inactivation of dried bacterial spores. *Biotechnology and Bioengineering*, *109*(8), 1996-2004. https://doi.org/10.1002/bit.24465

Colyer, R. A., Lee, C., & Gratton, E. (2008). A novel fluorescence lifetime imaging system that optimizes photon efficiency. *Microscopy Research and Technique*, *71*(3), 201-213. https://doi.org/10.1002/jemt.20540

Cortezzo, D. E., Koziol-Dube, K., Setlow, B., & Setlow, P. (2004). Treatment with oxidizing agents damages the inner membrane of spores of Bacillus subtilis and sensitizes spores to subsequent stress. *Journal of Applied Microbiology*, *97*(4), 838-852. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02370.x

Cortezzo, D. E., & Setlow, P. (2005). Analysis of factors that influence the sensitivity of spores of Bacillus subtilis to DNA damaging chemicals. *Journal of Applied Microbiology*, *98*(3), 606-617. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02495.x

Corthouts, J., & Michiels, C. W. (2016). Inhibition of nutrient- and high pressure-induced germination of Bacillus cereus spores by plant essential oils. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, *34*, 250-258. https://doi.org/10.1016/j.ifset.2016.02.011

Cowan, A. E., Koppel, D. E., Setlow, B., & Setlow, P. (2003). A soluble protein is immobile in dormant spores of Bacillus subtilis but is mobile in germinated spores: Implications for spore dormancy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *100*(7), 4209-4214. https://doi.org/10.1073/pnas.0636762100

Cowan, A. E., Olivastro, E. M., Koppel, D. E., Loshon, C. A., Setlow, B., & Setlow, P. (2004). Lipids in the inner membrane of dormant spores of Bacillus species are largely immobile. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101*(20), 7733-7738. https://doi.org/10.1073/pnas.0306859101

Delbrück, A. I. (2022). *Moderate high pressure superdormancy – Properties of Bacillus subtilis superdormant spores and potential underlying mechanisms Moderate high pressure superdormancy – Properties of Bacillus subtilis superdormant spores and potential*.

Delbrück, A. I., Tritten, Y., Nanni, P., Heydenreich, R., & Mathys, A. (2022). Moderate High-Pressure Superdormancy in Bacillus Spores: Properties of Superdormant Spores and Proteins Potentially Influencing Moderate High-Pressure Germination. *Applied and Environmental Microbiology*, *88*(4). https://doi.org/10.1128/aem.02406-21

Delbrück, A. I., Zhang, Y., Heydenreich, R., & Mathys, A. (2021). Bacillus spore germination at moderate high pressure: A review on underlying mechanisms, influencing factors, and its comparison with nutrient germination. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *20*(4), 4159-4181. https://doi.org/10.1111/1541-4337.12789

Delbrück, A. I., Zhang, Y., Hug, V., Trunet, C., & Mathys, A. (2021). Isolation, stability, and characteristics of high-pressure superdormant Bacillus subtilis spores. *International Journal of Food Microbiology*, *343*. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109088

Delves-Broughton, J., Blackburn, P., Evans, R. J., & Hugenholtz, J. (1996). Applications of the bacteriocin, nisin. *Antonie van Leeuwenhoek*, *69*(2), 193-202. https://doi.org/10.1007/BF00399424

Demazeau, G., Plumecocq, A., Lehours, P., Martin, P., Couëdelo, L., & Billeaud, C. (2018). A New High Hydrostatic Pressure Process to Assure the Microbial Safety of Human Milk While Preserving the Biological Activity of Its Main Components. *Frontiers in Public Health*, *6*, 1-8. https://doi.org/10.3389/fpubh.2018.00306

Donsì, G., Ferrari, G., & Maresca, P. (2007). Pulsed high pressure treatment for the inactivation of Saccharomyces cerevisiae: The effect of process parameters. *Journal of Food Engineering*, *78*(3), 984-990. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2005.12.042

Doona, C. J., Feeherry, F. E., Kustin, K., Chen, H., Huang, R., Philip Ye, X., & Setlow, P. (2017). A Quasi-chemical Model for Bacterial Spore Germination Kinetics by High Pressure. *Food Engineering Reviews*, *9*(3), 122-142. https://doi.org/10.1007/s12393-016-9155-1

Doona, C. J., Feeherry, F. E., Ross, E. W., & Kustin, K. (2016). Chemical Kinetics for the Microbial Safety of Foods Treated with High Pressure Processing or Hurdles. *Food Engineering Reviews*, *8*(3), 272-291. https://doi.org/10.1007/s12393-015-9138-7

Doona, C. J., Feeherry, F. E., Setlow, B., Wang, S., Li, W., Nichols, F. C., Talukdar, P. K., Sarker, M. R., Li, Y.-Q., Shen, A., & Setlow, P. (2016). Effects of High-Pressure Treatment on Spores of Clostridium Species. *Applied and Environmental Microbiology*, *82*(17), 5287-5297. https://doi.org/10.1128/AEM.01363-16

Doona, C. J., Ghosh, S., Feeherry, F. F., Ramirez-Peralta, A., Huang, Y., Chen, H., & Setlow, P. (2014). High pressure germination of Bacillus subtilis spores with alterations in levels and types of germination proteins. *Journal of applied microbiology*, *117*(3), 711-720. https://doi.org/10.1111/jam.12557

Douki, T., Setlow, B., & Setlow, P. (2005). Effects of the Binding of α/β-type Small, Acid-soluble Spore Proteins on the Photochemistry of DNA in Spores of Bacillus subtilis and In Vitro. *Photochemistry and Photobiology*, *81*, 163-169. https://doi.org/10.1562/2004-08-18-RA-278.1

Eijlander, R. T., Abee, T., & Kuipers, O. P. (2011). Bacterial spores in food: How phenotypic variability complicates prediction of spore properties and bacterial behavior. *Current Opinion in Biotechnology*, *22*(2), 180-186. https://doi.org/10.1016/j.copbio.2010.11.009

Furukawa, S., Nakahara, A., & Hayakawa, I. (2000). Effect of reciprocal pressurization on germination and killing of bacterial spores. *International Journal of Food Science and Technology*, *35*(5), 529-532. https://doi.org/10.1046/j.1365-2621.2000.00416.x

Furukawa, S., Shimoda, M., & Hayakawa, I. (2003). Mechanism of the inactivation of bacterial spores by reciprocal pressurization treatment. *Journal of Applied Microbiology*, *94*(5), 836-841. https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.01913.x

Garcia, D., van der Voort, M., & Abee, T. (2010). Comparative analysis of Bacillus weihenstephanensis KBAB4 spores obtained at different temperatures. *International Journal of Food Microbiology*, *140*(2-3), 146-153. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.04.005

Gauvry, E., Mathot, A. G., Leguérinel, I., Couvert, O., Postollec, F., Broussolle, V., & Coroller, L. (2017). Knowledge of the physiology of spore-forming bacteria can explain the origin of spores in the food environment. *Research in Microbiology*, *168*(4), 369-378. https://doi.org/10.1016/j.resmic.2016.10.006

Gayán, E., Torres, J. A., & Paredes-Sabja, D. (2012). Hurdle Approach to Increase the Microbial Inactivation by High Pressure Processing: Effect of Essential Oils. *Food Engineering Reviews*, *4*(3), 141-148. https://doi.org/10.1007/s12393-012-9055-y

Ghosh, A., Manton, J. D., Mustafa, A. R., Gupta, M., Ayuso-Garcia, A., Rees, E. J., & Christie, G. (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). https://doi.org/10.1128/AEM.00760-18

Ghosh, S. (2013). Understanding The Mechanism of Bacillus subtilis Spore Germination. In *Doctoral Dissertations*. http://digitalcommons.uconn.edu/dissertations/245

Ghosh, S., Setlow, B., Wahome, P. G., Cowan, A. E., Plomp, M., Malkin, A. J., & Setlow, P. (2008). Characterization of spores of Bacillus subtilis that lack most coat layers. *Journal of Bacteriology*, *190*(20), 6741-6748. https://doi.org/10.1128/JB.00896-08

