
Optimisation de la sporulation des bactéries probiotiques du genre *Bacillus* : Développement d'un outil moléculaire adapté à l'utilisation industrielle

Thèse de doctorat

Présentée par **Jeanne Françoise Kabanyana** en
vue de l'obtention du grade de Docteur en sciences

Promoteur de thèse :
Prof. Ongena Marc

Microbial technologies
Département GxABT
Gembloux Agro-Bio Tech - ULiège

Co-promoteur de thèse :
Prof. Joris Bernard

CIP - InBioS
Département des Sciences de la Vie
Faculté des Sciences - ULiège

Président et membres du jury :

Galleni Moreno, (ULiège), Coutte François, Université de Lille, France, De Bolle Xavier (UNamur), Fickers Patrick (ULiège), Thonart Philippe, (Artechno Sa, Gembloux), Ongena Marc, co-promoteur (ULiège), Joris Bernard, promoteur (ULiège)

Année académique 2025-2026

Résumé

Optimisation de la sporulation des bactéries probiotiques du genre *Bacillus* : Développement d'un outil moléculaire adapté à l'utilisation industrielle

Bacillus subtilis et *Bacillus licheniformis* sont largement utilisés comme probiotiques, biostimulants et biofertilisants grâce à leur capacité à former des endospores, structures qui assurent une grande résistance et en font des candidats de choix pour des applications industrielles variées. Toutefois, la maîtrise de la sporulation demeure un défi majeur : obtenir une conversion efficace et reproductible des cellules végétatives en endospores à grande échelle reste difficile, car ce processus complexe dépend fortement des souches, des milieux et des conditions de culture.

L'objectif de ce travail était de développer un outil moléculaire permettant de suivre en temps réel l'initiation de la sporulation chez les *Bacillus*, en vue d'identifier rapidement les conditions de culture les plus favorables à une production industrielle efficace d'endospores.

Pour cela, trois promoteurs spécifiques de gènes clés impliqués dans la sporulation (*spo0A*, *spoIIIE*, *spoIIIAA*) ont été sélectionnés après une approche bioinformatique et bibliographique, puis fusionnés au gène rapporteur *gfp-mut3* codant pour un variant de la protéine fluorescente verte. Ces constructions ont été introduites dans un plasmide navette adapté aux bactéries appartenant au genre *Bacillus*.

Parmi les promoteurs testés, seul le promoteur de *spoIIIE* a permis une détection fiable et précoce de l'initiation de la sporulation, aussi bien chez *B. subtilis* que chez *B. licheniformis*, en conditions de culture en fiole ou en fermenteur. L'analyse par cytométrie en flux (FC) a mis en évidence une forte hétérogénéité au sein des populations bactériennes au stade précoce de la sporulation, soulignant l'intérêt d'un outil de suivi à l'échelle cellulaire.

En conclusion, l'outil que nous avons développé constitue une base solide pour le criblage rapide des conditions optimales de culture en vue de la production industrielle d'endospores. Il permet de réduire la variabilité entre lots, d'augmenter les rendements et d'améliorer la qualité des produits finis, avec des retombées directes pour les secteurs de la santé humaine et animale ainsi que pour l'agriculture.

Abstract

Optimization of sporulation in probiotic *Bacillus* species: development of a molecular tool for industrial applications

Bacillus subtilis and *Bacillus licheniformis* are widely used as probiotics, biostimulants, and biofertilizers due to their ability to form endospores, structures that confer remarkable resistance and make them highly suitable for diverse industrial applications. However, controlling sporulation remains a major challenge: achieving an efficient and reproducible conversion of vegetative cells into endospores on a large scale is difficult, as this complex process strongly depends on the strain, the medium, and the culture conditions.

The aim of this study was to develop a molecular tool enabling real-time monitoring of sporulation initiation in *Bacillus*, with the goal of rapidly identifying the culture conditions most favorable for efficient industrial-scale endospore production.

To this end, three promoters of key sporulation-related genes (*spo0A*, *spoIIIE*, *spoIIIAA*) were selected based on bioinformatic and bibliographic analyses and subsequently fused to the reporter gene *gfp-mut3*, encoding a variant of the green fluorescent protein. These constructs were introduced into a shuttle plasmid adapted for bacteria of the genus *Bacillus*.

Among the tested promoters, only that of *spoIIIE* enabled reliable and early detection of sporulation initiation, both in *B. subtilis* and *B. licheniformis*, under flask and bioreactor culture conditions. Flow cytometry (FC) analysis revealed strong heterogeneity within bacterial populations at the early stage of sporulation, highlighting the relevance of a monitoring tool at the single-cell level.

In conclusion, the tool developed in this work provides a solid basis for the rapid screening of optimal culture conditions for industrial endospore production. It helps reduce batch-to-batch variability, increase yields, and improve the quality of final products, with direct benefits for human and animal health as well as for agriculture.

Remerciements

La réalisation de cette thèse a été une aventure intellectuelle exigeante et profondément humaine. Je tiens à exprimer ma sincère gratitude à toutes celles et ceux qui m'ont accompagnée et soutenue tout au long de ce parcours.

Je remercie en premier lieu mon promoteur, Prof. Joris Bernard, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire dès le début de mon stage, et pour m'avoir offert l'opportunité de poursuivre cette collaboration à travers une thèse de doctorat. Sa confiance, son encadrement rigoureux, sa disponibilité et son expertise ont été déterminants dans la réussite de ce travail. Son engagement constant à mes côtés a grandement contribué à mon développement scientifique et personnel.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à Dr. Dauvin Marjorie, ma superviseure et encadrante, pour son accompagnement précieux, sa patience, sa rigueur scientifique et son soutien bienveillant au quotidien. Sa présence constante et ses conseils avisés ont joué un rôle clé tout au long de mon parcours doctoral.

Je suis reconnaissante aux membres du jury, Le Pr. Coutte François, le Pr. De Bolle Xavier, le Prof. Thonart Philippe, le Prof. Ongena Marc, pour l'attention portée à mon travail et l'honneur qu'ils me font en acceptant de l'évaluer. J'exprime également toute ma gratitude aux membres du comité de thèse, le Prof. Dommes Jacques, le Prof. Thonart Philippe, et le Dr. Ahmed Sabri, pour leur suivi régulier, leurs conseils, et les échanges constructifs tout au long de ces années. Leur implication a contribué à guider et à structurer mes recherches dans la durée.

Je souhaite adresser mes remerciements les plus sincères à toute l'équipe, passée, du laboratoire de Physiologie et Génétique bactériennes : Bernard, Ana, Oli, Thomas, Marjorie, Madeleine, Alice, Youssef, Loïc, Patrick, Michaël. Chacun d'entre vous, par votre accueil, vos échanges, votre aide technique ou vos encouragements, a contribué à rendre cette expérience de laboratoire enrichissante, tant sur le plan professionnel qu'humain.

Ce travail a pu voir le jour grâce à de nombreuses collaborations. Je tiens tout d'abord à exprimer ma gratitude au laboratoire du Pr. Dumoulin Mireille pour les analyses de fluorimétrie. Mes remerciements vont également à Sandra Ormenese, Céline Vanwinge et Stephan Raafat pour la réalisation des mesures de cytométrie au sein de la plateforme de cytométrie en flux du GIGA. J'adresse aussi ma profonde reconnaissance au Pr. Thonart Philippe, qui m'a offert l'opportunité de mener une partie de mes recherches au sein de son entreprise, Artechno SA.

Son accueil et la confiance qu'il m'a témoignée ont grandement contribué au développement de ce projet. Je remercie également Mario Aguedo pour son précieux soutien technique lors des cultures en fermenteurs. Enfin, je souhaite exprimer toute ma gratitude à l'ensemble du personnel d'Artechno à Gembloux pour leur disponibilité, leur collaboration et leur appui technique tout au long de mes travaux.

Je tiens également à remercier mon mari, Jean Claude, pour son soutien moral inébranlable, sa patience inestimable et sa présence rassurante tout au long de cette aventure. Il a su m'encourager dans les moments de doute, me rappeler mes forces et m'apporter un équilibre essentiel entre la vie personnelle et la rigueur académique. Je lui suis également profondément reconnaissante pour son appui financier constant, depuis mon arrivée en Belgique jusqu'aujourd'hui, qui a rendu possible la réalisation de ce travail.

Je voudrais remercier chaleureusement le Pr. Baurain Denis, ainsi que Mesdames Houben et Marchal de la Faculté, pour leur soutien et leur réactivité qui ont permis la validation du jury de thèse dans des délais exceptionnellement courts, afin qu'il puisse être présenté au Conseil de Faculté de juin. Leur efficacité et leur bienveillance ont été précieuses à un moment clé de ce parcours.

Je souhaite exprimer ma profonde gratitude à Monsieur Niyitegeka Bonaventure, dont le soutien a été déterminant dans la réalisation de mon projet académique. Grâce à son appui financier, à sa prise en charge et à sa générosité, j'ai pu concrétiser mon aspiration à venir en Belgique et à poursuivre mes études.

J'adresse également mes sincères remerciements à Messieurs, Armand et César, qui ont accepté de se porter garants pour moi, facilitant ainsi l'obtention de mes titres de séjour. Leur engagement et leur confiance ont constitué un appui essentiel me permettant de poursuivre mon parcours dans un cadre légal et serein. Je remercie chaleureusement Apollinaire qui a été toujours là pour moi et dont le soutien et les encouragements ont compté plus que je ne saurais le dire.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à ma mère, dont l'amour inconditionnel, le soutien moral et les prières m'ont porté tout au long de ce parcours. À mes sœurs et mes frères, merci pour votre présence rassurante, vos encouragements et vos mots réconfortants dans les moments de doute. Votre affection et votre confiance en moi ont été une source précieuse de motivation.

Enfin, je dédie une pensée pleine d'amour à mon enfant, Timo-Nathan, qui a partagé avec moi cette période intense de ma vie. Sa présence, sa joie et sa lumière m'ont donné la force d'avancer chaque jour. Il m'a rappelé, souvent sans le savoir, ce qui compte vraiment.

Au-delà de tout, je rends grâce à Dieu pour le souffle de vie, la santé, la force et la foi m'ayant permis d'arriver à bon port.

Liste des abréviations

Acétyl-CoA	Acétylcoenzyme
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
ATP	Adénosine triphosphate
BSA	Bovin Serum Albumin
BSNK-5	Souche nattokinase à haut rendement
BSH	Bile Salt Hydrolase
Caco-2	carcinoma of colon- 2
dDDH	hybridation ADN - ADN
DPA	acide dipicolinique ou acide pyridine-2,6-dicarboxylique)
EBM	Evidence based medicine
EPS	exo-polsaccharides
FAO	Food and Agricultural Organization
F-1,6-P	fructose-1,6-bisphosphate
F6P	fructose-6-phosphate
GGDC	Genome-to-Genome Distance Calculator
G6P	glucose-6-phosphate
GlcK	glucokinase
GRAS	Generally Recognized As Safe
GTDB	Genome Taxonomy Database
GTP	guanosine triphosphate
HT-29	human tumor 29
ICAM	intercellular Adhesion Molecule
IgA	Immunoglobuline de classe A
IgM	Immunoglobuline de classe M
IL-6	Interleukine 6
IL-10	Interleukine 10
LPSN	List of Prokaryotic names withstanding in Nomenclature
MEB	Microscope électronique à balayage
MET	Microscope électronique en transmission
MLST	Multilocus Sequence Typing S
NADH	Nicotinamide adénine dinucléotide réduit
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PEP	Phosphoénolpyruvate
pH	Potentiel hydrogène

PCR	polymerase chain reaction
PTS	Phospho Transferase System,
QSP	Qualified Presumption of Safety
ribulose-5P	D-ribulose-5-phosphate
Spo0A	Stage 0 sporulation protein A
SOD	Superoxyde dismutase
TGI	Tractus gastro-intestinal
TNF-apha	Facteur de nécrose tumorale alpha
UFC	Unités formant colonie
UV	Rayonnement ultra-violet
VCAM-1	vascular Cell Adhesion Molecule-1
Xylulose-5P	Xylulose-5-phosphate

Table des matières

CHAPITRE I. ÉTAT DE L'ART	1
I.1. Les probiotiques	2
I.1.1. Historique et définition des probiotiques	2
I.1.2. Principaux microorganismes utilisés comme probiotiques	2
I.1.2.1. Les bactéries lactiques	3
I.1.2.2. Les bifidobactéries	3
I.1.3. Le genre <i>Bacillus</i> et les bactéries <i>B. subtilis</i> , <i>B. coagulans</i> et <i>B. licheniformis</i> ...	4
I.1.3.1. Classification des Bacilli	4
I.2. Intérêt des probiotiques pour la santé humaine et animale	6
I.3. Autres intérêts économiques des Bacilli probiotiques	8
I.3.1. Utilisation des probiotiques en agriculture	8
I.3.2. Utilisation des Bacilli probiotiques par l'industrie alimentaire	8
I.3.3. Utilisation des Bacilli probiotiques pour la production d'enzymes à usage industriel	9
I.3.4. Utilisation des Bacilli probiotiques pour la bioremédiation des sols	10
I.3.5. Utilisation des Bacilli probiotiques par les industries pharmaceutiques et cosmétiques	11
I.4. Contraintes industrielles et aspects réglementaires à l'utilisation de probiotiques	12
I.4.1. Contraintes industrielles	12
I.4.2. Utilisation du terme « Probiotique » selon la réglementation européenne	13
I.4.3. Statut et utilisation des probiotiques du genre <i>Bacillus</i> : <i>B. subtilis</i> , <i>B.</i> <i>licheniformis</i> et <i>H. coagulans</i> en alimentation humaine et animale au regard des avis de l'EFSA	14
I.5. La sporulation	15
I.5.1. La spore bactérienne	15
I.5.2. Etapes de la sporulation	19
I.5.3. Les facteurs σ	22
I.5.4. Milieux de culture	23
I.6. Transport des sucres chez les bactéries et influence de la glycolyse ainsi que de la voie des pentoses phosphates sur le processus de sporulation	24

I.6.1. La glycolyse	25
I.6.1.1. Impact de la croissance en conditions aérobies et anaérobies sur la glycolyse et le cycle de Krebs	27
I.6.1.2. Impact sur cycle de Krebs sur la sporulation	28
I.6.2. Voie des pentoses phosphates	28
I.7. Impact des sources de carbone sur la sporulation et le métabolisme chez <i>B. subtilis</i>	30
I.8. Détermination du nombre de spores	31
CHAPITRE II. OBJECTIFS.....	34
II.1. Contexte scientifique	34
II.2. Problématique et justification	34
II.3. Objectifs de la thèse	34
II.4. Stratégie expérimentale.....	35
II.4.1. Constructions génétiques et systèmes de détection	35
II.4.2. Cultures à l'échelle laboratoire	35
II.4.3. Cultures à l'échelle pilote.....	35
II.5. Résultats attendus et perspectives	36
CHAPITRE III. MATERIEL ET METHODES	37
III.1. Techniques de biologie moléculaire.....	37
III.1.1. Vecteurs.....	37
III.1.2. Les primers	40
III.1.3. Les enzymes.....	41
III.1.4. Extraction d'ADN génomique depuis <i>Bacillus spp</i>	42
III.1.5. Extraction de l'ADN plasmidique	42
III.1.6. Amplification par PCR	43
III.1.6.1. Fusion d'amplicons par triple PCR	43
III.1.6.2. TempliPhi	44
III.1.7. Electrophorèse sur gel d'agarose	45
III.1.8. Purification des fragments d'ADN	45
III.1.9. Quantification des acides nucléiques	46

III.1.10. Techniques de clonage et construction des plasmides	46
III.1.11. Séquençage de l'ADN	46
III.2. Techniques de bactériologie générale	47
III.2.1. Souches	47
III.2.1.1. Conditions de culture et conservation des souches	48
III.2.1.2. Milieu de culture	48
III.2.2. Les antibiotiques	50
III.2.3. Détermination de la concentration minimale inhibitrice	50
III.2.4. Préparation des cellules compétentes et transformation d' <i>E. coli</i>	51
III.2.5. Préparation de cellules compétentes et transformation de <i>B. subtilis</i>	52
III.2.6. Préparation de cellules compétentes et transformation de <i>B. licheniformis</i>	52
III.2.6.1. Méthode des protoplastes	52
III.2.6.2. Compétence naturelle	53
III.2.7. Préparation de cellules compétentes et transformation de <i>H. coagulans</i>	54
III.2.7.1. Compétence naturelle	54
III.2.7.2. Electroporation	54
III.2.8. Courbe de croissance	54
III.3. Suivi de l'activité promotrice	55
III.4. Lecture de la fluorescence cellulaire	55
III.4.1. Lecture de la fluorescence cellulaire en microplaque	55
III.4.2. Lecture de la fluorescence cellulaire en cytométrie en flux	55
III.5. Comptage des spores et de la flore totale	56
III.6. Quantification du glucose dans le milieu de culture	57
III.7. Évaluation de l'activité hémolytique des souches sélectionnées pour estimer leur potentiel pathogène.....	57
III.8. Logiciels	57
CHAPITRE IV. RESULTATS	59
IV.1. Sélection et optimisation de la sporulation à l'échelle industrielle de plusieurs souches du genre <i>Bacillus</i> et apparenté	59
IV.1.1. Sélection et caractérisation phénotypique des souches du genre <i>Bacillus</i> et apparentés possédant des propriétés probiotiques, de biostimulant ou de biofertilisant	59

IV.1.2. Caractérisation des souches sélectionnées	61
IV.1.2.1. Évaluation de l'activité hémolytique des souches sélectionnées pour estimer leur potentiel pathogène	61
IV.1.2.2. Caractérisation du phénotype des souches pour la fermentation des glucides	63
IV.1.3. Culture en erlenmeyer des six souches d'intérêt dans deux types de milieux contrastés : sélection et transfert en fermenteur de 15 l	65
IV.1.3.1. Culture de <i>B. subtilis</i> 168 et <i>B. subtilis</i> natto	66
IV.1.3.2. Culture de <i>B. licheniformis</i> LMG12363	70
IV.1.3.2. Culture de <i>H. coagulans</i> sp.	74
IV.1.4. Tolérance des endospores de <i>H. coagulans</i> Artech_1 au pH acide et de ses formes végétatives à la bile	75
IV.1.4.1. Tolérance des endospores en milieu acide	75
IV.1.4.2 Tolérance à la bile des cellules de <i>H. coagulans</i> Artech_1 en phase végétative	77
IV.1.5. Comparaison de l'efficacité de différents milieux de culture pour la production industrielle de <i>H. coagulans</i> Artech_1	80
IV.1.5.1. Culture de <i>H. coagulans</i> Artech_1 en Erlenmeyer.....	80
IV.1.5.2. Culture de <i>H. coagulans</i> Artech_1 dans les milieux SSM en erlenmeyer	82
IV.2. Développement d'un outil moléculaire pour le suivi de la sporulation chez <i>H. coagulans</i>	87
IV.2.1. Sélection de promoteurs régulés au cours de la sporulation	88
IV.2.2. Transformation de <i>H. coagulans</i> Artech_1	90
IV.2.2.1. Identification des marqueurs de sélection	91
IV.2.2.2. Transformation par compétence naturelle	91
IV.2.2.3. Transformation des protoplastes	92
IV.2.2.4. Transformation par électroporation	94
IV.2.2.5. Conclusion	95
IV.2.3. Transformation et suivi de la sporulation-chez <i>H. coagulans</i> DSM1	95
IV.2.3.1. Transformation des protoplastes de <i>H. coagulans</i> DSM1	95
IV.2.3.2. Transformation de <i>H. coagulans</i> DSM1 par électroporation	97
IV.2.4. Construction des plasmides rapporteurs pULG180, pULG181 et pULG182 dérivés du pNW33N	97
IV.2.4.1. Constructions des fusions promoteurs-fluorophore et clonage dans des vecteurs plasmidiques.....	98

IV.2.4.2. Suivi de l'expression de <i>Pspo0A-gfpMut3</i> au cours de la sporulation de <i>H. coagulans</i> -pULG180	100
IV.2.4.3. Suivie de l'expression de <i>PspolIE-gfpmut3</i> au cours de la sporulation de <i>H. coagulans</i> -pULG181	102
IV.2.4.4. Conclusion	104
IV.2.5. <i>B. subtilis</i> et <i>B. licheniformis</i>	106
IV.2.5.1. Description et transformation des souches	106
IV.2.5.2. Constructions et validation des outils moléculaires	107
IV.2.5.2.1. Identification bio-informatique des promoteurs	107
IV.2.5.2.2. Constructions des fusions promoteurs-fluorophore et clonage dans des vecteurs plasmidiques	108
IV.2.5.3. Expression de <i>Pspo0A-cfp</i> chez <i>B. licheniformis</i> pULG172.....	109
IV.2.5.4. Expression de <i>PspolIIAA-cfp</i> et <i>PspolIE-cfp</i> chez <i>B. licheniformis</i> pULG174 et pULG178	113
IV.2.5.5. Expression du gène <i>gfp</i> ou <i>gfpmut3</i> chez <i>B. subtilis</i> <i>PspolIE-gfp::amyE-spc</i> , <i>B. subtilis</i> pULG4 et <i>B. licheniformis</i> pULG8	113
IV.2.5.6. Dynamique de l'expression du promoteur <i>PspolIE-gfpmut3</i> au cours de la croissance de <i>B. subtilis</i> pULG4.....	117
IV.2.5.7. Dynamique de l'expression du promoteur <i>PspolIE-gfpmut3</i> au cours de la croissance de <i>B. licheniformis</i> pULG8.....	123
IV.2.6. Suivi de l'expression de <i>PspolIE-gfpmut3</i> par cytométrie de flux	127
IV.2.6.1. Cinétique d'expression de <i>PspolIE-gfpmut3</i> chez <i>B. subtilis</i> pULG4	128
IV.2.6.2. Cinétique d'expression de <i>PspolIE-gfpmut3</i> chez <i>B. licheniformis</i> pULG8	130
IV.2.6.3. Déconvolution temporelle de la cytométrie en flux de <i>B. subtilis</i> pULG4 et <i>B. licheniformis</i> pULG8.....	131
IV.2.6.4. Influence de différentes sources de carbone sur la croissance, l'expression de <i>PspolIE-gfpmut3</i> et la sporulation.....	134
IV.2.6.5. Effet du glucose, du xylose et d'un sucre complexe sur la croissance et l'expression de <i>PspolIE-gfpmut3</i> chez <i>B. subtilis</i> pULG4 et <i>B. licheniformis</i> pULG8	135
IV.2.6.5.1. Analyse par spectrophotométrie.....	135
IV.2.6.5.2. Analyse par fluorométrie	138
IV.2.6.5.3. Evolution du pH.....	140
IV.2.6.5.4. Analyse en cytométrie en flux	142
IV.2.7. Etude de la sporulation dans différents milieux de cultures.....	146
IV.3. Mise à l'échelle du laboratoire en fermenteur 20 l	152

IV.3.1. Conditions expérimentales.....	152
IV.3.2. Fermentation de <i>B. subtilis</i> pULG4	152
IV.3.3. Fermentation de <i>B. licheniformis</i> pULG8.....	156
CHAPITRE V. CONCLUSION ET PERSPECTIVES	161
V.1. Optimisation de la sporulation	161
V.2. Suivi de l'expression de <i>spoII</i> E au cours de la sporulation	161
V.3. Effet des différentes sources carbonées sur la sporulation.....	162
Bibliographie	165
Annexe. Liste des communications scientifiques	181

CHAPITRE I. ÉTAT DE L'ART

I.1. Les Probiotiques

I.1.1. Historique et définition des probiotiques

Si le terme probiotique est d'usage récent, le concept lui-même découle de travaux réalisés au début du XX^{ème} siècle qui ont mis en évidence ou postulé l'effet bénéfique de certaines bactéries sur la flore intestinale ou la santé humaine. C'est le pédiatre français Henry Tissier qui observa en 1900 que les selles de nourrissons atteints de diarrhée aiguë renfermaient peu de bactéries possédant une forme bifide dans leur flore intestinale contrairement à celle des nourrissons sains, qui en comportait beaucoup. Il identifia également la présence d'une bactérie bifide dans les selles des nourrissons nourris au sein. Il en déduit l'effet bénéfique de cette bactérie qu'il dénomma *Bacillus bifidus communis* (dénomination actuelle : *Bifidobacterium bifidum*, (Tissier, 1900). Il en recommanda l'utilisation pour le traitement de la diarrhée infantile en postulant que celle-ci éliminerait la bactérie protéolytique responsable de la diarrhée infantile et rétablirait une flore intestinale (Tissier, 1900).

En 1907, le biologiste Elie Metchnikoff, suite à son observation que les populations rurales de Bulgarie avaient une espérance de vie plus élevée que la moyenne européenne, postula que cette longévité était liée à la consommation régulière de produits fermentés, notamment le yaourt et la présence dans ceux-ci de bactéries lactiques (comme *Lactobacillus bulgaricus*). Selon son hypothèse, celles-ci auraient un rôle bénéfique en limitant la prolifération des bactéries intestinales nocives productrices de toxines. Quelques dizaines d'années plus tard, d'autres micro-organismes non pathogènes n'appartenant pas aux bactéries lactiques ont été isolés et considérés comme bénéfiques pour la santé humaine : par exemple en 1917, la souche d'*Escherichia coli* 1917 (Nissle, 1918) et en 1923, la levure *Saccharomyces boulardii* (Czerucka et al., 2007).

Le terme « probiotique », selon l'étymologie grecque du mot : « pro » signifiant « pour » et « bios » désignant « la vie » signifie littéralement « en faveur de la vie », a été pour la première fois utilisé en 1954 par le chercheur allemand Ferdinand Vergin qui comparait les effets délétères des antibiotiques (« contre la vie ») sur le microbiote intestinal avec les effets favorables des bactéries bénéfiques dans l'ouvrage « Anti- und Probiotika » (Vergin, 1954) . Le terme « probiotique » lui est attribué. Au cours des années qui ont suivi plusieurs définitions pour les probiotiques ont été proposées pour aboutir à une définition officielle établie par L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) et l'Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) en 2001 (Food and Agricultural Organization/World Health Organization., 2001) et rééditée en 2017 par l'Association Scientifique Internationale pour les

probiotiques et les prébiotiques (Gibson et al., 2017). Le **Tableau I.1** reprend les différentes définitions utilisées dans cette thèse.

Tableau I.1. Différentes définitions utilisées dans cette thèse

Termes	Définitions	Références
Probiotique	Les probiotiques sont des micro-organismes vivants qui, lorsqu'ils sont administrés en quantité adéquate, confèrent un bénéfice pour la santé de l'hôte	(Gibson et al., 2017)
Prébiotique	Un prébiotique est un substrat qui est utilisé de manière sélective par les micro-organismes hôtes conférant un bénéfice pour la santé	(Gibson et al., 2017)
Biofertilisant	Les biofertilisants sont des préparations contenant des micro-organismes vivants qui, lorsqu'ils sont appliqués sur les semences, les surfaces des plantes ou le sol, colonisent la rhizosphère ou l'intérieur de la plante et favorisent sa croissance en augmentant l'apport ou la disponibilité des nutriments essentiels pour la plante hôte.	(Bhardwaj et al., 2014) (Malusá & Vassilev, 2014)
Biostimulant	Un biostimulant est un produit qui stimule les processus naturels des plantes afin d'améliorer l'efficacité de l'utilisation des nutriments, la tolérance au stress abiotique, la qualité des cultures ou la disponibilité des nutriments dans le sol ou la rhizosphère, indépendamment de sa teneur en éléments nutritifs.	(Règlement (UE), 2019)
Bioconservateur	Un bioconservateur est une substance naturelle ou un micro-organisme utilisé pour prolonger la durée de conservation des aliments en inhibant le développement des micro-organismes indésirables (pathogènes ou altérants), sans recourir à des conservateurs chimiques.	(Food and Agriculture Organization, 2006)
Bioremédiation	La bioremédiation est une technique de dépollution qui utilise des microorganismes (bactéries, champignons, algues) ou des plantes pour dégrader, transformer ou immobiliser les polluants présents dans l'environnement (sols, eaux, sédiments, air), en les convertissant en formes moins toxiques ou non toxiques. Ce processus repose sur l'activité métabolique naturelle des organismes vivants, qui peuvent utiliser les contaminants comme source de carbone, d'énergie ou de nutriments.	(Vidali, 2001)

I.1.2. Principaux microorganismes utilisés comme probiotiques

Les espèces des genres *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* constituent les probiotiques les plus fréquemment utilisés, mais quelques sous-espèces d'*E. coli*, la levure *Saccharomyces cerevisiae* ainsi que des souches de *Bacillus* le sont également. Afin de conserver de la nourriture par fermentation, les bactéries lactiques dont les espèces du genre *Lactobacillus*, sont utilisées depuis des milliers d'années. Elles peuvent jouer un double rôle comme agents de fermentation alimentaire et comme agents bénéfiques pour la santé.

I.1.2.1. Les bactéries lactiques

Depuis des siècles, les bactéries lactiques sont employées pour fabriquer et conserver des aliments, en particulier des produits laitiers, avant même la découverte de leur existence et de leur rôle. Elles forment un groupe hétérogène regroupant plusieurs genres pouvant réaliser la fermentation des glucides, pour générer de l'acide lactique.

- Si l'acide lactique est le seul métabolite formé, alors la fermentation est dite homolactique
- Si des composés tels que de l'éthanol, du dioxyde de carbone, des acides organiques volatils sont générés en plus de l'acide lactique, alors la fermentation est qualifiée d'hétérolactique

Par ailleurs, on les nommera bactéries homofermentaires ou hétérofermentaires en fonction du mode de fermentation (préférentielle, ou obligatoire).

Les bactéries à Gram positif des genres *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* et *Pediococcus* sont des bactéries lactiques. Elles sont la plupart du temps asporulées, immobiles, anaérobies ou microaérophiles. Leur métabolisme repose sur la fermentation, en anaérobiose ou en aérobiose. Une diversité des espèces comprises dans ces genres a été mise en évidence par analyse du pourcentage en bases azotées guanine et cytosine (GC %) de leur ADN.

Les bactéries lactiques peuvent être réparties en trois catégories en fonction de leur forme : les lactobacilles, les bifidobactéries et les coques.

I.1.2.2. Les bifidobactéries

Le genre *Bifidobacterium* se différencie des autres genres de bactéries lactiques par leur GC % plus élevé allant de 55 à 67 %. Elles sont caractérisées par la présence de fructose-6-phosphate phosphokétolase, leur permettant de réaliser la fermentation des glucides en générant davantage d'acide acétique que d'acide lactique (ratio 3 :2), ainsi que des faibles quantités d'éthanol et d'acides organiques. Ce métabolisme particulier contribue aux effets bénéfiques des *Bifidobacterium* dans le microbiote intestinal, notamment par la production d'acide acétique, connu pour son action antimicrobienne.

Les bifidobactéries appartiennent à l'ordre des Bifidobacteriales et à la famille des Bifidobacteriaceae et sont représentées par une trentaine d'espèces. De forme irrégulière, ces bacilles, qui se présentent isolés ou en chaînes, sont dotés de bifurcations, de protubérances voire d'extrémités spatulées comme chez *Bifidobacterium longum* (Felis & Dellaglio, 2007). Les

bacilles du genre *Bifidobacterium* sont d'origine animale ou humaine, également retrouvés en quantités importantes dans les eaux résiduaires.

Chez l'homme, ce sont des bactéries commensales de l'intestin, de la bouche, des bronches qui prolifèrent dans le tube digestif des nourrissons depuis la flore vaginale ou fécale maternelle entre deux et cinq jours après l'accouchement pour y devenir majoritaires. L'allaitement maternel favorise leur implantation. A l'âge adulte, le nombre de bactéries du genre *Bifidobacterium* subit une réduction, mais représente toutefois le microbiote dominant au cours de toute la vie. Avec l'âge, les espèces de *Bifidobacterium* varient. Ainsi, le côlon des enfants présente par exemple majoritairement les espèces *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium infantis*, et *Bifidobacterium longum* tandis que les espèces majoritaires à l'âge adulte sont *B. longum* et *Bifidobacterium adolescentis* (Larpen, 1994). Ainsi, de nombreuses espèces de *Bifidobacterium* sont employées comme probiotiques, étant donné leurs propriétés chimiques et leurs caractéristiques.

I.1.3. Le genre *Bacillus* et les bactéries *B. subtilis*, *B. coagulans* et *B. licheniformis*

I.1.3.1. Classification des Bacilli

Le genre *Bacillus* regroupe des bactéries à Gram positif appartenant à la famille des *Bacillaceae*, l'ordre des Bacillales, la classe des Bacilli et le phylum des Firmicutes (Bacillota). Les Bacilli sont aérobies ou aéro-anaérobies facultatifs. Elles tirent leur énergie par la respiration ou la fermentation. Les Bacilli sont capables de produire des endospores leur permettant de résister à des conditions environnementales défavorables. *Bacillus* est le genre type de la famille des *Bacillaceae* (Alfred Fischer, 1895 ; Sneath et al., 1980) avec *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* et *Bacillus coagulans* espèces étudiées dans ce travail.

Caractéristiques de *B. subtilis*

B. subtilis est une bactérie à Gram positif, catalase positive, aérobie stricte, mobile grâce à une ciliature péritriche, en forme de bâtonnets à bouts arrondis, sa longueur varie de 2 à 4 µm et sa largeur de 0,5 à 2 µm. Les conditions optimales de croissance se situent à un pH de 5,5 à 8,5 et à une température de 10° C à 50° C. Sa température de croissance optimale est de 40° C (espèce mésophile) et son type trophique est chimiohétérotrophe. *B. subtilis* produit des biofilms qui peuvent abriter d'autres espèces de bactéries (Bridier et al., 2011), (Romeo, 2008). Elle forme des endospores qui peuvent survivre à de très hautes températures, telles que celles communément utilisées pour cuire les aliments. Les colonies des *B. subtilis* ont une

forme irrégulière : translucide, de couleur blanc crème ou jaune, à surface brillante, marge dentelée avec une consistance gluante, à élévation bossue.

B. subtilis peut être responsable de la présence de zones collantes ou gluantes dans le pain. Malgré cela, une souche de *B. subtilis* connue sous le nom de *Bacillus natto* est utilisée dans la fermentation des grains de soja au Japon pour produire un aliment traditionnel appelé natto (Sumi et al., 2004). *B. subtilis* natto possède les propriétés anticancéreuses et la stimulation du système immunitaire. Cette souche sécrète une sérine protéase appelée nattokinase, connu pour son action de réduction de la coagulation sanguine par fibrinolyse (Sumi et al., 2004).

Caractéristiques de *B. coagulans*

B. coagulans est une bactérie du genre *Bacillus* produisant de l'acide lactique, elle a été isolée et décrite pour la première fois en 1915 par B.W Hammer à la Station expérimentale de l'Iowa, lors d'une épidémie de coagulation du lait emballé.

B. coagulans est une bactérie à Gram positif, catalase positive, sporulant, mobile, aéro-anaérobie facultative en forme de bâtonnets mobiles. Les cellules se présentent isolées ou dans les chaînes courtes de longueurs variables (de 0,9 µm par 3,0 µm à 5,0 µm). Elles se développent de manière optimale à 50 °C, l'échelle de températures tolérées est de 35 à 55 °C. Des valeurs de pH de croissance sont comprises entre 5,5 et 6,5 (Drago & De Vecchi, 2009). Elle forme des endospores et leur position est terminale contrairement à d'autres *Bacilli* où elles sont centralisées ou subterminales. *B. coagulans* n'est pas capable de réduire les nitrates en nitrite et elle est oxydase négative. Originellement, *B. coagulans* était considérée comme un *Lactobacillus* sporulant tout en montrant des caractéristiques spécifiques à la fois des genres *Lactobacillaceae* et *Bacillaceae*. Finalement, *B. coagulans* a été classée dans le genre *Bacillus*, dans la 7^e édition du Bergey (Drago & De Vecchi, 2009) grâce à des analyses reposant sur l'ADN (séquençage de l'ADNr 16S et analyse totale de l'ADN) qui ont permis de distinguer ces deux genres bactériens qui possèdent une morphologie similaire et des caractéristiques physiologiques et biochimiques identiques (voir **Tableau I.2**).

Tableau I.2 Principales caractéristiques de *B. coagulans* à l'égard des genres *Bacillus* et *Lactobacillus*

Propriétés	<i>B. coagulans</i>	<i>Bacillus</i> sp	<i>Lactobacillus</i> sp
Catalase	+	+	-
Oxydase	-	+	-
Réduction des nitrates	-	+	-
Spores	+	+	-
Mobilité	+	+	-/+
Production de l'acide lactique	+	-	+
Acide <i>meso</i> -diaminopimélique	+	+	-

Caractéristiques de *B. licheniformis*

B. licheniformis est un bacille Gram-positif en forme de bâtonnet. Typiquement, les cellules sont mobiles avec les flagelles péritriches et sont aérobies. C'est un Bacilli sporulant du sol qui contribue au recyclage des éléments nutritifs et possède une activité antifongique. *B. licheniformis* est utilisé pour produire une grande variété d'antibiotiques comme la bacitracine utilisée pour prévenir les infections. *B. licheniformis* est également utilisé comme supplément dans l'alimentation animale pour améliorer la qualité des œufs (Lei et al., 2013).

I.2. Intérêt des probiotiques pour la santé humaine et animale

Les probiotiques ont été étudiés en détail depuis de nombreuses années et se sont avérés utiles dans la prise en charge de troubles inflammatoires tels que les maladies intestinales inflammatoires et le syndrome métabolique (Mallappa et al., 2012). Les spores bactériennes, en particulier celles des souches du genre *Bacillus* sont en effet utilisées comme probiotiques chez l'homme depuis les années 1960 pour traiter divers troubles liés au tractus gastro-intestinal (TGI). Il a été mis en évidence que plusieurs souches probiotiques de référence jouent un rôle potentiel dans la modulation de plusieurs scénarii cliniques telles que les épisodes diarrhéiques, l'obésité, le diabète de type 2, mais aussi dans les maladies cardiovasculaires et le cancer (Panwar et al., 2016 ; Ranji et al., 2015).

Utilisation de *B. subtilis natto*

Les spores de *B. subtilis natto* sont consommées au Japon, car il est la principale espèce microbienne contenue dans le soja fermenté constituant le Natto. Leur consommation a été associée à la stimulation immunitaire, à la prolifération des lymphocytes et à des changements bénéfiques dans la constitution du microbiote (Dimidi et al., 2019). L'administration de spores de *B. subtilis* s'est également révélée bénéfique chez les patients atteints du syndrome de l'intestin irritable qu'un régime faible en FODMAP (**F**ermentables **O**ligosaccharides, **D**isaccharides, **M**onosaccharides **A**nd **P**olyols) ou des antibiotiques (Catinean et al., 2019).

Le potentiel du traitement probiotique par le biais de spores dans la suppression de l'inflammation gastro-intestinale a également été mise en évidence grâce à des modèles animaux. L'administration d'un mélange de spores provenant de cinq espèces différentes de *Bacillus*, connues sous le nom de « MegaSporeBiotic » chez des rats atteints de colite induite a entraîné une réduction de l'inflammation et des lésions aux tissus du côlon. Ceci s'expliquerait par la nette diminution de la production des cytokines pro-inflammatoires, notamment le facteur tissulaire nécrosant alpha (TNF-alpha) et de l'interleukine 6 (IL-6)

(Catinean et al., 2020). De plus, les taux d'ICAM (Intercellular Adhesion Molecule) et de VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule-1) molécules d'adhésion respectivement exprimées sur les cellules lymphocytaires et endothéliales et impliquées dans l'inflammation gastro-intestinale, ont été réduits (Catinean et al., 2020).

Utilisation de *B. coagulans*

B. coagulans est principalement destiné à un usage vétérinaire et employé comme probiotique pour améliorer la santé digestive des animaux, contribuer à l'équilibre de leur flore intestinale microbiote intestinal, renforcer leur barrière intestinale et stimuler leur immunité locale. En effet, des études ont montré qu'il peut réduire les troubles digestifs, notamment la diarrhée, et améliorer la croissance chez certaines espèces, comme les porcs et les volailles (Khadem et al., 2018). Son usage est donc prometteur dans le cadre d'une approche alternative aux antibiotiques, traditionnellement employés pour favoriser la croissance du bétail ou comme traitement prophylactique (Gaggia et al., 2010).

Chez l'Homme, son emploi est préconisé pour rétablir la flore vaginale (Sanders et al., 2003), lutter contre les maux d'estomac et les ballonnements liés au syndrome du côlon irritable (Hun, 2009) et pour augmenter la réponse immunitaire aux infections virales (Baron, 2009). Son innocuité en tant qu'ingrédient alimentaire probiotique a été établie pour son utilisation dans les produits alimentaires (Endres et al., 2009).

Utilisation de *B. licheniformis*

Il a été mis en évidence que *B. licheniformis* K-508, un probiotique aérobie, est doté de la capacité d'améliorer la dégradation, l'absorption et l'utilisation des nutriments (Rozs et al., 2001), et les produits fermentés de *B. licheniformis* peuvent inhiber la croissance et la multiplication des pathogènes pour favoriser la santé intestinale (Y.-C. Chen & Yu, 2020). Il a été démontré que la pâte de soja fermentée renfermant la bactérie *B. licheniformis* est dotée de propriétés antidiabétiques et anti-obésité. De plus, elle réduit l'accumulation du peptide bêta-amyloïde, responsable de la maladie d'Alzheimer, dans l'hippocampe cérébral (Shobharani et al., 2015).

En médecine vétérinaire, *B. licheniformis* est une des bactéries les plus importantes pour améliorer l'homéostasie de la flore intestinale et améliorer la valeur nutritionnelle des aliments pour animaux (S. Wang et al., 2020). Les caractéristiques probiotiques de cette souche ont été principalement étudiées en aquaculture (crevettes, poissons) mais aussi pour des animaux d'élevage (Lan & Kim, 2019). *B. licheniformis* est généralement considérée comme une bactérie probiotique bénéfique (Lee et al., 2019).

La recherche sur les poulets a démontré que le fait de compléter les régimes avec *B. licheniformis* HJDY01 peut améliorer la performance de croissance, augmenter la production d'acides gras à chaîne courte et réguler le microbiote caecal chez les poulets (Xu et al., 2021). De plus, des études récentes ont montré que *B. licheniformis* PY79 (Duc et al., 2004) et *B. licheniformis* CGMCC 1.3448 (Duc et al., 2004) dans l'alimentation des poulets, peuvent améliorer la performance de production et la qualité des œufs (Deng et al., 2012) et enfin réguler les sécrétions d'hormones reproductrices des poules pondeuses (Y. Wang et al., 2017).

I.3. Autres intérêts économiques des Bacilli probiotiques

I.3.1. Utilisation des probiotiques en agriculture

Les Bacilli sont utilisés comme agent biostimulant pour favoriser la croissance des plantes et activer leurs défenses. Ils sont également utilisés pour leur capacité de produire des molécules aux propriétés antibiotiques et antifongiques ; et des toxines entomopathogènes pour le biocontrôle des insectes nuisibles.

B. licheniformis produit une protéine antifongique F2 (T. B. Cui et al., 2012) qui a un effet inhibiteur contre de nombreux agents pathogènes des plantes, cette protéine peut être également utilisée comme pesticide chimique. Ainsi, cette protéine antifongique a été utilisée pour améliorer les conditions de stockage et éviter la pourriture brune des pêches (Zhaolin et al. 2015).

Quant à *B. subtilis*, elle peut coloniser la rhizosphère et ainsi entrer en compétition nutritive avec les agents pathogènes, empêchant ainsi leur fixation aux racines de la plante. De plus, la présence de *B. subtilis* dans les sols, stimule les défenses naturelles de la plante. *B. subtilis* peut être également utilisé comme agent de biocontrôle pour lutter contre la pourriture des bulbes du *Taibai Beimu* (une plante traditionnelle chinoise), causée par *Fusarium* (Ku et al., 2021) ainsi que pour combattre la pourriture grise de la vigne, aussi appelée botrytis ou mildiou gris. (Buzek, 2009)

La protéine antifongique produite par *B. licheniformis* peut être utilisée pour améliorer les conditions de stockage et éviter la pourriture brune des pêches (Zhaolin et al., 2015), *B. subtilis* entre en compétition nutritive avec les agents pathogènes, empêchent leur fixation sur la plante, et stimulent la défense naturelle.

I.3.2. Utilisation des Bacilli probiotiques par l'industrie alimentaire

Les espèces du genre *Bacillus* utilisées pour la production et la préparation des aliments depuis plusieurs siècles. Cela est principalement dû à leur propriété de produire et d'exporter

un nombre important de protéines, d'enzymes, des composés antimicrobiens et de produire des vitamines et des caroténoïdes (Elshaghabee et al., 2017).

B. subtilis est largement utilisé dans l'industrie (Cui et al., 2018 ; van Dijn & Hecker, 2013) notamment en raison de son statut GRAS (*Generally Recognized As Safe*), accordé par la FDA (Food and Drug Administration) et de son statut QPS (*Qualified Presumption of Safety*) reconnu par l'EFSA (Autorité européenne de sécurité des aliments). Par exemple, *B. subtilis* est utilisé dans l'industrie agroalimentaire pour la production du natto, un aliment traditionnel japonais à base de graines de soja fermentées, où la bactérie intervient dans la dégradation des protéines du soja, contribuant à la texture filamenteuse caractéristique du produit. D'autres espèces du genre *Bacillus* interviennent également dans la transformation post-récolte et le développement des arômes caractéristiques de produits tels que le cacao, le café et la vanille. Elles participent en outre à la fermentation de divers aliments traditionnels à base de feuilles ou de graines (Lima et al., 2011).

Si les exemples précédents décrivent l'utilisation de la bactérie vivante, les enzymes tels que l' α -amylase ou la xylanase produite par *B. subtilis* ou *B. licheniformis* peuvent être utilisés comme additifs en boulangerie. Ainsi α -amylase décompose l'amidon en sous-unités plus facilement utilisable par la levure favorisant la panification et les propriétés organoleptiques du pain. Ce processus étant facilité, car ces deux souches ainsi que leurs enzymes sont thermorésistantes. L' α -amylase peut être utilisée pour clarifier les sirops de glucose ou de fructose et les jus de fruit (Monteiro De Souza, 2010).

I.3.3. Utilisation des Bacilli probiotiques pour la production d'enzymes à usage industriel

Dans la quasi-totalité des études concernant la production d'enzymes à usage industriel, le microorganisme sélectionné comme usine cellulaire appartient au genre *Bacillus*. Les cultures réalisées se sont souvent focalisées sur la production d'enzymes telles que les amylases, les cellulases, les protéases ou encore les xylanases tant pour leur utilité dans la vie quotidienne que pour des applications industrielles.

Plusieurs enzymes présentant des caractéristiques thermorésistantes intéressantes ont été décrites chez les souches *B. subtilis* et *B. licheniformis* bien qu'elles soient décrites comme des bactéries mésophiles, leurs α -amylases sont habituellement davantage thermostables que celles d'autres micro-organismes, y compris d'autres espèces du genre *Bacillus*. En effet, les α -amylases produites par *B. subtilis* et *B. licheniformis* présentent des températures optimales élevées entre 50 et 100 °C (Ibrahim et al., 2013 ; Monteiro De Souza, 2010)

Les souches du genre *Bacillus* présentent une capacité de production et de sécrétion extracellulaire pouvant atteindre des concentrations de l'ordre du g.L⁻¹ que ce soit pour des petits métabolites ou des protéines. Cette capacité a favorisé l'usage des espèces du genre *Bacillus* comme cellule hôte (Cui et al., 2018 ; Westers et al., 2004) pour la production industrielle de vitamines (Commichau et al., 2014) et d'enzymes tels que des protéases, des α -amylases et des lipases (Contesini et al., 2018 ; Zhao et al., 2021).

Les protéases sécrétées par les espèces du genre *Bacillus* sont produites dans leur majorité pendant les phases pré-stationnaire et stationnaire et sont régulées en fonction du stress nutritif lié à l'appauvrissement en source de carbone et/ou d'azote. Ce stress est associé au début de la phase pré-stationnaire et stationnaire marqué par la transition de la croissance végétative au stade de sporulation chez les bactéries sporulantes. Par conséquent, la production de protéases est souvent liée au stade de sporulation chez de nombreux Bacilli, dont *B. subtilis* et *B. licheniformis* (Contesini et al., 2018).

Pour les productions industrielles, des souches optimisées de *B. subtilis* ont aussi été sélectionnées pour obtenir des usines cellulaires aptes à répondre à un besoin précis. Une souche de *B. subtilis* surproduisant l'enzyme acétolactate synthase, a par exemple, été optimisée pour la production d'isobutanol lors de la fermentation discontinue (Li et al., 2011).

B. licheniformis possède un large éventail d'enzymes exo-cellulaires qui couvre un large spectre d'activités enzymatiques. Pour cette raison ce microorganisme, représente un outil exceptionnel pour de nombreuses applications industrielles. En effet, ses propriétés cellulolytiques sont employées dans l'industrie papetière (Makowski et al., 2021), tandis que ses α -amylases thermostables sont largement utilisées dans le secteur agro-alimentaire pour la transformation de l'amidon. En outre, *B. licheniformis* produit également des protéases alcalines et des amylases acides qui trouvent des applications dans l'industrie textile, notamment pour le détachage enzymatique, le décreu et le bio-polissage des fibres (Souza & Magalhães, 2010). Les lipases produites par *B. licheniformis* possèdent une application environnementale visant à dégrader des composés organiques contenant des liaisons ester, tels que certains pesticides, contribuant ainsi à la bioremédiation (Zhao et al., 2021).

Enfin, d'autres enzymes de *B. licheniformis*, comme la β -glucosidase, la chitinase, l'endoglucanase et la xylase (Seo et al., 2013) ont présenté non seulement une stabilité à haute température, mais aussi une vaste gamme de résistance au pH.

I.3.4. Utilisation des Bacilli probiotiques pour la bioremédiation des sols

En raison de leur capacité à dégrader des matières organiques complexes, les Bacilli sont utilisés dans des projets de bioremédiation, où ils interviennent notamment dans la

décomposition des hydrocarbures et d'autres polluants environnementaux. Certaines espèces comme *B. licheniformis* et *B. subtilis*, possèdent dans leur génome des gènes clés impliqués dans ce processus, tels que *alkH* chez *B. licheniformis* codant pour un alcane hydrolase, et *spf* chez *B. subtilis*, impliqué dans la dégradation des composés hydrocarbonés du pétrole (Das et al., 2024). En outre, *B. subtilis*, *B. licheniformis* et *B. coagulans* peuvent également être utilisés dans la bioremédiation des sols contaminés par des métaux lourds (Schommer et al., 2023, Goyal et al., 2024) ainsi que pour le traitement des eaux usées (Safitri et al., n.d.).

I.3.5. Utilisation des Bacilli probiotiques par les industries pharmaceutiques et cosmétiques

De nombreuses souches de Bacilli produisent une grande variété d'antibiotiques, notamment la bacitracine, la polymixine, la bacilylsine, la mycosubtiline, la surfactine ou encore la fengycine. Ces antibiotiques sont généralement synthétisés durant la phase pré stationnaire ainsi qu'au début de la sporulation, et sont couramment utilisés dans les formulations, en raison de leurs propriétés antibactériennes, voire antifongiques dans certains cas (Shah et al., 2007).

La bacitracine représente le premier antibiotique peptidique issu de *B. licheniformis* largement employé en médecine humaine et vétérinaire. Il s'agit d'un mélange d'au moins 5 polypeptides, et contient 3 composés distincts, les bacitracines A, B et C. Il est actif contre diverses espèces bactériennes à Gram positif et quelques espèces de bactériennes à Gram négatif (Stoica et al., 2019). De plus, *B. licheniformis* peut synthétiser des exo-polsaccharides (EPS) de diverses activités biologiques, y compris des effets antibactériens et antioxydants (Petrova et al., 2021). Un exemple typique est le lévane (Hertadi et al., 2021), qui est synthétisé par une enzyme, la lévane-sucrase (N.U. Permatasari, 2019). Les effets inhibiteurs de *B. licheniformis* peuvent également être associés à la synthèse non ribosomiale du lipopeptide lichénysine (un biosurfactant) (Anuradha S. Nerurkar, 2010 ; Roy, 2018). Ces propriétés biologiques font de *B. licheniformis* un candidat potentiel pour le développement de nouveaux probiotiques.

Les bacilles sont dotés d'une capacité de « quorum sensing », un moyen de maintenir leur « comportement social », elles sont capables de bloquer le système de signalisation des colonies des bactéries pathogènes et de les empêcher de proliférer. Grâce à ce comportement, les bacilles peuvent être capables de corriger la dysbiose cutanée, caractérisée par une diminution de diversité bactérienne favorisant la colonisation de la peau par *Staphylococcus aureus*. Les souches de *B. subtilis* et *B. licheniformis* peuvent être incorporées dans des probiotiques topiques, dans des produits de soins personnels et des produits cosmétiques, dans le but de traiter les pathologies cutanées causées par la dysbiose cutanée (Yemchenko et al., 2024).

I.4. Contraintes industrielles et aspects réglementaires à l'utilisation de probiotiques

I.4.1. Contraintes industrielles

Outre la contrainte liée à la nécessité pour le micro-organisme probiotique d'être délivré vivant jusqu'à l'intestin, où il pourra exercer ses effets bénéfiques, deux autres impératifs doivent être respectés. Le premier concerne le procédé industriel ainsi que le conditionnement du produit commercialisé, qui doivent garantir la viabilité du probiotique tout au long de sa durée de vie. Le second est lié au respect du cadre réglementaire européen, défini par l'EFSA (Autorité européenne de sécurité des aliments) pour les usages destinés à l'homme, ou par le règlement (CE) n° 1831/2003 pour les usages vétérinaires.

De nombreux produits probiotiques ont été développés et mis sur le marché, principalement dans le secteur agroalimentaire. Pour l'usage chez l'homme, ils sont généralement proposés sous forme de produits laitiers fermentés, tels que les yaourts ou les kéfirs, mais également sous forme sèche, conditionné en comprimés, gélules ou sachets. Ces formulations peuvent contenir une ou plusieurs espèces bactériennes, sélectionnées pour leurs effets bénéfiques sur la santé digestive et immunitaire.

Dans le domaine vétérinaire, les formes galéniques sont adaptées aux espèces animales ciblées ainsi qu'aux modes d'administration les plus pratiques. Les probiotiques secs peuvent être incorporés directement dans la ration alimentaire, notamment chez les ruminants, les porcs, les volailles ou les chevaux. Ils peuvent également être ajoutés à l'eau de boisson, en particulier pour les volailles, ou administrés individuellement sous forme de pâtes orales, comme c'est le cas pour les chiens, chats et chevaux. Enfin, des formes unitaires telles que les gélules ou comprimés sont disponibles pour les animaux de compagnie, facilitant une utilisation ciblée et contrôlée.

À l'échelle industrielle, les formes sèches de probiotiques sont généralement obtenues par séchage dans une tour d'atomisation (ou spray-drying), une technique qui consiste à atomiser une suspension de probiotiques dans un flux d'air chaud afin d'en éliminer l'eau. Cette méthode permet non seulement de sécher les micro-organismes, mais aussi, si nécessaire, de les microencapsuler dans une matrice protectrice composée, par exemple, d'amidon, de maltodextrine ou de protéines.

Le principal inconvénient de cette technique réside dans l'exposition prolongée des probiotiques à des températures élevées (supérieures à 40–50 °C), ce qui peut altérer leur viabilité. Toutefois, dans le cas des bactéries formant des endospores, comme *B. subtilis*, *B. licheniformis* ou *B. coagulans*, le séchage est réalisé lorsque les souches sont sous leur forme

sporulée. Ces endospores, particulièrement résistantes aux agents physiques et chimiques (notamment à l'acidité gastrique et aux sécrétions digestives), sont bien mieux adaptées à ce procédé. Cependant, l'inconvénient principal lié à l'utilisation de probiotiques sous forme d'endospores est qu'ils doivent impérativement germer dans l'intestin pour donner naissance à des cellules végétatives, seules capables d'exercer l'activité probiotique.

I.4.2. Utilisation du terme « Probiotique » selon la réglementation européenne

Selon la réglementation européenne 1924/2006, le terme probiotique tel qu'il est défini dans le **Tableau I.3** est une allégation santé, car sa description fait référence à une fonctionnalité bénéfique sur la santé de l'hôte. Ainsi pour qu'un probiotique soit reconnu comme bénéfique pour la santé, il est nécessaire que la preuve scientifique de son effet bénéfique soit établie suivant les règles édictées par la Commission Européenne (CE), par exemple, par le biais d'un essai clinique. Par conséquent, l'utilisation du terme « Probiotique » est interdite sur l'étiquetage des produits commercialisés dans la CE, si cette démonstration n'est pas prouvée. A ce jour une seule allégation santé spécifique à des microorganismes présents dans le yaourt, a été autorisée depuis l'entrée en application de ce règlement (Tableau I.3). Cependant, un nombre croissant de pays membre de la CE ne respectent pas cette réglementation sur l'utilisation du mot « Probiotique » sur l'étiquetage des compléments alimentaires. Ainsi, de plus en plus le terme « Probiotique » est utilisé comme une catégorie de compléments alimentaires et est défini comme une substance contribuant à l'équilibre de la flore intestinale. L'allégation santé des probiotiques n'étant plus, dès lors, réservée qu'aux effets bénéfiques autres que ceux associés à l'équilibre de la flore intestinale. Si le mot « Probiotique » est utilisé pour désigner une catégorie de compléments alimentaires, son usage doit néanmoins être conforme à la réglementation applicable aux compléments alimentaires, en particulier en ce qui concerne la sécurité pour la consommation humaine.

Tableau I. 3. Allégation santé du seul produit laitier contenant des microorganismes

Produit	Yaourt contenant les ferments lactiques vivants <i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i> et <i>Streptococcus thermophilus</i> .
Année	2011
Autorité	EFSA, en vertu du règlement UE n°432/2012
Allégation santé autorisée	Les ferments lactiques du yaourt (<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i> et <i>Streptococcus thermophilus</i>) améliorent la digestion du lactose contenu dans le yaourt chez les personnes ayant des difficultés à le digérer

Conditions d'utilisation

Pour pouvoir utiliser cette allégation sur l'étiquetage, le produit doit contenir au moins 10⁸ unités formant colonie de chaque souche vivante par gramme de yaourt au moment de la consommation.

« Novel foods »

Le terme « Novel foods » défini dans le règlement EU 258/97, s'applique à des aliments ou à des ingrédients dont la consommation était négligeable, voire inexistante dans la CE avant 1997. Suivant cette réglementation, les nouvelles souches bactériennes bénéfiques isolées après cette date sont considérées comme « Novel foods »(Orchidali, 2023).

Actuellement, la majorité des souches bactériennes utilisées comme probiotiques dans les produits commercialisés ont été isolées à partir d'aliments consommés avant 1997 et échappent à la réglementation « Novel foods ». Ces souches bénéficient généralement d'une présomption d'innocuité et possèdent le statut GRAS (Generally Regarded As Safe) aux Etats-Unis et QPS (Qualified Presumption of Safety) en Europe. (Borrell Fontelles & Korkeaoja, 2006)

I.4.3. Statut et utilisation des probiotiques du genre *Bacillus* : *B. subtilis*, *B. licheniformis* et *H. coagulans* en alimentation humaine et animale au regard des avis de l'EFSA

L'EFSA considère plusieurs espèces du genre *Bacillus* dans le cadre du statut QPS (Qualified Presumption of Safety), en appliquant toutefois des qualifications strictes, comme l'absence de production de toxines ou de gènes de résistance transférables aux antibiotiques (Allende et al., 2025).

B. subtilis est l'espèce la plus fréquemment évaluée. Certaines souches ont été autorisées comme *novel food* pour l'alimentation humaine, avec des apports journaliers de l'ordre de 10⁹ UFC considérés comme sûrs, à condition que l'absence de toxines soit démontrée (Bampidis, Azimonti, de Lourdes Bastos, et al., 2019).

Dans l'alimentation animale, *B. subtilis* est largement utilisé comme additif dans la ration alimentaire, notamment chez les volailles, les porcs et les ruminants, où il contribue à l'amélioration de la croissance et de l'efficacité alimentaire. De manière similaire, *B. licheniformis* est inclus sur la liste QPS et reconnu comme sûr lorsqu'il ne produit pas de toxines. Son utilisation reste plus rare dans les compléments alimentaires humains, mais il est couramment employé comme probiotique chez les animaux d'élevage, souvent en association avec *B. subtilis*.

H. coagulans (anciennement nommé *B. coagulans*) n'est pas non plus inclus dans la liste QPS, mais a fait l'objet de plusieurs évaluations favorables comme *novel food* pour l'humain, à des doses comparables à celles de *B. subtilis* (Bampidis, Azimonti, Bastos, et al., 2019). En revanche, son utilisation en alimentation animale reste moins répandue.

En résumé, l'EFSA reconnaît plusieurs espèces de *Bacillus* comme sûres, à condition d'une évaluation rigoureuse souche par souche.

I.5. La sporulation

De nombreux microorganismes, aussi bien eucaryotes que procaryotes, sont capables de former des spores, soit pour se protéger face à des conditions environnementales extrêmes, soit dans un but reproductif. Nous allons à présent décrire les caractéristiques des spores bactériennes et plus particulièrement chez celles du genre *Bacillus* chez qui, l'entrée en sporulation est déclenchée par des conditions défavorables à leur croissance, notamment une déplétion en nutriments dans leur environnement naturel (Koopman et al., 2022).

I.5.1. La spore bactérienne

Les spores bactériennes sont classées en quatre catégories selon leur structure, leur mode de formation et leur origine (Sonenshein, 2000) :

- les arthrospores, aussi appelées conidies, produites notamment par les actinomycètes,
- les kystes, produits par certaines bactéries à Gram négatifs, (ex. *Azotobacter vinelandii*)
- les exospores, observées chez certaines cyanobactéries, (ex. *Chamaesiphon spp*)
- les endospores.

Les endospores concernent quasi exclusivement des bacilles à Gram positif des genres *Bacillus* et *Clostridium*, très répandus dans l'environnement. Elles sont formées et maturées à l'intérieur de la cellule mère (Carlin, 2011). En réponse à des conditions défavorables, ces bactéries peuvent produire, par un processus d'enkystement, des endospores dans le milieu extérieur après la lyse de la cellule mère. Elles sont métaboliquement inactives et capables de survivre plusieurs millions d'années (Nicholson et al., 2000).

La **Figure I.1 A** présente un schéma général illustrant les différentes parties d'une endospore chez le genre *Bacillus* ainsi que les coupes transversales des endospores de *B. subtilis* et *B. anthracis* obtenues par microscopie électronique à transmission (**Figure I.6 B et C**).

Les endospores sont composées de plusieurs structures, et les paragraphes suivants décrivent ces éléments en partant de l'extérieur de l'endospore vers son centre.

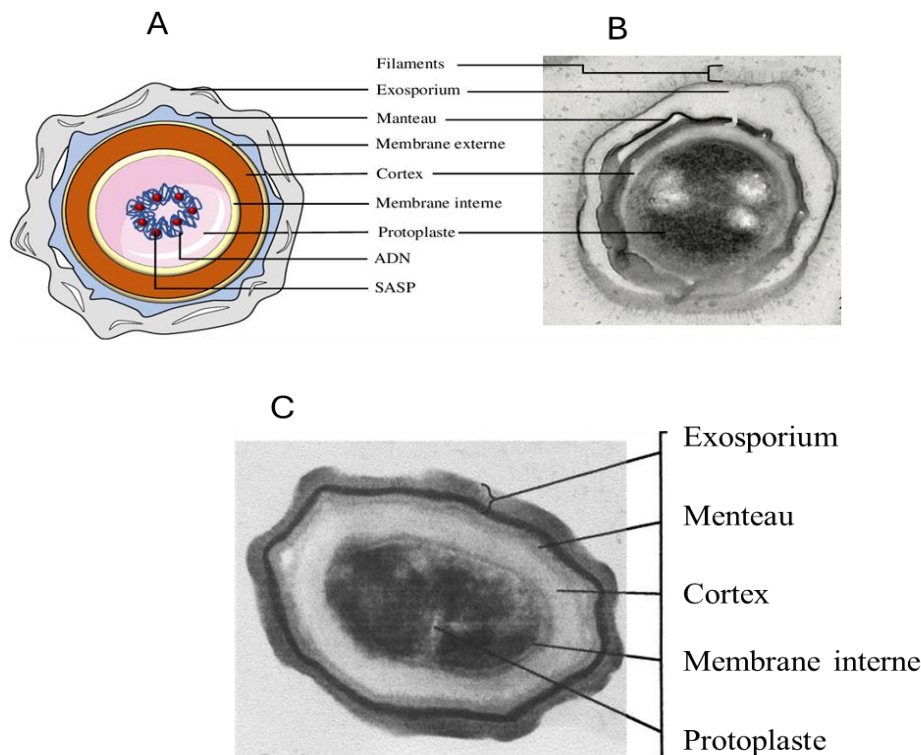


Figure I.1. Structure des endospores chez le genre *Bacillus*

A : Schéma général décrivant les différentes parties de l'endospore ; **B** et **C** : respectivement les coupes transversales des endospores de *B. anthracis* et *B. subtilis* obtenues par MET. On peut observer l'ADN contenu dans le nucléoïde (zone sombre dense aux électrons) situé au centre de l'endospore. Chez *B. subtilis*, l'endospore mesure 1,2 μm de long. (Sources : Bozue et al., 2015, Nicholson et al., 2000). Pour plus de détails voir texte.

L'exosporium

Seules certaines espèces du genre *Bacillus* telles que *B. thuringiensis*, *B. anthracis*, *B. cereus*, possèdent une structure périphérique appelée exosporium. *B. subtilis*, en revanche, en est dépourvue. Bien que la structure de l'exosporium varie selon les souches, une couche basale paracrystalline accompagnée de filaments périphériques a été décrite dans la majorité des cas (Henriques & Moran, 2007). L'exosporium constitue la couche la plus externe de l'endospore. (**Figure I.1**). Sa composition majoritairement constituée de protéines et de glycoprotéines, lui confère un caractère fortement hydrophobe (Storz & Hengge-Aronis, 2010). Chez *B. cereus*, par exemple, la proportion de protéines atteint 52 % de la structure totale. Ses fonctions exactes ne sont pas encore entièrement élucidées, mais son rôle est de permettre l'adhérence des spores aux surfaces et aux cellules, grâce à son caractère très hydrophobe. Ce mécanisme est crucial pour la virulence de certaines espèces, telles que *B. anthracis* (Setlow & Johnson, 2019). L'exosporium contient également des enzymes, notamment des protéases, des

superoxyde dismutases (SOD) et des hydrolases qui seraient impliquées dans la germination des endospores (Charlton et al., 1999).

Le manteau

Si l'on assimile la spore à une sphère, le manteau représente environ 35 % de son volume total. Il contient entre 50 et 80 % des protéines totales de l'endospore (Leggett et al., 2012), ainsi que près de 6 % de glucides. Il est composé de trois à six couches superposées, à l'architecture et à la composition protéique variables, lui conférant un aspect lamellaire (Henriques & Moran, 2007 ; Leggett et al., 2012). Le manteau est divisé en deux parties : une enveloppe interne, peu dense aux électrons, à l'aspect lamellaire, et une enveloppe externe, plus dense et plus épaisse (Leggett et al., 2012). Il renferme environ 30 à 80 protéines spécifiques différentes. Chez les spores quiescentes, le manteau occupe une grande fraction du volume et présente une épaisseur moyenne de 77 nm pour un rayon total de spore d'environ 577 nm (Westphal et al., 2003).

Le manteau remplit plusieurs fonctions essentielles :

- un rôle détoxifiant grâce à sa teneur en enzymes telles que la superoxyde dismutase (SOD), les peroxyrédoxines ou encore les chitinases. Il protège ainsi les structures internes de la spore contre les biocides (peroxyde d'hydrogène, dioxyde de chlore, ozone, etc.) et certains agents chimiques (glutaraldéhyde, iode, agents oxydants) (Leggett et al., 2012, Setlow, 2014). Les spores mutantes dépourvues de manteau se révèlent très sensibles à l'hypochlorite de sodium (eau de Javel).
- une barrière protectrice contre les bactériovores, telle que le protozoaire *Tetrahymena thermophila* (Klobutcher et al., 2006) et le nématode *Caenorhabditis elegans* (Laaberki & Dworkin, 2008). En empêchant l'accès des enzymes muralytiques produites par ces microorganismes, comme le lysozyme, il préserve l'intégrité du cortex de la spore (Leggett et al., 2012).
- des propriétés mécaniques favorisant l'adhésion et la persistance dans des environnements hostiles, notamment sur les surfaces en milieu agroalimentaire (Driks & Eichenberger, 2016).

Le cortex

Le cortex est constitué d'un peptidoglycane hétéropolymérique, similaire, mais non identique à celui des parois cellulaires végétatives. Il est composé de N-acétyl-glucosamine (NAG), d'acide N-acétyl-muramique (NAM) et de divers acides aminés. Sa particularité réside dans la présence de résidus muramiques δ -lactames (MAL), responsables d'une faible réticulation des

brins glycanes et d'un nombre réduit de chaînes latérales peptidiques (Popham & Bernhards, 2015).

Les membranes externes et interne

La membrane externe, située sous le manteau, joue un rôle encore mal compris, mais elle est essentielle durant la sporogénèse (Setlow, 2006). Bien qu'elle soit difficile à visualiser en microscopie électronique, sa présence dans la spore mature a été confirmée par des analyses biochimiques (Leggett et al., 2012). Elle ne semble pas impliquée dans la résistance aux rayonnements, à la chaleur ou à certains agents chimiques (Setlow, 2006).

La membrane interne est une bicouche phospholipidique qui deviendra la membrane plasmique de la cellule végétative après germination. À l'état de dormance, elle est fortement compactée. Sa composition lipidique est proche de celle des cellules végétatives, mais ses protéines sont spécifiques à la spore (Leggett et al., 2012). Les lipides y sont en grande partie immobiles, sauf lors de la germination, où ils retrouvent une certaine fluidité (Cowan et al., 2004). La membrane interne héberge des protéines cruciales pour la sporulation et la germination, notamment les récepteurs de germination (Setlow, 2003). Elle agit également comme une barrière de perméabilité essentielle à la protection de l'ADN du cœur de la spore contre de nombreux produits chimiques (Setlow, 2006).

Le cœur de la spore (anciennement "protoplaste")

Structure centrale de la spore, le cœur renferme le matériel génétique, la majorité des enzymes nécessaires à la reprise d'activité, ainsi qu'une concentration élevée d'acide dipicolinique (DPA), spécifique à la spore. Il est faiblement hydraté (27 à 50 %), un taux qui varie selon l'espèce et les conditions de sporulation (Storz & Hengge-Aronis, 2010). À titre de comparaison, les cellules végétatives contiennent environ 4 g d'eau/g de poids sec, contre seulement 0,4 à 1 g/g dans les spores (Setlow & Johnson, 2019). Cette déshydratation est principalement due à la présence de Ca-DPA, complexe formé entre le DPA et les ions calcium selon un ratio 1:1. La mobilité interne des protéines et des ions dans le cœur est quasiment nulle (Cowan et al., 2003).

Le pH du cœur diminue également de 1 à 1,5 unité au cours de la sporulation, pour atteindre une valeur proche de 6, contre 7,5 à 8 dans les cellules végétatives. Cette acidification, associée à la faible teneur en eau, influence fortement la mobilité et l'activité enzymatique intracellulaire.

Enfin, le cœur contient une famille de protéines spécifiques appelées SASP (*Small Acid Soluble Proteins*), représentant 5 à 10 % des protéines totales des spores. Les SASP α et β

sont les plus abondantes. Elles interagissent étroitement avec l'ADN, le saturent et lui confèrent une structure condensée particulière en anneau ("ring-like") (Ragkousi et al., 2000) comme illustré en **Figure I.2.**

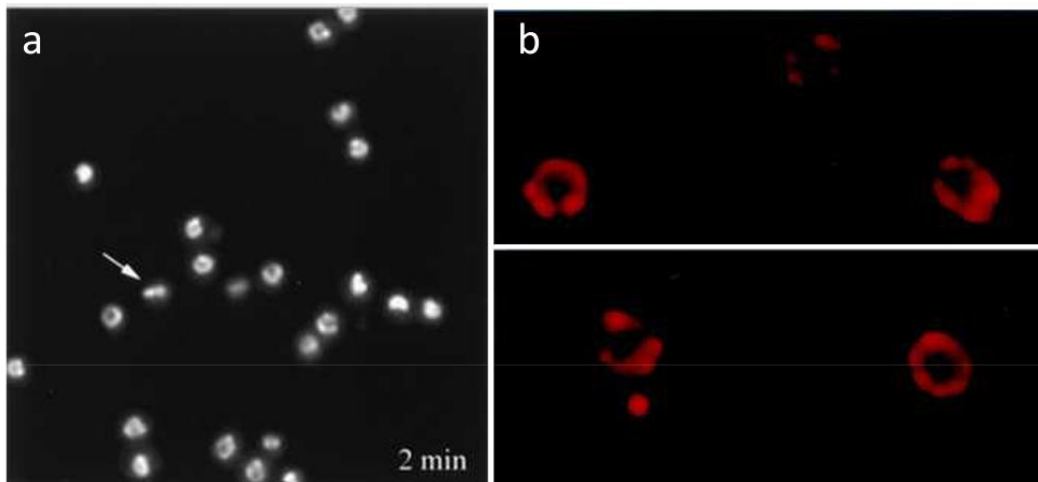


Figure I.2. Spores de *B. megaterium* observées en microscopie à fluorescence

a) marquage de l'ADN au DAPI b) immunomarquage des SASPs α/β (Ragkousi et al., 2000)

I.5.2. Etapes de la sporulation

La sporulation correspond à une compartimentation de la cellule bactérienne aboutissant à la formation d'une endospore, issue d'un cycle cellulaire complexe, contrôlé par de multiples facteurs intracellulaires et des signaux perçus par la cellule. Le principal stimulus initiateur de ce mécanisme est une carence en nutriments. En effet, une déplétion en sources de carbone, d'azote, voire parfois de phosphore, peut induire l'entrée en sporulation (Sonenshein, 2000, (Storz & Hengge-Aronis, 2010). Diverses stratégies de survie peuvent alors être activées, comme le cannibalisme, la compétence, ou encore la production de métabolites secondaires et d'enzymes capables d'hydrolyser des substrats complexes et insolubles.

Durant cette période, *B. subtilis* produit dans le milieu extérieur des oligopeptides modifiés, appelés auto-inducteurs, qui s'accumulent au fur et à mesure que la densité cellulaire augmente. Lorsque leur concentration dépasse un seuil critique, ces signaux sont perçus par des récepteurs membranaires, déclenchant une réponse collective coordonnée de la population bactérienne : c'est le phénomène de quorum sensing (Sonenshein, 2000). Ce mécanisme régule notamment la phosphorylation du régulateur transcriptionnel Spo0A, un facteur clé, indispensable à l'initiation de la sporulation (López et al., 2009).

La sporulation est un processus complexe, généralement divisé en huit étapes (voir **Figure I.3**), et régulé par cinq facteurs sigma (σ) distincts. L'entrée en sporulation requiert l'activation de σ^H et de Spo0A, impliqués dans la mise en place de la division cellulaire asymétrique qui initie la sporulation (Strauch et al., 1990). Ces éléments régulent l'expression des gènes spécifiques à la préspore (via σ^F puis σ^G) et à la cellule mère (via σ^E puis σ^K), à différents stades du développement.

Les étapes I à VII de la sporulation ont été historiquement définies à partir de mutants de sporulation, chacun présentant un blocage morphologique spécifique observable en microscopie optique. Une étape 0 a été introduite pour désigner les mutants incapables d'initier le processus. Les gènes associés à ces différents blocages ont été nommés *spo0* à *spoVII*, selon l'étape à laquelle ils interviennent dans le déroulement du processus.

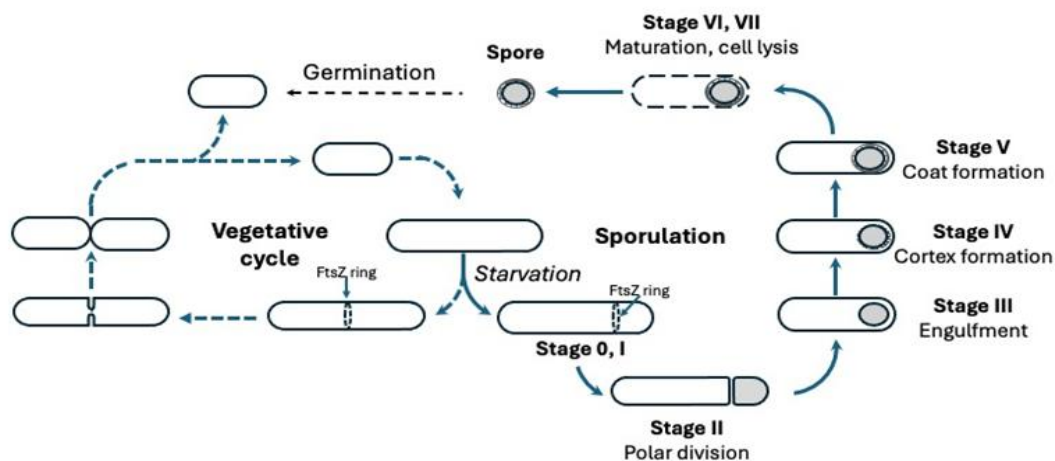


Figure I.3. Les différentes étapes du cycle de sporulation de *B. subtilis*

Description des étapes de la sporulation chez *B. subtilis*

Étape 0 : la cellule détecte un stress environnemental, principalement une carence en nutriments. Cette situation déclenche une réponse impliquant, notamment, une diminution du GTP (Higgins & Dworkin, 2012) et l'accumulation des auto-inducteurs du quorum sensing. Ces signaux activent la phosphorylation de *spo0A*, le maître régulateur de la sporulation

Étape I : cette phase comprend l'ensemble des processus conduisant à la décision de la cellule d'entrer en sporulation.

Étape II : la cellule mère effectue une division asymétrique spécifique, formant deux compartiments distincts : la préspore, plus petite, et la cellule mère, plus grande. Ce processus repose sur la formation d'un septum de division particulier (Errington, 2003). Durant cette

phase, la cellule mère synthétise également des enzymes extracellulaires telles que des α -amylases, protéases et nucléases, ainsi que des antibiotiques.

Étape III : la préspore s'invagine dans la cellule mère, se retrouvant entourée de trois membranes. La seconde, à orientation inversée, joue un rôle crucial dans la déshydratation de la future spore (Strauch et al., 1990). Le septum s'incurve, permettant l'engloutissement complet de la préspore par un mécanisme similaire à la phagocytose (Piggot & Hilbert, 2004; Strauch et al., 1990). Une fois l'invagination achevée, la préspore est totalement isolée à l'intérieur de la cellule mère. L'engagement dans la sporulation devient alors irréversible (Higgins & Dworkin, 2012).