Ghosh, S., & Setlow, P. (2009). Isolation and characterization of superdormant spores of bacillus species. *Journal of Bacteriology*, *191*(6), 1787-1797. https://doi.org/10.1128/JB.01668-08

Griffiths, K. K., & Setlow, P. (2009). Effects of modification of membrane lipid composition on Bacillus subtilis sporulation and spore properties. *Journal of Applied Microbiology*, *106*(6), 2064-2078. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04176.x

Griffiths, K. K., Zhang, J., Cowan, A. E., Yu, J., & Setlow, P. (2011). Germination proteins in the inner membrane of dormant Bacillus subtilis spores colocalize in a discrete cluster. *Molecular Microbiology*, *81*(4), 1061-1077. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07753.x

Haidekker, M. A., & Theodorakis, E. A. (2010). Environment-sensitive behavior of fluorescent molecular rotors. *Journal of Biological Engineering*, *4*, 1-14. https://doi.org/10.1186/1754-1611-4-11

Hayakawa, I., Furukawa, S., Midzunaga, A., Horiuchi, H., Nakashima, T., Fujio, Y., Yano, Y., Ishikura, T., & Sasaki, K. (1998). Mechanism of inactivation of heat-tolerant spores of Bacillus stearothermophilus IFO 12550 by Rapid Decompression. *Journal of Food Science*, *63*(3), 371-374. https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1998.tb15745.x

Hayakawa, I., Kanno, T., Yoshiyama, K., & Fujio, Y. (1994). Oscillatory Compared with Continuous High Pressure Sterilization on Bacillus stearothermophilus Spores. *Journal of Food Science*, *59*(1), 164-167. https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1994.tb06924.x

He, L., Chen, Z., Wang, S., Wu, M., Setlow, P., & Li, Y. (2018). Germination, Outgrowth, and Vegetative-Growth Kinetics of Dry-Heat-Treated Individual Spores of Bacillus Species. *Applied and Environmental Microbiology*, *84*(7), 1-14. https://doi.org/10.1128/AEM.02618-17

Heinz, V., & Knorr, D. (1996). High pressure inactivation kinetics of Bacillus subtilis cells by a three-state-model considering distributed resistance mechanisms. *Food Biotechnology*, *10*(2), 149-161. https://doi.org/10.1080/08905439609549908

Henriques, A. O., & Moran, J. C. P. (2007). Structure, Assembly, and Function of the Spore Surface Layers. *Annual Review of Microbiology*, *61*(1), 555-588. https://doi.org/10.1146/annurev.micro.61.080706.093224

Higgins, D., & Dworkin, J. (2012). Recent progress in Bacillus subtilis sporulation. *FEMS Microbiology Reviews*, *36*(1), 131-148. https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00310.x

Hindle, A. A., & Hall, E. A. H. (1999). Dipicolinic acid (DPA) assay revisited and appraised for spore detection. *Analyst*, *124*(11), 1599-1604. https://doi.org/10.1039/a906846e

Igura, N., Kamimura, Y., Islam, M. S., Shimoda, M., & Hayakawa, I. (2003). Effects of Minerals on Resistance of Bacillus subtilis Spores to Heat and Hydrostatic Pressure. *Applied and Environmental Microbiology*, *69*(10), 6307-6310. https://doi.org/10.1128/AEM.69.10.6307-6310.2003

Isticato, R., Lanzilli, M., Petrillo, C., Donadio, G., Baccigalupi, L., & Ricca, E. (2020). Bacillus subtilis builds structurally and functionally different spores in response to the temperature of growth. *Environmental Microbiology*, *22*(1), 170-182. https://doi.org/10.1111/1462-2920.14835

Kanaan, J., Murray, J., Higgins, R., Nana, M., DeMarco, A. M., Korza, G., & Setlow, P. (2022). Resistance properties and the role of the inner membrane and coat of Bacillus subtilis spores with extreme wet heat resistance. *Journal of Applied Microbiology*, *132*(3), 2157-2166. https://doi.org/10.1111/jam.15345

Knudsen, S. M., Cermak, N., Feijó Delgado, F., Setlow, B., Setlow, P., & Manalis, S. R. (2016). Water and Small-Molecule Permeation of Dormant Bacillus subtilis Spores. *Journal of Bacteriology*, *198*(1), 168-177. https://doi.org/10.1128/JB.00435-15

Kong, L., Doona, C. J., Setlow, P., & Li, Y. Q. (2014). Monitoring rates and heterogeneity of high-pressure germination of bacillus spores by phase-contrast microscopy of individual spores. *Applied and Environmental Microbiology*, *80*(1), 345-353. https://doi.org/10.1128/AEM.03043-13

Kong, L., Zhang, P., Setlow, P., & Li, Y. Q. (2010). Characterization of Bacterial Spore Germination Using Integrated Phase Contrast Microscopy, Raman Spectroscopy, and Optical Tweezers. *Analytical Chemistry*, *82*(9), 3840-3847. https://doi.org/10.1021/ac1003322

Kong, L., Zhang, P., Yu, J., Setlow, P., & Li, Y. Q. (2010). Monitoring the kinetics of uptake of a nucleic acid dye during the germination of single spores of bacillus species. *Analytical Chemistry*, *82*(20), 8717-8724. https://doi.org/10.1021/ac1022327

Korza, G., Setlow, B., Rao, L., Li, Q., & Setlow, P. (2016). Changes in Bacillus spore small molecules, rRNA, germination, and outgrowth after extended sublethal exposure to various temperatures: Evidence that protein synthesis is not essential for spore germination. *Journal of Bacteriology*, *198*(24), 3254-3264. https://doi.org/10.1128/JB.00583-16

Kuimova, M. K. (2012). Mapping viscosity in cells using molecular rotors. *Physical Chemistry Chemical Physics*, *14*(37), 12671-12686. https://doi.org/10.1039/c2cp41674c

Kuimova, M. K., Yahioglu, G., Levitt, J. A., & Suhling, K. (2008). Molecular rotor measures viscosity of live cells via fluorescence lifetime imaging. *Journal of the American Chemical Society*, *130*(21), 6672-6673. https://doi.org/10.1021/ja800570d

Laue, M., Han, H. M., Dittmann, C., & Setlow, P. (2018). Intracellular membranes of bacterial endospores are reservoirs for spore core membrane expansion during spore germination. *Scientific Reports*, *8*(1), 1-12. https://doi.org/10.1038/s41598-018-29879-5

Leggett, M. J., Mcdonnell, G., Denyer, S. P., Setlow, P., & Maillard, J. Y. (2012). Bacterial spore structures and their protective role in biocide resistance. *Journal of Applied Microbiology*, *113*(3), 485-498. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05336.x

Lenz, C. A., & Vogel, R. F. (2015). Pressure-Based Strategy for the Inactivation of Spores. In K. Akasaka & H. Matsuki (Éds.), *Basic Concepts, Applications and Frontiers* (Vol. 72, p. 469-537). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-017-9918-8_23

Leray, A., Spriet, C., Trinel, D., Usson, Y., & Héliot, L. (2012). Generalization of the polar representation in time domain fluorescence lifetime imaging microscopy for biological applications: Practical implementation. *Journal of Microscopy*, *248*(1), 66-76. https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.2012.03651.x

Levitt, J. A., Kuimova, M. K., Yahioglu, G., Chung, P., Suhling, K., & Phillips, D. (2009). Membrane-Bound Molecular Rotors Measure Viscosity in Live Cells via Fluorescence Lifetime Imaging. *The Journal of Physical Chemistry C*, *113*(27), 11634-11642. https://doi.org/10.1021/jp9013493

Liang, D., Wang, X., Wu, X., Liao, X., Chen, F., & Hu, X. (2021). The effect of high pressure combined with moderate temperature and peptidoglycan fragments on spore inactivation. *Food Research International*, *148*(July), 110615. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110615

Liang, J., Zhang, P., Setlow, P., & Li, Y. Q. (2014). High-precision fitting measurements of the kinetics of size changes during germination of individual Bacillus spores. *Applied and Environmental Microbiology*, *80*(15), 4606-4615. https://doi.org/10.1128/AEM.01204-14

Loison, P. (2013). *Etude de la spore de Bacillus subtilis : caractérisation des structures impliquées dans sa résistance*.