Étape IV : le pH de la préspore diminue légèrement, de même que sa teneur en potassium, déclenchant sa déshydratation. La synthèse du cortex et du manteau débute grâce à l'augmentation de la concentration en peptidoglycane entre les membranes. Deux couches de peptidoglycane se forment : une épaisse (le cortex) et une plus fine (le manteau). Ces événements sont régulés par les facteurs σ^E et σ^K (Higgins & Dworkin, 2012).

Étape V : le manteau externe commence à se former dès l'invagination et se poursuit tout au long de la sporulation. Il est constitué d'environ 70 protéines produites par la cellule mère, qui s'assemblent à la surface de la spore. Les précurseurs du peptidoglycane sont également synthétisés par la cellule mère puis transférés à travers la membrane externe de la préspore (González-Pastor et al., 2003). En parallèle, la déshydratation se poursuit, accompagnée d'une baisse du pH et d'une réduction du volume. La spore accumule des cations divalents (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+}) (Henriques & Moran, 2007 ; McKenney et al., 2013), ainsi que de l'acide dipicolinique (DPA), synthétisé par la cellule mère et incorporé dans la spore.

Étape VI : la phase de maturation constitue la dernière étape de développement de la spore. Une fois la déshydratation achevée, la concentration en DPA atteint un seuil de solubilité, ce qui induit la formation de complexes DPA-calcium. Peu de modifications morphologiques sont visibles à ce stade, mais la spore acquiert progressivement ses propriétés de dormance, de résistance thermique et de capacité de germination.

Étape VII : la lyse de la cellule mère permet la libération de la spore mature. Celle-ci peut alors résister à divers stress environnementaux extrêmes (solvants chimiques, détergents, radiations, températures élevées, etc.). Métaboliquement inactive, la spore peut rester en dormance durant de longues périodes. Lorsqu'elle rencontre des conditions environnementales favorables, elle entame le processus de germination et, en présence suffisante de nutriments, redonne naissance à une cellule végétative (Higgins & Dworkin, 2012).

I.5.3. Les facteurs σ

L'expression des gènes est un processus fondamental et largement conservé chez les bactéries. L'étape clé de ce processus est la transcription, assurée par l'ARN polymérase (ARNP). Cette enzyme est guidée par des facteurs σ , des sous-unités protéiques qui s'associent transitoirement à l'ARNP. Ces facteurs σ dirigent l'enzyme vers des séquences spécifiques appelées promoteurs, généralement situées à environ -10 et -35 paires de bases en amont du site d'initiation de la transcription.

Une fois liés, les facteurs σ déterminent la spécificité de reconnaissance de l'ARNP pour certains promoteurs, facilitant ainsi la transcription de sous-ensembles de gènes. Cette régulation permet notamment d'adapter l'expression génétique à des conditions particulières, comme celles rencontrées lors de la sporulation.

Chez *B. subtilis*, on dénombre au moins 14 facteurs σ différents. (**Tableau I.4**). Certains régulent l'expression de gènes pendant la phase de croissance végétative, tandis que d'autres interviennent durant la sporulation. Plus précisément, les facteurs σ^F (dans la préspore) et σ^E (dans la cellule mère) contrôlent l'expression des gènes dans les premières étapes de la sporulation. Aux stades plus avancés, ce sont σ^G (préspore) et σ^K (cellule mère) qui prennent le relais pour activer les gènes nécessaires à la maturation et à la libération de la spore.

Tableau I.4. Facteurs sigma chez *B. subtilis* et leurs fonctions

	Facteurs σ	Genes	Fonction	Références
Cellule végétative	σ^A	<i>SigA</i>	Sporulation précoce	(Moran Jr et al., 1982)
	σ^B	<i>SigB</i>	Réponse au stress général de la cellule	(Bartolini et al., 2019 ; Boylan et al., 1991)
	σ^C	<i>Inconnu</i>	Expression des gènes lors de la phase postexponentielle	(W. C. Johnson et al., 1983)
	σ^D	<i>SigD</i>	Mobilité, autolyse	(Rodriguez Ayala et al., 2020)
	σ^H	<i>SigH</i>	Expression des gènes de la phase post exponentielle, compétence et sporulation précoce	(Predich et al., 1992)
	σ^L	<i>SigL</i>	Expression des gènes des enzymes dégradative	(Rodriguez Ayala et al., 2020)
	σ^N	<i>SigN</i>		
Sporulation	σ^E	<i>SigE</i>	Expression des gènes dans la cellule mère au début de la sporulation	(Roels et al., 1992)

	σ^F	<i>SigF</i>	Expression des gènes dans le prespore au début de la sporulation (précoce)	(Sun et al., 1991)
	σ^G	<i>SigG</i>	Expression des gènes dans le prespore vers la fin de la sporulation (tardif)	(Nicholson et al., 1989)
	σ^K	<i>SigK</i>	Expression des gènes dans la cellule mère tardif	(Zheng et al., 1992)
ECF (Extracellular RNA polymerase sigma Factor) type	σ^M	<i>SigM</i>	Maintenir l'intégrité de la paroi suite aux antibiotiques et aux réponses environnementaux	(Rodriguez Ayala et al., 2020)
RNA polymerase	σ^V	<i>SigV</i>	Réponse aux enzymes lytiques	(Rodriguez Ayala et al., 2020)
RNA polymérase extracellulaire	σ^W	<i>SigW</i>	Réponse aux stress de l'enveloppe cellulaire	(Rodriguez Ayala et al., 2020)
RNA polymerase ECF-type	σ^X	<i>SigX</i>	Réponse aux peptides antimicrobiens cationiques. Contrôle du biofilm	(Rodriguez Ayala et al., 2020)
ECF-type	σ^Y	<i>SigY</i>	Production de sublincine	(Rodriguez Ayala et al., 2020)
	σ^Z	<i>SigZ</i>	ECF-type	(Rodriguez Ayala et al., 2020)

I.5.4. Milieux de culture

Les bactéries ont besoin de sources variées de nutriments pour assurer leur croissance, leur survie et se multiplier. Ces besoins incluent principalement des sources de carbone et d'azote, des minéraux essentiels (comme le phosphore, le potassium et le magnésium), des vitamines, des facteurs de croissance et de l'eau. Ces nutriments jouent un rôle crucial à la fois dans la production d'énergie (catabolisme) et dans la biosynthèse des constituants cellulaires (anabolisme). Il a été démontré que la composition du milieu de culture constitue un facteur déterminant influençant la formation de spores chez de nombreuses bactéries du genre *Bacillus*, notamment *B. subtilis* (Z.-M. Chen et al., 2010)

En effet, une limitation ou un déséquilibre nutritionnel peut déclencher des réponses adaptatives majeures, comme la sporulation.

Les nutriments (Z.-M. Chen et al., 2010), (Gudiña et al., 2015) requis peuvent être classés en deux grandes catégories : les macroéléments, nécessaires en grandes quantités (par exemple : C, N, H, O, P, S, K, Mg, Ca, Fe) et les oligoéléments (ou éléments traces), indispensables en faibles concentrations, mais jouant un rôle essentiel comme cofacteurs enzymatiques (ex : Zn, Mn, Cu, Co, Ni, Mo).

La compréhension de ces besoins nutritionnels est donc essentielle pour contrôler la croissance bactérienne et moduler des processus spécifiques tels que la sporulation.

Les éléments minéraux comme le Ca, le Mn, le Mg, le Fe et le Zn, lorsqu'ils sont des concentrations appropriées, sont essentiels à l'achèvement du processus de sporulation. Ils rentrent dans la composition des différentes couches structurales de la spore et contribuent à sa résistance aux températures élevées (Hageman et al., 1984). D'autre part, le Fe et le Zn semblent également favoriser le processus de sporulation (Farrera et al., 1998; Tzeng et al., 2008). Le **Tableau I.5** reprend les différents macroéléments et leurs sources pour la culture des *Bacilli*.

Tableau I.5. Source de macronutriments

Macronutriments	Source
Carbone	glucose, saccharose, lactose, xylose, glycerol, mélasse, amidon...
Azote	Peptone, extrait de levure, extrait de viande et hydrolysats de caséine ammoniacale (NH ₃), nitrate (NO ₃ ⁻), azote moléculaire (N ₂),
Oxygène	Air, agitation pour l'oxygénation, oxygène pur
Hydrogène	Eau
Phosphore	Du phosphate de potassium dihydrogène (KH ₂ PO ₄) et phosphate d'hydrogène dipotassium (K ₂ HPO ₄)
Soufre	Sulfate SO ₄ et les sulfures métalliques : FeSO ₄ , CuSO ₄ , ZnSO ₄ , extrait de levure.
Potassium	Chlorure de potassium (KCl), extrait de levure
Magnésium	Extrait de levure, MgSO ₄

I.6. Transport des sucres chez les bactéries et influence de la glycolyse ainsi que de la voie des pentoses phosphates sur le processus de sporulation

Chez les bactéries, le transport actif des sucres présents dans le milieu extérieur vers le cytoplasme est principalement réalisé par le système phosphotransférase [phosphotransferase system (PTS)] qui utilise l'hydrolyse du phospho-énol-pyruvate (PEP), comme source d'énergie et la phosphorylation du sucre transporté. Pour chaque sucre tel que le glucose, le fructose, le mannose et la cellobiose, il existe un PTS spécifique. Ainsi dans le cas du glucose il est transporté par le PTS PtsG qui libère dans le cytoplasme du glucose-6-phosphate (G-6-P). Une voie alternative pour le transport du glucose est possible et fait intervenir le symporteur H⁺ GlcP du glucose (Nakano & Zuber, 1998). Après son transport par le GlcP, le glucose est phosphorylé par glucose phosphorylase GlcK pour donner du G-6-P. Cette seconde voie de phosphorylation est essentielle pour les bactéries chez lesquelles le

PTS est déficitaire et pour le catabolisme des disaccharides comme le maltose et le tréhalose qui génère du glucose (Bachem et al., 2006).

Le G-6-P généré peut être ensuite catabolisé par deux voies métaboliques : la glycolyse et la voie des pentoses phosphates (VPP) (Postma et al., 1993).

I.6.1. La glycolyse

La glycolyse représente la voie principale d'utilisation des sucres chez les bactéries. Elle est commune à différents modes de production d'énergie, qu'il s'agisse de la respiration oxydative ou de la fermentation. Ce processus convertit une molécule de glucose en deux molécules de pyruvate par une série de réactions enzymatiques en cascade. Cette dégradation permet la synthèse d'ATP et la réduction du NAD^+ en NADH, fournissant ainsi de l'énergie et du pouvoir réducteur à la cellule (**Figure I.4**).

Le pyruvate ainsi formé peut ensuite être orienté vers différentes voies selon le contexte métabolique : fermentation (production d'éthanol ou d'acide lactique, selon l'espèce), ou conversion en acétyl-coenzyme A (Ac-CoA) par décarboxylation ou en oxaloacétate par carboxylation, deux métabolites clés pour l'entrée dans le cycle de Krebs.

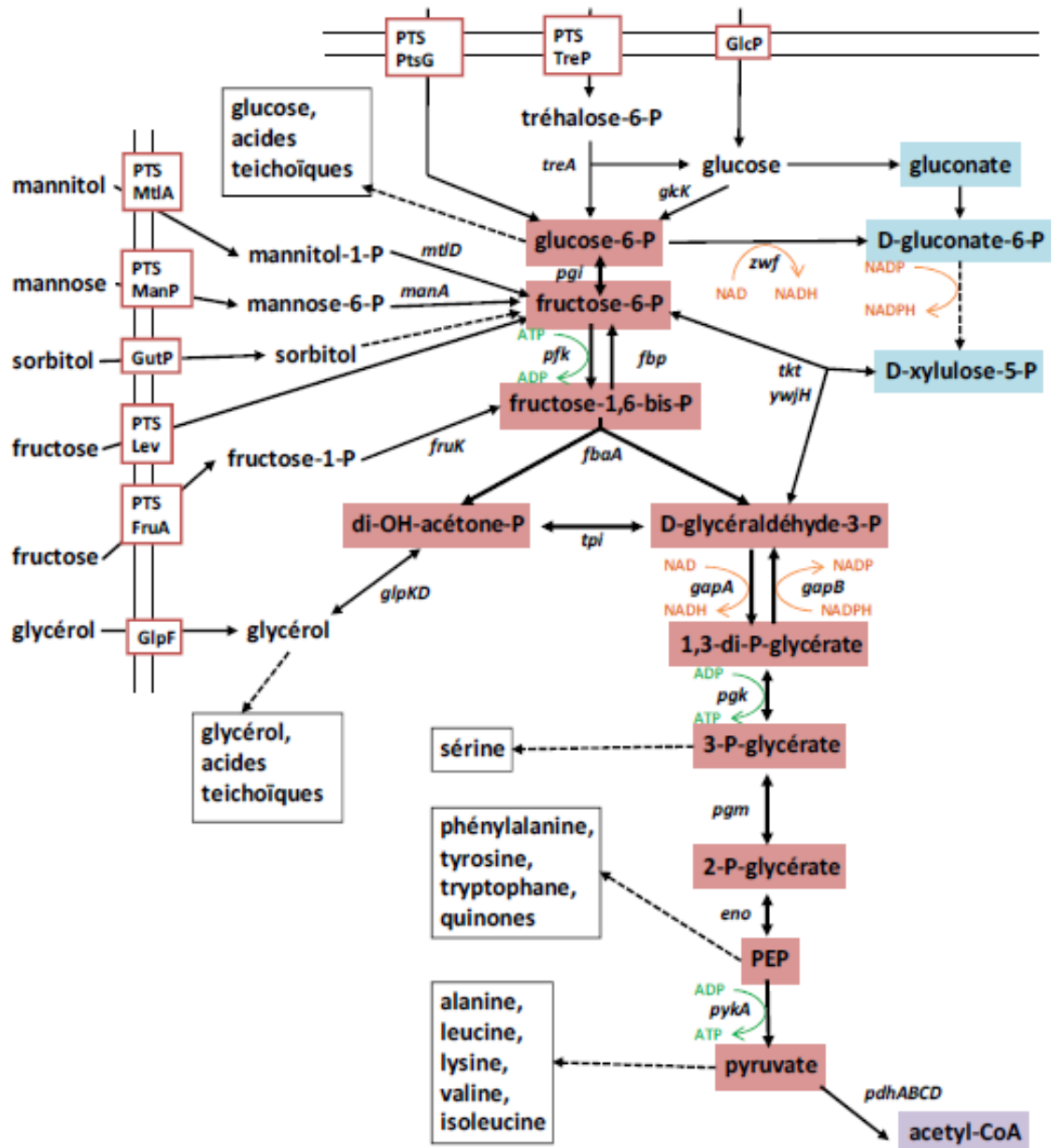


Figure I.4. Voie de la glycolyse chez *B. subtilis* (Bachem et al., 2006)

Les intermédiaires de la voie de la glycolyse apparaissent en rouge, les intermédiaires de la voie des pentoses phosphates en bleu et celui du cycle de Krebs est représenté en violet. Les cadres noirs représentent les principales voies anaboliques liées à la glycolyse.

La glycolyse peut être divisée en deux phases : une première phase consommatrice d'énergie qui aboutit à la production de glycéraldéhyde-3-phosphate et une seconde productrice d'énergie avec au terme de l'acide pyruvique (**Figure I.4**).

Phase consommatrice d'énergie de la glycolyse

Au début de la glycolyse, le G-6-P est converti en fructose-6-phosphate (F-6-P), puis en fructose-1,6-bisphosphate (F-1,6-P). Cette dernière réaction consomme une molécule d'ATP et est catalysée par la 6-fructokinase PfkA. Au terme de cette phase, deux molécules de glycéraldéhyde-3-phosphate ont été produites et un ATP consommé.

Chez *B. subtilis*, le gène **pfkA** fait partie d'un opéron incluant aussi le gène **pyk** codant pour le pyruvate kinase. L'inactivation de **pfkA** perturbe fortement la croissance en milieu minimal en présence de glucose lorsqu'elle est la seule source de carbone, et ralentit la croissance même en milieu riche (Fiegler et al., 1999). Fait intéressant, ce mutant présente, également, un taux de sporulation plus élevé que la souche sauvage au début du processus de sporulation.

Phase de production d'énergie

Au cours de cette phase, les deux molécules de glyceraldéhyde-3-phosphate seront converties en pyruvate et le bilan de cette conversion aboutira à la production de 2 NADH et de 4 ATP. Donc le bilan final de la glycolyse est :



dans laquelle Pi est du phosphate inorganique.

S'il faut tenir compte de la phosphorylation du glucose par le PTS, une molécule de PEP n'est pas convertie en pyruvate, car elle est employée pour le transport et la phosphorylation de la molécule de glucose. Le bilan final sera, dans le cas des bactéries et pour *B. subtilis* :



I.6.1.1. Impact de la croissance en conditions aérobies et anaérobies sur la glycolyse et le cycle de Krebs

La disponibilité de l'oxygène influence profondément les voies métaboliques utilisées par les bactéries pour produire de l'énergie. Lors d'une croissance en aérobiose, dans un milieu contenant un excès de glucose comme unique source de carbone et une source d'azote (telle que le glutamate ou l'ammonium), la cellule bactérienne privilégie la glycolyse pour générer de l'ATP. Cette production se fait : directement, via la conversion du glucose en pyruvate et indirectement, via les pouvoirs réducteurs générés, qui alimentent la phosphorylation oxydative.

Dans ces conditions, le cycle de Krebs fonctionne de manière limitée. Son rôle est principalement de fournir des précurseurs pour l'anabolisme. L'Ac-CoA est en partie converti en acétate, qui est ensuite exporté, avec génération supplémentaire d'ATP. L'activité de

certaines enzymes du cycle, notamment la citrate synthase et l'aconitase, est alors faible et inhibée par le glutamate (Nakano & Zuber, 1998). Le maintien du fonctionnement minimal du cycle repose sur la reconstitution du pool de cofacteurs oxydés par la chaîne respiratoire.

Lorsque le glucose devient limité, le cycle de Krebs est réactivé pour permettre l'utilisation de sources carbonées alternatives telles que le glutamate ou les métabolites excrétés. Cependant, cela s'accompagne d'une réduction de la croissance bactérienne.

En anaérobiose, la glycolyse reste la principale voie de production d'ATP à partir du glucose. Toutefois, en l'absence d'oxygène, ce dernier ne peut plus servir d'accepteur final d'électrons. Ce rôle est alors repris par des composés tels que le nitrate ou le nitrite. Dans ce contexte, l'activité des deux premières enzymes du cycle de Krebs (citrate synthase et aconitase) est fortement réduite, même si du glucose est présent dans le milieu (Nakano & Zuber, 1998).

I.6.1.2. Impact sur cycle de Krebs sur la sporulation

L'importance du cycle de Krebs va au-delà du simple métabolisme énergétique. Des études sur *B. subtilis* ont montré que des mutations dans certains gènes du cycle de Krebs affectent profondément la sporulation. Par exemple, une souche mutante pour le gène *citC*, codant pour l'isocitrate déshydrogénase (troisième enzyme du cycle de Krebs), présente un blocage de la sporulation entre le stade 0 et le stade II. Bien que les gènes précoces contrôlés par le facteur Spo0A soient normalement exprimés, ceux exprimés à partir du stade II ne le sont pas chez le mutant. L'analyse morphologique révèle une accumulation d'anneaux de protéine FtsZ et de filaments chromosomiques, mais l'absence de formation de septums de division asymétriques indique un blocage au stade I de la sporulation (Jin et al., 1997).

Par ailleurs, il a été démontré que l'aconitase possède un rôle bifonctionnel. En présence de fer, elle agit comme enzyme du cycle de Krebs. En absence de fer, elle se lie à des ARNm impliqués dans la sporulation, avec une affinité nettement plus élevée chez certaines souches mutantes (Jin et al., 1997). Cela suggère une implication directe de cette enzyme dans la régulation post-transcriptionnelle de la sporulation.

I.6.2. Voie des pentoses phosphate

La voie des pentoses phosphate (VPP) est une voie métabolique clé impliquée dans la conversion du glucose en fructose-6-phosphate (F-6-P) et en glycéraldéhyde-3-phosphate (glycéradehyde-3-P) (Doan, 2003). En plus de ce rôle central dans le métabolisme intermédiaire, la VPP assure deux fonctions métaboliques majeures (**Figure I.5**) :

- la synthèse du ribose-5-phosphate (ribose-5-P), un métabolite essentiel servant de précurseur à la biosynthèse de l'histidine, des nucléotides, du NAD, du tryptophane et de la thiamine ;
- la production de l'érythrose-4-phosphate (érythrose-4-P), intervenant dans la synthèse du noyau aromatique de certains acides aminés et dans la formation de quinones.

Par ailleurs, la VPP permet la génération de NADPH, un cofacteur indispensable aux réactions anaboliques.

La VPP se divise en deux branches, comme illustré dans la **Figure I.5** :

- la branche oxydative, qui convertit le glucose-6-phosphate (G-6-P) en D-ribulose-5-phosphate (ribulose-5-P) avec production concomitante de NADPH et d'un dégagement de CO_2 ;
- la branche non oxydative, qui transforme le ribulose-5-P en F-6-P et en glycéradehyde-3-P.

De plus, la VPP représente la seule voie métabolique permettant l'utilisation de certains carbohydrates (gluconate, ribose, arabinose et xylose) comme sources de carbone. Par exemple, la dégradation du gluconate induit la formation de ribulose-5-P, tandis que le ribose, l'arabinose et le xylose sont convertis en ribose-5-P ou en xylulose-5-phosphate (xylulose-5-P), deux composés interconvertibles dans la branche non oxydative.

Lorsque le glucose constitue la seule source de carbone, une partie du G-6-P dérivé de la glycolyse est réorientée vers la VPP. Ce G-6-P est d'abord oxydé en gluconate-6-phosphate (gluconate-6-P). Chez *B. subtilis*, cette conversion irréversible est catalysée par la glucose-6-phosphate-déshydrogénase Zwf pour donner du 6-phospho-glucono-1,5-lactone (6-P-glucono-lactone). Cette enzyme utilise le NADP^+ comme cofacteur, lequel est réduit en NADPH lors de l'oxydation du G-6-P. Cette étape constitue ainsi une source majeure de NADPH, nécessaire à diverses réactions anaboliques, notamment lorsque la bactérie croît en présence de glucose (Doan, 2003). Ensuite la 6-P-glucono-lactone est convertie en gluconate-6-P par l'enzyme Pgl (YkgB). Plusieurs études ont mis en lumière que chez *B. subtilis*, le glucose est catabolisé par la glycolyse et la VPP dans un ratio de 70 % / 30 % (Fuhrer et al., 2005; Tännler et al., 2008)

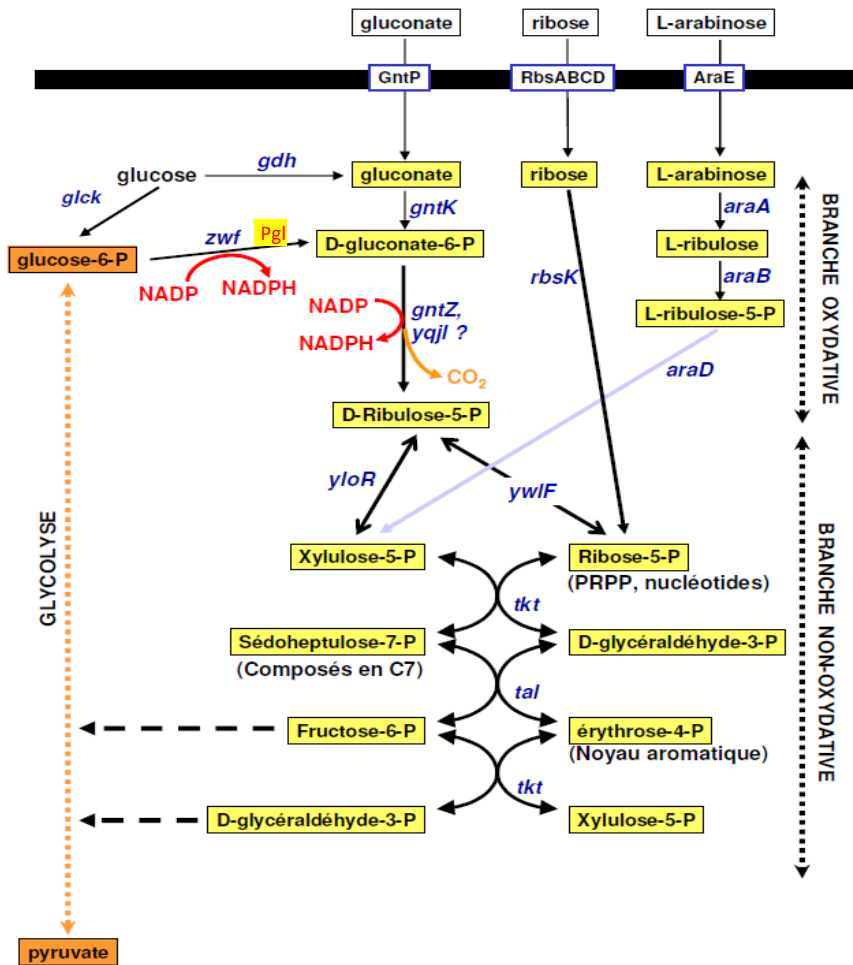


Figure I.5. Voie des pentoses phosphates, principales sources de carbone catabolisées et voies anaboliques rattachées chez *B. subtilis* (Doan, 2003)

I.7. Impact des sources de carbone sur la sporulation et le métabolisme chez *B. subtilis*

Au cours des dernières décennies, de nombreux efforts ont été déployés pour élucider les mécanismes régulant la sporulation chez les bactéries formant des endospores. Bien qu'il soit établi que la présence de substrats métabolisables puisse inhiber ce processus, il a également été démontré que la nature et la combinaison des sources de carbone et d'énergie présentes dans le milieu de culture influencent significativement le rendement en spores.

Par exemple, la culture de *B. subtilis* dans des milieux contenant du glucose en combinaison avec de la mélasse, du sirop de menthe ou des pentoses (tels que le xylose ou l'arabinose) permet une augmentation notable de la biomasse et du rendement en spores, comparativement à des milieux contenant une seule source de glucides à concentration équivalente (Osadchaia et al., 1997). Ces auteurs ont montré qu'un mélange glucose/xylose

à un ratio 1:1 augmente le rendement cellulaire de 143 à 190 % par rapport aux cultures cultivées uniquement avec l'un ou l'autre des sucres. Le rendement en spores (atteignant 30 à 50 % du nombre final de cellules) est corrélé à la densité cellulaire élevée obtenue à la fin de la phase de croissance exponentielle.

Ce phénomène s'explique par l'utilisation simultanée de deux substrats, qui optimise la production de biomasse et favorise les conditions métaboliques propices à la sporulation. En particulier, la co-métabolisation de sucres empruntant à la fois la glycolyse et la VPP semble jouer un rôle important.

Une autre étude a examiné l'impact de la combinaison glucose/ribose sur la sporulation de la souche *B. subtilis* PS 346. Les résultats ont montré que cette combinaison de sucres entraîne une augmentation de plus de 100 % du nombre de spores par rapport aux cultures contenant uniquement du glucose (Warriner & Waites, 1999). Les spores produites dans ces conditions présentaient une résistance thermique et un rayon hydrodynamique comparables à ceux obtenus avec du glucose ou du ribose seuls, suggérant que la qualité des spores n'était pas altérée.

En testant différentes combinaisons de glucides, il a été observé que les substrats principalement métabolisés via la VPP favorisaient davantage la sporulation. À l'inverse, des composés tels que le citrate ou le malate, dont le métabolisme passe essentiellement par la glycolyse ou le cycle de Krebs, étaient moins efficaces. De manière intéressante, l'ajout de pyruvate (intermédiaire central de la glycolyse) au milieu contenant du glucose améliorait également la sporulation, contrairement au citrate ou au malate.

Ces observations suggèrent que l'amélioration du rendement en spores pourrait être attribuée à une modulation des flux de carbone et d'électrons via différentes voies métaboliques, menant à la production de métabolites impliqués directement ou indirectement dans la régulation de la sporogénèse.

I.8. Détermination du nombre de spores

Pour répondre à la demande croissante du marché en endospores de *Bacillus*, une production efficace à grande échelle est nécessaire. Idéalement, d'un point de vue industriel, le milieu de culture sélectionné doit être rentable tout en permettant un temps de culture le plus court possible, une densité cellulaire maximale et un rendement de conversion des endospores de 90 % ou plus. Pour sélectionner ce milieu de culture optimal et définir les paramètres de fermentation associés, une quantification efficace des endospores est essentielle (Biermann & Beutel, 2023, Biermann et al., 2023).

La méthode standard de surveillance des endospores consiste à déterminer les UFC après destruction des cellules végétatives par traitement thermique.

Le comptage des UFC sans traitement thermique reflète le nombre total de cellules viables (flore totale) et permet de calculer le rendement en endospores. Cependant, cette technique est chronophage en raison de la préparation des échantillons et de la période d'incubation requises (Biermann et al., 2022).

Une approche alternative consiste à quantifier l'acide dipicolinique (DPA), un biomarqueur spécifique des endospores, libéré lors de la lyse ou de la germination des endospores.

La concentration en DPA peut être mesurée par dosage colorimétrique au sulfate d'ammonium et de fer (II) (Rotman & Fields, 1968) ou par complexation avec des lanthanides. Le dosage de sulfate d'ammonium et de fer (II) est économique, mais il est sensible aux antioxydants tels que l'acide ascorbique éventuellement présents dans l'échantillon. En revanche, les dosages à base de lanthanides sont plus coûteux, mais ne sont pas affectés par la présence d'antioxydants (Bi et al., 2023, Hindle & Hall, 1999). Ces dosages DPA ne nécessitent pas d'équipement spécialisé et réduisent considérablement le temps d'analyse par rapport à la méthode CFU. Cependant, ils impliquent toujours des étapes de préparation des échantillons. D'autres méthodes permettent la quantification des endospores par marquage chimique, notamment la spectroscopie Raman, la spectroscopie laser et la cytométrie de flux (Biermann et al., 2022).

Bien que ces techniques permettent une détection et une quantification précises des endospores, elles sont souvent limitées par le coût élevé de l'équipement et la nécessité d'un personnel qualifié.

Une approche plus simple est :

L'observation microscopique, soit après coloration de Schaeffer-Fulton (Hamouda et al., 2002), soit par microscopie à contraste de phase (Biermann et al., 2022).

En microscopie à contraste de phase, les endospores apparaissent comme des structures hautement réfringentes, facilement identifiables par l'expérimentateur ou par analyse d'image automatisée à l'aide d'algorithmes dédiés. Avec la coloration de Schaeffer-Fulton, les endospores se distinguent par leur motif de coloration spécifique. Dans les deux cas, la quantification des spores peut être réalisée à l'aide d'une chambre de comptage Petroff-Hausser.

Par conséquent, les méthodes classiques décrites dans la littérature pour la détection et la quantification des endospores sont souvent chronophages et inadaptées à un suivi en temps réel. Pour surmonter cette limitation, nous proposons une nouvelle approche utilisant une souche de *Bacillus* génétiquement modifiée portant un gène rapporteur codant pour la GFP. Dans ce système, l'expression de la GFP est contrôlée par un promoteur spécifique de la

sporulation régulant un gène essentiel impliqué dans la formation des endospores (Lewis & Errington, 1996). Dans ce contexte, la cytométrie de flux permettra de distinguer avec finesse, spores, cellules végétatives et débris, y compris dans des échantillons mixtes (Comas-Riu & Rius, 2009 ; Grégori et al., 2001). Elle est de plus en plus utilisée pour le suivi de la sporulation ou de la germination à haut débit, notamment dans les études de fermentation.

Enfin, dans un contexte de production industrielle, des systèmes automatisés ont été développés pour permettre la détection et la quantification des endospores in situ, directement à partir de la cuve de fermentation. Ces dispositifs combinent sondes optiques, spectroscopie en ligne, cytométrie automatisée ou encore microfluidique intégrée, et s'inscrivent dans la logique des bioprocédés intelligents et de l'industrie 4.0. Ils permettent un suivi en temps réel des paramètres de sporulation, et offrent la possibilité d'ajuster dynamiquement les conditions de culture (pH, température, aération, etc.) pour optimiser la performance du procédé (Müller et al., 2020 ; Moreira et al., 2021 ; Reichl et al., 2019).

Ainsi, la diversité des techniques disponibles pour la détection des endospores permet d'adapter les stratégies de suivi aux objectifs spécifiques des processus : détection qualitative rapide, quantification précise, compatibilité avec des systèmes automatisés ou encore intégration dans des chaînes de production en continu. Le développement et la combinaison de ces approches participent à l'optimisation des procédés impliquant des bactéries sporulantes et à l'assurance qualité des produits qui en dérivent.

CHAPITRE II. OBJECTIFS

II.1. Contexte scientifique

Les bactéries du genre *Bacillus* se distinguent par leur capacité à former des endospores, structures dormantes et résistantes capables de survivre à des conditions environnementales extrêmes telles que la chaleur, le dessèchement, les variations de pH ou encore les traitements chimiques. Cette propriété confère aux bactéries du genre *Bacillus* un avantage considérable dans la formulation de probiotiques stables et efficaces, en particulier comparés aux bactéries non sporulantes comme celles appartenant au genre les *Lactobacillus*.

Contrairement à ces dernières, les endospores produites par les membres du genre de *Bacillus* peuvent être conservées à température ambiante pendant de longues périodes sans altération significative de leur viabilité. Elles résistent également aux traitements thermiques utilisés dans les procédés industriels et conservent leur fonctionnalité après le passage dans le tractus gastro-intestinal, ce qui les rend particulièrement intéressantes pour des applications dans l'agroalimentaire et la santé humaine.

Aujourd'hui, de nombreuses espèces du genre *Bacillus* sont présentes dans de nombreux produits commerciaux : produits laitiers fermentés, céréales, jus, viandes, aliments pour nourrissons, crèmes glacées, etc. Toutefois, malgré leur potentiel, la maîtrise de la sporulation à l'échelle industrielle reste encore un défi, nécessitant une compréhension approfondie des mécanismes moléculaires qui régulent ce processus complexe.

II.2. Problématique et justification

La sporulation chez *Bacillus sp* est un processus hautement régulé, caractérisé par une succession d'événements morphologiques et transcriptionnels coordonnés faisant intervenir de nombreux gènes, dont les produits jouent pour certains un rôle clef dans ce processus.

Le suivi dynamique de l'expression de ces gènes-clés dans des conditions proches de la production industrielle est encore peu documenté. Une meilleure compréhension de leur régulation permettrait non seulement d'optimiser le rendement en spores viables, mais également de proposer des conditions de culture rationnellement définies, adaptées à une production à grande échelle.

II.3. Objectifs de la thèse

Cette thèse vise à :

(i) sélectionner trois souches du genre *Bacillus* présentant un potentiel probiotique, conformément aux recommandations du comité de thèse 2015 et à la demande croissante du marché.

(ii) Identifier trois gènes clés impliqués dans les premières étapes de la sporulation, susceptibles de constituer des marqueurs précoces et fiables de son initiation, puis analyser leur expression au cours des phases de croissance et de sporulation à l'aide d'un système rapporteur GFP (Green Fluorescent Protein).

Les objectifs spécifiques sont de développer des outils génétiques pour suivre l'induction de trois promoteurs sélectionnés, fusionnés au gène *gfp*, et de les introduire par transformation dans les souches probiotiques retenues. L'étude examinera ensuite l'effet de différents substrats carbonés sur la sporulation, l'expression des gènes cibles et les cinétiques d'expression, à la fois en cultures en Erlenmeyers (échelle laboratoire) et en fermenteur pilote (échelle industrielle).

II.4. Stratégie expérimentale

II.4.1. Constructions génétiques et systèmes de détection

Trois constructions seront réalisées, chacune plaçant le gène *gfp* sous le contrôle d'un des trois promoteurs sélectionnés. Elles permettront de visualiser l'activité de chaque promoteur par mesure de la fluorescence de la GFP. Le gène rapporteur pourra être intégré directement dans le chromosome bactérien ou porté par un plasmide. Les plasmides obtenus seront introduits, par transformation, dans les souches probiotiques retenues.

II.4.2. Cultures à l'échelle laboratoire

Les souches transformées seront cultivées en Erlenmeyers agités dans différents milieux, avec ou sans ajout de substrats carbonés (glucose, xylose, etc.). Les paramètres suivis comprendront :

- la croissance cellulaire (absorbance à 600 nm) ;
- l'évolution du pH du milieu ;
- le comptage de la flore totale et des spores (avant et après traitement thermique) ;
- la fluorescence globale (lecteur de microplaques) ;
- Fluorescence à l'échelle cellulaire (cytométrie de flux).

II.4.3. Cultures à l'échelle pilote

Après optimisation des conditions au laboratoire, les souches seront cultivées dans un fermenteur de 20 l au sein d'une entreprise spécialisée en biotechnologie microbienne. Deux milieux adaptés à la production d'endospores seront comparés. Le suivi inclura :

- la cinétique de croissance (biomasse, pH) ;
- l'expression des gènes d'intérêt par fluorescence ;
- l'efficacité de sporulation (quantité et viabilité des endospores) ;
- l'identification des conditions optimales pour une production industrielle reproductible.

II.5. Résultats attendus et perspectives

Les résultats attendus sont :

- le développement d'outils moléculaires pour un suivi précis de la sporulation chez les bactéries du genre *Bacillus* ;
- l'identification des conditions de culture favorisant l'activation des gènes rapporteurs ;
- l'optimisation des rendements en endospores viables dans un contexte industriel.

À terme, ces travaux permettront de mieux maîtriser les processus de sporulation chez les bactéries du genre *Bacillus* d'intérêt industriel et d'ouvrir la voie à l'ingénierie de souches sporulantes répondant à des exigences spécifiques, pour des applications probiotiques, agricoles ou environnementales.

CHAPITRE III. MATERIEL ET METHODES

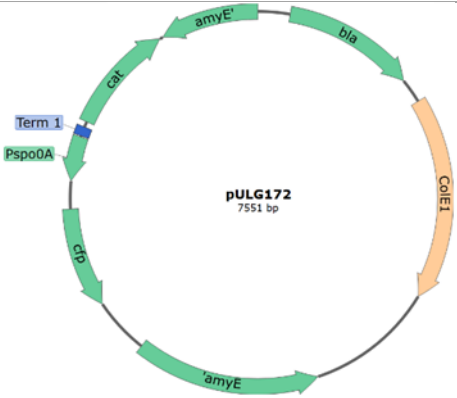

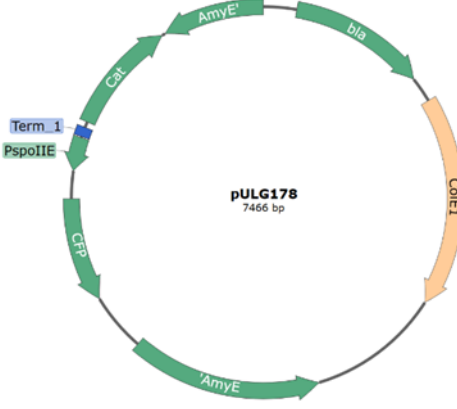
III.1. Techniques de biologie moléculaire

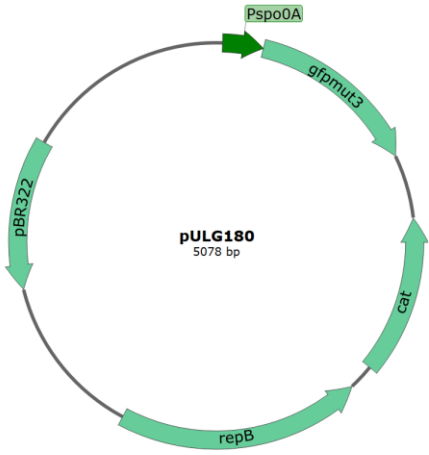
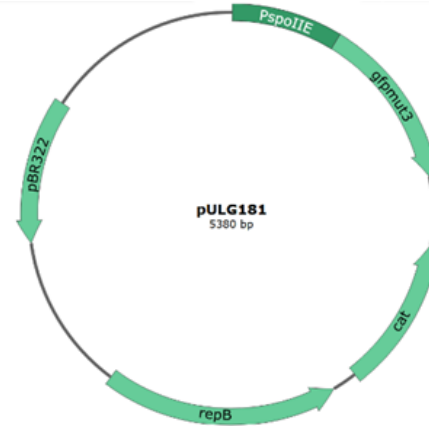
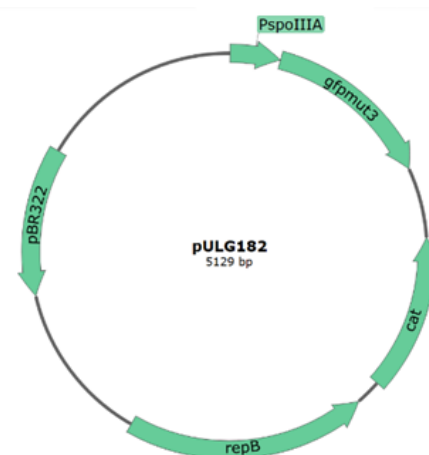
III.1.1. Vecteurs

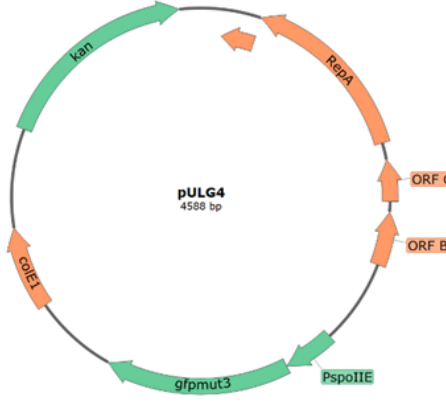
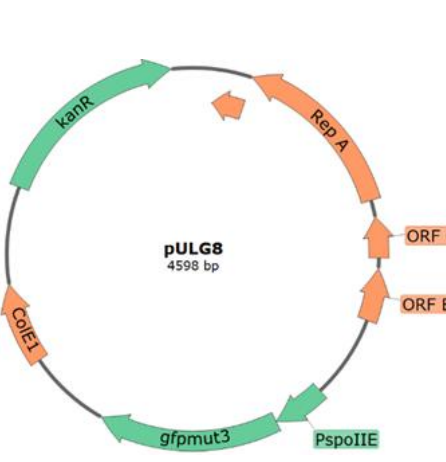
Les techniques de biologies moléculaires, la construction des vecteurs réalisés dans ce travail ainsi que les primers sont décrits ci-après.

Tableau III.1 Vecteurs d'intérêt construits et utilisés dans ce travail

Vecteur	Utilisation	Source
<p style="text-align: center;">pBPG211 9,143 bp</p>	<p>Gène d'intérêt</p> <p>Vecteur dérivé du pDML995 où le gène <i>BlaP</i> est remplacé par le gène rapporteur <i>gfpmut3</i></p> <p>Ce plasmide a été utilisé pour amplifier le gène rapporteur <i>gfpmut3</i>.</p>	<p>Thèse M. Dauvin</p>
<p style="text-align: center;">pDG1792 3992 bp</p>	<p>Gène d'intérêt</p> <p>Gène codant la Kanamycine <i>KanR</i>.</p> <p>Plasmide utilisé pour amplifier le gène de résistance à la kanamycine <i>KanR</i>.</p>	
<p>pJET1.2_Pspo0A</p>	<p>Gène d'intérêt</p> <p>Clonage par ligation du gène codant le promoteur <i>Pspo0A</i> obtenu par PCR depuis l'ADN génomique de <i>B. licheniformis</i> avec les primers <i>Pspo0A_up</i> et <i>Pspo0A_rp</i></p>	<p>Ce travail</p>
	<p>Gène d'intérêt</p> <p>Clonage du gène codant le promoteur <i>Pspo0A</i> de <i>B. licheniformis</i> DSM13 en aval du gène rapporteur <i>cfp</i>.</p> <p>Clonage en BamHI du promoteur <i>Pspo0A</i> obtenu par digestion en BamHI du plasmide pJET1.2_Pspo0A</p>	<p>Ce travail</p>

	
<p>pJET1.2_Psp00A</p>	<p>Gène d'intérêt</p> <p>Ce travail</p> <p>Clonage par ligation du gène codant le promoteur <i>Psp00A</i> obtenu par PCR depuis l'ADN génomique de <i>B. licheniformis</i> avec les primers Psp00A_up et Psp00A_rp</p>
	<p>Gène d'intérêt</p> <p>Ce travail</p> <p>Clonage du gène codant le promoteur <i>Psp00A</i> en aval du gène rapporteur <i>cfp</i> dans le plasmide pCFP-star.</p> <p>Clonage en BamHI du promoteur <i>Psp00A</i> obtenu par digestion en BamHI du plasmide pJET1.2_Psp00A</p>
<p>pJET1.2_Psp01E</p>	<p>Gène d'intérêt</p> <p>Clonage par ligation du gène codant le promoteur <i>Psp01E</i> obtenu par PCR depuis l'ADN génomique de <i>B. licheniformis</i> avec les primers Psp01E_up et Psp01E_rp</p>
	<p>Gène d'intérêt</p> <p>Clonage du gène codant le promoteur <i>Psp01E</i> en aval du gène rapporteur <i>cfp</i> dans le plasmide pCF-Star.</p> <p>Clonage en BamHI du promoteur <i>Psp01E</i> obtenu par digestion en BamHI du plasmide pJET1.2_Psp01E</p>

	<p><u>Gène d'intérêt</u> Ce travail</p> <p>Gène codant le promoteur <i>Pspo0A</i> fusionné au gène rapporteur <i>gfpmut3</i>.</p> <p><u>Clonage</u></p> <p>Clonage de l'amplicon <i>Pspo0A</i> amplifié par triple PCR comme suit : PCR1 à partir du génome de <i>B.coagulans</i> DSM1 avec les primers <i>Pspo0A_BC_UP</i> et <i>Psp0A_BC_RP</i> et PCR2 à partir du plasmide <i>pNW33N</i> amplifié avec les primers <i>Gfp_Pspo0A_up</i> et <i>Gfp_pNW33N_RP</i>. PCR3 pour fusionner les deux amplicons avec les primers <i>Psp0A_BC_UP</i> et <i>Gfp_pNW33N_RP</i>.</p>
	<p><u>Gène d'intérêt</u> Ce travail</p> <p>Gène codant le promoteur <i>Psp01E</i> fusionné au gène rapporteur <i>gfpmut3</i>.</p> <p><u>Clonage</u></p> <p>Clonage de l'amplicon <i>Psp01E</i> amplifié par triple PCR comme suit : PCR1 à partir du génome de <i>B. coagulans</i> DSM1 avec les primers <i>Psp01E_BC_up</i> et <i>Psp01E_BC_rp</i> et PCR2 à partir du plasmide <i>pNW33N</i> amplifié avec les primers <i>Gfp_Psp01E_up</i> et <i>Gfp_pNW33N_rp</i>. PCR3 pour fusionner les deux amplicons avec les primers <i>Psp01E_BC_up</i> et <i>Gfp_pNW33N_rp</i>.</p>
	<p><u>Gène d'intérêt</u> Ce travail</p> <p>Gène codant le promoteur <i>Psp01A</i> fusionné au gène rapporteur <i>gfpmut3</i>.</p> <p><u>Clonage</u></p> <p>Clonage de l'amplicon <i>Psp01A</i> amplifié par triple PCR comme suit : PCR1 à partir du génome de <i>B.coagulans</i> DSM1 avec les primers <i>Psp01A_BC_up</i> et <i>Psp01A_BC_RP</i> et PCR2 à partir du plasmide <i>pNW33N</i> amplifié avec les primers <i>Gfp_Psp01A_up</i> et <i>Gfp_pNW33N_rp</i>. PCR3 pour fusionner les deux amplicons avec les primers <i>Psp01A_BC_up</i> et <i>Gfp_pNW33N_rp</i>.</p>

	<p>Gène d'intérêt Ce travail</p> <p>Gène codant le promoteur <i>PspolIE</i> fusionné au gène rapporteur <i>gfpmut3</i>.</p> <p>Clonage</p> <p>Clonage de l'amplicon <i>PspolIE</i> amplifié par triple PCR comme suit : PCR1 à partir du génome de <i>B. subtilis</i> 168 avec les primers <i>PspolIE</i>-Bs1_up et <i>PspolIE</i>-Bs2_rev et PCR2 à partir du plasmide pBPG211 amplifié avec les primers <i>PspolIE</i>-Bs3_up et <i>PspolIE</i>-GFP_end_rev. PCR3 pour fusionner les deux amplicons avec les primers <i>PspolIE</i>-Bs1_up et <i>PspolIE</i>-GFP_end_rev.</p>
	<p>Gène d'intérêt Ce travail</p> <p>Gène codant le promoteur <i>PspolIE</i> fusionné au gène rapporteur <i>gfpmut3</i>.</p> <p>Clonage</p> <p>Clonage de l'amplicon <i>PspolIE</i> amplifié par triple PCR comme suit : PCR1 à partir du génome de <i>B. licheniformis</i> DSM13 avec les primers <i>PspolIE</i>-BI1_up et <i>PspolIE</i>-BI2_rev et PCR2 à partir du plasmide pBPG211 amplifié avec les primers <i>PspolIE</i>-BI3_up et <i>PspolIE</i>-GFP_end_rev. PCR3 pour fusionner les deux amplicons avec les primers <i>PspolIE</i>-BI1_up et <i>PspolIE</i>-GFP_end_rev.</p>

III.1.2. Les primers

Les noms des primers utilisés dans ce travail, leurs séquences ainsi que leur source sont décrits dans le tableau ci-dessous.

Tableau III.2. Listes des primers utilisés dans ce travail (a)

Nom	Séquence 5'-3'	Source
1.Construction des plasmides pULG_B. subtilis		
PspollE-Bs1_up	TCGAATTCGCGGATCCATCCTAACAAATCGGTTTCTCTTGC	EGT (b)
PspollE-Bs2_rev	TTCCTCTCATCTCCCACCTGTTATATTCG	EGT
PspollE-Bs3_up	CAGGTGGGAGATGAGAGGAAATGCGTAAAGGAGAAGAAGCTTTTCACTGG	EGT
PspollE-GFP_end_rev	TAATGCAGGGGATCCTTATTTGTATAGTTCATCCATGCCATGTG	EGT
2.Construction des plasmides pULG_B. licheniformis		
PspollE-BI1_up	TCGAATTCGCGGATCCATTCCGGAACCGGCTTCTCTGAAGC	EGT
PspollE-BI2_rev	TGCTCTCATCTCCCACCTGTTTATTCG	EGT
PspollE-BI3_up	CGAATAAACGAGTGGGAGATGAGAGCAATGCGTAAAGGAGAAGCTTTTCACTGG	EGT
3.Construction des plasmides pULG172 et pULG174 de B. licheniformis DSM13=ATCC14580		
Pspo0A_up	GTACCATCGTGGATCCGTTTCTTCTCCCAATGTGTATGTTG	EGT
Pspo0A_RP	TTTTTCACACGGATCCACTGCCGGATTCTCCGGCAGTTTTTG	EGT
PspollIA_up	GTACCATCGTGGATCCAAACACTCCCTCCTTTTTGCTTGCTTC	EGT
PspollIA_RP	TTTTTCACACGGATCCCACACATGATAAGAGAGGCCGAC	EGT
4.Construction des plasmides pULG178 de B. licheniformis DSM13=ATCC14580		
PspollE_lich_1	GGATCCATTCCGAAACCGGCTTCTTCTG	EGT
PspollE_lich_2	TGCTCTCATCTCCCACCTGTTTATTCG	EGT
PspollE_lich_3	CGAGTGGGAGATGACAGGAACGATGGTACCCCGCGGTAAG	EGT
PspollE_lich_4	GATATCATCATCGCTCATCCATGTGCG	EGT
5.Construction des plasmides pNW33N-gfp pour B. coagulans DSM1=ATCC7050		
Psp0A_BC_up	TTGTGAAATTGAATTCCTGCCACTGCTCCTCAAAAAATAGC	EGT
Psp0A_BC_rp	TGCATTATCTATCATTATAATGCGTGAGGACG	EGT
Gfp_Psp0A_up	GAGGGGGAGTTTATGATGAATTATGCGTAAAGGAGAAGAAGCTTTTCACTGG	EGT
PspIIIE_BC_up	TTGTGAAATTGAATTCATTGCTGTCTAGTTGACTCATATATCCG	EGT
PspIIIE_BC_rp	AATCATCATAAACTCCCCCTCATCACTTTG	EGT
GFP_PspollE_up	GAGGGGGAGTTTATGATGAATTATGCGTAAAGGAGAAGAAGCTTTTCACTGG	EGT
PspIIIIE_BC_up	TTGTGAAATTGAATTCATTTCTTTGAAAAAGCTTGCGTCCCAACGG	EGT
PspIIIIE_BC_rp	TCTTCATCCCTGCTTTCAAACATACAGTTTGG	EGT
Gfp_PspollIA_up	GTATGTTTTGAAAGCAGGGATGAAGAATGCGTAAAGGAGAAGAAGCTTTTCA CTG G	EGT
Gfp_pNW33N_rp	CGACTCTAGAGGATCCTTATTTGTATAGTTCATCCATGCCATGTGTAATC	EGT

(a) Les positions des séquences dans les génomes peuvent être obtenues en utilisant Blastn du NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>); (b) Eurogentec

III.1.3. Les enzymes

Les enzymes de restriction et les polymérases utilisées au cours de cette thèse sont repris dans le tableau ci-dessous ainsi que leur distributeur. Elles ont été utilisées suivant les recommandations du fournisseur.

Tableau III.3 Les enzymes de restriction utilisées dans ce travail

Nom de l'enzyme	Site de reconnaissance	Source
NcoI	5'C/CATGG...3' 3'G GTAC/C..5'	Promega
XhoI	5'C/TCGAG...3' 3'G AGCT/C..5'	Promega
XbaI	5'T/CTAGA...3' 3'AGATC/T...5'	Promega
HindIII	5'A/AGCTT...3' 3'TTCGA/A...5'	Promega
BamHI	5'G/GATCC...3' 3'CCTAG/G...5'	Promega
EcoRI	5'G/AATTC...3' 3'CTTAA/G...5'	Promega

/ : Site de clivage

5'...C/ : Bout collant

Tableau III.4 Les polymérases

Nom	Vitesse d'élongation à 72°C	Activité	Reference
GoTaq	1kb/min		Promega
Phusion® fidelity	High	1kb/15sec pour l'ADN complexe	Polymérase 5'-3'
		1kb/30sec pour l'ADN génomique	Exonucléase 3'-5'
phi29	>10kb AND plasmidique et ADN génomique	Exonucléase 3'-5' Polymerase 5'-3'	GE health care

III.1.4. Extraction d'ADN génomique depuis *Bacillus spp*

L'extraction et la purification de l'ADN génomique de *B. licheniformis* et *B. subtilis* ont été réalisées à l'aide du kit « GenElute™ Bacterial Genomic DNA » (Sigma) et comme suit. Un millilitre d'une préculture d'une nuit est centrifugé, après élimination du surnageant le culot est resuspendu dans une solution composée de 480 µl d'EDTA 50 mM, 120 µl de lysozyme (10mg/ml). Le mélange est ensuite incubé à 37 °C pendant 20 minutes, puis centrifugé pendant 2 minutes. Le culot ainsi obtenu est resuspendu dans 600 µl de la solution de lyse du kit (nucleic lysis solution) de chez Promega. Le mélange est vortexé jusqu'à l'obtention d'une solution homogène puis incubé à 80 °C pendant 5 minutes avant d'être incubé sur paillasse pendant 5 minutes. Un demi-microlitre de la solution de RNase est ajouté puis la solution est homogénéisée en inversant les tubes, ensuite, les protéines ont été précipitées par l'ajout de 20 µl de la solution 'Protein precipitation solution ». La solution est vortexée pendant vingt secondes, avant d'être incubée sur glace pendant 5 minutes, puis centrifugée pendant 3 minutes à 14 000 g à 4 °C. Le surnageant est transféré dans un tube contenant 600 µl d'isopropanol. Le mélange est homogénéisé, en inversant les tubes plusieurs fois jusqu'à l'apparition d'une masse d'ADN. Celui-ci est collecté par centrifugation (2 minutes à 14000 g à 4 °C). Après élimination du surnageant le culot est lavé avec 600 µl d'éthanol 70 %, les tubes sont, ensuite, séchés sur du papier absorbant. L'ADN est solubilisé dans 500 µl d'eau stérile en incubant le culot à 65 °C pendant une heure.

III.1.5. Extraction de l'ADN plasmidique

La mini-préparation d'ADN plasmidique, ou miniprep, a été réalisée en suivant le protocole décrit dans le kit « GenJet Plasmid Miniprep » kit #K0502, #K0503" (thermoscientific). Les miniprep ont été réalisées à partir d'1 ml d'une culture d'une nuit.

III.1.6. Amplification par PCR

Les amplifications d'un fragment nucléique par « polymérase chain reaction » (PCR) ont été réalisées selon les conditions recommandées par le fournisseur. Au cours de ce travail deux DNA polymérases ont été utilisées : la DNA GoTaq polymérase (Promega) et la Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase (Finnzyme). Cette dernière étant recommandée pour sa performance et sa fidélité lorsque les fragments de plus de 2 000 bp sont amplifiés.

III.1.6.1. Fusion d'amplicons par triple PCR

Les fragments pour la construction des vecteurs navettes *Bacillus/E. coli* ont été obtenus par la méthode dite de la triple PCR comme schématisé dans la **Figure III.1**. Le **Tableau III.5** reprend les conditions expérimentales des trois PCR.

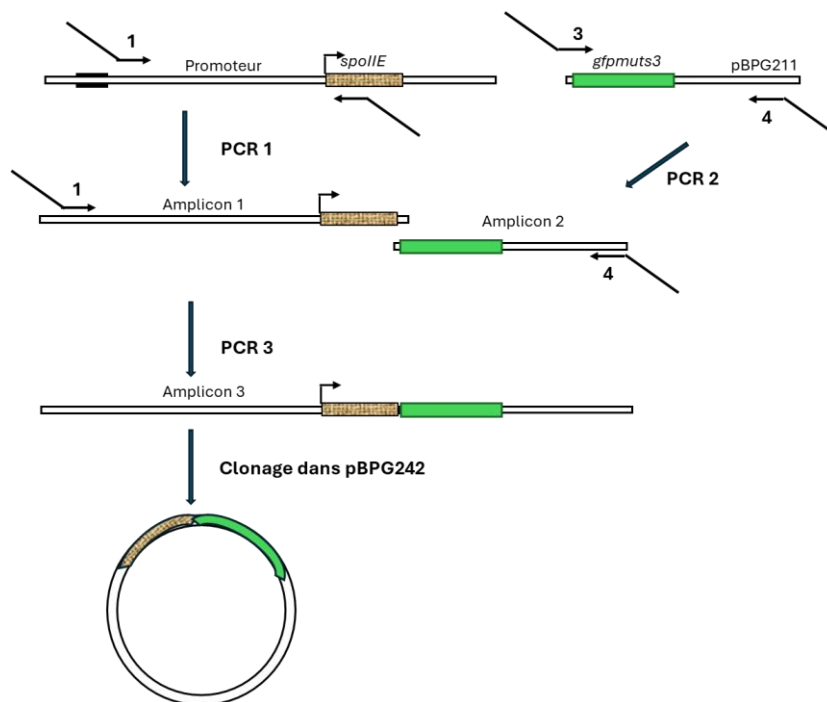


Figure III.1. Schéma de la Triple PCR réalisé pour fusionner la région promotrice en amont d'un gène de sporulation avec la *gfpmutS3* et le clonage de l'amplicon final dans le plasmide

La première PCR (PCR1) est réalisée avec les oligos 1 et 2 et permet l'amplification des régions promotrice (± 200 pb) en amont de l'ATG du gène de sporulation sélectionné. L'Oligo 1 contient une queue flottante pour permettre le clonage de l'amplicon final dans le plasmide choisi.

La deuxième PCR (PCR 2) avec les oligos 3 et 4 permet l'amplification du gène codant pour la *gfp-muts3* sans son promoteur. Les oligos 3 et 4 contiennent chacun une queue flottante.

Celle de l'oligo 3 contient la séquence de l'oligo 2 et celle de l'oligo 4, une séquence pour permettre le clonage de l'amplicon final dans le plasmide sélectionné.

La troisième PCR (PCR 3) est réalisée en utilisant comme matrice les amplicons obtenus lors des PCR 1 et PCR 2 et les oligos 1 et 4 comme amplimères. Après amplification, l'amplicon obtenu contient le gène de la *gfp-muts3* sous la dépendance de la région promotrice du gène de sporulation sélectionné et à ses extrémités des séquences nucléotidiques qui permettent son clonage dans le plasmide choisi.

Tableau III.5 Conditions expérimentales pour réaliser les expériences de triple PCR

PCR 1 et 2	Température °C	Durée	Nombre de cycle
Dénaturation initiale	98	1 min.	
Dénaturation	98	10 sec.	26 x
Hybridation	50	30 sec.	
Elongation	72	1 min.	
Elongation finale	72	5 min.	

Tableau III.6 Programme PCR utilisé pour fusionner les amplicons 3

PCR 3	Température °C	Durée	Nombre de cycle	Température °C	Durée	Nombre de cycle
Dénaturation initiale	98	1 min.		/	/	/
Dénaturation	98	10 sec.	3x	98	10 sec.	25 x
Hybridation	48	30 sec.		55	30 sec.	
Elongation	72	1 min.		72	1 min.	
Elongation finale	72	/		72	min.	/

III.1.6.2. TempliPhi

La méthode TempliPhi est basé sur l'utilisation de l'ADN polymérase du bactériophage $\Phi 29$ pour réaliser une amplification isotherme d'un ADN circulaire mono- ou bicaténaire et de générer un ADN bicaténaire linéaire contenant plusieurs concatémères du DNA circulaire qui a servi de matrice (Reagin et al., 2003). Cette amplification peut être réalisée à partir d'une colonie, d'une culture ou d'un plasmide purifié. Chez *Bacillus sp.* lors de la transformation

naturelle le complexe protéique qui transporte l'ADN exogène à l'intérieur de la cellule bactérienne reconnaît un ADN bicaténaire linéaire et le fragment libéré à l'intérieur de la cellule est monocaténaire (I. Chen et al., 2005). Le résultat de l'amplification TempliPhi est un matériel de choix pour réaliser la transformation naturelle de *B. licheniformis* et *H. coagulans*.

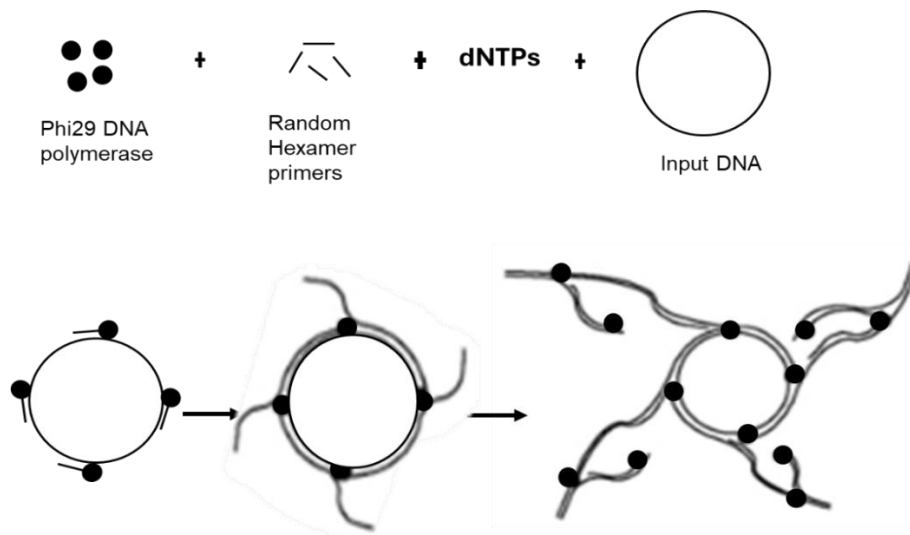


Figure III.2 Représentation schématique de l'amplification isotherme TempliPhi

Des hexamères aléatoires servent d'amorces pour la DNA polymerase $\Phi 29$. Chaque brin nouvellement synthétisé peut servir de matrice et le résultat final de l'amplification est de l'ADN bicaténaire linéaire contenant plusieurs concatémères de la matrice initiale. Schéma repris du manuel d'utilisation TempliPhi de Cystivia.

III.1.7. Electrophorèse sur gel d'agarose

La séparation et l'analyse des tailles des fragments d'ADN ont été réalisées par électrophorèse sur gel d'agarose (1 %) et en utilisant du tampon TAE (Tris-acetate 40 mM, pH, EDTA 2 mM, acide acétique glacial 5,7 % pH 8) puis additionnée d'un agent intercalant, ici, du bromure d'éthidium (0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$). La migration sur gel d'agarose se fait dans du tampon TAE (100mV, 30 min). Après élimination de l'excès du Bromure d'éthidium par une incubation dans l'eau, les fragments de l'ADN sont visualisés grâce à la fluorescence du bromure d'éthidium intercalé entre les paires de base. La taille des fragments est déterminée grâce à un marqueur de taille moléculaire O'gene ruler 1kb DNA Ladder (250-10 000 pb).

III.1.8. Purification des fragments d'ADN

Différents kits ont été utilisés pour purifier les fragments d'ADN résultant soit d'une PCR soit d'une digestion d'ADN par les enzymes de restriction ; notamment "GeneJet Gel Extraction

Kit"(Thermoscientific) et "PCR clean-up Gel extraction". Les purifications ont été réalisées selon les instructions du fournisseur.

III.1.9. Quantification des acides nucléiques

Les concentrations des solutions contenant du matériel nucléique ont été déterminée par mesure de leur absorbance à 260 nm (4 µl d'échantillon) à l'aide d'un spectrophotomètre Nanovue® (GE HealthCare). Si nécessaire l'échantillon est dilué pour être dans la gamme de mesure (A^{600} entre 0,1 et 2) et suivant la règle 1 unité $A^{600}=0,02$ µg/ml d'acide nucléique bicaténaire. La contamination de la préparation par des protéines est également évaluée en calculant le rapport (A^{260}/A^{280} doit être entre 1,7 et 1,9).

III.1.10. Techniques de clonage et construction des plasmides

Les techniques de clonages utilisés dans ce travail reposent sur la linéarisation préalable du vecteur d'intérêt par l'action d'un ou deux enzymes de restriction. Les digestions ont été réalisées selon les recommandations des fournisseurs (Promega).

Clonage par recombinaison homologue

La technique d'In- fusion est réalisée grâce au kit " In-Fusion® HD Cloning Kit"(Clontech). Son principe est basé sur la propriété de l'enzyme In-fusion qui fusionne deux ou plusieurs fragments d'ADN par exemple l'insert (un fragment d'ADN produit de PCR) et le vecteur linéarisé en reconnaissant une séquence de 15pb en commun à leurs extrémités.

Clonage par ligation

La ligation est réalisée en mélangeant des quantités équimolaires du plasmide et du fragment à insérer digéré par la ligase T4 (Fermentas). Pour éviter la ligation du vecteur sur lui-même lorsque le plasmide a été clivé par une seule enzyme de restriction ou que les extrémités sont compatibles, les extrémités 5' du vecteur ont été déphosphorylé au préalable par l'action d'une alcaline Phosphatase (NEB). Selon l'expérience, les fragments provenant d'une amplification ont été clonés directement dans le vecteur pJet1.2 afin de purifier et d'amplifier le fragment d'intérêt avant le clonage dans le vecteur final. Après transformation et purification du plasmide recombinant, la présence de l'insert a été vérifiée par la digestion du plasmide par les enzymes de restriction utilisés lors de la digestion préparative de ce dernier.

III.1.11. Séquençage de l'ADN

Le séquençage des fragments d'ADN a été réalisé par la méthode de terminaison des chaînes de Sanger et à l'aide d'un séquenceur automatique d'ADN d'ABI (Sanger et al., 1977).

III.2. Techniques de bactériologie générale

III.2.1. Souches

Les souches d'intérêt construites et utilisées dans ce travail ainsi que leurs références sont décrites dans le tableau ci-dessous.

Tableau III.6 Souches d'intérêt construites et utilisées dans ce travail

Souche	Génotype	Référence
<i>E. coli</i>		
DH5α	F Φ 80lacZ Δ M15 Souche utilisée pour l'amplification des plasmides	Invitrogen
<i>B. subtilis</i>		
168 WT	<i>trpC2</i>	BGSC
KM 81 (JH 642 amyE::PspolIE-gfp spc)	<i>trpC2 pheA1</i> Mutant de <i>B. subtilis</i> 168 chez lequel l'opéron <i>bla</i> de <i>B. licheniformis</i> , dont le gène codant pour la β -lactamase BlaP a été remplacé par le promoteur du gène de la sporulation <i>spoIIIE</i> et le gène codant pour la GFPmut3, a été inséré dans le site de l'amylase E.	Hoover et al. 2010
pBPG211	Vecteur dérivé du pDML995 où le gène <i>blaP</i> est remplacé par le gène codant pour la GFPmut3.	Thèse M. Dauvin
Bs_pULG4	La souche de <i>B. subtilis</i> contenant le plasmide pULG4	Ce travail
<i>B. licheniformis</i> DSM13/MW3		
DSM13	Souche sauvage produisant une β -lactamase inducible par la présence d'antibiotiques à noyau β -lactame dans le milieu.	ATCC 14580
DSM13 MW3	Souche dérivée de la DSM13 permettant le maintien d'ADN étranger dans la cellule par inactivation des endonucléases majeures.	(Hoffman et al, 2010)
DSM13 MW3/pMMcomK	MW3 arborant le plasmide pMMcomK permettant la transformation de la souche par compétence naturelle grâce à l'induction du gène <i>comK</i> sous le contrôle du promoteur xylose.	(Hoffman et al, 2010)
BI_pULG172	La souche de <i>B. licheniformis</i> DSM13/MW3 contenant le plasmide pULG172.	Ce travail

BI_pULG174	La souche de <i>B. licheniformis</i> DSM13/MW3 contenant le plasmide BI_pULG174.	Ce travail
BI_pULG178	La souche de <i>B. licheniformis</i> DSM13/MW3 contenant le plasmide pULG178.	Ce travail
BI_pULG8	La souche de <i>B. licheniformis</i> DSM13/MW3 contenant le plasmide pULG8.	Ce travail
<i>H. coagulans</i> DSM1		
DSM1	La souche de <i>H. coagulans</i> DSM1 capable de produire de l'acide lactique	ATCC 7050
Bc_pULG180	La souche de <i>H. coagulans</i> DSM1 contenant le plasmide Bc_pULG180	Ce travail
Bc_pULG181	La souche de <i>H. coagulans</i> DSM1 contenant le plasmide Bc_pULG181	Ce travail
Bc_pULG182	La souche de <i>H. coagulans</i> DSM1 contenant le plasmide Bc_pULG182	Ce travail

III.2.1.1. Conditions de culture et conservation des souches

Les cultures en routine d'*E. coli* et *Bacillus spp* ont été réalisées en milieu liquide à 37 °C sous agitation orbitale (250 rpm) ou sur un milieu solide pendant 16 heures. Les souches ont été conservées à -80 °C dans du milieu LB additionné du glycérol (40 % W/V).

Les boîtes de culture en milieu solide des souches de *B. subtilis*, *B. licheniformis* et *H. coagulans* ont été conservées à température ambiante sous forme de spores ou à 4 °C. Les souches d'*E. coli* sur milieu solide ont été conservées à 4 °C pendant 1 mois.

Les cultures en fermenteurs ont été réalisées en milieu liquide à 37 °C, sous une agitation (300 rpm). Le pH a été régulé à ± 7 par l'ajout de H₃PO₄ (12 %) ou de KOH 12,5 % et l'aération est maintenue à 1VVM (volume d'air injecté par unité de volume du milieu de croissance par minute).

III.2.1.2. Milieu de culture

Les milieux de culture utilisés dans ce travail sont décrits dans le tableau ci-dessous.

Tableau III.7 Les milieux de cultures utilisés dans ce travail

Milieu	Composition pour un litre	Référence
Luria-Bertani (LB)	tryptone 10 g, extrait de levure 5 g, Chlorure de sodium 10 g	BD Difco™

Luria-Bertani/agar LBA	tryptone 10 g, extrait de levure 5 g, Chlorure de sodium 10 g, agar 21 g	BD Difco™
MD	500 ml de tampon phosphate-citrate (K ₂ HPO ₄ 107 g/l, KH ₂ PO ₄ 60 g/l, citrate ferrique 100 g/l), 100 ml de glucose 20 %, 10 ml de L-tryptophane (5 mg/ml), 5 ml de citrate d'ammonium ferrique (2,2 mg/ml), 25 ml d'aspartate de potassium (100 ng/ml), 3 ml de MgSO ₄ 1M et 357 ml d'eau distillée.	
LM	1 l du milieu LB, 3 ml de MgSO ₄ 1 mM en concentration finale, et 10 ml de L-tryptophane (5 mg/ml).	
Milieu BH	37 g de Bacto Brain Heart infusion et 1 L d'eau distillée.	
Super Optimal broth with catabolic repressor (SOC)	10 g de bactotryptone, 5 g d'extrait de levure, 10 g de NaCl, 10 mM de MgSO ₄ , 10 mM de MgCl ₂ , 20 mM de glucose.	
#416-media	20 g de tryptone, 10 g d'extrait de levure, 10 g de NaCl, 0.2 g de sucrose	(Waschkau et al., 2008)
Glycerol based electroporation media	Base LB, Sorbitol 0,5 M, glycérol 10 %	(Waschkau et al., 2008)
SSM(2x)	171 g de sucrose, 2,32 g acide maléique, 1,9 g MgCl ₂	(Waschkau et al., 2008)
SSMP	Antibiotic broth 4x, 250 ml, SMM 2x 250ml	(Waschkau et al., 2008)
SSM	Extrait de viande 3 g, Peptone 5 g, KCl 1g, MgSO ₄ .7H ₂ O 0,25 g, NaOH 0,04 g, Ca(NO ₃) ₂ 0.2361g, MnCl ₂ 0,002 g, FeSO ₄ 0,0003 g	(Waschkau et al., 2008)
Milieu BC liquide/BC agar (pH 6.6 - 6.7)	Extrait de levure 10 g, di-ammonium-phosphate 2 g, di-ammoniumsulphate 3,5 g, Bis-Tris buffer (bis [2-hydroxymethyl] iminotris [hydroxymethyl]-methane 10 g, CaCl ₂ 3 mg, MgCl ₂ 5 mg, sucrose 50 g. Agar 20 g, MgCl ₂ 1 g, CoCl ₂ 6 H ₂ O 0.2 mg, CuCl ₂ 2 H ₂ O 0,01 mg, H ₃ BO ₃ 3 mg, Na ₂ MoO ₄ 2 H ₂ O 0,03 mg, NiSO ₄ . 6 H ₂ O 0,02 mg, MnCl ₂ 4 H ₂ O 0,03 mg ZnCl ₂ 0,05 mg	(Van Kranenburg et al., 2007)
Competence medium (C-broth), pH 6.8	Extrait de levure 0,05 g, di-ammonium-phosphate 2 g, di-ammonium sulphate 3,5 g, glucose 10 g, CaCl ₂ 10 mg, KCl 0,5 g, MgCl ₂ 25 mg. Stériliser (20 min 121 °C) et ajouter les éléments suivants séparément CoCl ₂ 2,4 mg, FeCl ₃ 3,6 mg, MnCl ₂ 3 mg,	(Van Kranenburg et al., 2007)

	ZnCl ₂ 1,2 mg biotine 0,024 mg, thiamine 0,012 mg, méthionine 20 mg	
M1	Peptone de caséine 10g, extrait de levure 5 g, tryptone, 2,5 g, KH ₂ PO ₄ 2 g, CaCl ₂ .H ₂ O 0,05 g, MgSO ₄ .7H ₂ O 0,2 g, MnSO ₄ .H ₂ O 0,003 g, ZnSO ₄ .7H ₂ O 0,0045, CuSO ₄ .5H ₂ O 0,0025 g	Ce travail
Milieu de régénération à base de M1	Peptone de caséine 10 g, extrait de levure 5 g, NaCl ₂ 5 g, Sucrose 0,5 mM 171,06 g, Glucose 55.6 mM 10 g, MgCl ₂ 2mM 0,19 g, CaCl ₂ .H ₂ O 1mM 0,11g	Ce travail
Milieu SG pour 500 ml	Glycerol 10 % 50g, Sucrose 0,5M 85,533 g, MgCl ₂ 1mM 0,0475	Ce travail

III.2.2. Les antibiotiques

La description des antibiotiques utilisés dans ce travail et la concentration finale propre à chaque souche sont présentées dans le tableau ci-dessous.

Tableau III.8 Les antibiotiques utilisés dans ce travail.

Antibiotique	Famille	Cible	Concentration (µg/ml) dans <i>E.coli</i>	Concentration (µg/ml) dans <i>Bacillus spp</i>	Reference
Ampicilline	β-lactamine	Synthèse de la paroi de PG	100	/	Sigma-Aldrich
Kanamycine	Aminoglycoside	Synthèse des protéines	50	10	Merck
Spectinomycine	Aminoglycoside	Synthèse des protéines		100	Sigma-Aldrich
Chloramphénicol	Phénicolés	Synthèse des protéines	30	10	Calbiochem
Tétracycline	Tétracycline	Synthèse des protéines	/	12.5	Sigma-Aldrich

III.2.3. Détermination de la concentration minimale inhibitrice

La CMI ou Concentration Minimale Inhibitrice est la concentration d'antibiotique la plus faible pour laquelle la croissance bactérienne est inhibée.

Une solution de céphalosporine est préparée avec de l'eau stérile et filtrée grâce à un filtre de porosité 0,22 µm. Ensuite des dilutions de l'antibiotique allant de 0 µg/ml à 20 µg/ml sont réalisées dans du milieu BH. 100 µl de chaque solution sont déposés dans les puits d'une plaque multipuits.

L'isolement des souches à étudier est réalisé sur du milieu LB agar sans antibiotique et incubé à 37 °C pendant 16 heures. La suspension bactérienne est réalisée en diluant quelques colonies dans 5 ml du sérum physiologique et comparée avec un témoin correspondant à 0,5 unité de l'échelle de turbidité de McFarland.

Ensuite, la suspension est diluée 100X dans 5 ml de milieu BH. 100 µl de cette suspension sont ajoutés dans les puits de la plaque multipuits dans lesquels la solution d'antibiotique est déjà déposée. Finalement, chaque puits contient un volume de 200 µl. 200 µl de BH seul sont ajoutés comme contrôle négatif.

La plaque multipuits recouverte de son couvercle est déposée dans un bassin contenant du papier absorbant humidifié pour éviter l'évaporation pouvant survenir lors de l'incubation. Ensuite, la plaque est incubée à 37 °C pendant 16 heures. La CMI est déterminée par le puits qui contiennent la plus faible concentration d'antibiotique dans laquelle aucune croissance n'est visible.