Loison, P., Gervais, P., Perrier-Cornet, J.-M., & Kuimova, M. K. (2016). Effect of ethanol perturbation on viscosity and permeability of an inner membrane in Bacillus subtilis spores. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, *1858*(9), 2060-2069. https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2016.06.003

Loison, P., Hosny, N. A., Gervais, P., Champion, D., Kuimova, M. K., & Perrier-Cornet, J.-M. (2013). Direct investigation of viscosity of an atypical inner membrane of Bacillus spores: A molecular rotor/FLIM study. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, *1828*(11), 2436-2443. https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2013.06.028

Lopes, R. P., Mota, M. J., Gomes, A. M., Delgadillo, I., & Saraiva, J. A. (2018). Application of High Pressure with Homogenization, Temperature, Carbon Dioxide, and Cold Plasma for the Inactivation of Bacterial Spores: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *17*(3), 532-555. https://doi.org/10.1111/1541-4337.12311

López-Duarte, I., Vu, T. T., Izquierdo, M. A., Bull, J. A., & Kuimova, M. K. (2014). A molecular rotor for measuring viscosity in plasma membranes of live cells. *Chemical Communications*, *50*(40), 5282-5284. https://doi.org/10.1039/c3cc47530a

López-Pedemonte, T. J., Roig-Sagués, A. X., Trujillo, A. J., Capellas, M., & Guamis, B. (2003). Inactivation of spores of Bacillus cereus in cheese by high hydrostatic pressure with the addition of nisin or lysozyme. *Journal of Dairy Science*, *86*(10), 3075-3081. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73907-1

Loshon, C. A., Genest, P. C., Setlow, B., & Setlow, P. (1999). Formaldehyde kills spores of Bacillus subtilis by DNA damage and small, acid-soluble spore proteins of the α/β-type protect spores against this DNA damage. *Journal of Applied Microbiology*, *87*(1), 8-14. https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1999.00783.x

Løvdal, I. S., From, C., Madslien, E. H., Romundset, K. C. S., Klufterud, E., Rosnes, J. T., & Granum, P. E. (2012). Role of the gerA operon in L-alanine germination of Bacillus licheniformisspores. *BMC Microbiology*, *12*. https://doi.org/10.1186/1471-2180-12-34

Luu-Thi, H., Corthouts, J., Passaris, I., Grauwet, T., Aertsen, A., Hendrickx, M., & Michiels, C. W. (2015). Carvacrol suppresses high pressure high temperature inactivation of Bacillus cereus spores. *International Journal of Food Microbiology*, *197*, 45-52. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.12.016

Luu, S., Cruz-Mora, J., Setlow, B., Feeherry, F. E., Doona, C. J., & Setlow, P. (2015). The effects of heat activation on Bacillus spore germination, with nutrients or under high pressure, with or without various germination proteins. *Applied and Environmental Microbiology*, *81*(8), 2927-2938. https://doi.org/10.1128/AEM.00193-15

Luu, S., & Setlow, P. (2014). Analysis of the loss in heat and acid resistance during germination of spores of Bacillus species. *Journal of Bacteriology*, *196*(9), 1733-1740. https://doi.org/10.1128/JB.01555-14

Margosch, D., Ehrmann, M. A., Gänzle, M. G., & Vogel, R. F. (2004). Comparison of Pressure and Heat Resistance of Clostridium botulinum and Other Endospores in Mashed Carrots. *Journal of Food Protection*, *67*(11), 2530-2537. https://doi.org/10.4315/0362-028X-67.11.2530

Margosch, D., Gänzle, M. G., Ehrmann, M. A., & Vogel, R. F. (2004). Pressure inactivation of Bacillus endospores. *Applied and Environmental Microbiology*, *70*(12), 7321-7328. https://doi.org/10.1128/AEM.70.12.7321-7328.2004

Mathys, A., Chapman, B., Bull, M., Heinz, V., & Knorr, D. (2007). Flow cytometric assessment of Bacillus spore response to high pressure and heat. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, *8*(4), 519-527. https://doi.org/10.1016/j.ifset.2007.06.010

Mathys, A., Reineke, K., Heinz, V., & Knorr, D. (2009). High pressure thermal sterilization - Development and application of temperature controlled spore inactivation studies. *High Pressure Research*, *29*(1), 3-7. https://doi.org/10.1080/08957950802526469

Melly, E., Genest, P. C., Gilmore, M. E., Little, S., Popham, D. L., Driks, A., & Setlow, P. (2002). Analysis of the properties of spores of Bacillus subtilis prepared at different temperatures. *Journal of Applied Microbiology*, *92*(6), 1105-1115. https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2002.01644.x

Mika, J. T., Thompson, A. J., Dent, M. R., Brooks, N. J., Michiels, J., Hofkens, J., & Kuimova, M. K. (2016). Measuring the Viscosity of the Escherichia coli Plasma Membrane Using Molecular Rotors. *Biophysical Journal*, *111*(7), 1528-1540. https://doi.org/10.1016/j.bpj.2016.08.020

Mills, G., Earnshaw, R., & Patterson, M. F. (1998). Effects of high hydrostatic pressure on Clostridium sporogenes spores. *Letters in Applied Microbiology*, *26*(3), 227-230. https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.1998.00329.x

Modugno, C., Kmiha, S., Simonin, H., Aouadhi, C., Diosdado Cañizares, E., Lang, E., André, S., Mejri, S., Maaroufi, A., & Perrier-Cornet, J.-M. (2019). High pressure sensitization of heat-resistant and pathogenic foodborne spores to nisin. *Food Microbiology*, *84*. https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.103244

Modugno, C., Peltier, C., Simonin, H., Dujourdy, L., Capitani, F., Sandt, C., & Perrier-Cornet, J.-M. (2020). Understanding the Effects of High Pressure on Bacterial Spores Using Synchrotron Infrared Spectroscopy. *Frontiers in Microbiology*, *10*, 1-10. https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.03122

Moeller, R., Wassmann, M., Reitz, G., & Setlow, P. (2011). Effect of radioprotective agents in sporulation medium on Bacillus subtilis spore resistance to hydrogen peroxide, wet heat and germicidal and environmentally relevant UV radiation. *Journal of Applied Microbiology*, *110*(6), 1485-1494. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.05004.x

Moir, A. (2006). How do spores germinate? *Journal of Applied Microbiology*, *101*(3), 526-530. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.02885.x

Moir, A., Corfe, B. M., & Behravan, J. (2002). Spore germination. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *59*(3), 403-409. https://doi.org/10.1007/s00018-002-8432-8

Moir, A., & Smith, D. A. (1990). The genetics of bacterial spore germination. *Annual Review of Microbiology*, *44*(1), 531-553. https://doi.org/10.1146/annurev.mi.44.100190.002531

Mok, J. H., Sun, Y., Pyatkovskyy, T., Hu, X., & Sastry, S. K. (2022). Mechanisms of Bacillus subtilis spore inactivation by single- and multi-pulse high hydrostatic pressure (MP-HHP). *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, *81*. https://doi.org/10.1016/j.ifset.2022.103147

Nguyen Thi Minh, H., Dantigny, P., Perrier-Cornet, J.-M., & Gervais, P. (2010). Germination and inactivation of Bacillus subtilis spores induced by moderate hydrostatic pressure. *Biotechnology and Bioengineering*, *107*(5), 876-883. https://doi.org/10.1002/bit.22849

Nguyen Thi Minh, H., Durand, A., Loison, P., Perrier-Cornet, J.-M., & Gervais, P. (2011). Effect of sporulation conditions on the resistance of Bacillus subtilis spores to heat and high pressure. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *90*(4), 1409-1417. https://doi.org/10.1007/s00253-011-3183-9

Nguyen Thi Minh, Hue. (2011). *Compréhension des mécanismes de résistance des spores bactériennes à la chaleur et à la pression*.

Nicholson, W. L., Munakata, N., Horneck, G., Melosh, H. J., & Setlow, P. (2000). Resistance of Bacillus Endospores to Extreme Terrestrial and Extraterrestrial Environments. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *64*(3), 548-572. https://doi.org/10.1128/MMBR.64.3.548-572.2000

Noma, S., Shimoda, M., & Hayakawa, I. (2002). Inactivation of Vegetative Bacteria by Rapid Decompression Treatment. *Journal of Food Science*, *67*(9), 3408-3411. https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2002.tb09598.x

Obaidat, R., Yu, D., Aljawhiri, S., & Macgregor, R. (2015). Moderate hydrostatic pressure–temperature combinations for inactivation of Bacillus subtilis spores. *High Pressure Research*, *35*(3), 317-329. https://doi.org/10.1080/08957959.2015.1055560

Omardien, S., Drijfhout, J. W., Zaat, S. A., & Brul, S. (2018). Cationic Amphipathic Antimicrobial Peptides Perturb the Inner Membrane of Germinated Spores Thus Inhibiting Their Outgrowth. *Frontiers in Microbiology*, *9*. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02277

Oomes, S. J. C. M., van Zuijlen, A. C. M., Hehenkamp, J. O., Witsenboer, H., van der Vossen, J. M. B. M., & Brul, S. (2007). The characterisation of Bacillus spores occurring in the manufacturing of (low acid) canned products. *International Journal of Food Microbiology*, *120*(1-2), 85-94. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.06.013

Paidhungat, M., Ragkousi, K., & Setlow, P. (2001). Genetic Requirements for Induction of Germination of Spores of Bacillus subtilis by Ca 2 + -Dipicolinate. *Journal of Bacteriology*, *183*(16), 4886-4893. https://doi.org/10.1128/JB.183.16.4886

Paidhungat, M., Setlow, B., Daniels, W. B., Hoover, D., Papafragkou, E., & Setlow, P. (2002). Mechanisms of Induction of Germination of Bacillus subtilis Spores by High Pressure. *Applied and Environmental Microbiology*, *68*(6), 3172-3175. https://doi.org/10.1128/AEM.68.6.3172-3175.2002

Paidhungat, M., Setlow, B., Driks, A., & Setlow, P. (2000). Characterization of spores of Bacillus subtilis which lack dipicolinic acid. *Journal of Bacteriology*, *182*(19), 5505-5512. https://doi.org/10.1128/JB.182.19.5505-5512.2000

Paidhungat, M., & Setlow, P. (2000). Role of Ger proteins in nutrient and nonnutrient triggering of spore germination in Bacillus subtilis. *Journal of Bacteriology*, *182*(9), 2513-2519. https://doi.org/10.1128/JB.182.9.2513-2519.2000

Paidhungat, M., & Setlow, P. (2014). Spore Germination and Outgrowth. In A. L. Sonenshein, J. A. Hoch, & R. Losick (Éds.), *Bacillus subtilis and Its Closest Relatives : from Genes to Cells* (Vol. 25, Numéro 6, p. 537-548). ASM Press. https://doi.org/10.1128/9781555817992.ch37

Pandey, R., Ter Beek, A., Vischer, N. O. E., Smelt, J. P. P. M., Brul, S., & Manders, E. M. M. (2013). Live Cell Imaging of Germination and Outgrowth of Individual Bacillus subtilis Spores; the Effect of Heat Stress Quantitatively Analyzed with SporeTracker. *PLoS ONE*, *8*(3). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058972

Paredes-Sabja, D., Raju, D., Torres, J. A., & Sarker, M. R. (2008). Role of small, acid-soluble spore proteins in the resistance of Clostridium perfringens spores to chemicals. *International Journal of Food Microbiology*, *122*(3), 333-335. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.12.006

Paredes-Sabja, D., Setlow, B., Setlow, P., & Sarker, M. R. (2008). Characterization of Clostridium perfringens spores that lack SpoVA proteins and dipicolinic acid. *Journal of Bacteriology*, *190*(13), 4648-4659. https://doi.org/10.1128/JB.00325-08

Peng, L., Chen, D., Setlow, P., & Li, Y. Q. (2009). Elastic and inelastic light scattering from single bacterial spores in an optical trap allows the monitoring of spore germination dynamics. *Analytical Chemistry*, *81*(10), 4035-4042. https://doi.org/10.1021/ac900250x

Polita, A., Toliautas, S., Žvirblis, R., & Vyšniauskas, A. (2020). The effect of solvent polarity and macromolecular crowding on the viscosity sensitivity of a molecular rotor BODIPY-C10. *Physical Chemistry Chemical Physics*, *22*(16), 8296-8303. https://doi.org/10.1039/c9cp06865a

Popham, D. L. (2002). Specialized peptidoglycan of the bacterial endospore: the inner wall of the lockbox. *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)*, *59*(3), 426-433. https://doi.org/10.1007/s00018-002-8435-5

Popham, D. L., & Bernhards, C. B. (2015). Spore Peptidoglycan. *Microbiology Spectrum*, *3*(6), 157-177. https://doi.org/10.1128/microbiolspec.TBS-0005-2012

Popham, D. L., Helin, J., Costello, C. E., & Setlow, P. (1996). Muramic lactam in peptidoglycan of Bacillus subtilis spores is required for spore outgrowth but not for spore dehydration or heat resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *93*(26), 15405-15410. https://doi.org/10.1073/pnas.93.26.15405

Raju, D., Waters, M., Setlow, P., & Sarker, M. R. (2006). Investigating the role of small, acid-soluble spore proteins (SASPs) in the resistance of Clostridium perfringens spores to heat. *BMC Microbiology*, *6*, 1-13. https://doi.org/10.1186/1471-2180-6-50

Ramirez-Peralta, A., Zhang, P., Li, Y. Q., & Setlow, P. (2012). Effects of sporulation conditions on the germination and germination protein levels of Bacillus subtilis spores. *Applied and Environmental Microbiology*, *78*(8), 2689-2697. https://doi.org/10.1128/AEM.07908-11

Ranjit, S., Malacrida, L., Jameson, D. M., & Gratton, E. (2018). Fit-free analysis of fluorescence lifetime imaging data using the phasor approach. *Nature Protocols*, *13*(9), 1979-2004. https://doi.org/10.1038/s41596-018-0026-5

Ratphitagsanti, W., Ahn, J., Balasubramaniam, V. M., & Yousef, A. E. (2009). Influence of Pressurization Rate and Pressure Pulsing on the Inactivation of Bacillus amyloliquefaciens Spores during Pressure-Assisted Thermal Processing. *Journal of Food Protection*, *72*(4), 775-782. https://doi.org/10.4315/0362-028X-72.4.775

Reineke, K., Doehner, I., Schlumbach, K., Baier, D., Mathys, A., & Knorr, D. (2012). The different pathways of spore germination and inactivation in dependence of pressure and temperature. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, *13*, 31-41. https://doi.org/10.1016/j.ifset.2011.09.006

Reineke, K., Ellinger, N., Berger, D., Baier, D., Mathys, A., Setlow, P., & Knorr, D. (2013). Structural analysis of high pressure treated Bacillus subtilis spores. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, *17*, 43-53. https://doi.org/10.1016/j.ifset.2012.10.009

Reineke, K., & Mathys, A. (2020). Endospore Inactivation by Emerging Technologies: A Review of Target Structures and Inactivation Mechanisms. *Annual Review of Food Science and Technology*, *11*, 255-274. https://doi.org/10.1146/annurev-food-032519-051632

Reineke, K., Mathys, A., Heinz, V., & Knorr, D. (2013). Mechanisms of endospore inactivation under high pressure. *Trends in Microbiology*, *21*(6), 296-304. https://doi.org/10.1016/j.tim.2013.03.001

Reineke, K., Mathys, A., & Knorr, D. (2011). The Impact of High Pressure and Temperature on Bacterial Spores: Inactivation Mechanisms of Bacillus subtilis above 500 MPa. *Journal of Food Science*, *76*(3), M189-M197. https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02066.x