III.2.4. Préparation des cellules compétentes et transformation d'*E. coli*

Une préculture d'*E. coli* dans 5 ml LB est incubée à 37 °C pendant 16 heures. Ensuite, 100 ml de milieu liquide LB sontensemencés avec 1 ml de cette préculture. La culture est incubée à 37 °C jusqu'à ce que l' A^{600} atteigne 0,5. La culture est stoppée en plaçant la fiole dans la glace pendant 10 minutes.

Les cellules bactériennes sont collectées par centrifugation (3000 g, 10 min., 4 °C). Le culot bactérien est resuspendu dans 10 ml de tampon TFB1 filtré stérilement (0,22 µm). La solution bactérienne est incubée 90 minutes sur glace puis centrifugée (3000 g, 10 min., 4 °C). Le culot bactérien est resuspendu dans 2 ml de tampon TFB2 filtré stérilement (0,22 µm). A ce stade, les cellules *E. coli* sont rendues compétentes et sont aliquotées par 100 µl et conservées à – 70 °C.

Pour transformer *E. coli*, 50 ng de plasmide purifié sont ajoutés à 100 µl de cellules compétentes. Ce mélange est incubé sur glace pendant 30 minutes puis soumis à un choc thermique de 60 secondes à 42 °C. Ensuite, 900 µl de milieu SOC sont ajoutés et le tout est incubé à 37 °C pendant 1 h 30. La sélection des clones transformés s'effectue par étalement

sur milieu LB Agar additionné d'un antibiotique approprié. Les boîtes de Pétri sont incubées à 37 °C pendant 16 heures.

III.2.5. Préparation de cellules compétentes et transformation de *B. subtilis*

B. subtilis présente un état de compétence naturel observé en fin de phase exponentielle de croissance, plus précisément lorsque la vitesse décroît juste avant d'atteindre la phase plateau, stade où la paroi bactérienne est naturellement fragilisée.

Chez *B. subtilis* 168, cet état de compétence a été induit comme suit : cinq ml de milieu LM ont étéensemencés par une culture d'une nuit dans le même milieu de manière à obtenir une $A^{600} = 0,2$, et ensuite incubée à 37 °C sous agitation 250 rpm et dans un incubateur à bain d'eau. Lorsque l' $A^{600}=1$, 500 μ l de cette culture ont été transférés dans 10 ml de milieu MD (préchauffé à 37 °C) et incubés à 37 °C sous agitation à 250 rpm durant 3 h 30. Une fois la phase stationnaire atteinte, les cellules sont dites compétentes (Harwood & Cutting, 1990).

Pour transformer *B. subtilis* 168, 500 μ l de cellules compétentes ont été aliquotés dans un eppendorf de 1,5 ml et mises en présence de 1 μ g d'ADN et incubées à 37 °C pendant 2 heures sous agitation de 250 rpm. Les cellules ont été ensuite étalées sur boîtes LBA additionnée de l'antibiotique approprié pour sélectionner les cellules transformées. Les boîtes sont ensuite incubées 16 heures à 37 °C. La validation des clones transformés a été réalisée par PCR et séquençage Sanger, en utilisant les amorces externes utilisés pour la triple PCR (voir **Tableau III.2**).

III.2.6. Préparation de cellules compétentes et transformation de *B. licheniformis*

III.2.6.1. Méthode des protoplastes

Au départ, une préculture est réalisée dans 25 ml de milieu #416media additionnés de 5 ml de milieu glycerol based electroporation regeneration media dans un erlenmeyer de 100 ml et incubée sous agitation à 37 °C pendant une nuit. Le lendemain, cette préculture est utilisée pour inoculer 35 ml de milieu #416 media additionnés de 5 ml de milieu « glycerol-based-electroporation-regeneration media » de manière à obtenir une densité cellulaire égale à une $A^{600}=0,25$. La culture est ensuite incubée à 37 °C (250 rpm) dans un incubateur à eau jusqu'à ce qu'elle atteigne une valeur d' A^{600} entre 0,85-0,9.

La culture est répartie de manière stérile dans un Falcon de 50 ml puis centrifugée à 3 220 g pendant 15 minutes à 4 °C. Le culot est resuspendu dans 5 ml de milieu SMMP puis additionnée de 130 μ l d'une solution de lysozyme (10 mg/ml dans SMMP) et incubés à 37 °C jusqu'à ce qu'on observe au microscope que 90 % des bactéries sous forme de protoplastes. Douze ml de SMMP sont ensuite ajoutés et la suspension centrifugée à 4200 x g à 4 °C

pendant 12 min. Le culot est resuspendu dans 3 ml de SMMP et contient les protoplastes prêts à être transformés.

Pour la transformation, les cellules compétentes aliquotées par 500 µl de protoplastes sont prélevés et transféré dans des Eppendorf stériles contenant 25 µl d'ADN additionnés de 25 µl de SMM2x, pour faire les transformations. Un contrôle négatif est également réalisé dans lequel l'échantillon contenant l'ADN est remplacé par de l'eau stérile (50 µl). Le mélange est transféré dans un Falcon 12 ml contenant 1,6 ml de polyéthylèneglycol 40 % et incubé pendant 2 minutes à température ambiante en inversant constamment le Falcon fermé hermétiquement. Ensuite, 5 ml de SMMP additionnée de BSA 2 % (w/v) sont ajoutés, puis centrifuger à 4 200 g pendant 8 min à 8 °C. Le culot est resuspendu dans 1ml de milieu SMMP BSA 2 % dans un Eppendorf stérile et incubé sur l'agitateur rotatif à 30 °C pendant 135 min. La culture est ensuite étalée sur de la gélose LB additionnée de l'antibiotique approprié et sur milieu DSM13 additionné de l'antibiotique approprié (Il est nécessaire de faire l'étalement sur les deux milieux de culture car le milieu DSM13 dégrade l'antibiotique et la sélection est laborieuse). Les boîtes sont incubées à 37 °C pendant 48 h et prévoir une boîte DSM13 et une boîte LB sans antibiotique pour s'assurer de la bonne régénération des protoplastes.

III.2.6.2. Compétence naturelle

Une culture de 50 ml de LB additionnée de tétracycline (12,5 µg/ml) dans un Erlenmeyer de 250 ml estensemencée par 2,5 ml d'une préculture d'une nuit de *B. licheniformis* MW3 cultivée dans le même milieu LB/tétracycline 12,5. La culture est incubée à 37 °C dans un incubateur à bain d'eau. Lorsque l' A^{600} de la culture atteint la valeur de 0,6, la culture est divisée en deux et placée dans deux erlenmeyers de 100 ml. La compétence est induite dans une des deux cultures avec 0,25 % de xylose pendant 3 h sous agitation à 37 °C dans l'incubateur à bain d'eau. L'autre moitié de la culture sert de contrôle.

Au terme des 3 h, l' A^{600} est mesuré et doit être inférieure à celle du contrôle. Si c'est le cas, des aliquots de 500 µl de cellules compétentes sont transférés dans un tube Falcon 12 ml et transformés avec 1 µg d'ADN. En parallèle, un contrôle négatif est également réalisé sans ajout d'ADN. Les tubes sont incubés pendant 1 h à 37 °C et mélangé à l'aide d'un agitateur rotatif. Les suspensions bactériennes sont ensuite étalées sur un milieu gélosé et complémenté de kanamycine (10 µg/ml) et incubées à 37 °C pendant une nuit.

III.2.7. Préparation de cellules compétentes et transformation de *H. coagulans*

III.2.7.1. Compétence naturelle

Une préculture d'une nuit réalisée dans 5 ml de BC broth est utilisée pour ensemercer 25ml de C-broth préchauffé (45 °C), jusqu'à obtenir une A^{600} de 0,15. La culture est incubée à 45 °C, jusqu'à une A^{600} de 0,9-1,2.

Pour la transformation, 500 µl de la culture sont centrifugées (4300 g, 10 min, 4 °C) et le culot est resuspendu dans 100 µl de T-broth. 5µg du plasmide pNW33N sont ajoutées. Puis, le mélange est incubé à 45 °C pendant 90 min dans un thermomixer à 900 rpm. Après l'ajout de 300 µl de BC préchauffé (45 °C), l'incubation est poursuivie pendant 2 h. La culture est étalée sur un milieu BC gélosé contenant du chloramphénicol (7 µg/l) pour sélectionner les cellules recombinantes, et incubée à 45 °C pendant 3 jours.

III.2.7.2. Electroporation

Une préculture d'une nuit réalisée dans 5 ml de milieu BC broth est utilisée pour ensemercer 50 ml (5 % en v/v) de milieu BC supplémenté avec 1 % de glycine jusqu'à obtenir une A^{600} d'environ 0,13 à 0,14. Après 2,5 heures d'incubation à 45 °C, les cellules sont récoltées par centrifugation (433 g, 10 min, 4 °C). Les culots cellulaires sont lavés deux fois avec 50 ml et 25 ml, respectivement, de tampon d'électroporation glacé (5 mM KH_2PO_4 ; 0,4 M de sorbitol, 10 % de glycérol, 4 mM de MgCl_2 à pH 4.5). Le culot est re-suspendu dans 1 ml de tampon d'électroporation sur glace. Dans 100 µl de la suspension cellulaire, 1 µg d'ADN plasmidique est ajouté et mélangé. Le mélange est transféré dans une cuvette d'électroporation de 0,2 cm (Bio-Rad ®) pré-refroidi dans la glace. L'échantillon est soumis à une impulsion de 1,6 kV à 200 [Omega] et 25 [mu] F. Un ml de milieu BC est ajouté immédiatement après électroporation et le mélange est transféré dans un tube Eppendorf 1,5 µl, puis, incubé dans un Thermomixer (3 h, 45 °C, 900 rpm). La culture est étalée sur un milieu BC gélosé contenant du chloramphénicol (7 µg/l) pour sélectionner les cellules recombinantes, et incubée à 45 °C pendant 1 à 2 jours.

III.2.8. Courbe de croissance

La courbe de croissance a été suivie par l'évolution de la densité cellulaire de la culture en mesurant son A^{600} . De manière générale, 50 ml de milieu de culture sont inoculés par une préculture d'une nuit, de manière à obtenir une A^{600} égale à 0,1. La culture est incubée à 37 °C et des prélèvements sont réalisés toutes les heures pour mesurer l' A^{600} .

III.3. Suivi de l'activité promotrice

Culture en erlenmeyer 250 ml

Une préculture de 16 heures de la souche d'intérêt sert à inoculer 50 ml de milieu de culture approprié additionné ou pas de sucre (0,5% final) et de kanamycine (10µg/ml), de façon à obtenir une valeur d' A^{600} de 0,1. Cette culture est incubée à 37°C dans un incubateur à eau. Pour la lecture de la fluorescence de la GFP en microplaque, 1 ml de culture est prélevé et centrifugé (15000 g, 5 min., 4 °C), puis remis en suspension dans 200 µl d'une solution de NaCl 0,9%. La suspension est transférée dans une plaque multipuits à fond noir (Greiner, 96 Flat black). Pour les analyses en cytométrie de flux, 1ml de culture est prélevé et centrifugé (15000 g, 5 minutes, 4 °C), puis remis en suspension dans 200 µl de glycérol à 10 % et conservé à -20 °C avant d'être analysé en cytométrie.

Culture en fermenteur 20 l

Les cultures en fermenteurs ont été réalisées chez Artechno (Gembloux) comme suit : Une préculture (200 ml) de 16 heures dans du LB additionné de kanamycine (10µg/ml) a servi à inoculer un fermenteur de 20 l rempli avec du milieu de production choisi, contenant de la kanamycine (10µg/ml) et 1ml d'antimousse. Le volume de la préculture ajouté a été sélectionné de façon à obtenir une A^{600} de 0,1. Les paramètres de la culture sont les suivantes : température 37°C, agitation : 300 rpm, pH est maintenu à 6,8 par l'ajout de l'acide H_3PO_4 et le KOH ; l'aération : 1 vvm. L' A^{600} a été mesurée toutes les heures, 10 ml de culture sont récoltés, 1 ml est centrifugé (15000 g, 5 min., 4°C), les culots sont resuspendus dans du glycérol 10% et conservés à -20°C jusqu'à la lecture de la fluorescence en microplaque multipuits et en cytométrie de flux. La culture est arrêtée après 48 heures.

III.4. Lecture de la fluorescence cellulaire

III.4.1. Lecture de la fluorescence cellulaire en microplaque

La fluorescence cellulaire est mesurée en plaque multi puits noir (Greiner, 96 Flat black, fond incolore) à l'aide d'un lecteur de microplaques spectrophotomètre/ fluorimètre SpectraMax M2e. 1ml des cultures est prélevé et centrifugé, le culot cellulaire est suspendu dans 200 µl de NaCl 0.9 %. Les paramètres d'acquisition du signal de GFP sont les suivants : longueur d'onde d'excitation (λ^{exci}) : 485 nm, longueur d'onde d'émission (λ^{emi}) : 528 nm. La largeur de la bande passante étant de 20 nm pour les deux longueurs d'onde.

III.4.2. Lecture de la fluorescence en cytométrie de flux

Les échantillons ont été analysés par le cytomètre de flux FACS Cytotflex (Beckman coulter), configuration optique : $A^{exci} = 488$ nm (laser bleu) et $A^{emi} = 524$ nm filtre avec une bande

passante de 40 nm. Un volume de 1 mL de culture a été prélevé à intervalles horaires. Chaque échantillon a été immédiatement centrifugé à $4000 \times g$ pendant 10 minutes à 4°C afin de concentrer les cellules. Le culot obtenu a été délicatement resuspendu dans 1 mL de glycérol stérile à 20 % (v/v), qui agit comme cryoprotecteur pour préserver la fluorescence de la GFP lors du stockage. Les échantillons ainsi préparés ont été conservés à -70°C jusqu'à la fin de la série temporelle.

À la fin de la période d'incubation, tous les échantillons congelés ont été simultanément décongelés à température ambiante, puis resuspendus dans $500\ \mu\text{L}$ de solution physiologique stérile (solution saline tamponnée isotoniqument) pour standardiser la concentration cellulaire et les conditions d'analyse. Cette étape assure une homogénéité des mesures et limite les variations dues à la manipulation.

III.5. Comptage des spores et de la flore totale

Le comptage des spores et de la flore totale a été réalisé selon le schéma ci-dessous

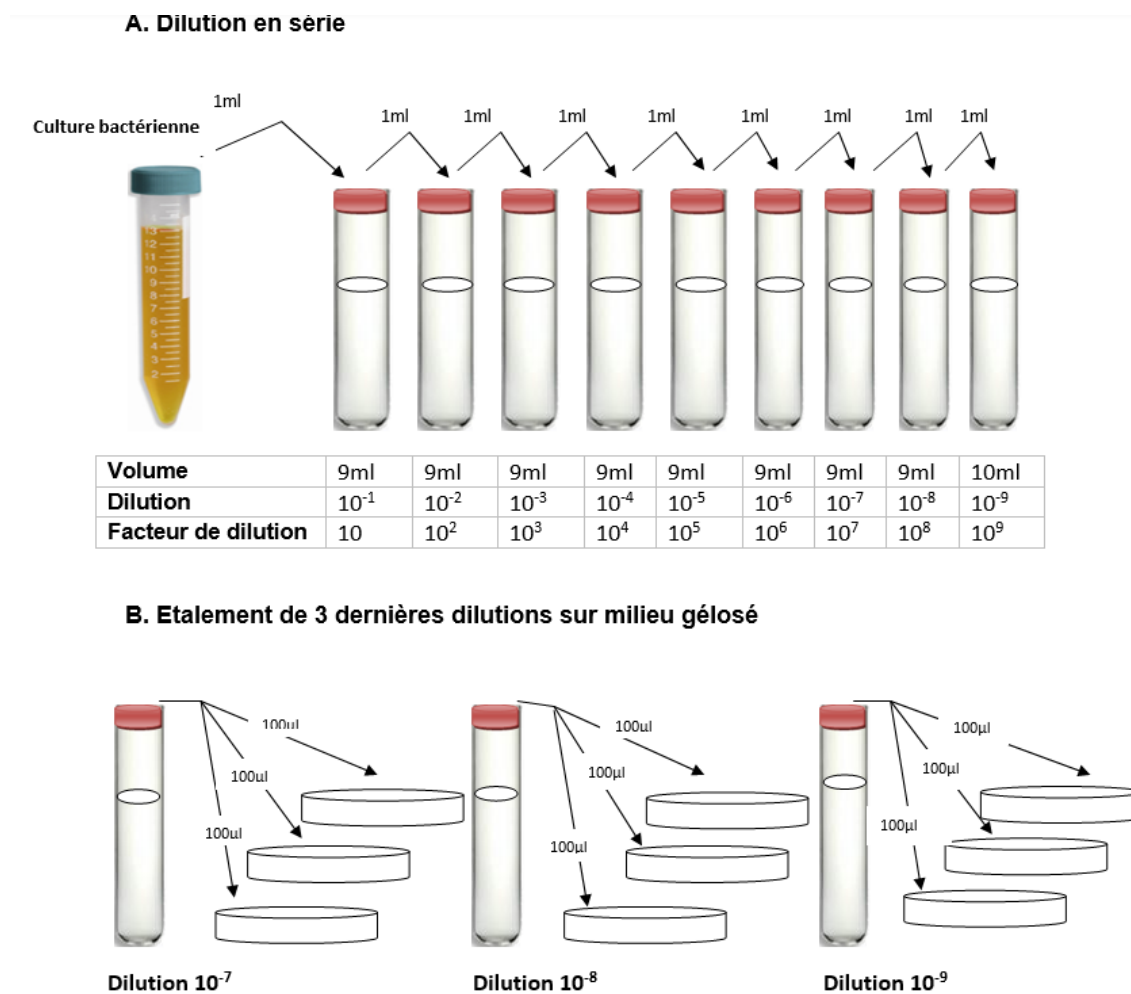


Figure III. 3 Schéma démontrant la procédure de dénombrement de la flore totale et des spores

La flore totale (cellules végétatives et spores) est déterminée comme présenté dans la figure III.3. Pour dénombrer le nombre de spores, les cellules végétatives sont éliminées en incubant au bain-marie la dilution 10^{-1} à 80°C pendant 10 minutes ; ensuite, les dilutions sont réalisées selon le schéma ci-dessus, avant d'être étalé sur le milieu gélosé.

III.6. Quantification du glucose dans le milieu de culture

La concentration en glucose dans le milieu de culture a été réalisée par chromatographie d'exclusion ionique à l'aide d'une colonne IC Sep ICE-ION 300. 1ml de culture est centrifugé (15000 g , 5 min, 4°C), $100\mu\text{l}$ d'acide trichloracétique à 72% ont été ajoutés dans $900\mu\text{l}$ du surnageant. Le mélange a été centrifugé (15000 g , 30 min., à 4°C). Le surnageant a été transféré dans des vials avant d'être analysés par le HPLC. La colonne est éluée par une phase mobile de H_2SO_4 0,01N ($0,4\text{ ml/min}$) et l'effluent est analysé par un détecteur d'indice de réfraction (RI série 200, PerkiElmer) La concentration en glucose est déterminée grâce à une droite d'étalonnage allant de 0 à 1 % de glucose.

III.7. Test d'hémolyse

Ce test repose sur la culture des souches sur un milieu solide enrichi en sang de mouton, tel que la gélose Columbia. Concrètement, une culture d'une nuit en milieu liquides des souches sélectionnées sert à ensemencer sous la forme d'une strie une boîte de gélose Columbia. Après incubation à 37°C pendant 24 h à 48 h, les colonies sont observées pour détecter la présence éventuelle de zones de lyse autour des stries bactériennes traduisant une activité hémolytique.

Trois types d'hémolyse peuvent être observés :

- β -hémolyse : apparition d'un halo clair autour des colonies, indiquant une lyse complète des hématies et qui est caractéristique de la présence d'une hémolysine.
- α -hémolyse présence d'un halo verdâtre ou brunâtre, signalant une oxydation partielle de l'hémoglobine par une production de H_2O_2 par la bactérie.
- γ : hémolyse qui marque l'absence de tout changement visible sur la gélose, indiquant une absence d'activité hémolytique

III.8. Les logiciels

Les analyses statistiques ont été réalisées avec *GraphPad Prism* (v7.0.0 et v10.0, GraphPad Software, USA). Les données de cytométrie en flux ont été traitées avec *FlowJo X* (v10.0, BD Biosciences, USA).

Les séquences nucléotidiques ont été récupérées à partir de la base de données *NCBI GenBank* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Ensuite, les comparaisons de similarité ont

été réalisées à l'aide de *NCBI BLAST* (Basic Local Alignment Search Tool, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Des analyses complémentaires ont été effectuées à l'aide d'*EMBOSS Explorer* (<https://www.bioinformatics.nl/emboss-explorer/>).

Les constructions plasmidiques ont été conçues à l'aide de *Geneious Prime* (v2025.0.2, Biomatters Ltd., New Zealand) et *SnapGene Viewer* (v8.0.1., Dotmatics, USA).

IV. RESULTATS

IV.1. Sélection et optimisation de la sporulation à l'échelle industrielle de plusieurs souches du genre *Bacillus* et apparenté

La sporulation est un processus clé chez les bactéries du genre *Bacillus* et apparentés, leur permettant de former lorsque les nutriments viennent à manquer, des endospores hautement résistantes à des agents physiques et chimiques défavorables à la croissance de la bactérie et de survivre en absence de nutriments. Ce mécanisme biologique de « survie » est exploité à des fins industrielles dans divers secteurs innovants tels que les probiotiques, les biofertilisants et les agents de biocontrôle. Ces applications reposent toutes sur la capacité des spores à rester viables pendant de longues périodes, à résister aux conditions de stockage et de transport, et à se réactiver dans des environnements cibles variés comme le sol, la rhizosphère ou le tractus intestinal (Cutting, 2011b; Hong et al., 2005).

Toutefois, pour que ces applications soient viables à grande échelle, il est impératif d'optimiser le processus de sporulation en milieu industriel. Cela implique la maîtrise de nombreux paramètres : la composition du milieu de culture, la température, le pH, l'aération, mais aussi le mode de culture (batch, fed-batch ou continu), ainsi que le dynamique de croissance cellulaire (Tian et al., 2022). Pour ce faire et dans un premier temps, nous avons sélectionné et caractérisé phénotypiquement une série de souches du genre *Bacillus* qui possèdent un intérêt économique. Par la suite pour des raisons pratiques nous avons étudiés la production d'endospores de trois d'entre elles. Ensuite, nous avons étudié un procédé à l'échelle industrielle pour l'une d'entre elle.

IV.1.1. Sélection et caractérisation phénotypique des souches du genre *Bacillus* et apparentés possédant des propriétés probiotiques, de biostimulant ou de biofertilisant

Parmi les souches du genre *Bacillus* et apparenté, les plus fréquemment étudiées et commercialisées comme probiotique pour l'humain et animal, et comme biostimulant figurent les souches de *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus clausii* et *Bacillus coagulans*. Ces deux dernières souches après une analyse avec des outils de la biologie moléculaire ont été retirées du genre *Bacillus* pour faire à elles seules un genre séparé. *B. clausii* est toujours inclus dans la famille de Bacillaceae mais reprise dans un nouveau genre dénommé *Alkalihalobacillus* et la souche se nomme dorénavant *Alkhalobacillus clausii*. Quant à *B. coagulans*, il est maintenant inclus dans une nouvelle famille de l'ordre des Bacillales appelée Heyndrickxiaceae et porte le nom de *Heyndrickxia coagulans*

Dans le domaine des probiotiques, les spores de *B. subtilis*, *H. coagulans*, *B. licheniformis* et *A. clausii* sont utilisées comme complément alimentaires en raison de leur stabilité remarquable et de leur aptitude à germer dans l'intestin, où elles peuvent exercer des effets bénéfiques sur le microbiote hôte (Cutting, 2011b; Hong et al., 2005).

Quant aux souches telles que *B. spizizenii*, *B. atrophaeus*, *P. polyxyma* sont utilisées pour promouvoir la croissance végétale ou pour lutter contre des agents pathogènes telluriques, en remplacement ou en complément des produits phytosanitaires chimiques.

Tableau IV.1. Liste des souches sélectionnées comme probiotiques, biofertilisant ou biocontrôle et présentes dans la collection d'Artechno

Les souches de Bacilles sporulant utilisées dans ce chapitre sont décrites dans le tableau ci-dessous.

Souche	Nouveau nom	Action	Source
1 <i>B. coagulans</i> Artech_1	<i>Heyndrickxia coagulans</i> Artech_1	Probiotique	Artechno
2 <i>B. coagulans</i> Artech_2	<i>Heyndrickxia coagulans</i> Artech_2	Probiotique	Artechno
3 <i>B. coagulans</i> Artech_3	<i>Heyndrickxia coagulans</i> Artech_3	Probiotique	Artechno
4 <i>B. coagulans</i> DSM1= ATCC 7050	<i>Heyndrickxia coagulans</i> DSM1=ATCC 7050	Probiotique	(S. L. Johnson et al., 2016a), (Narsing Rao et al., 2023)
5 <i>B. licheniformis</i> LMG 12363	-	Probiotique	Artechno
6 <i>B. subtilis</i> 168	-	Probiotique Agriculture	Artechno
7 <i>B. subtilis</i> natto	-	Probiotique	Artechno
8 <i>B. clausii</i>	<i>Alkalihalobacillus clausii</i>	Probiotique	Nielsen et al.1995
9 <i>B. subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i>	<i>Bacillus spizizenii</i>	Biocontrôle agriculture	(Nakamura et al., 1999)
10 <i>B. pumilis</i> 10-2	-	Biofertilisant, agriculture	(Meyer, 1901)
11 <i>B. mojavensis</i> 9 sel	-	Agriculture	
12 <i>B. subtilis</i> var. <i>niger</i>	<i>Bacillus atrophaeus</i> 6sel	Biocontrôle Agriculture	(Sella et al., 2015)
13 <i>Bacillus polymyxa</i>	<i>Paenibacillus polymyxa</i>	Biofertilisant Biocontrôle Horticulture	(Ash et al., 1994)

IV.1.2. Caractérisation des souches sélectionnées

Les souches sélectionnées ont été caractérisées selon les deux critères : leur activité hémolytique, indiquant un potentiel pathogène, et leur aptitude à fermenter divers sucres, reflétant leur métabolisme carboné.

IV.1.2.1. Évaluation de l'activité hémolytique des souches sélectionnées pour estimer leur potentiel pathogène

Avant toute valorisation industrielle ou agricole, les souches sélectionnées doivent être rigoureusement évaluées sur le plan de la biosécurité. L'un des tests fondamentaux dans ce processus est l'évaluation de l'activité hémolytique, qui permet de détecter une éventuelle capacité à lyser les globules rouges, un caractère souvent associé à la virulence chez certaines espèces appartenant aux *Bacilli*, notamment comme *B. cereus* et *Bacillus subtilis natto* (Logan, 2012).

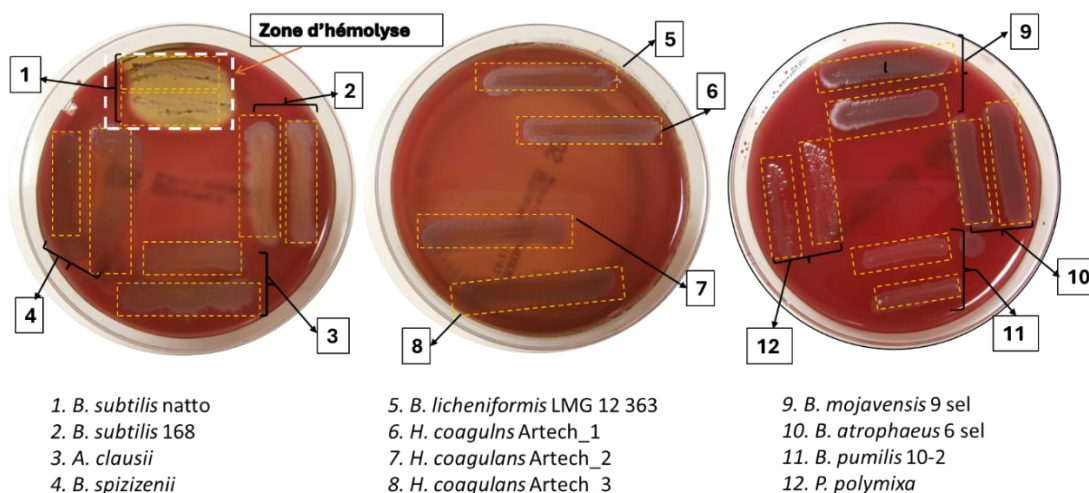


Figure IV.1: Le test d'hémolyse réalisé sur les souches sélectionnées

Les stries de différentes bactéries ensemencées sur gélose additionnée de sang de mouton sont encadrées par des rectangles pointillés jaunes. La présence d'une zone de lyse autour de strie de *B. subtilis natto*, est mise en évidence par l'ellipse en pointillé blanc. Toutes les autres souches ne montrent pas de zone d'hémolyse.

Les résultats obtenus (**Figure IV.1**) ont révélé un comportement différencié entre les souches testées : *Bacillus subtilis natto* présente une activité β -hémolytique de la souche.

En revanche, toutes les autres souches testées (*H. coagulans* Artech_1, *H. coagulans* Artech_2, *H. coagulans* 513, *B. licheniformis* LMG 12363, *B. subtilis* 168, *A. clausii*, *B. spizizenii*, *B. pumilis* 10-2, *B. mojavensis* 9sel, *B. atrophaeus* 6sel et *P. polymixa*) sont non hémolytiques (γ -hémolyse).

Bien que *B. subtilis* natto soit historiquement utilisé dans la fermentation du soja (le natto) au Japon et reconnu pour ses propriétés probiotiques bénéfiques, la présence d'une hémolyse *in vitro* soulève des questions de sécurité potentielle, en particulier pour des applications en dehors de son contexte alimentaire traditionnel. Cette activité β -hémolytique pourrait être due à la production de lipopeptides, des biosurfactants, tels que la surfactine, connus pour leur effet légèrement hémolytique (Ongena & Jacques, 2008). Il convient de noter que cette activité ne reflète pas systématiquement une toxicité *in vivo*, et qu'elle ait justifié une analyse complémentaire comme notamment :

- La recherche dans le génome bactérien la présence de gènes potentiellement impliqués dans la production de toxines (par exemple des gènes *hbl*, *nhe*, *cytK*, codant respectivement pour les complexes hémolytique Hbl, entérotoxine non hémolytique Nhe, et cytotoxine K. Ces gènes sont bien connus pour être impliqués dans la production de toxines chez *B. cereus* et ses proches parents, et sont associés à des cas d'intoxications alimentaires (Ehling-Schulz et al., 2004; Granum & Lund, 2006)
- Des tests de toxicité sur les cellules eucaryotes ;
- Une vérification de l'historique d'usage « sûr » de la souche particulière de *B. subtilis* natto testée.

Par ailleurs, certaines souches commerciales de *B. subtilis* natto ont été décrites comme exprimant des profils enzymatiques proches de *B. subtilis* tout en conservant des particularités métaboliques qui pourraient expliquer cette hémolyse ponctuelle

Le profil non hémolytique des autres souches testées est un indicateur rassurant en faveur de l'innocuité pour un usage en tant que probiotique ou agent de biocontrôle. Cela renforce leur potentiel de valorisation industrielle, en conformité avec les critères de sécurité définis par la FAO/OMS et l'EFSA (Allende et al., 2025), (FAO/WHO, 2006). Ces souches peuvent être considérées comme compatibles avec une qualification QPS ou GRAS, sous réserve de l'absence de gènes de virulence.

Conclusion

Le comportement hémolytique positif observé chez *B. subtilis* natto souligne l'importance de caractériser chaque souche individuellement, même lorsqu'elle appartient à une espèce historiquement considérée comme « sûre ». Ce résultat met en évidence la variabilité intraspécifique possible au sein de genre *Bacillus* et l'importance d'une approche intégrée combinant le phénotypage, la génomique et l'historique d'usage pour l'évaluation du risque.

IV.1.2.2. Caractérisation du phénotype des souches pour la fermentation des glucides

Plusieurs espèces des souches sélectionnées suscitent un intérêt croissant dans les milieux scientifique et industriel en raison de leur capacité à former des spores hautement résistantes (voir **Tableau IV.1**). A la suite de la réunion du comité de thèse 2015, et en réponse à la forte demande sur marché pour certaines souches spécifiques, il a été décidé de concentrer les travaux sur les espèces suivantes : *H. coagulans*, *B. licheniformis* et *B. subtilis*.

Dans ce cadre, sept souches de *Bacilli* sporulantes et possédant un potentiel probiotique ont été sélectionnées pour une caractérisées phénotypique à l'aide du test API 50 CHB/E. Les souches analysées sont les suivantes :

- *H. coagulans* Artech_1
- *H. coagulans* Artech_2
- *H. coagulans* artech_3
- *B. licheniformis* LMG 12363
- *B. subtilis* 168
- *B. subtilis* natto.

Le système API 50 CHB/E a été utilisé pour identifier des *Bacillus* et apparentés et des bacilles à Gram négatif appartenant aux *Enterobacteriaceae* et *Vibrionaceae*. Ce test repose sur l'analyse du profil de fermentation de 49 substrats glucidiques, ce qui permet de dresser une carte métabolique spécifique à chaque souche.

Les résultats ont permis de confirmer l'identité des souches sélectionnées tout en révélant certaines différences métaboliques notables, notamment dans la capacité à fermenter des sucres tels que le D-mannitol, le L- arabinose ou le mélibiose. Ces profils sont essentiels pour mieux comprendre les potentialités technologiques et probiotiques de chaque souche, et orienter leur sélection en fonction des applications ciblées (alimentaire, humaine, nutrition animale, agriculture, etc.).

Tableau IV.2 Fermentation des sucres par *H. coagulans* Artech_1

Glycérol	-	Sorbose	-	Cellobiose	+	D-Turanose	+
Erythritol	-	Rhamnose	+	Maltose	+	D-Xylose	-
D-Arabinose	-	Dulcitol	-	Lactose	0	D-Tagatose	-
L-Arabinose	+	Inositol	-	Mellibiose	+	D-Fucose	-
Ribose	+	Mannitol	+	Saccharose	+	L-Fucose	-
D-Xylose	+	Sorbitol	-	Trehalose	+	D-Arabitol	+
L-Xylose	-	α -Méthyl-D-Mannoside	-	Inuline	-	L-Arabitol	-
Adonitol	-	α -Méthyl-D-Glucoside	+	Mélézitose	-	Gluconate	+
B-méthyl-D-Xyloside	-	N-acétyl-glucosamine	+	Raffinose	+	2 Céto-glutamate	+
Galactose	+	Amygdaline	+	Amidon	+	5 Céto-glutamate	-
Glucose	+	Arbutine	+	Glycogène	-		
Fructose	+	Esculine	+	Xylitol	-		
Mannose	+	Salicine	+	Gentobiose	+		

Tableau IV.3 Fermentation des sucres par *Heyndrickxia coagulans* Artech_2

Glycérol	-	Sorbose	-	Cellobiose	+	D-Turanose	+
Erythritol	-	Rhamnose	+	Maltose	+	D-Xylose	-
D-Arabinose	-	Dulcitol	-	Lactose	+	D-Tagatose	-
L-Arabinose	+	Inositol	-	Mellibiose	+	D-Fucose	-
Ribose	+	Mannitol	+	Saccharose	+	L-Fucose	-
D-Xylose	+	Sorbitol	-	Trehalose	+	D-Arabitol	+
L-Xylose	-	α -Méthyl-D-Mannoside	-	Inuline	-	L-Arabitol	-
Adonitol	-	α -Méthyl-D-Glucoside	+	Mélézitose	-	Gluconate	-
B-méthyl-D-Xyloside	-	N-acétyl-glucosamine	+	Raffinose	+	2 Céto-glutamate	+
Galactose	+	Amygdaline	+	Amidon	+	5 Céto-glutamate	
Glucose	+	Arbutine	+	Glycogène	-		
Fructose	+	Esculine	+	Xylitol	-		
Mannose	+	Salicine	+	Gentobiose	+		

Tableau IV.4 Fermentation des sucres par *H. coagulans* Artech_3

Glycérol	-	Sorbose	-	Cellobiose	+	D-Turanose	+
Erythritol	-	Rhamnose	+	Maltose	+	D-Xylose	-
D-Arabinose	-	Dulcitol	-	Lactose	0	D-Tagatose	-
L-Arabinose	+	Inositol	-	Mellibiose	+	D-Fucose	-
Ribose	+	Mannitol	+	Saccharose	+	L-Fucose	-
D-Xylose	+	Sorbitol	-	Trehalose	+	D-Arabitol	+
L-Xylose	-	α -Méthyl-D-Mannoside	-	Inuline	-	L-Arabitol	-
Adonitol	-	α -Méthyl-D-Glucoside	+	Mélézitose	-	Gluconate	+
B-méthyl-D-Xyloside	-	N-acétyl-glucosamine	+	Raffinose	+	2 Céto-glutamate	+
Galactose	+	Amygdaline	+	Amidon	+	5 Céto-glutamate	-
Glucose	+	Arbutine	+	Glycogène	-		
Fructose	+	Esculine	+	Xylitol	-		
Mannose	+	Salicine	+	Gentobiose	+		

Tableau IV.5 Fermentation des sucres par *B. subtilis* 168

Glycérol	+	Sorbose	-	Cellobiose	+	D-Turanose	-
Erythritol	-	Rhamnose	-	Maltose	+	D-Xylose	-
D-Arabinose	-	Dulcitol	-	Lactose	-	D-Tagatose	-
L-Arabinose	+	Inositol	+	Mellibiose	-	D-Fucose	-
Ribose	-	Mannitol	+	Saccharose	+	L-Fucose	-
D-Xylose	-	Sorbitol	+	Trehalose	+	D-Arabitol	-
L-Xylose	-	α -Méthyl-D-Mannoside	-	Inuline	0	L-Arabitol	-
Adonitol	-	α -Méthyl-D-Glucoside	+	Mélézitose	-	Gluconate	-
B-méthyl-D-Xyloside	-	N-acétyl-glucosamine	+	Raffinose	-	2 Céto-glutamate	
Galactose	-	Amygdaline	+	Amidon	+	5 Céto-glutamate	
Glucose	+	Arbutine	+	Glycogène	+		
Fructose	+	Esculine	+	Xylitol	-		
Mannose	+	Salicine	+	Gentobiose	0		

Tableau IV.6 Fermentation des sucres par *B. licheniformis* LM12363

Glycérol	+	Sorbose	+	Cellobiose	+	D-Turanose	+
Erythritol	-	Rhamnose		Maltose	+	D-Xylose	-
D-Arabinose	-	Dulcitol	-	Lactose	+	D-Tagatose	+
L-Arabinose	-	Inositol	-	Mellibiose	-	D-Fucose	-
Ribose	+	Mannitol	+	Saccharose	+	L-Fucose	-
D-Xylose	+	Sorbitol	+	Trehalose	+	D-Arabitol	-
L-Xylose	-	α -Méthyl-D-Mannoside	-	Inuline	-	L-Arabitol	-
Adonitol	-	α -Méthyl-D-Glucoside	+	Mélézitose	-	Gluconate	-
B-méthyl-D-Xyloside	-	N-acétyl-glucosamine	+	Raffinose	-	2 Céto-glutamate	-
Galactose	-	Amygdaline	+	Amidon	-	5 Céto-glutamate	-
Glucose	+	Arbutine	+	Glycogène	-		
Fructose	+	Esculine	+	Xylitol	-		
Mannose	+	Salicine	+	Gentobiose	+		

IV.1.3. Culture en erlenmeyer des six souches d'intérêt dans deux types de milieux contrastés : sélection et transfert en fermenteur de 15 l.