Reineke, K., Schlumbach, K., Baier, D., Mathys, A., & Knorr, D. (2013). The release of dipicolinic acid - The rate-limiting step of Bacillus endospore inactivation during the high pressure thermal sterilization process. *International Journal of Food Microbiology*, *162*(1), 55-63. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.12.010

Rivalain, N., Roquain, J., Boiron, J.-M., Maurel, J.-P., Largeteau, A., Ivanovic, Z., & Demazeau, G. (2012). High hydrostatic pressure treatment for the inactivation of Staphylococcus aureus in human blood plasma. *New Biotechnology*, *29*(3), 409-414. https://doi.org/10.1016/j.nbt.2011.10.003

Robertson, R. E., Carroll, T., & Pearce, L. E. (2008). Bacillus Spore Inactivation Differences after Combined Mild Temperature and High Pressure Processing Using Two Pressurizing Fluids. *Journal of Food Protection*, *71*(6), 1186-1192. https://doi.org/10.4315/0362-028X-71.6.1186

Rose, R., Setlow, B., Monroe, A., Mallozzi, M., Driks, A., & Setlow, P. (2007). Comparison of the properties of Bacillus subtilis spores made in liquid or on agar plates. *Journal of Applied Microbiology*, *103*(3), 691-699. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03297.x

Sale, A. J. H., Gould, G. W., & Hamilton, W. A. (1970). Inactivation of Bacterial Spores by Hydrostatic Pressure. *Journal of General Microbiology*, *60*(3), 323-334. https://doi.org/10.1099/00221287-60-3-323

Santo, L. Y., & Doi, R. H. (1974). Ultrastructural Analysis During Germination and Outgrowth of Bacillus subtilis Spores. *Journal of Bacteriology*, *120*(1), 475-481. https://doi.org/10.1128/jb.120.1.475-481.1974

Segev, E., Rosenberg, A., Mamou, G., Sinai, L., & Ben-Yehuda, S. (2013). Molecular kinetics of reviving bacterial spores. *Journal of Bacteriology*, *195*(9), 1875-1882. https://doi.org/10.1128/JB.00093-13

Segev, E., Smith, Y., & Ben-Yehuda, S. (2012). RNA dynamics in aging bacterial spores. *Cell*, *148*(1-2), 139-149. https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.11.059

Setlow, B., Atluri, S., Kitchel, R., Koziol-Dube, K., & Setlow, P. (2006). Role of dipicolinic acid in resistance and stability of spores of Bacillus subtilis with or without DNA-protective α/β-type small acid-soluble proteins. *Journal of Bacteriology*, *188*(11), 3740-3747. https://doi.org/10.1128/JB.00212-06

Setlow, B., Loshon, C. A., Genest, P. C., Cowan, A. E., Setlow, C., & Setlow, P. (2002). Mechanisms of killing spores of Bacillus subtilis by acid, alkali and ethanol. *Journal of Applied Microbiology*, *92*(2), 362-375. https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2002.01540.x

Setlow, B., Peng, L., Loshon, C. A., Li, Y. Q., Christie, G., & Setlow, P. (2009). Characterization of the germination of Bacillus megaterium spores lacking enzymes that degrade the spore cortex. *Journal of Applied Microbiology*, *107*(1), 318-328. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04210.x

Setlow, B., & Setlow, P. (1996). Role of DNA repair in Bacillus subtilis spore resistance. *Journal of Bacteriology*, *178*(12), 3486-3495. https://doi.org/10.1128/jb.178.12.3486-3495.1996

Setlow, P. (1988). Small, Acid-Soluble Spore Proteins of Bacillus Species: Structure, Synthesis, Genetics, Function, and Degradation. *Annual Review of Microbiology*, *42*(1), 319-338. https://doi.org/10.1146/annurev.mi.42.100188.001535

Setlow, P. (1995). Mechanisms for the Prevention of Damage to DNA in Spores of Bacillus Species. *Annual Review of Microbiology*, *49*(1), 29-54. https://doi.org/10.1146/annurev.mi.49.100195.000333

Setlow, P. (2003). Spore germination. *Current Opinion in Microbiology*, *6*(6), 550-556. https://doi.org/10.1016/j.mib.2003.10.001

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

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

Setlow, P. (2013). Summer meeting 2013 - when the sleepers wake: the germination of spores of Bacillus species. *Journal of Applied Microbiology*, *115*(6), 1251-1268. https://doi.org/10.1111/jam.12343

Setlow, P. (2014). Germination of Spores of Bacillus Species: What We Know and Do Not Know. *Journal of Bacteriology*, *196*(7), 1297-1305. https://doi.org/10.1128/JB.01455-13

Setlow, P. (2018). Observations on research with spores of Bacillales and Clostridiales species. *Journal of Applied Microbiology*, *126*(2), 348-358. https://doi.org/10.1111/jam.14067

Setlow, P., & Johnson, E. A. (2012). Spores and Their Significance. In M. P. Doyle & R. L. Buchanan (Éds.), *Food Microbiology, Fundamentals and Frontiers* (4th éd., p. 45-79). ASM Press. https://doi.org/10.1128/9781555818463.ch3

Setlow, P., & Johnson, E. A. (2019). Spores and Their Significance. In and C. H. M. P. Doyle, F. Diez-Gonzalez (Éd.), *Food Microbiology* (5th éd., p. 23-63). ASM Press. https://doi.org/10.1128/9781555819972.ch2

Setlow, P., Wang, S., & Li, Y.-Q. (2017). Germination of Spores of the Orders Bacillales and Clostridiales. *Annual Review of Microbiology*, *71*(1), 459-477. https://doi.org/10.1146/annurev-micro-090816-093558

Sevenich, R., & Mathys, A. (2018). Continuous Versus Discontinuous Ultra-High-Pressure Systems for Food Sterilization with Focus on Ultra-High-Pressure Homogenization and High-Pressure Thermal Sterilization: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *17*(3), 646-662. https://doi.org/10.1111/1541-4337.12348

Sinai, L., & Ben-Yehuda, S. (2016). Commentary : Changes in Bacillus spore small molecules, rRNA, germination, and outgrowth after extended sublethal exposure to various temperatures: Evidence that protein synthesis is not essential for spore germination. *Frontiers in Microbiology*, *7*. https://doi.org/10.3389

Sinai, L., Rosenberg, A., Smith, Y., Segev, E., & Ben-Yehuda, S. (2015). The molecular timeline of a reviving bacterial spore. *Molecular Cell*, *57*(4), 695-707. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.12.019

Sokołowska, B., Skąpska, S., Fonberg-Broczek, M., Niezgoda, J., Chotkiewicz, M., Dekowska, A., & Rzoska, S. (2012). The combined effect of high pressure and nisin or lysozyme on the inactivation of Alicyclobacillus acidoterrestris spores in apple juice. *High Pressure Research*, *32*(1), 119-127. https://doi.org/10.1080/08957959.2012.664642

Steinberg, W., Halvorson, H. O., Keynan, A., & Weinberg, E. (1965). Timing of Protein Synthesis during Germination and Outgrowth of Spores of Bacillus cereus Strain T. *Nature*, *208*, 710-711. https://doi.org/10.1038/208710a0

Stewart, K. A. V., & Setlow, P. (2013). Numbers of individual nutrient germinant receptors and other germination proteins in spores of Bacillus subtilis. *Journal of Bacteriology*, *195*(16), 3575-3582. https://doi.org/10.1128/JB.00377-13

Stiefel, P., Schmidt-Emrich, S., Maniura-Weber, K., & Ren, Q. (2015). Critical aspects of using bacterial cell viability assays with the fluorophores SYTO9 and propidium iodide. *BMC Microbiology*, *15*(1), 1-9. https://doi.org/10.1186/s12866-015-0376-x

Sunde, E. P., Setlow, P., Hederstedt, L., & Halle, B. (2009). The physical state of water in bacterial spores. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *106*(46), 19334-19339. https://doi.org/10.1073/pnas.0908712106

Swarge, B., Nafid, C., Vischer, N., Kramer, G., Setlow, P., & Brul, S. (2020). Investigating Synthesis of the MalS Malic Enzyme during Bacillus subtilis Spore Germination and Outgrowth and the Influence of Spore Maturation and Sporulation Conditions. *mSphere*, *5*(4). https://doi.org/10.1128/msphere.00464-20

Syed, Q.-A., Reineke, K., Saldo, J., Buffa, M., Guamis, B., & Knorr, D. (2012). Effect of compression and decompression rates during high hydrostatic pressure processing on inactivation kinetics of bacterial spores at different temperatures. *Food Control*, *25*(1), 361-367. https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2011.10.061

Tennen, R., Setlow, B., Davis, K. L., Loshon, C. A., & Setlow, P. (2000). Mechanisms of killing of spores of Bacillus subtilis by iodine, glutaraldehyde and nitrous acid. *Journal of Applied Microbiology*, *89*(2), 330-338. https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.01114.x

Thackray, P. D., Behravan, J., Southworth, T. W., & Moir, A. (2001). GerN, an antiporter homologue important in germination of Bacillus cereus endospores. *Journal of Bacteriology*, *183*(2), 476-482. https://doi.org/10.1128/JB.183.2.476-482.2001

Tovar-Rojo, F., Chander, M., Setlow, B., & Setlow, P. (2002). The Products of the spoVA Operon Are Involved in Dipicolinic Acid Uptake into Developing Spores of Bacillus subtilis. *Journal of Bacteriology*, *184*(2), 584-587. https://doi.org/10.1128/JB.184.2.584-587.2002

Troiano, A. J., Zhang, J., Cowan, A. E., Yu, J., & Setlow, P. (2015). Analysis of the dynamics of a Bacillus subtilis spore germination protein complex during spore germination and outgrowth. *Journal of Bacteriology*, *197*(2), 252-261. https://doi.org/10.1128/JB.02274-14

Valeur, B. (2001). *Molecular Fluorescence : Principles and Applications*. Wiley. https://doi.org/10.1002/3527600248

Van Boekel, M. A. J. S. (2002). On the use of the Weibull model to describe thermal inactivation of microbial vegetative cells. *International Journal of Food Microbiology*, *74*(1-2), 139-159. https://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00742-5

Vepachedu, V. R., & Setlow, P. (2007). Analysis of interactions between nutrient germinant receptors and SpoVA proteins of Bacillus subtilis spores. *FEMS Microbiology Letters*, *274*(1), 42-47. https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00807.x

Vyšniauskas, A., Qurashi, M., Gallop, N., Balaz, M., Anderson, H. L., & Kuimova, M. K. (2015). Unravelling the effect of temperature on viscosity-sensitive fluorescent molecular rotors. *Chemical Science*, *6*(10), 5773-5778. https://doi.org/10.1039/c5sc02248g

Wang, S., Brunt, J., Peck, M. W., Setlow, P., & Li, Y.-Q. (2017). Analysis of the Germination of Individual Clostridium sporogenes Spores with and without Germinant Receptors and Cortex-Lytic Enzymes. *Frontiers in Microbiology*, *8*, 1-13. https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02047

Warren, S. C., Margineanu, A., Alibhai, D., Kelly, D. J., Talbot, C., Alexandrov, Y., Munro, I., Katan, M., Dunsby, C., & French, P. M. W. (2013). Rapid Global Fitting of Large Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy Datasets. *PLoS ONE*, *8*(8). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070687

Wei, J., Shah, I. M., Ghosh, S., Dworkin, J., Hoover, D. G., & Setlow, P. (2010). Superdormant spores of Bacillus species germinate normally with high pressure, peptidoglycan fragments, and bryostatin. *Journal of Bacteriology*, *192*(5), 1455-1458. https://doi.org/10.1128/JB.01497-09

Wells-Bennik, M. H. J., Eijlander, R. T., den Besten, H. M. W., Berendsen, E. M., Warda, A. K., Krawczyk, A. O., Nierop Groot, M. N., Xiao, Y., Zwietering, M. H., Kuipers, O. P., & Abee, T. (2016). Bacterial Spores in Food: Survival, Emergence, and Outgrowth. *Annual Review of Food Science and Technology*, *7*(1), 457-482. https://doi.org/10.1146/annurev-food-041715-033144

Wen, J., Pasman, R., Manders, E. M. M., Setlow, P., & Brul, S. (2019). Visualization of Germinosomes and the Inner Membrane in Bacillus subtilis Spores. *Journal of Visualized Experiments*, *146*. https://doi.org/10.3791/59388

Wu, Y., Štefl, M., Olzyńska, A., Hof, M., Yahioglu, G., Yip, P., Casey, D. R., Ces, O., Humpolíčková, J., & Kuimova, M. K. (2013). Molecular rheometry: Direct determination of viscosity in Lo and Ld lipid phases via fluorescence lifetime imaging. *Physical Chemistry Chemical Physics*, *15*(36), 14986-14993. https://doi.org/10.1039/c3cp51953h

Wuytack, E. Y., Boven, S., & 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), 3220-3224. https://doi.org/10.1128/AEM.64.9.3220-3224.1998

Xu, J., Janahar, J. J., Park, H. W., Balasubramaniam, V. M., & Yousef, A. E. (2021). Influence of water activity and acidity on Bacillus cereus spore inactivation during combined high pressure-thermal treatment. *LWT*, *146*. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111465

Yi, X., & Setlow, P. (2010). Studies of the commitment step in the germination of spores of Bacillus species. *Journal of Bacteriology*, *192*(13), 3424-3433. https://doi.org/10.1128/JB.00326-10

Zhang, P., Garner, W., Yi, X., Yu, J., Li, Y. Q., & Setlow, P. (2010). Factors affecting variability in time between addition of nutrient germinants and rapid dipicolinic acid release during germination of spores of Bacillus species. *Journal of Bacteriology*, *192*(14), 3608-3619. https://doi.org/10.1128/JB.00345-10

Zhang, P., Kong, L., Wang, G., Setlow, P., & Li, Y. Q. (2010). Combination of Raman tweezers and quantitative differential interference contrast microscopy for measurement of dynamics and heterogeneity during the germination of individual bacterial spores. *Journal of Biomedical Optics*, *15*(5). https://doi.org/10.1117/1.3494567

Zhang, P., Liang, J., Yi, X., Setlow, P., & Li, Y. Q. (2014). Monitoring of commitment, blocking, and continuation of nutrient germination of individual Bacillus subtilis spores. *Journal of Bacteriology*, *196*(13), 2443-2454. https://doi.org/10.1128/JB.01687-14

Zhang, P., Setlow, P., & Li, Y. (2009). Characterization of single heat-activated Bacillus spores using laser tweezers Raman spectroscopy. *Optics Express*, *17*(19). https://doi.org/10.1364/oe.17.016480

Zhang, Y., Delbrück, A. I., Off, C. L., Benke, S., & Mathys, A. (2020). Flow Cytometry Combined With Single Cell Sorting to Study Heterogeneous Germination of Bacillus Spores Under High Pressure. *Frontiers in Microbiology*, *10*. https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.03118

Zhang, Y., Huber, N., Moeller, R., Stülke, J., Dubovcova, B., Akepsimaidis, G., Meneses, N., Drissner, D., & Mathys, A. (2020). Role of DNA repair in Bacillus subtilis spore resistance to high energy and low energy electron beam treatments. *Food Microbiology*, *87*. https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.103353

Zhang, Y., & Mathys, A. (2019). Superdormant Spores as a Hurdle for Gentle Germination-Inactivation Based Spore Control Strategies. *Frontiers in Microbiology*, *9*. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03163