Afin d'évaluer l'impact des nutriments dans le milieu de culture sur la sporulation, deux milieux de culture contrastés, M1 et M2, ont été utilisés. Leur composition détaillée est reprise dans le **Tableau IV.7**.

Le milieu M1 se distingue par l'absence de glucides. Dans ce milieu, la source du carbone est apportée exclusivement par désamination des acides aminés présents dans le milieu, induisant ainsi une fermentation de type alcalin. Ce mode de métabolisme crée un environnement favorable à la sporulation chez les bacilles alcalophiles en particulier certaines souches de *H. coagulans* et *B. licheniformis*.

Le milieu M2, quant à lui, contient du saccharose comme source de carbone. Il permet le développement d'une fermentation de type acide, plus adaptée aux bacilles acidophiles tel que *B. subtilis*. Ce milieu favorise l'entrée en sporulation de ces espèces dans des conditions physiologiques proches de celles rencontrées dans certains environnements industriels ou digestifs.

Dans un premier temps, chacune des six souches sélectionnées sera cultivée dans les deux milieux de culture et en erlenmeyers (200 ml de milieu dans un erlenmeyer de 500 ml). Ensuite le milieu donnant la meilleure croissance sera choisi pour réaliser une fermentation dans un fermenteur de 15 l. Cette dernière culture sera plus proche des conditions rencontrées lors de la production industrielle et permettra le scaling up vers de gros fermenteurs (3 et 8 m³).

Enfin, la comparaison des performances sporulantes des différentes souches dans ces deux milieux permet d'affiner la compréhension de leurs préférences métaboliques et d'optimiser les protocoles de production de spores en fonction du profil physiologique de chaque souche.

Tableau IV.7 Comparaison des milieux M1 et M2

M1		M2	Solution 61	
Produits	Quantité g/l	Quantité g/l	Produits	Quantité g/l
Peptone de caséine	5	30	CuSO4	0,01
Extrait de viande	3	-	H3BO3	0,1
Peptone de viande	4	-	KI	0,02
Tryptone	2,5	-	NaMoO4	0,04
Extrait de levure	4	7,5	ZnSO4	0,14
KH ₂ PO ₄	2	2	MnSO4	40
CaCl ₂ H ₂ O	0,05	-	FeCl3	50
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2	0,4	Acide citrique	100
MnSO ₄ .H ₂ O	0,0038	0,0038		
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,0045	-		
CuSO ₄ . 5H ₂ O	0,0025	-		
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,00045	-		
Saccharose	-	25		
Solution 61	-	0,41		

IV.1.3.1. Culture de *B. subtilis* 168 et *B. subtilis* natto

Culture en erlenmeyer de *B. subtilis* 168 et *B. subtilis* natto

Les cultures ont été réalisées dans des erlenmeyers de 500 ml contenant 200 ml de milieu M1 ou M2. Une préculture en milieu 868, incubée pendant une nuit à 37 °C, a étéensemencée et incubée pendant une nuit à 37 °C. Celle-ci a été utilisée pour inoculation. L'inoculum a été ajusté de manière à obtenir une densité cellulaire égale à une valeur d'A₆₀₀) d'A⁶⁰⁰= 0,1.

Les fioles ont été ensuite incubés à 37 °C sous agitation constante à 100 rpm, afin d'assurer une bonne aération et homogénéité du milieu. Ces conditions ont été maintenues tout au long de la phase de croissance et de sporulation. Des prélèvements ont été réalisés à différents temps d'incubation pour le suivi de la croissance cellulaire.

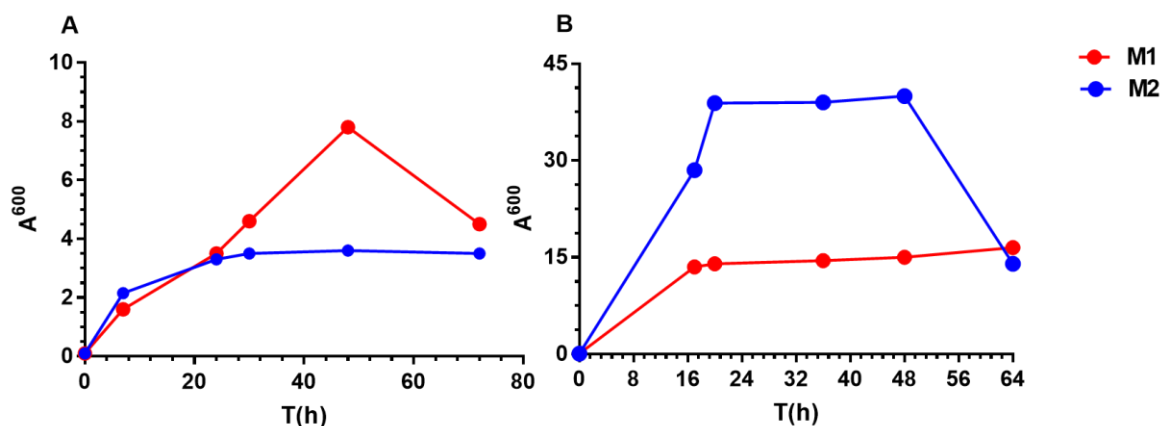


Figure IV.2. Suivi de la croissance cellulaire de culture de *B. subtilis* 168 (A) et *B. subtilis* natto (B en erlenmeyer dans les milieux de culture M1 et M2)

Les résultats présentés sont ceux obtenus pour une seule culture. La répétition des expériences donne des résultats variables en ce qui concerne l'évolution de la culture mais des résultats identiques en ce qui concerne la comparaison des milieux de culture.

Chez les deux souches, une augmentation significative de la densité cellulaire a été observée dans le milieu M2 (**Figure IV.2**), en comparaison avec le milieu M1. Cette différence souligne l'efficacité du milieu M2 pour favoriser la croissance. Chez *B. subtilis* 168, la phase stationnaire a été atteinte après 42 heures de culture, tandis que pour *B. subtilis* natto elle a été atteinte beaucoup plus rapidement : après seulement 16 heures de culture.

Culture en fermenteur 15 l

Afin d'évaluer les performances de production à l'échelle pilote, une culture a été réalisée en fermenteur de 15 l, avec un volume total de 10 l de milieu M2. Les conditions opératoires sont les suivantes :

Tableau IV. 8. Les conditions opératoires appliquées dans un fermenteur de 15 l pour la culture de *B. subtilis* 168 et *B. subtilis* natto

	<i>B. subtilis</i> 168	<i>B. subtilis</i> natto
Volume d'inoculum	200 ml	200 ml
Température	30 °C	30 °C
pH initial	6,57	6,5
Agitation	400 rpm	300 rpm
Aération	1vvm	1vvm
Antimousse	1 ml	1 ml
Régulation de pH l'acide phosphorique 3N	7,5	7

Après 66 heures de culture, la densité optique (A^{600}) a atteint une valeur élevée de 14,8 (**Figure IV.3.A**) correspondant à une flore totale de $2,6 \times 10^9$ CFU/ml. Cependant, le taux de sporulation est relativement faible de 11 %, avec un nombre de spores viables de seulement 3×10^8 CFU/ml (**Figure IV.4**). Ces résultats indiquent que, bien que la croissance cellulaire soit fortement optimisée dans ces conditions, la sporulation ne suit pas nécessairement la même dynamique. Cela suggère que des ajustements spécifiques, notamment en termes de durée de culture, de stress induit ou de composition du milieu, pourraient être nécessaires pour maximiser la production des spores.

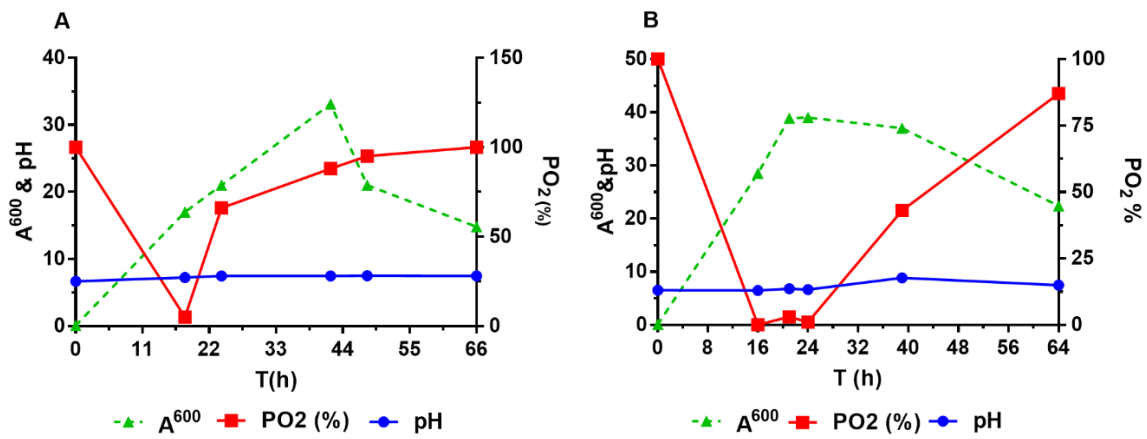


Figure IV.3. Suivi de culture de *B. subtilis* 168 (A) et *B. subtilis* natto (B) dans le milieu M2 dans un fermenteur de 15 l

—▲— A^{600} Courbe de croissance à 600 nm, —■— courbe de l'oxygène dissoute en pourcentage de PO₂, —●— courbe de l'évolution du pH. La culture est réalisée à 37 °C avec une agitation de 400 rpm. Les échantillons ont été prélevés tout au long de la culture pour mesurer l'absorbance. Les valeurs du pH et de l'oxygène dissous PO₂ % étaient accessibles sur l'écran de contrôle du fermenteur. Les résultats présentés sont ceux obtenus pour une seule culture. La répétition des expériences donne des résultats variables en ce qui concerne l'évolution de la culture mais des résultats identiques en ce qui concerne la comparaison des milieux de culture.

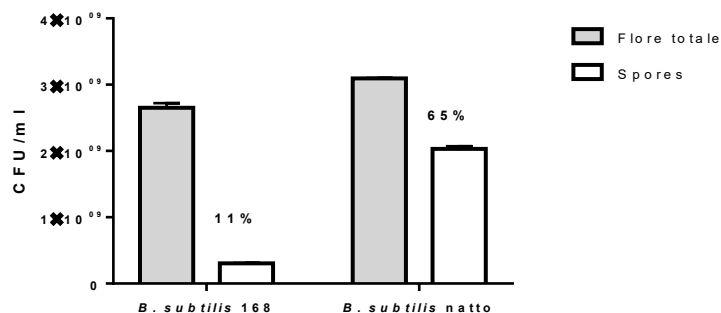


Figure IV.4. Nombres de spores et de la flore totale chez *B. subtilis* 168 et *B. subtilis* natto

Chez *B. subtilis* 168 les cellules ont été récoltées après 64 heures de cultures et 66 heures de culture pour *B. subtilis* natto. Le comptage de la flore totale et du nombre de spores représente la moyenne de deux réplicats techniques. La variation entre les deux mesures est inférieure à 5%.

Conclusion

Dans un premier temps, les cultures de *B. subtilis* ont été réalisées en erlenmeyer de 250 ml dans les milieux M1 et M2, dans le but d'identifier les conditions les plus favorables à la croissance et la sporulation. Les résultats ont montré que le milieu M2, contenant du saccharose comme source de carbone, favorisait significativement la production de biomasse chez les deux souches (**Figure IV.4**).

Afin d'optimiser ces performances, les cultures ont ensuite été transposées à l'échelle pilote dans un fermenteur de 15 l, utilisant également le milieu M2. Cette approche a permis de contrôler rigoureusement les paramètres physico-chimiques (pH, température, aération, agitation), essentiels pour la croissance et la sporulation.

Chez *B. subtilis* 168, un pH a été réglé à 7,5 a permis d'atteindre une densité optique ($A^{600} = 33,1$) après 42 heures de culture. Toutefois, cette valeur a diminué à 14,8 après 66 heures, indiquant une possible lyse cellulaire ou déclin de la viabilité. Le taux de sporulation observé est trop faible, ce qui suggère que le milieu M2, bien que favorable à la croissance, n'est pas optimal pour l'initiation de la sporulation chez cette souche.

En revanche, *B. subtilis* natto a présenté un profil de croissance rapide, avec une A^{600} maximale de 38,9, atteinte après 21 heures et une valeur de 22,1 à 64 heures. Le taux de sporulation observé était de 65 %, avec une concentration de spores de 2×10^9 CFU/ml pour une flore totale de 3×10^9 CFU/ml, ce qui reflète une sporulation efficace dans ces conditions. Ces résultats montrent une nette différence entre les deux souches de *B. subtilis* quant à leur aptitude à sporuler en milieu M2. Face au faible rendement en spores de *B. subtilis* 168, il été

conclu que si des essais devrait être poursuivis dans un autre milieu de culture, spécifiquement conçu pour induire et améliorer la sporulation devrait être trouvé pour cette souche.

IV.1.3.2. Culture de *B. licheniformis* LMG 12363

Culture de *B. licheniformis* LMG 12363 en erlenmeyer

B. licheniformis LMG 12363 a été cultivée dans des erlenmeyers de 500 ml afin d'optimiser les conditions de croissance et de sporulation. Une préculture a été d'abord réalisée en incubant la souche dans 200 ml de milieu 868. Cette préculture a ensuite servi à inoculer 200 ml de deux milieux de culture différents : M1 et M2 comme décrit précédemment pour *B. subtilis*. Les cultures ont été incubées à 37 °C avec une agitation modérée de 100rpm. Des échantillons ont été prélevés à différents temps tout au long de la culture. L'évolution de la croissance cellulaire a été suivie par mesure de l' A^{600} .

Les résultats obtenus sont représentés dans la **Figure IV.5**.

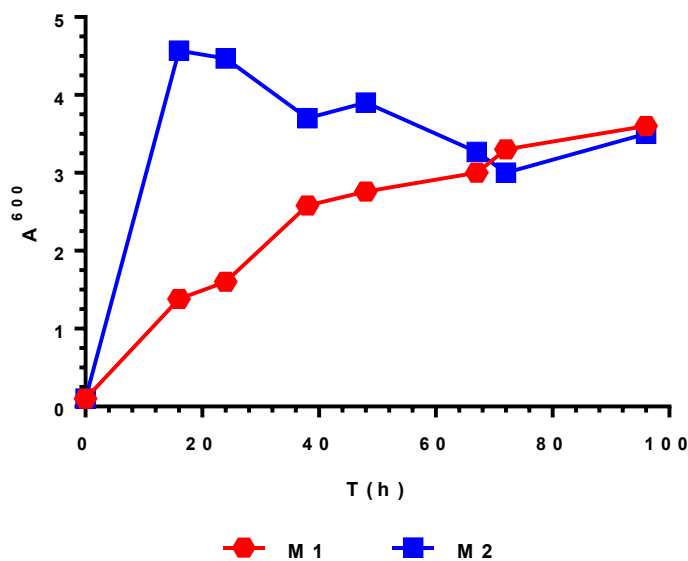


Figure IV. 5. Courbe de croissance chez *B. licheniformis* LMG12363.

Les résultats présentés sont ceux obtenus pour une seule culture. La répétition des expériences donne des résultats variables en ce qui concerne l'évolution de la culture mais des résultats identiques en ce qui concerne la comparaison des milieux de culture.

La **Figure IV.5** illustre l'évolution de la croissance de *B. licheniformis* LMG 12363 dans deux milieux de culture différents, M1 et M2, à 37 °C et 100 rpm. Dans le milieu M2, la concentration cellulaire augmentent rapidement atteignant la phase stationnaire après 16 heures de culture, avec une absorbance (A^{600}) maximale de 4,5. A l'inverse, dans le milieu M1, la croissance est

plus progressive et suit une courbe de croissance classique, avec une A^{600} de 1,3. La culture a été poursuivie jusqu'à 96 heures afin d'évaluer la capacité de sporulation de la souche dans ces deux milieux.

Le dénombrement de la flore totale et des spores a été réalisé après 96 h de culture. Pour quantifier les spores, un traitement thermique à 80 °C pendant 10 min a été appliqué, permettant d'éliminer les formes végétatives de ne conserver que les spores thermorésistantes.

Les résultats obtenus mettent en évidence des différences notables dans la croissance de *B. licheniformis* LMG12363 selon le milieu de culture utilisé. Le milieu M2 a permis une croissance rapide et soutenue, atteignant une absorbance de 4,5 après seulement 16 heures, ce qui indique une phase exponentielle bien marquée suivie d'une entrée en phase stationnaire relativement précoce. En comparaison, la croissance dans le milieu M1 a été plus lente et progressive, atteignant une absorbance maximale nettement inférieure ($A^{600}=1,3$). Cette différence suggère que le milieu M2 est plus favorable à la multiplication cellulaire, probablement en raison de sa composition plus riche ou mieux adaptée aux besoins métaboliques de la souche (Cutting, 2011b).

Cependant, malgré cette croissance importante dans le milieu M2, aucun phénomène de sporulation n'a pu être observé après 96 heures de culture, aussi bien dans M2 que dans M1. Le traitement thermique appliqué (80 °C pendant 10 minutes) n'a permis de récupérer aucune spore, ce qui indique soit une absence totale de sporulation, soit une production de spores en quantité faible, non détectable par les méthodes utilisées ((Nicholson et al., 2000). Plusieurs hypothèses peuvent être envisagées pour expliquer cette absence de sporulation. Premièrement, il est possible que les conditions physico-chimiques (comme le taux d'oxygène dissous, le pH ou le stress nutritionnel) dans des erlenmeyers ne soient pas propices à l'induction de la sporulation. La faible agitation (100 rpm) combinée à l'absence de contrôle automatisé de l'oxygénation ou du pH peut limiter la transition de la phase végétative vers la phase sporulée (Setlow, 2014). Deuxièmement, certains éléments déclencheurs nécessaires à la sporulation, comme des limitations spécifiques en carbone, azote ou la présence de signaux moléculaires, peuvent ne pas être présents ou ne pas atteindre les seuils requis dans les milieux utilisés (Errington, 2003).

La sporulation est un processus complexe et hautement régulé chez les *Bacillus*, dépendant de nombreux facteurs environnementaux et génétiques. Ainsi, l'échec observé en flacon agités souligne les limites de ce type de dispositif expérimental pour l'optimisation de la sporulation. Le recours au fermenteur de 15 l se justifie pleinement dans cette optique, car il permettra un

contrôle précis et continu de paramètres clés tels que l'aération, l'agitation, le pH, et la température

Culture de *B. licheniformis* LMG 12363 en fermenteur de 15 l

Afin de pallier les limitations observées en flacons agités, *B. licheniformis* LMG 12363 a été cultivée en fermenteur de 15 l, avec un volume total de 10 l de milieu M2 dans des conditions plus strictement contrôlées.

Les paramètres du fermenteur :

- Volume inoculé : 200 ml
- pH : régulé à 7,5 par l'acide phosphorique 3N
- Agitation : 400 rpm
- Température : 37 °C
- Aération : 1vvm

Le milieu utilisé pour la fermentation est le milieu M2, déjà identifié comme plus favorable à la croissance cellulaire. La culture a été conduite pendant 96 heures à 37 °C, avec une régulation du pH à 7,4 et un contrôle de l'aération maintenu à une concentration maximale d'oxygène dissous (PO_2) de 103 %.

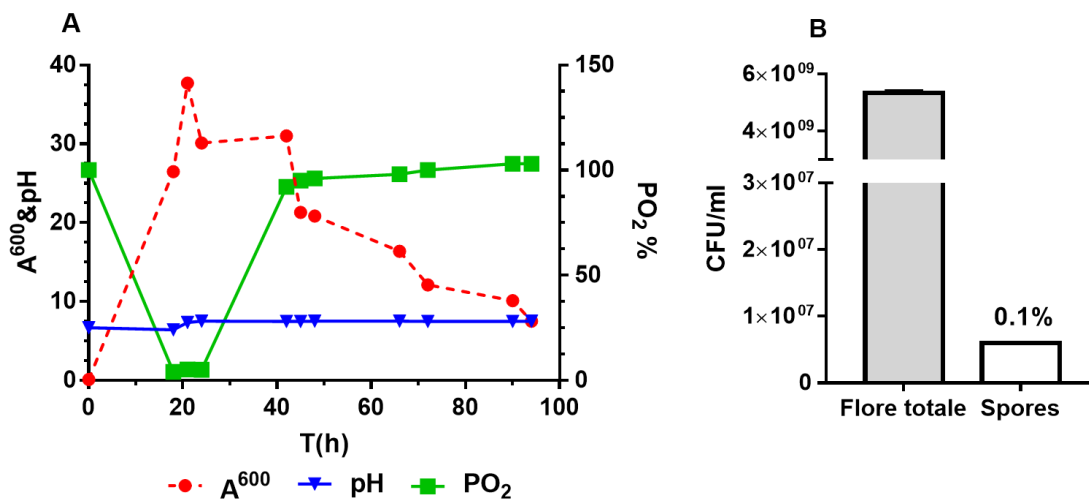


Figure IV.6. : Courbe de croissance (A) et nombre de spores et de la flore totale après 96 h de culture (B) de *B. licheniformis* LMG 12363.

- Courbe de croissance (A^{600}), ■ courbe de l'oxygène dissous en pourcentage, ▼ courbe de pH. A) *B. licheniformis* LMG 12363 a été cultivée pendant 96 h dans un fermenteur de 15 l contenant le milieu M2 (10 l), à 37°C, le pH a été maintenu à 7,4. Les résultats présentés sont ceux obtenus pour une seule culture.

La répétition des expériences donne des résultats variables en ce qui concerne l'évolution de la culture mais des résultats identiques en ce qui concerne la comparaison des milieux de culture. Le comptage de la flore totale et du nombre de spores représente la moyenne de deux réplicats techniques. La variation entre les deux mesures est inférieure à 5%.

Les résultats montrent une évolution atypique de la croissance, caractérisée par une diminution progressive de l'absorbance au cours du temps (**Figure IV.6.A**), ce qui pourrait indiquer une lyse cellulaire partielle ou un ralentissement métabolique global de la population bactérienne. Cette observation est cohérente avec le fait que la souche LMG 12363 présente des difficultés à entrer en sporulation. Après 96 heures de culture, la quantification de la flore totale a révélé une densité cellulaire de $5,3 \times 10^9$ CFU/ml. Cependant, la concentration en spores thermorésistantes était très faible, ne dépassant pas 6×10^6 CFU/ml, soit un taux de sporulation estimé à seulement 0,1%. Ces résultats confirment que *B. licheniformis* LMG 12363 est une souche faiblement sporulante, même dans des conditions optimisées de fermentation.

Conclusion

L'objectif de cette partie était d'optimiser la croissance et la sporulation de *B. licheniformis* LMG 12363 en conditions contrôlées. L'étude a été menée en deux étapes : une première en culture statique dans des erlenmeyers, suivie d'une culture en fermenteur de 15 l permettant un meilleur contrôle des paramètres physico-chimiques.

Les résultats ont montré que le milieu M2 favorisait nettement la croissance bactérienne comparé au milieu M1, tant en erlenmeyer qu'en fermenteur. Toutefois, malgré une biomasse importante, la sporulation de la souche LMG12363 est restée très faible, avec un taux ne dépassant pas 0,1 % après 94 heures de culture. Ni l'agitation, ni la régulation du pH, ni le contrôle de l'oxygénation n'ont pas permis de déclencher une sporulation efficace. Ces observations suggèrent que *B. licheniformis* LMG 12363 n'est pas adaptée aux conditions testées, ou qu'elle présente une faible capacité intrinsèque à sporuler. Par conséquent, une nouvelle stratégie doit être envisagée pour la production de spores, incluant la sélection de souches à plus fort potentiel sporulant et l'exploitation de nouveaux milieux de culture contenant des inducteurs spécifiques (restriction en source nutritive ou du manganèse et le calcium). Ce travail met en évidence l'importance de choix de la souche et des conditions de culture dans l'optimisation de la sporulation, étape clé pour les applications industrielle ou biotechnologiques impliquant des bactéries sporulantes.

IV.1.3.3. Culture de *H. coagulans* sp.

Avant les essais de fermentation, les trois souches de *H. coagulans* Artech_1, Artech_2 et Artech_3 de la collection ont été analysées pour déterminer leur pureté microbiologiques (Tableau IV.9).

Tableau IV. 9 Analyse microbiologique des souches de *H. coagulans* sélectionnées

Critères	Interprétation	<i>H. coagulans</i>		
		Artech_1	Artech_2	Artech_3
Pureté microbiologique	Un seul type de colonie	✓	✓	✓
Développement sur milieux de culture	Croissance moyenne sur 868 Faible croissance sur milieu MRS	✓	✓	✓
Température de croissance	Bonne croissance à 37 °C Faible croissance à 30 °C	✓	✓	✓

Culture de *H. coagulans* sp. en erlenmeyer

Chez *H. coagulans* les cultures ont été menées dans les milieux M2 et M1, à 50 °C avec une agitation de 150 rpm. Les mesures d'absorbance (A^{600}) et de pH ont été réalisées au temps T24, T48 et T72. Les résultats présentés dans la **Figure IV.7** révèlent une croissance nettement plus faible des trois souches dans le milieu M1. Par exemple la souche Artech_1 atteint une absorbance de 1,92 après 72 heures dans le milieu M1, contre $A^{600}=4$ dans le milieu M2. De manière similaire, les souches Artech_2 et Artech_3 présentent des densités cellulaires en M1 inférieures à 3, tandis qu'elles atteignent respectivement 4 et 3,6 dans le milieu M2 après 72 heures.

Parallèlement, une diminution notable du pH est observée dans le milieu M2 milieu, traduisant une acidification progressive du milieu au cours du temps. Pour la souche Artech_3, par exemple, le pH passe de 6,62 au T24 à 5,96 à T72. Cette acidification pourrait être liée à la présence de saccharose dans la composition du milieu de culture, un disaccharide formé de glucose et de fructose). *H. coagulans* appartenant au genre *Bacillus*, est en effet capable de produire de l'acide lactique à partir du glucose, ce qui pourrait expliquer cette baisse du pH.

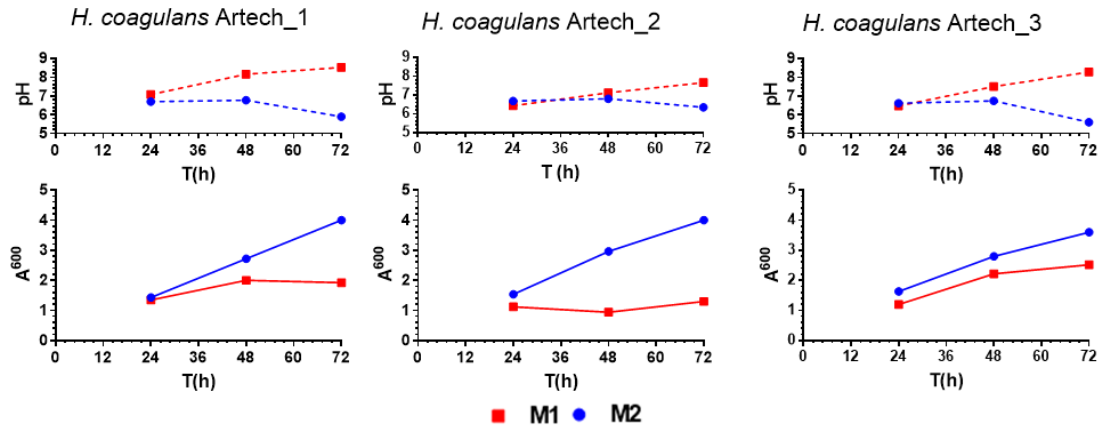


Figure I.V.7. Suivi de croissance et du pH chez *H. coagulans* Artech_1, *H. coagulans* Artech_2 et *H. coagulans* Artech_3

Les résultats présentés sont ceux obtenus pour une seule culture. La répétition des expériences donne des résultats variables en ce qui concerne l'évolution de la culture mais des résultats identiques en ce qui concerne la comparaison des milieux de culture.

Conclusion

Après évaluation des résultats obtenus sur les différentes souches sélectionnées, la souche d'*H. coagulans* Artech_1 a été retenue, pour des raisons internes à la société Artechno, en vue d'une étude plus approfondie. Cette démarche vise à aboutir à une production industrielle et à une valorisation des endospores produites.

IV.1.4. Tolérance des endospores de *H. coagulans* Artech_1 au pH acide et de ses formes végétatives à la bile

Dans le cadre de la commercialisation de *H. coagulans* Artech_1 en tant que probiotique, il est essentiel de caractériser et de quantifier la résistance de ses endospores aux conditions acides de l'estomac, le probiotique étant administré par voie orale mais actif au niveau du côlon. Il est également crucial d'évaluer la résistance de la souche d'intérêt aux sels biliaires libérés par la vésicule biliaire dans l'intestin grêle. En effet, le pH de ce dernier étant proche de la neutralité, il est probable que les endospores y amorcent leur germination, conduisant à la formation de cellules végétatives.

IV.1.4.1. Tolérance des endospores en milieu acide

La préparation des endospores a été réalisée comme suit. A partir d'une culture de *H. coagulans* Artech_1 (200 ml) ayant atteint sa phase stationnaire au cours de laquelle la bactérie a sporulé, a été centrifugée. Le culot cellulaire obtenu a ensuite été, resuspendu dans de l'eau peptonée puis chauffé à 80 °C pendant 10 minutes pour éliminer les cellules végétatives. La suspension d'endospores ainsi obtenues a servi de contrôle. Afin d'évaluer la

résistance des endospores à un stress acide simulant les conditions gastriques, le pH d'une partie aliquote de la suspension de référence été ajusté à 2,0 à l'aide d'une solution de HCl 3 M et incubée à température ambiante pendant 30, 60 et 120 min. Le dénombrement des endospores a été réalisé par la méthode de dilution comme décrit précédemment. Le résultat de ces comptages sont présentés dans le **Tableau IV. 10**.

Tableau IV. 10 Nombre de spores après exposition au pH 2

Condition	Durée min	Nombre de spores CFU/ml	% de survie
Contrôle	-	$3,7 \times 10^9 \pm 0,15$	100
pH 2	30	$3,5 \times 10^9 \pm 0,1$	95
pH 2	60	$3,1 \times 10^9 \pm 0,1$	84
pH 2	120	$3 \times 10^9 \pm 0,9$	81

Les résultats révèlent une diminution de 19 % du nombre d'endospores après 120 min (81 % de survie), ce qui témoigne d'une grande stabilité des endospores en milieu acide. L'examen plus précis des résultats montrent que la perte de viabilité des endospores suit une décroissance exponentielle avec un plateau. En effet, la perte de viabilité entre 60 et 120 min est de 3 % tandis qu'elle est de 16 % pour les premières 60 min). Un ajustement des valeurs obtenues sur ce modèle donne une valeur de 75 % pour le plateau (**Figure IV.8**). Cette observation pourrait démontrer une hétérogénéité dans la population des endospores : 25 % étant plus sensibles au pH. Néanmoins ces résultats confirment une très bonne résistance des endospores de *H. coagulans* Artech_1 à pH 2 et par extension à l'acidité gastrique.

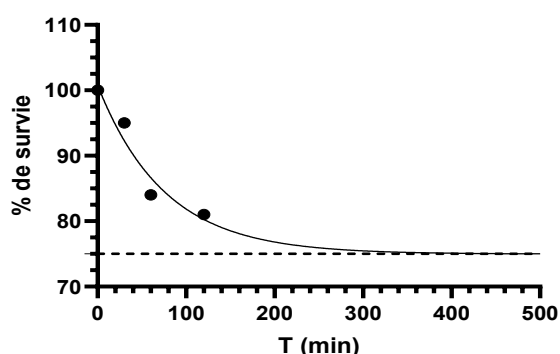


Figure IV.8 Décroissance de la viabilité des endospores de *H. coagulans* Artech_1 à pH 2 au cours du temps

L'ajustement a été réalisé en utilisant l'équation d'une décroissance exponentielle avec un plateau ($r^2 = 0,96$). Pour plus de détails voir texte.

IV.1.4.2. Tolérance à la bile des cellules de *H. coagulans* Artech_1 en phase végétative

Dans une première approche la méthode de diffusion sur un milieu solide a été utilisée pour évaluer la sensibilité de *H. coagulans* Artech_1 à la bile. Pour ce faire, de la poudre de bile bovine non-fractionnée (OX gal powder) a été solubilisée dans de l'eau distillée pour obtenir une solution mère à 1 %. Cette dernière a été ensuite diluée pour obtenir 9 solutions allant de 0,1 à 0,9 %. 50 µl de chacune de ces solutions ont été ensuite déposés sur des disques de papier Whatman 3MM (diamètre 0,5 cm) pour obtenir des quantités de bile allant de 12,76 µg/cm² (0,1 %) à 127,55 µg/cm² (1,0 %).

Les disques ont été déposés sur un milieu 868 gélosé sur lequel a été préalablement étalé une suspension d'*H. coagulans* Artech_1. Après incubation des boîtes de Petri à 37 °C pendant 48 h. Aucune zone d'inhibition de croissance n'a été observée mettant en évidence une tolérance à la bile de la souche d'intérêt dans les conditions expérimentales choisies.

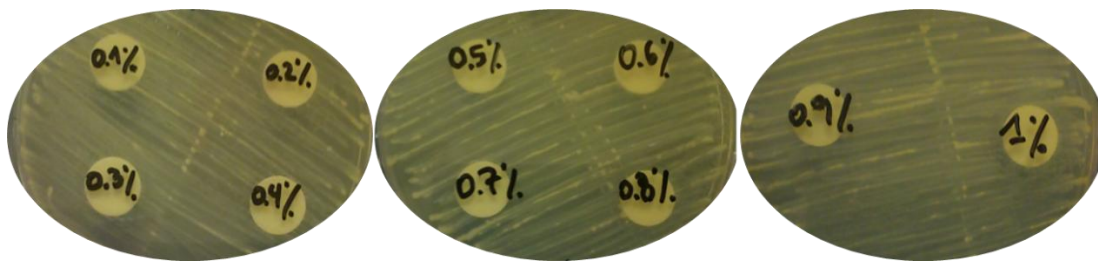


Figure IV.9 Sensibilité de *H. coagulans* Artech_1 à la bile par la méthode de diffusion

Les disques déposés sur l'agar ont été imbibés de 50 µl d'une solution de bile bovine allant de 0,1 à 1 % correspondant à une quantité de bile allant de 12,7 µg/cm² (0,1 %) à 127,5 µg/cm² (1,0 %). Pour plus de détails, voir texte.

En vue de mimer d'avantage les conditions présentes dans l'intestin grêle, des cultures liquides en présence de bile ont été réalisées. Il est généralement accepté que la concentration de la bile dans l'intestin grêle peut varier de 0,5 à 1 % et qu'elle est réabsorbée au niveau de l'iléum de telle manière que la concentration de la bile est très faible au niveau du colon (> 0,05 %, la réabsorption varie entre 90 à 95 %, Begley et al., 2005 ; Charteris et al., 1998). Deux cultures en milieu 868 supplémenté de 0,5 et 1 % ainsi qu'une troisième sans addition de bile (culture contrôle) ont été incubées à 37 °C pendant 72 h. Le dénombrement de la flore totale et des endospores a été réalisé par la méthode de dilution et les résultats présentés dans la **Figure IV.10**. Pour la culture témoin, la flore totale est de 1,1 x 10⁹ CFU et le nombre

de spores correspond à 32 % de la flore totale. Pour les cultures en présence de bile, la flore totale est fortement diminuée et représente, respectivement, pour les concentrations en bile de 0,5 et 1 %, 18 % et 16 % de la flore totale de la culture témoin. La sporulation est également affectée par la bile et n'est plus que 12 et 9 % de la flore totale.

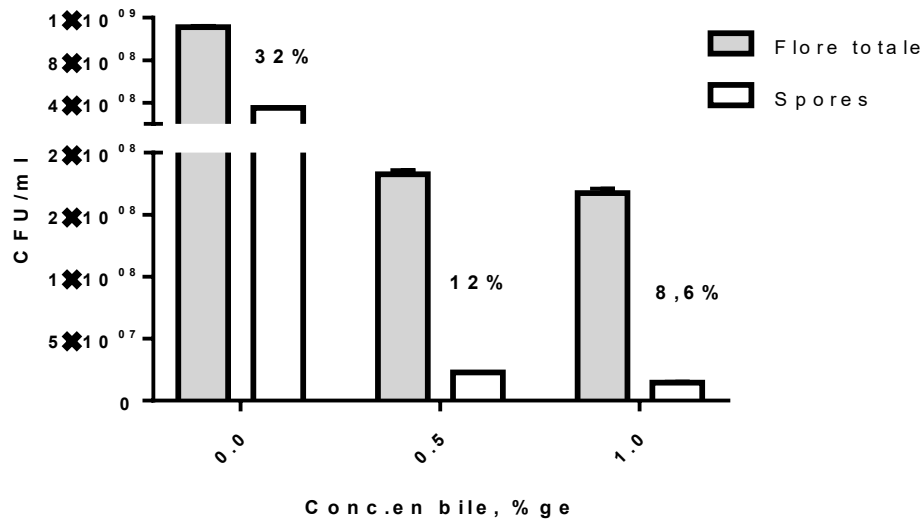


Figure IV.10 Nombre de CFU/ml dans la flore totale de *H. coagulans* Artech_1 et du nombre d'endospores en absence ou en présence de bile (0,5 et 1 %)

Les chiffres au-dessus des barres du nombre de spores représentent le pourcentage de spores dans la flore totale.

Ce comportement est cohérent avec les observations faites chez d'autres bactéries sporulées, pour lesquelles les sels biliars peuvent perturber la croissance cellulaire ou altérer les signaux de sporulation (Cutting, 2011a).

Conclusion

Les résultats obtenus au cours de cette étude mettent en évidence la robustesse physiologique de la souche *H. coagulans* Artech_1, en particulier sa capacité à résister à deux stress majeurs rencontrés lors du passage dans le TGI : l'acidité gastrique et les sels biliars. Les endospores de *H. coagulans* Artech_1 possède une résistance élevée au pH acide qui permet une survie suffisante des endospores jusqu'à l'intestin grêle, condition indispensable pour l'expression de leurs effets bénéfiques.

Par ailleurs, les cultures *H. coagulans* Artech_1 en milieu liquide supplémenté en bile ont montré que la souche est affectée par la présence de la bile. En effet, dans notre modèle expérimental uniquement 20 % de la flore initiale survit à l'action de la bile présente à une

concentration équivalente à celle présente dans l'intestin grêle. Ces résultats suggèrent, à la fois un effet bactéricide et un effet inhibiteur de la bile sur les performances physiologiques de la souche, tout en confirmant sa capacité à sporuler. Cette activité bactéricide est vraisemblablement liée à l'activité détergente des sels biliaires comme le taurocholate et glycocholate de sodium.

Enfin, si on tient compte des taux de survie obtenus lors de nos deux conditions de culture : 75 % de survie en milieu acide et 16 % en présence de bile, 14 % des bactéries qui seraient initialement ingérées par voie orale atteindraient le colon où elles pourraient exercer leur effet bénéfique. Ces résultats sont intéressants pour fixer la dose efficace de spores qu'il faudrait ingérer par voie orale pour obtenir l'effet probiotique de *H. coagulans* Artech_1.

IV.1.5. Comparaison de l'efficacité de différents milieux de culture pour la production industrielle de *H. coagulans* Artech_1

En plus des milieux M1 et M2 utilisés précédemment, le milieu MRS (Tajabadi et al., 2015), traditionnellement utilisé pour la croissance des bacilles lactiques, et le milieu de Schaeffer favorisant la sporulation de *B. subtilis* sur milieu gélosé Schaeffer's sporulation medium, (SSM), (Kreuzer-Martin et al., 2003) ont également été choisis pour trouver les conditions de culture permettant d'atteindre une densité cellulaire importante (10^9 CFU/ml) et un rendement de sporulation élevé (≥ 90 %). Le **Tableau IV.11**, reprend les compositions des milieux utilisés pour cultiver *H. coagulans* Artech_1.

Tableau IV.11 Composition des milieux utilisés pour cultiver *H. coagulans* Artech_1

Produits	M1	M2	MRS	MRS Δ Ac	SSM
	g/l	g/l	g/l	g/l	g/l
Peptone de caséine	5	30	10	10	5
Extrait de viande	3	-			3
Peptone de viande	4	-	5	5	
Tryptone	2,5	-	-	-	
Extrait de levure	4	7,5	5	5	
Saccharose	-	25			
Glucose	-	-	20	20	
KH ₂ PO ₄	2	2			
H ₃ BO ₃	-	41 10 ⁻⁶			
Acide citrique	-	41 10 ⁻³			
(NH ₄) ₂ citrate	-	-			
Na acétate	-	-		-	
NaOH	-	-			40 10 ⁻³
CaCl ₂ . H ₂ O	50 10 ⁻³	-			
Ca(NO ₃) ₂	-				236 10 ⁻³
MgSO ₄ . 7H ₂ O	200 10 ⁻³	400 10 ⁻³			250 10 ⁻³
MnSO ₄ . H ₂ O	3,8 10 ⁻³	20,2 10 ⁻³			
MnCl ₂					2 10 ⁻³
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	4,5 10 ⁻³	57,4 10 ⁻⁶			
CuSO ₄ . 5H ₂ O	2,5 10 ⁻³	4,1 10 ⁻⁶			
FeSO ₄ . 7H ₂ O	450 10 ⁻⁶	-			300 10 ⁻⁶
FeCl ₃		20,6 10 ⁻³			
NaMoO ₄		16,4 10 ⁻⁶ *			
KI		8,2 10 ⁻⁶			
KCl					1
Tween				1 ml	

MRS Δ Ac : MRS déplété de l'acétate de Na ; voir Tableau IV.12 pour plus de détails pour le milieu M2

IV.1.5.1. Culture de *H. coagulans* Artech_1 en erlenmeyer

Etant donné que *H. coagulans* Artech_1 est capable de croître dans une large gamme de plage de température, allant de 35 °C à 55 °C, nous avons choisi dans un premier temps d'effectuer les cultures à 37 °C. Ce choix vise à réduire les coûts énergétiques liés au chauffage du milieu de culture, tout en restant dans la plage optimale de croissance. Les

cultures ont été réalisées à 37 °C dans quatre milieux culture : M1, M2, MRS et MRSΔNaAc dans des erlenmeyers de 500 ml contenant 250 ml de milieu et avec une agitation de 100 rpm. Une partie aliquote d'une préculture de 48 h a été utilisée pour inoculer les milieux frais et obtenir une A^{600} initiale de 0,1. Les mesures d'absorbance A^{600} et du pH ont été réalisées au temps T0, 24, 30, 48 et 53 heures. Les résultats sont détaillés dans la **Figure IV.11**.

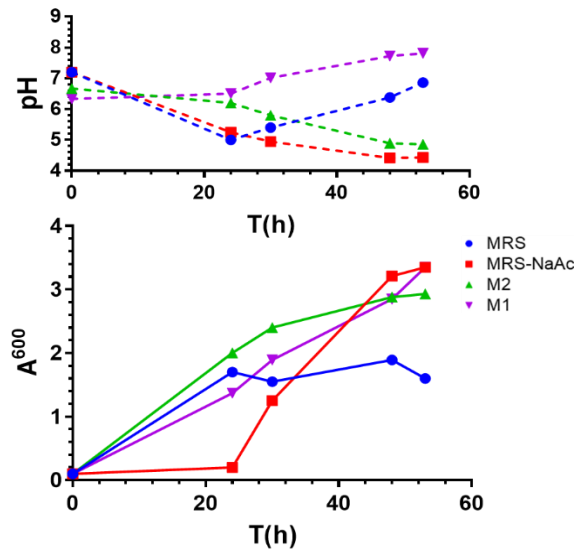


Figure IV.11 Suivi de la croissance de *H. coagulans* Artech_1 à 37°C.

Les résultats présentés sont ceux obtenus pour une seule culture. La répétition des expériences donne des résultats variables en ce qui concerne l'évolution de la culture mais des résultats identiques en ce qui concerne la comparaison des milieux de culture.

L'analyse des données montre une croissance variable selon le milieu utilisé. La densité cellulaire est plus élevée dans les milieux M1, M2 et MRSΔNaAc ($A^{600} \geq 3$), que pour le milieu MRS ($A^{600} = 1,6$). Toutefois, un phénomène intéressant a été observé : la sporulation de la souche Artechno_1 n'a été observée qu'au temps T53 dans le milieu M2. Ces résultats suggèrent que des conditions de stress modéré, comme celles présentes dans le milieu M1, peuvent favoriser l'induction de la sporulation. Afin d'optimiser ce processus, des cultures en fermenteur de 15 l ont été entreprises dans des milieux M1 et M2, à une température plus élevée de 50 °C. Ce choix visait à renforcer les conditions favorables à la sporulation, dans l'objectif d'augmenter le rendement en spores pour des applications industrielles potentielles.

IV.1.5.2. Culture de *H. coagulans* Artech_1 dans les milieux SSM en erlenmeyer

Parmi les cinq milieux testés pour la sporulation de *H. coagulans* Artech_1, le milieu SSM est le moins complexe. Il contient que deux sources de nutriments : un extrait de viande (3 g/l) et de la peptone de caséine (5 g/l) (**Tableau IV.11**). Afin d'évaluer l'impact de ces constituants, *H. coagulans* Artech_1 a été cultivé dans le milieu SSM standard (désigné ci-après SSM1x) ainsi que dans deux variantes dont les concentrations de tous les composants ont été respectivement doublées (SSM2x) ou quadruplées (SSM4x).

L'évolution de la croissance, du pH, ainsi que le nombre d'endospores (Nspo) à 24 et à 48 h ont été suivies (**Figure IV.12**, panneaux **A** et **B**). En revanche, la quantification du nombre total de cellules viables (Ntot), nécessaire au calcul du pourcentage de sporulation selon la formule $(N_{spo}/N_{tot}) \times 100$, n'a pas pu être réalisée en raison d'un problème expérimental. Malgré cela, plusieurs observations peuvent être formulées.

Après 24 h d'incubation, la densité cellulaire (mesurée par l' A^{600}) atteint respectivement 5,9, 3,3 et 5,4 dans les milieux SSM1x, 2x et 4x. Après 48 h, une baisse de l' A^{600} est observée dans les trois milieux, avec des valeurs respectives de 3,4, 2,4 et 1,4. Concernant la sporulation, celle-ci est présente après 24 h uniquement dans le milieu SSM1x ($1,5 \times 10^7$ CFU/ml) et se poursuit pendant les 24 h suivantes, atteignant un maximum de $1,4 \times 10^8$ CFU/ml, soit une quantité dix fois supérieure à celle mesurée à 24 h. Dans les milieux SSM2x 4x, les endospores ne sont pas présentes après 24h de culture mais bien après 48h et leur nombre pour les deux milieux est de 10^7 CFU/ml du même ordre de grandeur que celui obtenu pour le milieu SSM1x après 24 h.

En revanche, dans le milieu SSM4x, la sporulation ne débute qu'après 48 h, avec une production équivalente à la moitié de celle observée dans SSM1x après 24 h ($N_{spo}(48\text{ h})_{4x} \approx \frac{1}{2} N_{spo}(24\text{ h})_{1x}$). Ces résultats sont inattendus : en effet, la forte diminution de l' A^{600} dans SSM2x et 4x après 48 h aurait pu être interprétée comme une sporulation importante accompagnée d'une lyse cellulaire. Ce qui n'est pas le cas. Une hypothèse expliquant cette lyse marquée ou l'absence d'endospores pourrait être liée à la concentration élevée en ions, quadruplée dans ce milieu, en particulier les ions Mn^{2+} , K^+ et Cl^- . La concentration finale en Mn^{2+} dans SSM4x est de 40 μM , bien inférieure à 1 mM, seuil au-delà duquel la croissance bactérienne est généralement affectée.

En revanche, les concentrations finales en K^+ atteint sont respectivement, 2 et 4 fois celle présente dans les milieux M1, M2 et MRS, où cet ion est apporté par le KH_2PO_4 .

Afin d'éviter les effets potentiels d'inhibition liés à cet excès ionique, seules les proportions en extrait de viande et en peptone de caséine ont été modifiées dans la suite de l'étude, afin d'évaluer spécifiquement leur impact sur la sporulation et son rendement. Les milieux SSM1/2x, SSM2/1x et SSM2/2x correspondent respectivement à : (i) un milieu avec une

quantité standard d'extrait de viande et une quantité doublée de peptone de caséine ; (ii) une quantité d'extrait de viande doublée et une quantité standard de peptone ; (ii) une quantité doublée des deux sources de nutriment Une nomenclature équivalente a été utilisée pour les milieux SSM1/4x, SSM4/1x et SSM4/4x. Les résultats de ces différentes conditions expérimentales sont présentés dans la **Figure IV.12 ; C, D, E et F**.

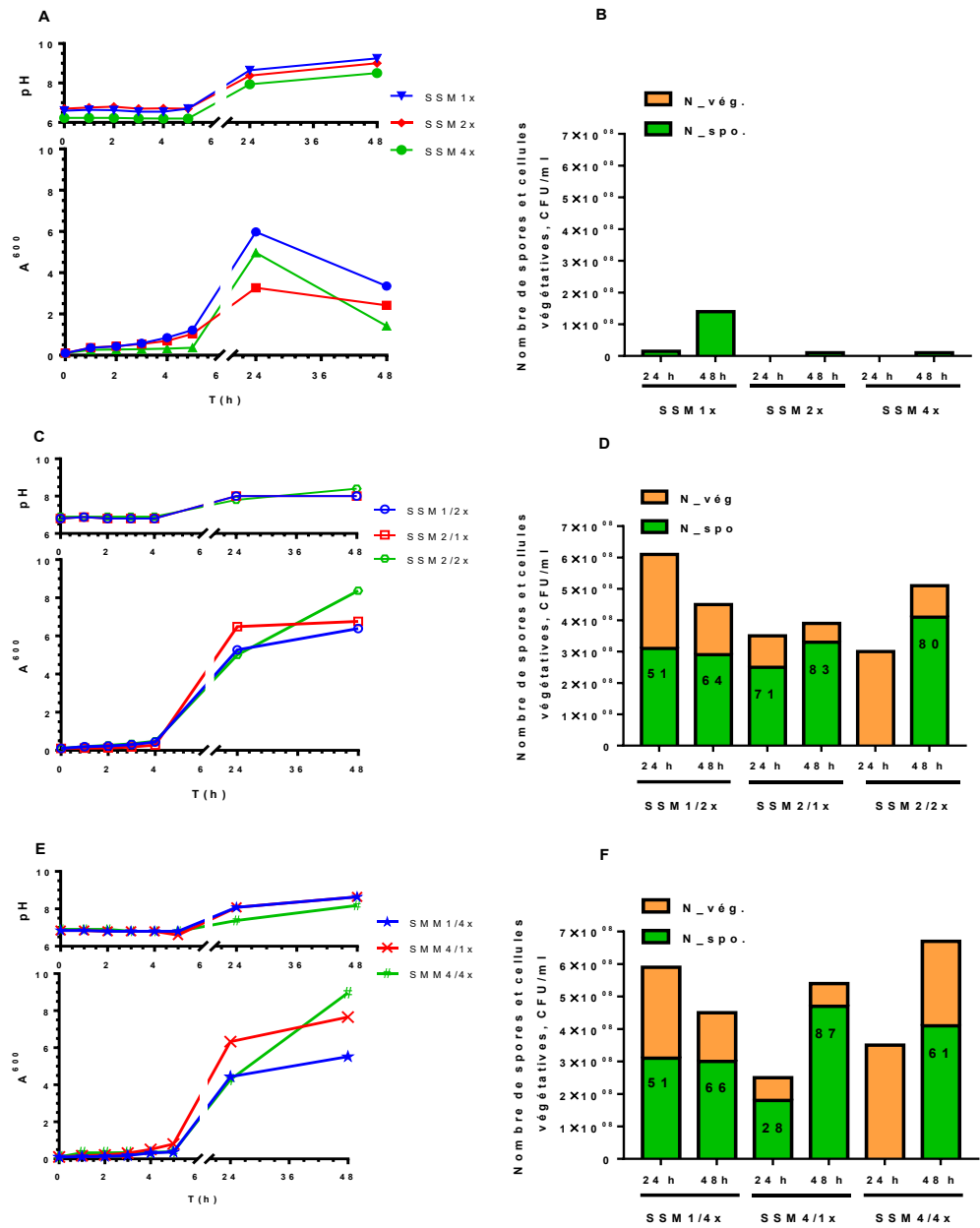


Figure IV.12 Suivi de la croissance, du pH (A, C, E) et de la sporulation (B, D, F) dans différents milieux SSM modifiés pendant 48 h.

Les panneaux présentent les résultats obtenus dans les milieux suivants : **SSM1X**, **SSM2X**, **SSM4X**, **SSM2/1X** : extrait de viande 2x, peptone 1x, **SSM/2X** : extrait de viande 1x, peptone 2x, **SSM2/2X** : extrait de viande 2x, peptone 2x, **SSM1/4X** : extrait de viande 1x, peptone 4x, **SSM4/1X** : extrait de viande 4x, peptone 1x, **SSM4/4X** : extrait de viande 4x, peptone 4x. Les résultats présentés sont ceux obtenus pour une seule culture. La répétition des expériences donne des résultats variables en ce qui concerne l'évolution de la culture mais des résultats identiques en ce qui concerne la comparaison des milieux de culture. Le comptage de la flore totale et du nombre de spores représente la moyenne de deux réplicats techniques. La variation entre les deux mesures est inférieure à 5%.

Les courbes de croissance obtenues pour les milieux allant de SSM1/2x à SSM4/4x ne montrent pas de différences significatives, à l'exception du milieu SSM4/4x. L'évolution du pH est également similaire entre les différentes cultures, se caractérisant systématiquement par une augmentation en fin de culture. Les principales différences observées concernent la production d'endospores et leur rendement. Elles sont reprises ci-dessous sous forme d'une liste pour plus de clarté.

Observations principales

- A l'exception des milieux SSM2/2x et 4/4x, des endospores sont détectées dans tous les milieux après 24 h de culture. Après 48 h, tous les milieux présentent des endospores.
- Dans le milieu SSM1/2x, le nombre d'endospores reste stable entre 24 h et 48 h ($3,1 \times 10^8$ et $2,9 \times 10^8$). Cependant, le rendement de sporulation augmente entre ces deux temps, passant de 51 % à 64 %. Cette différence s'explique par une diminution du nombre de cellules végétatives entre 24 h et 48 h. Cela suggère que la majorité des endospores ont été produites dès les 24 premières heures, et qu'ensuite, les cellules qui n'ont pas initié leur sporulation ne se divisent plus et finissent par perdre leur viabilité.
- Une observation similaire est faite pour le milieu SSM1/4x, où le nombre d'endospores reste quasi identique entre 24 h et 48 h ($3,1 \times 10^8$ et 3×10^8), mais le rendement augmente également et passe 51 à 66 %, en raison de la diminution de la population végétative.
- Les nombres d'endospores produits dans les milieux SSM1/2x et SSM1/4x sont très proches et suggère la présence d'un facteur limitant dans l'extrait de viande. En effet, doubler la quantité de peptone n'a aucun effet significatif ni sur la densité cellulaire finale, ni sur la production d'endospores. Lorsque le facteur limitant présent dans l'extrait de viande est épuisé dans le milieu, la sporulation d'une partie importante de la population bactérienne est enclenchée ainsi que la mort progressive des cellules végétatives qui n'ont pas entamé leur sporulation.
- Pour les cultures dans les milieux SSM2/1 et 4/1x, le N_{tot} des cellules viables augmentent en passant de 24 à 48 h, indiquant que maintenant l'extrait de viande n'est plus limitant.
- Pour les cultures dans les milieux SSM2/1x et 4/1x, les N_{tot} à 24 et 48 h sont inférieurs à ceux obtenus pour les milieux SSM1/2x et 1/4x au même temps de culture. Ce qui indique que l'augmentation de la quantité d'extrait de viande ne compense pas totalement la diminution de celle de la peptone.
- Pour le milieu SSM2/1x après 24 h de culture, le pourcentage de sporulation (71 %) est plus important que celui obtenu pour la culture dans le milieu SSM4/1x (28 %). Ce qui est en

accord avec le fait que la carence en nutriment arrive plus rapidement dans le milieu SSM2/1x.

- Pour les milieux SMM2/2x et 4/4x, l'effet limitant de l'extrait de viande n'est plus présent ($N_{tot}(48\text{ h}) > N_{tot}(24\text{ h})$). La présence d'endospores n'est pas mise en évidence dans les cultures après 24 h. Après 48 h et le N_{tot} de la culture dans le milieu SSM4/4x est supérieur à celui de la culture en milieu SSM2/2x.
- Le pourcentage d'endospores dans le milieu SSM2/2x après 48 h est de 80 % contre 61 % pour le milieu SSM4/4x. Ce qui met en évidence un lien direct entre le début de la sporulation et la quantité de nutriments dans le milieu de culture et son épuisement.

Conclusion

Bien qu'il soit établi que la formation d'endospores chez les *Bacilli* constitue un mécanisme ultime de survie en conditions de carence nutritionnelle, la variation du rapport entre l'extrait de viande et la peptone de caséine dans le milieu de Schaeffer nous a permis de mieux comprendre les conditions optimales favorisant la production d'endospores chez *B. licheniformis* Artech_1 : la « clef » réside dans la maîtrise de la carence en nutriment.

Ainsi, nos résultats ont démontré que l'extrait de viande contient un facteur essentiel au développement de *H. coagulans* Artech_1 dont l'épuisement déclenche la sporulation et la mort progressive des cellules végétatives restantes (**Figure IV.12 D et F**, milieux SSM1/2x et 1/4x).

Le doublement de la quantité d'extrait de viande dans le milieu SSM2/1x restaure une croissance qui est désormais limitée principalement par la quantité de peptone. La sporulation y débute après 24 h (% sporulation : 71) et est presque complète après 48 h (% sporulation : 83). Le quadruplement de l'extrait de viande (milieu SSM4/1x) montre que celui-ci peut partiellement compenser une faible quantité de peptone et permettant d'atteindre une population plus élevée que dans le milieu (SSM2/1x). L'augmentation des nutriments retarde la carence nutritionnelle et donc le déclenchement de la sporulation qui reste modérée après 24 h (% sporulation : 28) mais s'approche de la complétion après 48 h (% sporulation : 87). Le milieu SMM2/2x donne un résultat similaire, à l'exception que la sporulation ne débute qu'après 24 h, avec un rendement atteignant 80 % à 48 h. En fonction du coût des produits, de la fermentation et des nutriments résiduels non-consommés, un industriel pourra choisir entre ces deux milieux si le nombre de spores obtenu est suffisant. Si ce n'est pas le cas, le milieu SMM4/4x permet d'atteindre une population bactérienne encore plus élevée mais retarde significativement l'initiation de la sporulation. Celle-ci ne débute qu'après 48 h (%

sporulation : 61) et n'atteindra son terme que si la fermentation est prolongée au-delà de 48 h.

L'indentification des composés limitants présents dans l'extrait de viande pourrait également permettre un meilleur contrôle du déclenchement de la sporulation. Adapter leur concentration permettrait d'atteindre la densité cellulaire souhaitée avant leur épuisement qui marque le signal de départ de la sporulation. Les différentes cultures réalisées confirment que la sporulation chez les Bacilli n'est pas un phénomène coopératif, l'entrée en sporulation de certaines cellules n'entraînent pas celle de toute la population. Il s'agit plutôt d'un système bistable, dans lequel deux sous-population coexistent, chacune dans un état physiologique distinct.

Une autre observation importante est que ni, l' A^{600} ou le suivi du pH ne permettent d'estimer ou de prédire avec précision le rendement de sporulation. Seule la détermination du nombre de cellules viables et le comptage des endospores permettent une évaluation fiable de ce rendement, et donc la sélection du meilleur milieu pour la production. Cette méthode est cependant fastidieuse. La construction d'un outil moléculaire permettant d'indiquer le déclenchement ou l'avancement de la sporulation constituerait une avancée significative. Un tel outil permettrait d'envisager, dans un premier temps, un criblage des conditions de culture, robotisé ou non, pour optimiser la production d'endospores chez les Bacilli. La conception et l'utilisation d'un tel outil feront l'objet du point **IV.2**.

IV.2. Développement d'un outil moléculaire pour le suivi de la sporulation chez

H. coagulans

L'objectif est de concevoir un outil moléculaire basé sur un gène rapporteur codant pour une protéine fluorescente, telle que la *Green Fluorescent Protein* (GFP) ou *Cyan Fluorescent Protein* (CFP), placée sous le contrôle d'un promoteur spécifique de la sporulation. Cet outil permettra de suivre l'initiation de la sporulation dans un milieu de culture contenant *H. coagulans* Artech_1 en croissance. Le système pourra être intégré soit dans le chromosome bactérien, soit porté par un plasmide. Le promoteur sélectionné pour cet outil pourra également être utilisé chez d'autres membres de la classe des *Bacilli*. L'orthologue, chez d'autres espèces de *Bacilli*, du promoteur sélectionné chez *H. coagulans* Artech_1 pourra être utilisé pour des applications similaires.

Choix des fluorophores

Dans cette étude, les fluorophores CFP (*Cyan Fluorescent Protein*) et GFP (*Green Fluorescent Protein*) ont été initialement choisis comme gènes rapporteurs pour le suivi de

l'activité transcriptionnelle de promoteurs spécifiques de la sporulation chez *H. coagulans*, *B. subtilis* et *B. licheniformis*. Ces protéines fluorescentes, dérivées de la GFP native de *Aequorea victoria*, ont été sélectionnées pour leur compatibilité avec les systèmes bactériens et leur spectre d'émission distinct, permettant en principe une détection multiplexée.

GFPmut3

La *GFPmut3* est une variante optimisée de la protéine fluorescente verte (*GFP*). Elle se distingue par une maturation plus rapide et une intensité de fluorescence accrue par rapport à la *GFP* sauvage (Cormack et al., 1996). Ces propriétés sont particulièrement intéressantes pour des bactéries comme *H. coagulans*, qui se développent à des températures relativement élevées, car *GFPmut3* reste fonctionnelle à 37- 42 °C (Andersen et al., 1998). De plus, le spectre d'excitation/émission de la *GFPmut3* (environ 501/511 nm) est compatible avec les systèmes de microscopie classiques, ce qui facilite son utilisation dans des expériences de suivi en temps réel, notamment en fluorescence et en imagerie de cellules vivantes (Shaner et al., 2005).

CFP

La *CFP* (*Cyan Fluorescent Protein*) est un fluorophore dérivé de la *GFP*, modifié pour émettre dans le bleu-cyan. Son spectre d'excitation (environ 433 nm) et d'émission (environ 475 nm) la rend particulièrement intéressante pour des approches de double marquage, en combinaison avec des fluorophores émettant dans le vert comme la *GFPmut3*. Dans le cadre de l'étude de la sporulation chez *H. coagulans*, l'utilisation de la *CFP* permet de suivre l'expression de gènes spécifiques dans un contexte où l'autofluorescence cellulaire, souvent observée dans le vert, pourrait interférer avec le signal de la *GFP* (Elowitz et al., 2002 ; Veening et al., 2008a).

Grâce à son spectre bien distinct, la *CFP* offre une meilleure résolution spectrale, ce qui facilite l'analyse simultanée de plusieurs signaux fluorescents au sein de la même cellule. Elle peut, par exemple, être utilisée pour marquer l'activité transcriptionnelle d'un gène tardif de la sporulation, pendant que la *GFP* suit un gène exprimé plus précocement.

IV.2.1. Sélection des promoteurs régulés au cours de la sporulation

Dans le cadre de l'étude de la régulation la sporulation chez les *Bacilli* qui forment des endospores, *B. subtilis* constitue depuis plusieurs décennies l'organisme modèle de référence pour l'analyse des processus de différenciation cellulaire, et plus particulièrement de la sporulation (Errington, 2003 ; Hilbert & Piggot, 2004). Son génome est entièrement séquencé

(Kunst et al., 1997), et de nombreux outils génétiques ont été développés, facilitant la manipulation ciblée de son matériel génétique et l'étude fonctionnelle de gènes impliqués dans les étapes précoces et tardives de la sporulation. Ces gènes sont bien conservés chez les *Bacilli* et les connaissances acquises chez *B. subtilis* peuvent être étendues à tous les autres membres appartenant à cette classe, tel que *H. coagulans* (Galperin et al., 2022). Pour sélectionner les promoteurs qui seront mis en amont du gène codant pour la *GFP*, ils devront répondre aux critères suivants : être en amont d'un gène :

- spécifique de la sporulation et pas au-delà du stade III de la sporulation : cette condition élimine tous les gènes impliqués dans la maturation de l'endospore.
- exprimé uniquement ou surexprimé lors de la sporulation : ce critère est important pour mettre en évidence la variation de la fluorescence de la protéine rapportrice du bruit de fond.
- transitoirement exprimé lors de la sporulation : cette propriété mettra en évidence au cours de la culture l'étape de la sporulation dans laquelle le promoteur est spécifique.
- le gène dont il contrôle l'expression est repris dans la liste des gènes universellement conservés chez les bactéries appartenant au Bacillota : ce critère permettra d'étendre nos résultats à tous les membres de ce phylum tels que ceux appartenant à la classe des Clostridia qui forment aussi des endospores.

Sur base de ces critères, les promoteurs en amont des gènes *spo0A*, *spolIE* et *spolIIAA* codant pour des protéines conservées chez tous les Bacillota formant des endospores ont été sélectionnés. Les produits de ces gènes jouent des fonctions clés depuis la décision d'initier la sporulation jusqu'à la mise en place de la préspore. Une description plus détaillée de la fonction du produit de ces gènes est reprise ci-dessous.

Spo0A : régulateur central pour l'entrée en sporulation

Le gène *spo0A* code pour un régulateur transcriptionnel de type régulateur à deux composants, qui joue un rôle dans la décision d'engager la sporulation. Sa forme active phosphorylée (Spo0a-P), s'accumule en réponse à des signaux de stress nutritionnel ou cellulaire via une cascade de phosphorylation impliquant plusieurs histidine-kinases (KinA-E) et les phosphotransférases Spo0F et Spo0B. L'activation de Spo0A entraîne la répression des gènes de croissance végétatives tout en induisant la transcription des premiers gènes impliqués dans la sporulation notamment *spolIA*, *spolIE*, *spolIG* et *spolIR*, marquant le passage au stade II de la sporulation (Fujita & Losick, 2005 ; Predich et al., 1992).

Chez *B. subtilis*, la transcription de *spo0A* est régulée par deux promoteurs distincts. Le promoteur *Ps*, le plus proche du codon d'initiation, est spécifique de la sporulation. Il reste inactif pendant la croissance végétative et est réprimé par SinR et dépend du facteur σ^H ainsi

que de la présence du glucose (Chibazakura et al., 1991). En revanche, le promoteur le plus en amont nommé *P_v* (promoteur végétatif) est quant à lui, sous le contrôle de l'ARN polymérase associée au facteur σA qui est actif et exprimé pendant la phase de croissance exponentielle.

SpolIE : initiateur de la division asymétrique et de l'activation σF

Le gène *spolIE* code pour une phosphatase et son expression est sous le contrôle de Spo0A. SpolIE est essentielle à l'établissement de la division asymétrique de la cellule au stade II en interagissant avec FtsA-FtsZ du cytosquelette (Arigoni et al., 1995)

SpolIE active le facteur σF , spécifique de la préspore, en déphosphorylant son inhibiteur SpolIIA~P et requiert du Mn^{2+} comme cofacteur pour son activité phosphatase. L'ion métallique influence également l'oligomérisation de SpolIE et la formation du septum asymétrique. En effet l'absence de Mn^{2+} du milieu de sporulation, retarde la formation de l'anneau FtsZ au pôle de la cellule bactérienne (Cendrowicz et al., 2017).

Cette double fonction à la fois structurale et régulatrice est essentielle à la formation correcte de la préspore ainsi qu'à la mise en place d'une transcription différentielle entre préspore et la cellule mère.

SpolIIA : élément clé de la communication intercompartimentale

Le gène *spolIIA*, appartenant à l'opéron SpolIIAH, est exprimé dans la cellule mère sous le contrôle du facteur sigma σE , actif à partir du stade III. Il participe à la formation d'un canal protéique (SpolIIA-SpolIQ) reliant la cellule mère à la préspore (Camp & Losick, 2008)(Meisner et al., 2008). Ce complexe assure le passage des nutriments et des signaux entre les deux compartiments, et est indispensable à l'activation de la transcription du facteur σB dans la préspore. L'absence de *spolIIA* bloque la progression dans la cellule mère et dans la préspore soulignant son rôle central dans la coordination morphogénétique et transcriptionnelle entre les deux compartiments (Doan, 2003)

IV.2.2. Transformation de *H. coagulans* Artech_1

Afin d'introduire du matériel génétique exogène chez *H. coagulans* Artech_1, trois méthodes de transformation ont été mises en œuvre : la compétence naturelle, la transformation des protoplastes et l'électroporation.

IV.2.2.1. Identification des marqueurs de sélection

Avant d'entreprendre les essais de transformation génétique, nous avons d'abord déterminé les concentrations minimales inhibitrices (CMI) de plusieurs antibiotiques afin d'évaluer la sensibilité des souches de *H. coagulans*. Cette étape préalable est essentielle pour identifier des marqueurs de sélection compatibles avec les souches étudiées. Les CMI ont été déterminées par micro-dilution en milieu Mueller-Hinton pour les souches *H. coagulans* DSM1 et *H. coagulans* Artech_1 vis-à-vis du chloramphénicol, de la spectinomycine et de la kanamycine. Les résultats sont présentés dans le **Tableau IV.12**.

Tableau IV.12. Détermination des CMI pour *H. coagulans*

Antibiotique	Concentrations testées (µg/ml)	CMI observée (µg/ml)	Interprétation <i>H. coagulans</i> DSM1	Interprétation <i>H. coagulans</i> Artech_1
Chloramphénicol	1,2,3,4,5,6,7,8,9,10	2	S	S
Spectinomycine	1,2,3,4,5,6,7,8,9,10	4	S	S
Kanamycine	1,2,3,4,5,6,7,8,9,10	1	S	S

*S : sensible

Les deux souches de *H. coagulans* sont sensibles au chloramphénicol, à la spectinomycine et à la kanamycine.

V.2.2.2. Transformation par compétence naturelle

La compétence naturelle a été induite selon un protocole adapté aux bactéries sporulantes. La préparation de cellules compétentes de *H. coagulans* Artech_1 a été réalisée selon un protocole adapté aux *Bacillus*. Une préculture a été initiée en ensemençant 5 ml de milieu LM (Luria – Miller) avec une colonie fraîche, suivie d'une incubation overnight à 37 °C. Le lendemain, cette préculture a été utilisée pour inoculer le milieu LM (Voir **Tableau III.7** Matériel et Méthodes) frais de manière à obtenir une A⁶⁰⁰ de 0,2. Cette culture a ensuite été incubée à 37 °C sous agitation jusqu'à ce que l'A⁶⁰⁰ atteigne 1, ce qui correspond approximativement à une phase de croissance exponentielle active. 500 µl ont été prélevés et transférés dans 10 ml de milieu MD (voir **Tableau III.7**) dans un erlenmeyer de 100 ml. Cette culture a été incubée pendant 3 h 30 à 37 °C. A l'issue de cette étape, les cellules compétentes ont été utilisées directement pour la transformation, 2 à 3 µg d'ADN plasmidique ont été ajoutés à 500 µl de cellules compétentes. Le mélange a été transféré dans un tube Falcon de 10 ml, puis incubés pendant 1 h 30 à 37 °C sous agitation (250 rpm). Après l'incubation, les cellules ont été étalées sur gélose 868 contenant du chloramphénicol 5 µg/ml, pour la sélection des transformants. Les boîtes ont été incubées à 37 °C pendant 48 h. Aucune colonie n'a été observée après cette période d'incubation.

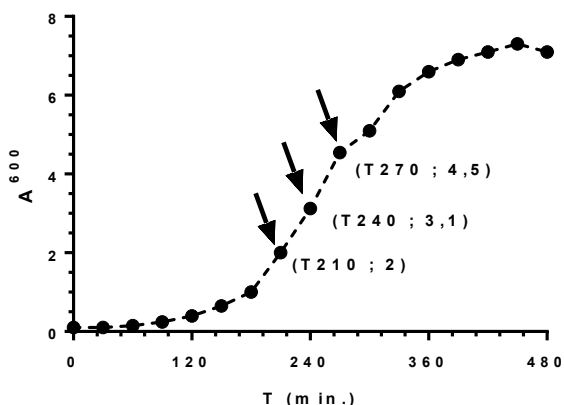


Figure IV.13. Courbe de croissance de *H. coagulans* Artech_1 dans le milieu 868

Une courbe de croissance a été réalisée dans le milieu 868 afin de déterminer la phase exponentielle de croissance. Les flèches indiquent les temps de prélèvement et l'A⁶⁰⁰.

Conclusion

La compétence naturelle a été induite selon un protocole adapté aux *Bacilli* qui forment des endospores, mais n'a conduit à aucun clone transformé détectable, malgré plusieurs tentatives et ajustement des conditions de culture. Nous avons poursuivi avec la technique de transformation des protoplastes.

IV.2.2.3. Transformation des protoplastes

La préparation de la culture bactérienne a été réalisée comme suit : Une préculture de *H. coagulans* Artech_1 a été lancée dans 25 ml de milieu Pennassay (**Tableau III.7**) à 37 °C pendant une nuit. Cette préculture a été utilisée pour ensemercer 25 ml de milieu frais afin d'obtenir une A⁶⁰⁰ de 0,25. La culture est poursuivie à 37 °C jusqu'à obtenir une absorbance A⁶⁰⁰ de ~0,9 (T180 correspondant à une A⁶⁰⁰ de 0,819), correspondant à une phase de croissance exponentielle optimale pour la préparation des protoplastes (**Figure IV.14**). Vingt millilitres de cette culture sont prélevés, puis centrifugés à 3220 x g pendant 15 minutes à 4 °C. Le culot cellulaire a été resuspendu dans 5 ml de tampon SMMP (Sucrose-maléique Acid MgCl₂ Phosphate buffer) contenant 2 mg/ml de lysozyme (**Tableau III.7**).

Cette suspension est incubée à 37 °C pendant 30 à 45 minutes dans un erlenmeyer de 100 ml, pour favoriser la dégradation partielle de la paroi cellulaire et la formation des protoplastes. Par la suite, 12 ml de SMMP ont été ajoutés à la suspension, qui est homogénéisée puis centrifugée à 4200 x g, pendant 12 minutes à 4 °C. Le culot obtenu est resuspendu dans 3 ml de SMMP. Pour la transformation, 500 µl de la suspension de protoplastes a été transférée dans un tube stérile contenant 25 µl d'ADN plasmidique et 0,5 ml de tampon SMM 2x. Ce

mélange a été ensuite ajouté à un tube Falcon stérile contenant 1,6 ml de PEG 40 % et 0,5 ml de tampon SSM 2x. L'incubation a été effectuée à une température ambiante pendant 2 minutes afin de faciliter l'entrée de l'ADN dans les protoplastes. Cinq millilitres de SMMP supplémentés en albumine bovine (BSA) à 2 % préalablement filtrée, ont été ensuite ajoutés au mélange. Après centrifugation à 4200 x g pendant 8 minutes à 8 °C, les protoplastes ont été resuspendus dans 1 ml de SMMP contenant également 2 % de BSA. Une incubation a été ensuite réalisée pendant 1 h 30 à 30 °C sous agitation modérée (100 rpm) pour permettre la régénération des protoplastes.

A l'issue de l'incubation, les protoplastes sontensemencés sur milieu DM3 (**Tableau III.7**) afin de permettre leur développement. La sélection des transformants a été effectuée en parallèle sur le même milieu contenant l'antibiotique (chloramphénicol 5 µg/ml) correspondant à la cassette de résistance. Un contrôle négatif a été systématiquement mis en place en soumettant les protoplastes non transformés sans ADN à une culture sur DM3 supplémenté en 5 µg/ml de chloramphénicol, afin d'évaluer l'absence de croissance et d'exclure toute contamination ou résistance spontanée. Les boîtes ont été incubées à 30 °C pendant 2 à 5 jours. Aucune colonie n'a été observée après cette période d'incubation.

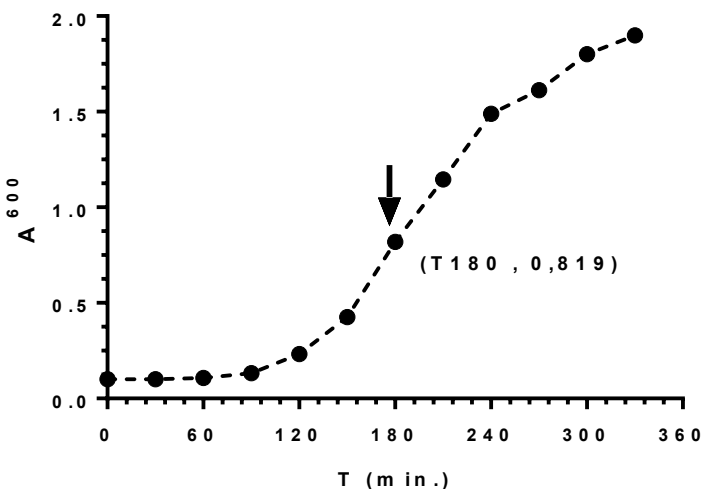


Figure IV.14. Suivi de la croissance de *H. coagulans* Aretch 1 dans le milieu Penassay pour préparer les protoplastes.

La flèche indique le temps de prélèvement pour préparer les protoplastes (Temps de prélèvement et l'A⁶⁰⁰)

Une courbe de croissance a été réalisée dans le milieu Penassay (**Tableau III.7**) afin de déterminer la phase exponentielle de croissance. Point de prise d'échantillon au temps 180 min correspondant à une A⁶⁰⁰ de 0,819.

La transformation des protoplastes, bien que théoriquement prometteuse grâce à une meilleure accessibilité membranaire, s'est heurtée à une forte sensibilité aux conditions osmotiques et à des difficultés de régénération cellulaire, sans qu'aucun transformant ne soit obtenu. Nous avons poursuivi avec la technique d'électroporation.