ANNEXES

Annexe 1

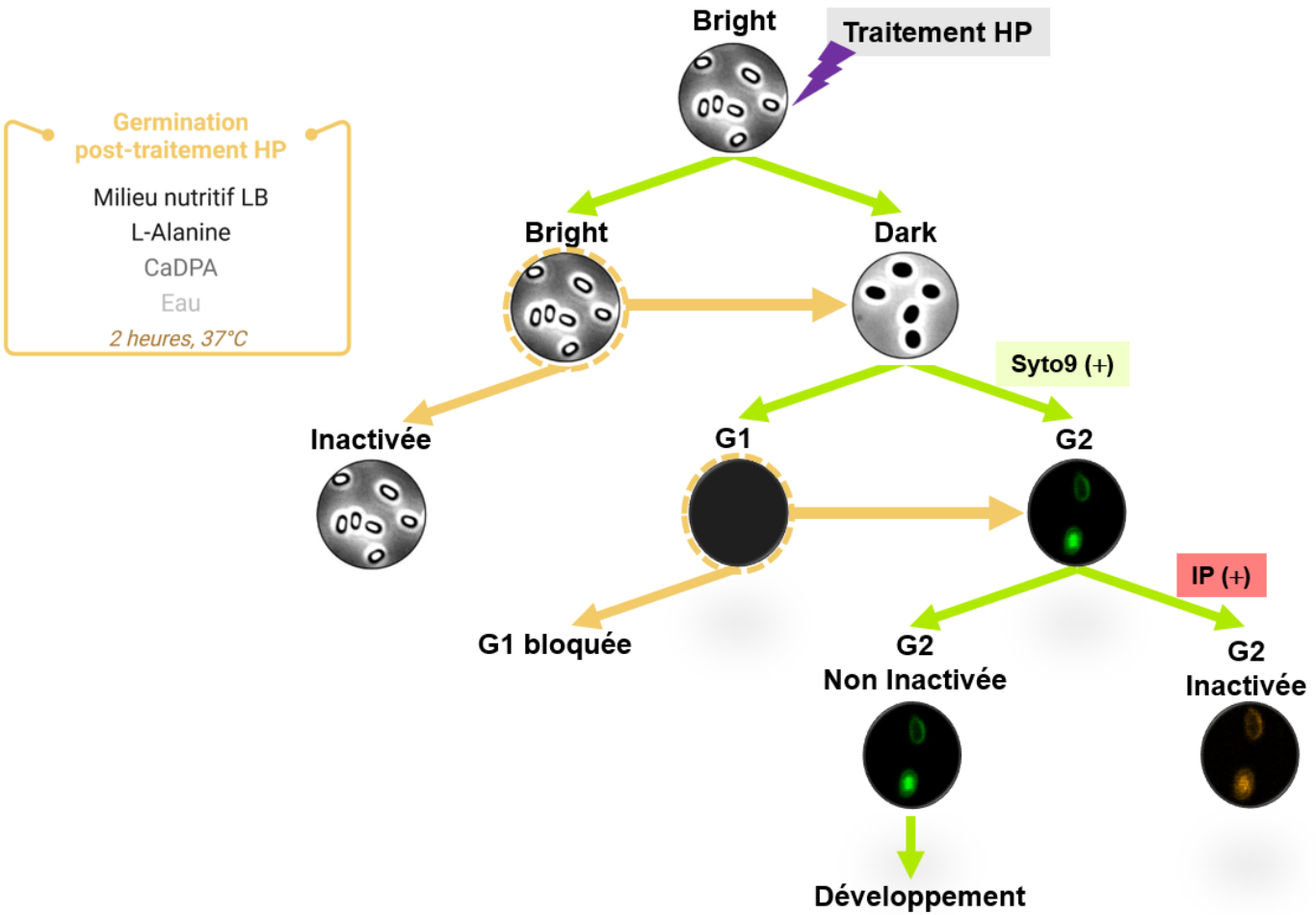


Figure 49 *: Distinction des différents stades physiologiques de la spore bactérienne grâce à la microscopie à contraste de phase et à la microscopie de fluorescence (double marquage Syto9/IP), suite à un traitement HP. Les spores traitées HP sont remises en suspension dans différentes conditions de germination (cadre orange) permettant de suivre l'évolution des spores dormantes ou partiellement germées suite au traitement HP (flèche orange).*

Annexe 2

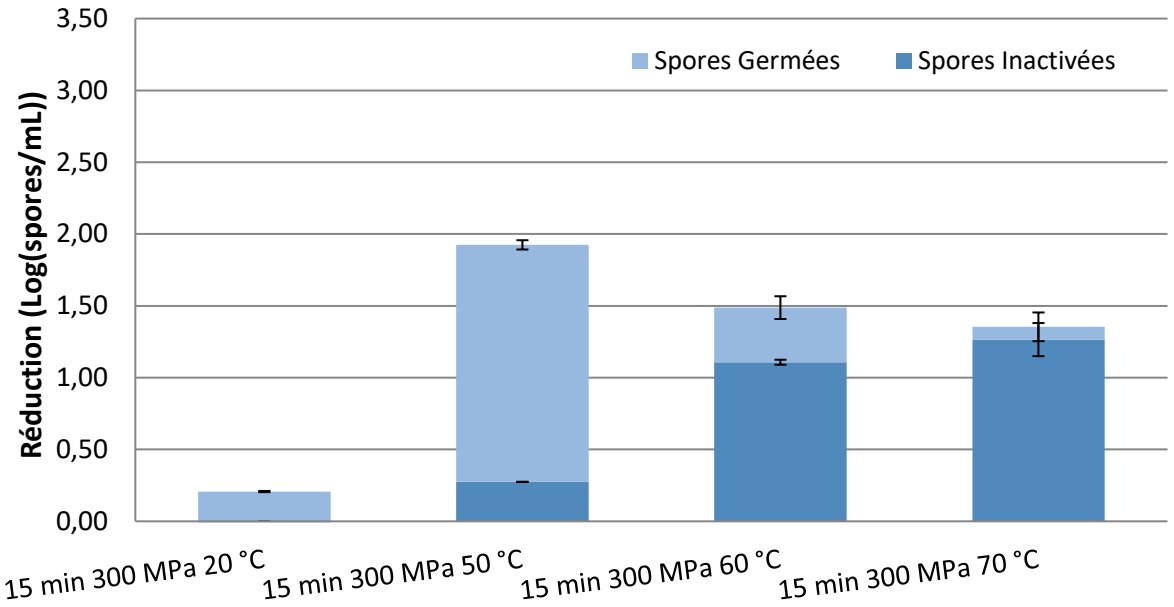


Figure 50 *: Effet du traitement haute pression (15 minutes, 300 MPa) à différentes températures sur l'inactivation des spores de B. subtilis.*

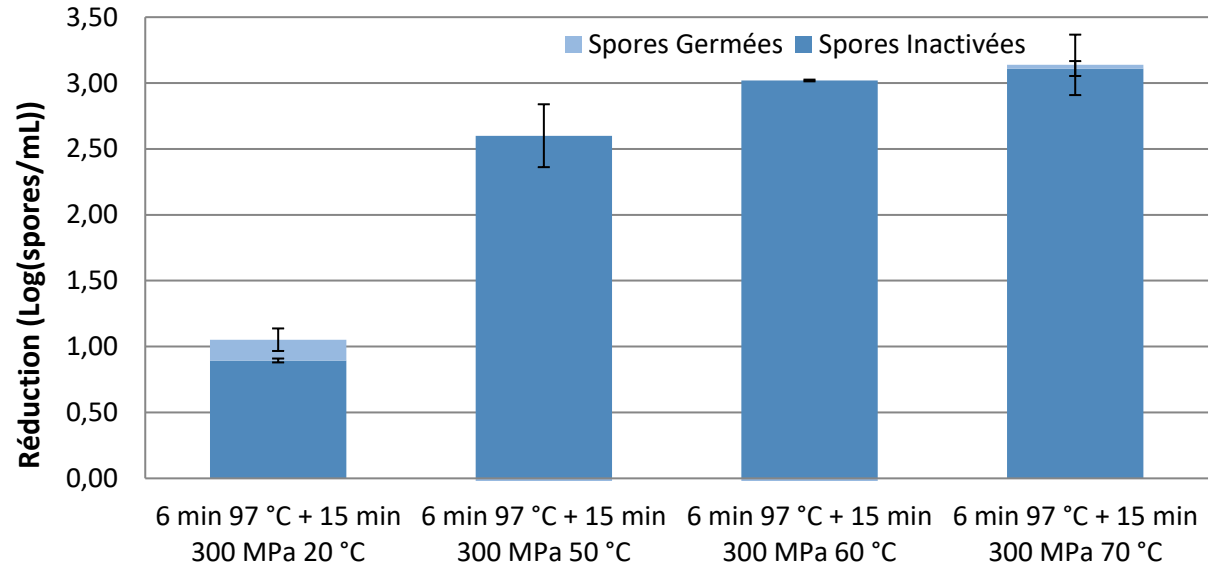


Figure 51 *: Effet du traitement thermique (6 minutes, 97 °C) combiné au traitement haute pression (15 minutes, 300 MPa) à différentes températures sur l'inactivation des spores de B. subtilis.*

Annexe 3 : Valorisations des travaux de thèse

* Communications écrites

Colas de la Noue, A., Natali, F., **Fekraoui, F.**, Gervais, P., Martinez, N., Perrier-Cornet, J. M., & Peters, J. (2020). The molecular dynamics of bacterial spore and the role of calcium dipicolinate in core properties at the sub-nanosecond time-scale. Scientific Reports, 10(1), 1-14. https://doi.org/10.1038/s41598-020-65093-y

Fekraoui, F., Ferret, E., Paniel, N., Auvy, O., Chamontin, C., André, S., Simonin, H., & Perrier-Cornet, J.-M. (2021). Cycling *versus* Continuous High Pressure treatments at moderate temperatures: Effect on bacterial spores? Innovative Food Science & Emerging Technologies, 74(September), 102828. https://doi.org/10.1016/j.ifset.2021.102828

* Communications affichées

Fekraoui, F., Kuimova, M., Simonin, H., Perrier-Cornet, J. M. How bacterial spores are inactivated by High Pressure Process? Focus on the evolution of spore compartments' viscosity. 2nd Innovations in Food Science and Technology conference, Amsterdam, Pays-Bas, 25-27 juin 2019.

Fekraoui, F., Ferret, E., Paniel, N., Auvy, O., Chamontin, C., André, S., Simonin, H., & Perrier-Cornet, J.M. Cycling *versus* Continuous High Pressure treatments at moderate temperatures: Effect on bacterial spores? Journée des Doctorants de l'UMR PAM, Dijon, France, 25 octobre 2021.

* Communications orales

Fekraoui, F., Simonin, H., Perrier-Cornet, J. M. Understanding of the phenomena involved in the inactivation of bacterial spores by a process combining high pressure and temperature. Forum des Jeunes Chercheurs, Dijon, France, 13-14 juin 2019.

Fekraoui, F., Kuimova, M., Simonin, H., Perrier-Cornet, J. M. How bacterial spores are inactivated by High Pressure Process? Focus on the evolution of spore compartments' viscosity. International Symposium on the Properties of Water XIV, Dijon, France, 24-28 août 2019.

Fekraoui, F., Munier, E. Maîtrise des spores bactériennes dans l'industrie agroalimentaire. Journées des doctorants de l'UMR PAM, Dijon, France, 2-3 octobre 2019.

Fekraoui, F., Ferret, E., Paniel, N., André, S., Simonin, H., & Perrier-Cornet, J.M. Does pressure cycling at moderate temperatures exert a specific effect on bacterial spore inactivation? International Conference on High Pressure Bioscience and Biotechnology (HPBB2021), Conférence virtuelle, 6-8 juillet 2021.

Annexe 4 : Enseignements

86 heures de Travaux Pratiques de Microbiologie pour les étudiants en 2 ème année de DUT Génie Biologique, à l'IUT Dijon-Auxerre, 2019-2020.

8 heures de Cours Magistraux pour les étudiants en 2 ème année de Master MP2, à Agrosup Dijon, 2019-2021.

ÉCOLE DOCTORALE
PRES I Bourgogne I Franche-Comté
Environnements - Santé

Université Bourgogne Franche-Comté
32, avenue de l'Observatoire
25000 Besançon

UBFC
UNIVERSITÉ
BOURGOGNE FRANCHE-COMTE

Titre : Compréhension des phénomènes impliqués dans l'inactivation des spores bactériennes par un procédé combinant Hautes Pressions et température

Mots clés : Spores, Germination, Inactivation, Hautes Pressions, Température

Résumé :
Le procédé de stabilisation des aliments par hautes pressions hydrostatiques, appliqué à froid, suscite un intérêt industriel car il offre l'avantage de respecter les propriétés organoleptiques et nutritionnelles, tout en étant efficace pour la destruction des flores végétatives pathogènes et d'altération. Cependant, les spores bactériennes sont très résistantes à la pression, ce qui nécessite le développement d'une stratégie combinant le procédé HP à une autre modalité (cyclique, thermique) afin d'augmenter l'effet sporicide. A l'heure actuelle, la combinaison de ces procédés n'est pas mise en place à l'échelle industrielle du fait de l'implémantation techniquement complexe doublée de résultats incertains étant donnée la littérature diverse et contradictoire sur le niveau et les mécanismes d'inactivation des spores par les HP. La compréhension des mécanismes à l'origine de l'inactivation des spores bactériennes par la pression est donc essentielle pour évaluer le réel potentiel de l'application industrielle du procédé HP pour l'inactivation des spores bactériennes. Dans un premier chapitre, une attention particulière a été portée au procédé HP cyclique, pouvant contribuer à une amélioration de l'inactivation des spores par une accélération de leur germination. En comparaison au traitement HP continu, il a permis de comprendre l'effet de chaque paramètre de la modalité cyclique sur l'inactivation des spores, et ensuite de proposer un modèle d'inactivation par la pression. Dans un deuxième chapitre, l'exploitation des propriétés intrinsèques et l'utilisation de marqueurs extrinsèques ont permis de suivre l'état physiologique de spores traitées à différents barèmes de pression et/ou de température, et ainsi de mettre en évidence une altération membranaire très différente de celle observée pour un simple traitement thermique. Dans le troisième chapitre, un nouveau type de marquage des spores a été exploité pour suivre l'état membranaire suite à la perturbation par la pression. L'utilisation d'un rotor moléculaire couplée à l'utilisation de l'imagerie par temps de vie de fluorescence (FLIM) ont mis en évidence une variation des temps de vie de fluorescence, reflétant une variation de la viscosité membranaire suite aux traitements à différents barèmes de pression et/ou de température. De manière générale, ces travaux de recherche renforcent la compréhension des mécanismes d'inactivation des spores par les HP, tout en proposant des pistes d'optimisation de l'application industrielle du procédé étudié.

Title : Understanding of the phenomena involved in the inactivation of bacterial spores by a process combining High Pressure and heat treatment

Keywords : Spores, Germination, Inactivation, High Pressure Process, Heat treatment

Résumé :
High Pressure Processing (HPP) is an established food processing technique for maintaining food quality while inactivating vegetative forms of pathogenic and spoilage bacteria. However, bacterial spores are very resistant to pressure, which requires the development of a strategy combining HPP with another modality (pressure cycling, heat treatment) to increase spore destruction. Currently, the combination of these processes are not implemented at an industrial scale due to the technically complex implementation and uncertain results given the diverse and contradictory literature on the level and mechanisms of spore inactivation by HP. The elucidation of spore inactivation mechanisms by pressure is therefore essential to assess the real potential of the industrial application of the HP process for the inactivation of bacterial spores. In the first chapter, special attention was paid to the pressure cycling process, which could improve spore inactivation by accelerating spore germination. The comparison with continuous HP treatment allowed to understand the effect of each parameter of the cyclicing modality on spore inactivation, and then to propose a pressure inactivation model. In the second chapter, exploitation of intrinsic properties and the use of extrinsic markers allowed the monitoring of the physiological state of pressure treated spores, and thus to highlight membrane alterations very different from that observed for a simple heat treatment. In the third chapter, a method using fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM) of a viscosity sensitive fluorophore was developped to study spore membrane perturbation by pressure. It showed a variation in fluorescence lifetimes, suggesting a variation in membrane viscosity following treatment at different pressure and/or temperature scales. Overall, these research works reinforce the understanding of spore inactivation mechanisms by HPP, while proposing ways to optimize the industrial application of the studied process.