IV.2.2.4. Transformation par électroporation

Des cellules électrocompétentes de *H. coagulans* Artech_1 ont été préparées à partir d'une préculture d'une nuit en milieu LB (5 ml) à 50 °C dans un erlenmeyer de 125 ml, sans agitation. Cette préculture a servi à ensemencer 100 ml de milieu LB de façon à obtenir une A600 de 0,03. La culture a été incubée à 50 °C, (200 rpm) jusqu'à une A⁴²⁰ de 0,3-0,5. Ensuite, les cellules ont été récoltées par centrifugation à 4300 x g pendant 10 minutes à 4°C dans un Falcon de 50 ml. Les culots ont été lavés trois fois avec 50 ml puis 25 ml de tampon d'électroporation glacé SG (10 % glycérol, sucrose 0,5 M et 1mM MgCl₂) (**Tableau III.7**). Les cellules ont ensuite été resuspendues dans 0,5 ml du même tampon maintenu sur glace. Pour l'électroporation, 1 µg d'ADN plasmidique pDML995 purifiés a été ajouté à 75 µl de cellules électrocompétentes sur glace, un contrôle négatif a été réalisé avec des cellules électrocompétentes sans ajout de l'ADN. Le mélange a été transféré dans une cuvette d'électroporation pré-refroidie (1 mm, Bo-Rad ®). L'électroporation a été réalisée à une impulsion de 1,5 kV (résistance : 600 Ω et une capacité de 25 µF). Immédiatement après impulsion, le mélange a été transféré dans un tube Falcon de 10 ml content 2 ml du milieu de régénération RG préchauffé à 50 °C. Après 3 heures d'incubation à température ambiante sous agitation sur un rotateur à tube, les cellules sont récupérées par centrifugation à 200 x g pendant 10 minutes. Le culot a été resuspendu dans 0,2 ml de LB. Les cellules ont été étalées sur gélose LB contenant 7,5 µg/ml de chloramphénicol et les boîtes ont été incubées à 37 °C pendant 24 à 48 heures pour permettre la sélection des cellules recombinantes. Aucune colonie n'a été observé à la fin de la période d'incubation.

L'électroporation a également été mise en œuvre avec différentes intensités de champ électrique et compositions de tampons, mais n'a pas permis l'intégration ou l'expression stable de l'ADN plasmidique.

Ainsi, malgré la diversité des approches évaluées, aucune n'a permis d'obtenir des clones transformés viables.

Ces résultats suggèrent une résistance intrinsèque des souches testées à la transformation génétique ou la nécessité d'optimiser plus finement les protocoles. Face à ces échecs répétés, nous avons envisagé de sélectionner une autre souche de *H. coagulans* pour laquelle des outils génétiques requis pour nos applications ont déjà été décrits dans la littérature.

IV.2.2.5. Conclusion

Compte tenu de ces résultats, la suite de notre travail s'est orienté vers l'identification d'une souche de *H. coagulans* présentant une meilleure permissivité à la transformation génétique. Parmi les souches disponibles, *H. coagulans* DSM1 a été sélectionnée en raison de sa disponibilité en collection, de ses caractéristiques phénotypiques bien documentées, et de précédents rapportant une sensibilité accrue à certaines méthodes de transformation (Rhee et al., 2007a). De plus la séquence nucléotidique de son génome est connue et déposée à la base genbank.

Par ailleurs, afin de maximiser nos chances de succès, le plasmide pDML995 initialement utilisé a été remplacé par pNW33N (Rhee et al., 2007b), un vecteur reconnu pour sa répllication stable chez plusieurs espèces du genre *Bacillus*.

La section suivante décrit les conditions de culture optimisées pour cette souche, ainsi que les premiers essais de transformation entrepris dans le but de valider sa compatibilité avec les outils génétiques envisagés.

IV.2.3. Transformation et suivi de la sporulation-chez *H. coagulans* DSM1

À la suite des échecs pour la transformation de *H. coagulans* Artech_1, la souche *H. coagulans* DSM1 a été choisie pour obtenir des données concernant la sporulation chez *H. coagulans*. La souche est disponible à la banque allemande des microorganismes (DSMZ). Elle a été séquencée et la littérature rapporte qu'elle est transformable. Dans une première étape, des essais de transformation de DSM1 par électroporation et par la méthode des protoplastes ont été entrepris en utilisant le plasmide pNW33N comme exemple. Ce plasmide est un plasmide shuttle *E. coli*-*Bacillus*, possédant une cassette de résistance au chloramphénicol et disponible au *Bacillus* Genetic Stock Center.

IV.2.3.1. Transformation des protoplastes de *H. coagulans* DSM1

Après plusieurs essais, le protocole suivant a été établi pour transformer les protoplastes de *H. coagulans* DSM1.

Une préculture d'une nuit de *H. coagulans* DSM1 dans du milieu #416 (25 ml) supplémenté de 5 ml de milieu glycerol-based electroporation-regeneration (voir **Tableau III.7**) a été utilisée pour ensemercer 35 ml du même milieu de culture de milieu #416 additionné de 5 ml de milieu de régénération afin d'obtenir une A^{600} de 0,25. La culture a été incubée à 37 °C dans un bain à eau jusqu'à la phase exponentielle de croissance, correspondant, à une A^{600} comprise entre 0,85-0,9.

Les cellules ont été récoltées par centrifugation (3220 x g, 12 min, 4 °C) puis, le culot cellulaire a été resuspendu dans 5 ml de milieu SMMP (voir **Tableau III.7**) (Falcon 50 ml), 130 µl de lysozyme (10 mg/ml) ont été ajoutés, puis le mélange a été incubé à 37 °C jusqu'à ce que l'observation microscopique révèle que 90 % de cellules bactériennes sont sous forme de protoplastes. Le volume de la suspension a été ensuite ajusté par l'ajout de 12 ml de milieu SMMP avant une seconde centrifugation (4200 x g, 4 °C, 12 min.) Le culot obtenu a été resuspendu dans 3 ml de SMMP.

La transformation a ensuite été réalisée en incubant 500 µl de protoplastes avec 25 µl d'ADN plasmidique (~1 µg, plasmide pNW33N) et 25 µl de solution SMM2x. Un contrôle négatif a été effectué en remplaçant l'ADN par de l'eau stérile. Le mélange réactionnel a été transféré dans un Falcon 12 ml, contenant 1,6 ml de PEG 40 %, puis incubé pendant 2 minutes à température ambiante sous agitation douce par retournement du tube.

A l'issue de cette étape, 5 ml de SMMP (voir **Tableau III.7**) contenant 2% de BSA ont été ajoutés. Les cellules ont été récupérées par centrifugation (4200 x g, 8 min. 8 °C), puis le culot a été resuspendu dans 1 ml de milieu SMMP/BSA 2 % (concentration finale) (voir **Tableau III.7**). Une incubation de 135 minutes à 30 °C sous agitation douce a permis de favoriser la viabilité avant la régénération des cellules. Celles-ci ont été étalées indépendamment sur des milieux LB et le milieu #416, tous deux additionnés ou non de chloramphénicol (10 µg/ml). Après incubation à 37 °C pendant 48 heures, des colonies ont été observées spécifiquement sur le milieu #416, contenant l'antibiotique, ce qui indique que la transformation a été réussie. Par ailleurs, la présence d'un tapis cellulaire sur le milieu #416 sans antibiotique témoigne d'un bon taux de régénération des protoplastes.

Conclusion

Après avoir obtenu des résultats positifs lors de la transformation des protoplastes de *H. coagulans* DSM1, nous avons procédé à une nouvelle tentative d'introduction du plasmide par électroporation, en modifiant à la fois le milieu de culture et les paramètres d'électroporation. Afin d'améliorer l'efficacité de l'électroporation, le protocole initial a été modifié. Le milieu de culture BC utilisé lors des premières tentatives a été remplacé par le milieu M1, et le milieu de régénération a été reformulé à partir de la composition du milieu M1 (voir **Tableau IV.7**). En parallèle, un nouveau milieu SG, enrichi en glycérol et glucose, a été développé afin de favoriser la récupération après électroporation, pour optimiser l'efficacité de la transformation. Ces ajustements, combinés à l'optimisation des paramètres pour l'électroporation, ont permis d'augmenter le taux de transformation observé.

IV.2.3.2. Transformation de *H. coagulans* DSM1 par électroporation

Afin de développer un protocole d'électroporation pour *H. coagulans* DSM1, une série d'optimisations a été réalisée et le protocole suivant a été établi pour transformer *H. coagulans* DSM1 par électroporation. Une préculture d'une nuit de DSM1 dans 10 ml de milieu M1 à 45 °C (200 rpm) a été utilisée pour ensemencer 50 ml de milieu M1 de manière à obtenir une A⁶⁰⁰ initiale de 0,15. Après 2 h d'incubation à 45 °C et sous agitation (200 rpm), les cellules ont été récoltées par centrifugation (4000 x g, 10 min, 4 °C) et lavées deux fois avec du milieu SG préalablement refroidi dans la glace. Après une dernière centrifugation, les cellules électrocompétentes ont été resuspendues dans 1 ml de milieu SG. Pour chaque électroporation, 100 µl de suspension cellulaire ont été mélangés à 1 µg d'ADN plasmidique, puis transféré dans une cuvette d'électroporation 0,2 cm de largeur. L'impulsion électrique a été réalisée sous les conditions suivantes : 1,6 kV, 200 Ω, 25 µF. Immédiatement après électroporation, les cellules ont été transférées dans 10 ml de milieu de régénération RG préchauffé à 45 °C, et incubée pendant 3 h à 45 °C sous agitation (250 rpm) dans un bain d'eau. Après la phase de récupération, les cellules ont été étalées sur boîtes de milieu M1 supplémentés en chloramphénicol 7 µg/ml et incubées à 37 °C pendant 48 h. La vérification des clones recombinants a été effectuée par séquençage des fragments d'ADN selon la méthode de terminaison de chaînes de Sanger en utilisant les oligos externes utilisés pour la triple PCR (voir **Tableau III.2**).

IV.2.4. Construction des plasmides rapporteurs pULG180, pULG181 et pULG182 dérivés du pNW33N

Dans le cadre de l'étude de la dynamique transcriptionnelle des gènes impliqués dans la compétence naturelle et la sporulation, une approche bio-informatique a été mise en œuvre pour identifier et caractériser les promoteurs des gènes *spo0A*, *spoIIE* et *spoIIIA*. Ces régions régulatrices ont été ensuite utilisées pour construire des plasmides rapporteurs permettant le suivi *in situ* de leur expression dans *H. coagulans*. La séquence génomique de *H. coagulans* DSM1 ont été obtenues à partir de la banque de séquence nucléotidique du NCBI (GenBank). Pour chaque gène d'intérêt, une région d'environ 300 à 500 pb en amont du codon d'initiation (ATG) a été extraite à partir des fichiers d'annotations génomiques correspondant à la région promotrice putative.

Ces régions ont été soumises à une comparaison inter-espèce à l'aide de NCBI-Blastn afin d'identifier les séquences conservées entre les espèces étudiées, garantissant la conservation fonctionnelle des promoteurs. Par la suite, une analyse fine de ces régions a été réalisée à l'aide de différents outils bio-informatique. Les boîtes consensus -10 (TATAAT) et -35 (TTGACA), caractéristiques des promoteurs bactériens dépendant de σ_A (*spo0A*) et la boîte

10 (TATAAT) commune à tous les facteurs σ ont été localisées à l'aide de EMBOSS Explorer (σ^F pour *spoIIIE* et σ^E pour *spoIIIAA*). Les régions de 200 à 300 bp situées en amont du codon d'initiation des gènes d'intérêt, et contenant ces boîtes, ont été amplifiées puis clonées en amont du gène codant pour la protéine rapportrice fluorescente.

IV.2.4.1. Construction des fusions promoteur-fluorophore et clonage dans des vecteurs plasmidiques

Dans le but de suivre l'expression des gènes sélectionnés impliqués dans la sporulation chez *H. coagulans* DSM1, des fusions transcriptionnelles entre les promoteurs d'intérêt (*Pspo0A*, *PspoIIIE* ou *PspoIIIA*) et des gènes rapporteurs codant pour les fluorophores GFP ou CFP ont été construites. Elles ont été construites par la méthode dite « triple PCR » comme suit :

La première PCR amplifie le promoteur à partir de l'ADN génomique, la seconde, le gène codant le fluorophore la GFP en utilisant le pBPG211 comme matrice et la troisième fusionne les deux fragments par chevauchement (Voir **Matériel et Méthode III.1.6.1**). Les amorces externes du fragment final ont été conçues avec des séquences complémentaires du plasmide pNW33N pour permettre le clonage dans ce dernier sans ligation. Ainsi, les fragments PCR finaux ont été clonés par In-Fusion dans le plasmide pNW33N, préalablement clivé par les enzymes de restriction en EcoRI et BamHI pour donner les plasmides pULG180, 181 et 182 (**Figures IV.15**). Les plasmides ont été ensuite clonés dans *E. coli* DH5 α pour être amplifiés. Après purification des plasmides recombinants, la séquence des inserts a été vérifiée par séquençage.

Ces constructions ont été introduites dans *H. coagulans* DSM1 par électroporation et transformation de protoplastes, afin de suivre l'induction de la sporulation et la dynamique d'expression des gènes d'intérêt via la mesure in vivo du signal de fluorescence de la protéine reportrice sous le contrôle d'un des promoteurs sélectionnés.

A. pULG180

```

----->Psp0A_BC_rp
1 TGCACTTATC TATCATTATA ATGCGTGAGG ACGTTTTGTC CGGGCGATTT ACGGCATCCC
61 GGTTTTCAAC AAAAAATAAT AAATAAAAA GCAGGAAATT TTCCGCCATT GTCGAAACTT
121 ATTCTTGTAC AGAGATATGG CTATTTTTTT GAGGAGGACA GTGGCAGTGA AAAAAATCAG
<----- Psp0A_BC_up
-----> Gfp_Pspo0A_up
181 GAGGGGGAGT TTATGATGAA TTATGCGTAA AGGAGAAGAA CTTTTCACTG GAGTTGTCCC
241 AATTCTTGTT GAATTAGATG GTGATGTTAA TGGGCACAAA TTTTCTGTCA GTGGAGAGGG
301 TGAAGGTGAT GCAACATACG GAAAACCTAC CCTTAAATTT ATTTGCACTA CTGGAAAAC
361 ACCTGTTCCA TGGCCAACAC TTGTCACTAC TTTTCGGTTAT GGTGTCAAT GCTTTGCGAG
421 ATACCCAGAT CACATGAAAC AGCATGACTT TTTCAAGAGT GCCATGCCCC AAGGTTATGT
481 ACAGGAAAGA ACTATATTTT TCAAAGATGA CGGGAACCTAC AAGACACGTG CTGAAGTCAA
541 GTTTGAAGGT GATACCTTTG TTAATAGAAT CGAGTTAAAA GGTATTGATT TTAAGAAGA
601 TGGAAACATT CTTGGACACA AATTGGAATA CAACTATAAC TCACACAATG TATACATCAT
661 GGCAGACAAA CAAAAGAATG GAATCAAAGT TAAC TTCAAA ATTAGACACA ACATGGAAGA
721 TGAAGCGTT CAACTAGCAG ACCATTATCA ACAAATACT CCAATTGGCG ATGGCCCTGT
781 CCTTTTACCA GACAACCATT ACCTGTCCAC ACAATCTGCC CTTTCGAAAG ATCCCAACGA
841 AAAGAGAGAC CACATGGTCC TTCTTGAGTT TGTAACAGCT GCTGGGATTA CACATGGCAT
901 GGATGAACTA TACAAATAA
<-----Gfp_pNW33N_RP

```

B. pULG181

```

-----> PspIIE_BC_UP
1 TTGTGAAATT GAATTCACCTT GCTGTCTAGT TGACTCATAT ATCCGTATCA TTGCTTTTCA
61 TTGGAGGGCG GAACCGGTTT AACAGAAAAT GTTTGTCCGA TCCGCTTTTT CTTTTACTG
121 TTTTCGGACAA AAATCGCCGA ATCACACGAA AAAACTTAA CGGGCCGGTT TTTTCAAAAC
-----
181 GAATATAGCG AAAAAATGTA AAATGCATCG CATATTTGTG GAAAAAGTCG AACTTTTCTT
241 TGGTGTGCA TTGGAATTTT GACAACTTTT TAAAATTGT CTTTTTATAA TTGCTTGTAT
301 CAAAGTGATG AGGGGGAGTT TATGATGAAT TTGGGAAAG TTGAGCGGGG AATGATCGAG
<----- PspIIE_BC_RP
-----> GFP_PspoIIE_UP
361 GAGGGGGAGT TTATGATGAA TTATGCGTAA AGGAGAAGAA CTTTTCACTG GAGTTGTCCC
421 AATTCTTGTT GAATTAGATG GTGATGTTAA TGGGCACAAA TTTTCTGTCA GTGGAGAGGG
481 TGAAGGTGAT GCAACATACG GAAAACCTAC CCTTAAATTT ATTTGCACTA CTGGAAAAC
541 ACCTGTTCCA TGGCCAACAC TTGTCACTAC TTTTCGGTTAT GGTGTCAAT GCTTTGCGAG
601 ATACCCAGAT CACATGAAAC AGCATGACTT TTTCAAGAGT GCCATGCCCC AAGGTTATGT
661 ACAGGAAAGA ACTATATTTT TCAAAGATGA CGGGAACCTAC AAGACACGTG CTGAAGTCAA
721 GTTTGAAGGT GATACCTTTG TTAATAGAAT CGAGTTAAAA GGTATTGATT TTAAGAAGA
781 TGGAAACATT CTTGGACACA AATTGGAATA CAACTATAAC TCACACAATG TATACATCAT
841 GGCAGACAAA CAAAAGAATG GAATCAAAGT TAAC TTCAAA ATTAGACACA ACATGGAAGA
901 TGAAGCGTT CAACTAGCAG ACCATTATCA ACAAATACT CCAATTGGCG ATGGCCCTGT
961 CCTTTTACCA GACAACCATT ACCTGTCCAC ACAATCTGCC CTTTCGAAAG ATCCCAACGA
1021 AAAGAGAGAC CACATGGTCC TTCTTGAGTT TGTAACAGCT GCTGGGATTA CACATGGCAT
1081 GGATGAACTA TACAAATAA
<----- Gfp_pNW33N_RP

```

C. pULG182

```

----->Psp0IIIA_BC_UP
1 TTGTGAAATT GAATTCATTT CTTTGAAAAA AGCTTGGCGT CCCAAACGGC GCCAAGCTTT
61 TTTGCTTTTC TGGCAAGAGA CAGGCAAAAA TAAGTTTACA TAATCATGTT ATAAATAACT
121 TAAACTTTCA GCATCTGCCT CGCTTCTTTG TCATAGTTTT CAAACCCGGC GAATGAGATT
181 TACTATCCAT GAACCAAAC GTATGTTTTG AAAGCAGGGA TGAAGATGGA AGATTTGCTG
<----- Psp0IIIA_BC_RP
----->Gfp_psp0IIIA_UP
241 GTATGTTTTG AAAGCAGGGA TGAAGAATGC GTAAAGGAGA AGAACTTTTC ACTGGAGTTG
301 TCCCAATTCT GTTGAATTA GATGGTGATG TTAATGGGCA CAAATTTTCT GTCAGTGGAG
361 AGGGTGAAGG TGATGCAACA TACGGAAAAC TTACCCTTAA ATTTATTTGC ACTACTGGAA
421 AACTACCTGT TCCATGGCCA ACACTTGTCA CTACTTTCGG TTATGGTGTT CAATGCTTTG
481 CGAGATACCC AGATCACATG AAACAGCATG ACTTTTTCAA GAGTGCCATG CCCGAAGGTT
541 ATGTACAGGA AAGAACTATA TTTTCAAAG ATGACGGGAA CTACAAGACA CGTGTGAAG
601 TCAAGTTTGA AGGTGATACC CTTGTTAATA GAATCGAGTT AAAAGGTATT GATTTTAAAG
661 AAGATGGAAA CATTCTTGGA CACAAATTGG AATACAATA TAAC TCACAC AATGTATACA
721 TCATGGCAGA CAAACAAAAG AATGGAATCA AAGTTAACTT CAAAATTAGA CACAACATTG
781 AAGATGGAAAG CTTTCAACTA GCAGACCATT ATCAACAAA TACTCCAATT GGCGATGGCC
841 CTGTCCTTTT ACCAGACAAC CATTACCTGT CCACACAATC TGCCCTTTTC AAAGATCCCA
901 ACGAAAAGAG AGACCACATG GTCTTCTTG AGTTTGTAA AGCTGCTGGG ATTACACATG
961 GCATGGATGA ACTATACAAA TAA
<-----Gfp_pNW33N_RP

```

Figure IV. 15. Séquences des fragments PCR obtenus par Triple PCR et clonés dans pNW33N pour donner les vecteurs pULG180, pULG181 et pULG182

Les amorces utilisées pour la construction sont indiquées par des flèches : Psp0A_BC_UP, Psp0IIE_BC_UP et Psp0IIIA_BC_UP (sens) et Psp0A_RP,

PspoIIE_BC_RP et PspolIIA_BC_RP (antisens) : amplifient la région promotrice de *spo0A*, *spoIIE* et *spolIIA*.
 Gfp_ψspo0A_UP, Gfp_PspoIIE_UP et Gfp_ψspolIIA_UP (sens) : amorce située à l'intersection entre la fin du promoteur et le début de *gfp*.
 Gfp_pNW33N_RP (antisens) : amorce spécifique du gène *gfp* et du vecteur pNW33N.
 Les promoteur *Pspo0A*, *PspoIIE* et *PspolIIA* sont positionné en amont du gène *gfp*, permettant l'expression du gène rapporteur dans les conditions de sporulation.

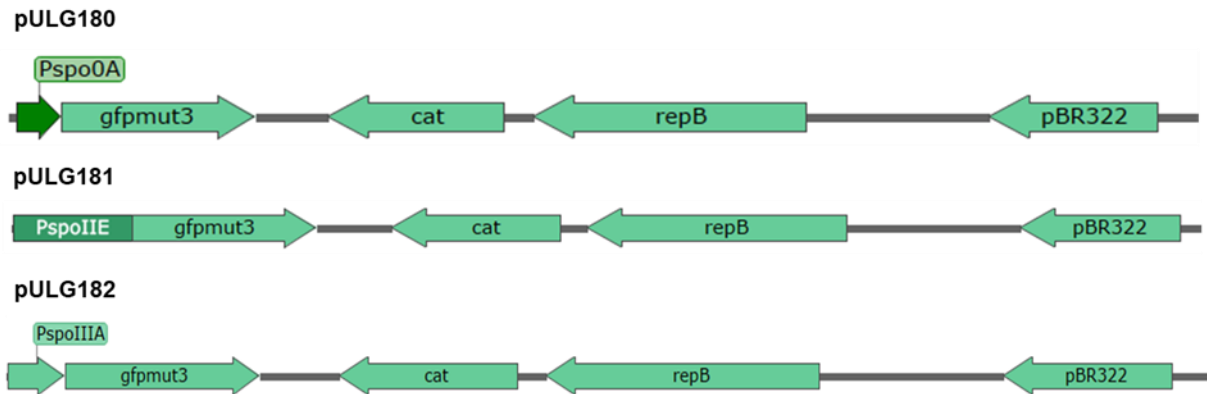


Figure IV.16. Représentation schématique des plasmides pULG180,181 et 182

Carte schématique du plasmide utilisé pour le suivi de l'induction du promoteur sporulation *Pspo0A* (pULG180), *PspoIIE* (pULG181) et *PspolIIA* (pULG182). Le gène rapporteur *gfpmut3*, codant pour une protéine fluorescente verte optimisée, est placé sous le contrôle du promoteur *PspolIIA* afin de permettre la détection de son activité au cours de la sporulation. Le gène *cat*, codant pour une chloramphénicol acétyltransférase, permet la sélection des bactéries transformées. Le plasmide contient également le gène *repB*, requis pour la réplication en hôtes Gram-positifs tels que *Bacillus spp.*, et l'origine de réplication pBR322, fonctionnelle en *Escherichia coli*, faisant de ce vecteur un plasmide navette.

IV.2.4.2. Suivi de l'expression *Pspo0A-gfpMut3* au cours de la sporulation de *H. coagulans* pULG180

Afin d'étudier la dynamique de la voie de régulation du gène *spo0A* chez *Heyndrickxia coagulans* DSM1 (S. L. Johnson et al., 2016b) un cadre expérimental rigoureux a été sélectionné. La validation de ce cadre repose sur la mise en place de conditions permettant une analyse fiable de l'expression de *Pspo0A* et de son activation durant les différentes phases de croissance.

L'expression de la GFPmut3 au cours de la croissance de *H. coagulans* pULG180 a été suivie pendant 72 h et les résultats obtenus sont présentés dans la **Figure IV.15.A** et montrent que la croissance cellulaire suit une courbe classique comportant une phase exponentielle bien marquée entre 20 h ($A^{600}=3,3$) et 48 h ($A^{600}=68$), avant d'atteindre le plateau à partir de 65 h

($A^{600}=12$). En parallèle, la fluorescence brute augmente progressivement, de T0 à T72, témoignant d'une accumulation progressive du signal fluorescent au cours du temps.

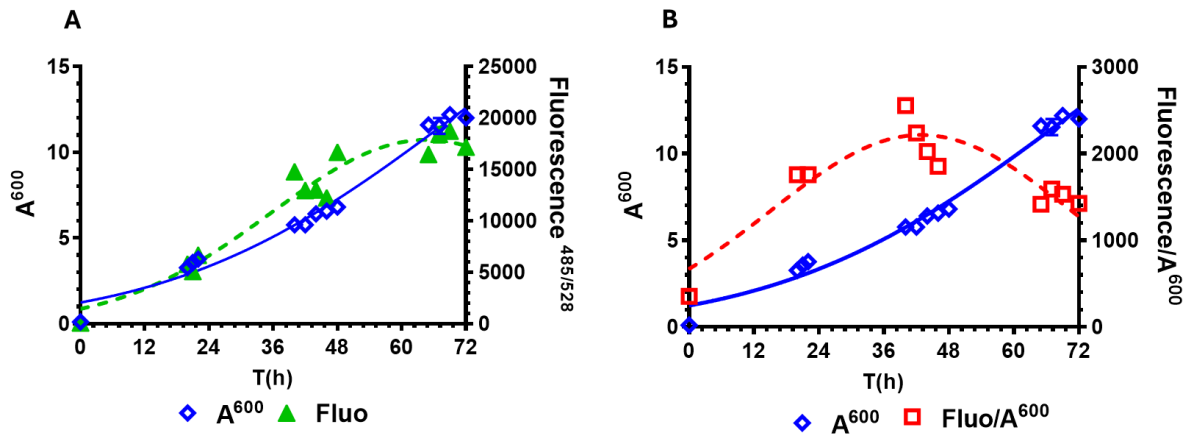


Figure IV.17. Courbe de croissance et d'expression de *spo0A* au cours du temps chez *H. coagulans* DSM1

(A) Suivi de la croissance, losange bleu, et de la fluorescence triangle vert, sur 72 heures.
 (B) Courbe de croissance et fluorescence/ A^{600} , carré rouge. Les courbes représentent les moyennes de mesures indépendantes, ajustées par une régression non linéaire. La souche a été cultivée dans le milieu M1 (50 ml, 37 °C) additionné de chloramphénicol (7 μ g/ml). La fluorescence de la GFP-mut3 a été mesurée en utilisant comme $\lambda^{exci} = 485$ nm et $\lambda^{emi} = 528$ nm en utilisant un lecteur de microplaque. Pour les différentes mesures, le gain de fluorimétrie a été constant.

Cependant, l'analyse de la fluorescence par cellule ($Fluo/A^{600}$), révèle une dynamique différente. Un pic de fluorescence de faible amplitude est observé après 40 h, correspondant à une activité maximale du promoteur à ce point du développement cellulaire. Après ce pic, la fluorescence spécifique diminue progressivement malgré la poursuite de la croissance, ce qui suggère une relation temporelle de l'expression de *spo0A*. Ce comportement est compatible avec un promoteur transitoirement actif dont l'induction pourrait être liée à une phase physiologique particulière, telle que la transition vers la sporulation.

Cependant, l'augmentation de la Flu/A^{600} est faible et intervient à la fin de la croissance exponentielle, comme attendu, pour induire chez *H. coagulans* pULG180 les différentes étapes de survie en carence de nutriment pour finir par la sporulation de la bactérie. De plus, *H. coagulans* DSM1 est une souche qui sporule difficilement, ce qui pourrait expliquer un signal de fluorescence par cellule très faible.

Cette constatation a été confirmée par nos expériences cytométrie de flux (résultats non montrés) qui n'ont pas mis en évidence la surexpression de *Pspo0A-gfpmut3* dans la population bactérienne au cours de la croissance cellulaire. Par conséquent, nous avons arrêté les expériences de l'induction de *Pspo0A-gfpmut3* chez *H. coagulans* pour nous concentrer sur l'induction de *PspolIE-gfpmut3* afin de continuer à explorer la régulation de la sporulation dans la souche *H. coagulans*-pULG181

IV.2.4.3. Suivre de l'expression de *PspolIE-gfpmut3* au cours de la sporulation de *H. coagulans* pULG181

L'expression du gène *PspolIE-gfpmut3* a été suivi tout au long de la croissance de *H. coagulans* pULG181 cultivé dans le milieu M1 supplémenté ou non en glucose 1 % ou en xylose 1 %. L'intensité de la fluorescence, reflétant de transcription de *PspolIE-gfpmut3*, a été mesurée à différents temps de culture à l'aide d'un lecteur de microplaque ($\lambda^{\text{exci}} = 485 \text{ nm}$ et $\lambda^{\text{emi}} = 528 \text{ nm}$). Pour chaque expérience le nombre total de cellules viables et le nombre d'endospores après 64 ou 70 h de cultures ont été déterminés (**Tableau IV.12**)

Pour la culture en milieu M1 (**Figure IV.18.A**) une augmentation de la Flu/A⁶⁰⁰ apparaît après 40 h de culture et atteint un plateau après 68 h. Le taux de sporulation après 64 h est de 69% et confirme que l'expression de *PspolIE-gfpmut3* est corrélée avec l'entrée en phase stationnaire et la sporulation.

L'augmentation progressive du signal de fluorescence au cours du temps confirme que la construction *PspolIE-gfpmut3* permet un suivi fiable de l'induction de la sporulation dans cette souche. Ce système pourra ainsi être utilisé pour étudier les régulations précoces de la sporulation, ainsi que pour compare différentes conditions de culture ou chez des souches génétiquement modifiées.

L'expression de *PspolIE-gfpmut3* a également été suivie en présence de 1 % de glucose ou de xylose, afin d'évaluer l'impact de ces sources carbonées sur l'initiation de la sporulation et la corrélation avec la variation de fluorescence de *GFPmut3*.

Les cultures ont été réalisées en erlenmeyer, puis reproduites dans un fermenteur de 1 l (résultats non-montrés) afin de valider la reproductibilité et la robustesse du système à l'échelle pilote.

En présence de glucose 1 % (M1G 1 %), la croissance de *H. coagulans*-pULG181 est stimulée et l'augmentation de la fluorescence de la GFPmut3 n'apparaît qu'après 68 h quand la culture atteint sa phase stationnaire. Cette observation est en accord avec les résultats du chapitre

précédent dans lequel il a été mis en évidence que si on retardait la carence en nutriment, la sporulation était retardée. Ce qui est le cas pour le milieu M1G 1 %, et corrélé avec le retard de l'expression du gène *PspolIE-gfpmut3* et le fait qu'aucune endospore ne soit mise en évidence dans le milieu de culture après 70 h de culture.

Pour le milieu M1 additionné de xylose (M1X 1 %), la présence de xylose n'a aucun effet sur la croissance observée et la culture se comporte comme ce qui a été observé pour le milieu M1. Le taux de sporulation après 70 h de culture est également proche de celui obtenu pour la culture dans le milieu M1 (50 % et 69 %). Le fait que la présence de xylose n'a pas d'effet sur la croissance est inattendu étant donné que dans le génome de *H. coagulans* DSM1 les gènes *xyIR* et l'opéron *xyIAB*, nécessaires pour la métabolisation du xylose, sont présents. Ces données permettent de visualiser la dynamique d'activation du promoteur au cours du temps, et sont discutées plus en détail dans la section suivante, en lien avec la pertinence du système de détection utilisé et la régulation métabolique de *spolIE* chez *H. coagulans* pULG181.

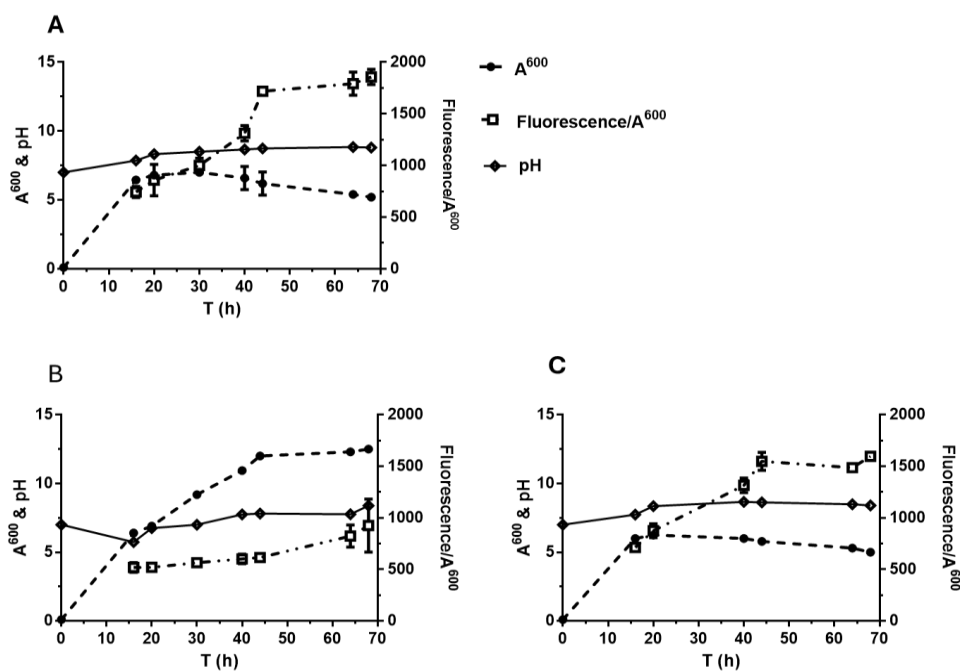


Figure IV.18. Courbes de croissance, du pH et d'expression de *PspolIE-gfpmut3* chez *H. coagulans*- pULG181 en erlenmeyer

A) M1 sans sucre, **B)** en présence de 1% glucose **et C)** en présence de 1 % Xylose. Courbe de croissance (disque noir), Courbe de fluorescence par cellule (carré noir) et courbe du pH (losange noir)

Tableau IV.13. Suivi de la croissance, de la sporulation de *H. coagulans* DSM 1 en erlenmeyer

Milieu	Observation au microscope	Flore totale	Spores	Taux de sporulation %
M1	Spores à 64 h	1,2 x 10 ⁹	8,3 x 10 ⁸	69 %
M1G 1%	Pas de spores après 70 h	1,5 x 10 ⁸	0	-
M1X 1%	Spores à 64 h	2,0 x 10 ⁸	1,0 x 10 ⁸	50 %
M1G 0,5%	Pas de spores après 70	2,5 x 10 ⁸	0	-
M1X 0,5%	Spores à 64 h	6,7 x 10 ⁸	1,0 x 10 ⁸	14 %

IV.2.4.4. Conclusion

Le suivi de l'expression de *PspolIE-gfpmut3* a permis de caractériser l'expression de ce gène chez *H. coagulans* DSM1. L'activation du promoteur a été détectée en phase stationnaire, ce qui correspond aux premières étapes du processus de sporulation, en accord avec le rôle de *SpolIE* dans la mise en place de la préspore σF (Barák & Muchová, 2018).

L'effet des sources de carbone telles que le glucose et le xylose a également été évalué. Le glucose a réprimé partiellement l'induction de *PspolIE*, probablement via un mécanisme de régulation catabolique (Veening et al., 2008b) tandis que le xylose n'a pas montré l'effet inhibiteur marqué, suggérant une moindre interférence avec les voies de la sporulation.

Cependant, malgré une expression claire *spolIE-gfpmut3*, la sporulation n'est pas complète après 64 h de culture dans le milieu M1 (Taux de sporulation 69 %) que ce soit en Erlenmeyer (**Tableau IV.13**) ou en fermenteur. L'objectif initial était d'atteindre une concentration de plus de 1 x 10⁹ spores/ml en 48 heures, afin de réduire le temps de production, diminuer les coûts associés et optimiser le rendement de production. Les résultats obtenus indiquent que, bien que l'engagement dans la voie de sporulation soit amorcé, les conditions expérimentales ne permettent pas encore d'atteindre l'efficacité souhaitée en termes de vitesse et de densité d'endospores.

Le comportement différent entre *H. coagulans* Artech_1 et *H. coagulans* DSM1 dans l'efficacité à sporuler ne peut pas s'expliquer par l'absence de l'initiation de la sporulation mais plutôt par la différence de cinétique dans le processus de sporulation. Par exemple, la phosphorylation de Spo0A serait plus lente chez *H. coagulans* DSM1 que chez Artech_1 ou la demi-vie de Spo0A phosphorylé plus courte. Il serait intéressant de comparer la séquence protéique des deux orthologues et de substituer le gène *spo0A* de *H. coagulans* DSM1 par celui d'Artech_1.

Plusieurs autres facteurs pourraient expliquer ce rendement limité. D'une part, la disponibilité insuffisante de certains nutriments essentiels ou l'accumulation de métabolites inhibiteurs au cours de la culture pourraient retarder ou perturber la progression complète du cycle de sporulation (Errington, 2001, 2003 ; Setlow, 2014). D'autre part, une induction non optimale du stress ou une hétérogénéité physiologique au sein de la population cellulaire pourraient limiter la synchronisation de l'initiation de la sporulation. En particulier, une transition mal contrôlée entre la phase de croissance exponentielle et la phase stationnaire est souvent critique pour maximiser l'engagement de la population dans la voie sporulante.

Ainsi, ces résultats mettent en évidence la complexité de la régulation de sporulation chez *H. coagulans* et soulignent que l'activation d'un promoteur précoce ne garantit pas l'achèvement du processus. Pour mieux comprendre les points de blocage, un suivi d'expression d'autres gènes clés de la cascade de sporulation pourrait être envisagé. Par exemple, les niveaux d'expression de gènes tels que *spoIIGA* ou *spoIIQ* pourraient constituer des facteurs limitants ((Errington, 2001, 2003 ; Tan & Ramamurthi, 2014).

IV.2.5. *B. subtilis* et *B. licheniformis*

L'étude initiale conduite sur *H. coagulans* avait pour objectif de caractériser les dynamiques de sporulation et optimiser les conditions de production d'endospores en vue d'applications industrielles. Toutefois, plusieurs limitations expérimentales ont été identifiées soit la souche n'est pas transformable ou sporule très difficilement.

Parmi les souches étudiées, *H. coagulans* Artech_1 s'est distinguée par sa capacité à sporuler de manière satisfaisante, mais sa faible efficacité de transformation génétique a constitué un frein majeur à la mise en place d'outils moléculaires pour le suivi et la modulation de la sporulation. Dans ce contexte, l'extension du modèle expérimental à *B. subtilis* et *B. licheniformis* s'est imposée.

B. subtilis constitue le modèle de référence pour l'étude des mécanismes de la sporulation, en raison de son accessibilité génétique, de sa régulation bien caractérisée et de la disponibilité de nombreux outils génomiques. Il est facilement transformable par de l'ADN exogène et, si nécessaire, de l'intégrer de manière stable à son génome par double recombinaison homologue. Parmi les sites d'intégration couramment utilisés, le locus *amyE*, codant pour une amylase extracellulaire non essentielle en conditions de laboratoire, est particulièrement adapté. *B. licheniformis*, pour sa part, représente un organisme d'intérêt industriel reconnu pour sa capacité naturelle à produire des endospores robustes.

Les résultats présentés dans cette section visent à (i) valider et à affiner les outils méthodologiques développés, en particulier les marqueurs transcriptionnels et les suivis dynamiques de sporulation, et (ii) identifier, par approche comparative, des leviers d'optimisation des processus de sporulation et de transformation génétique, en vue de leur transposition ultérieure à *H. coagulans*, notamment la souche Artech_1.

IV.2.5.1. Description et transformation des souches

***B. subtilis* 168**

La souche utilisée dans cette étude est dérivée de *B. subtilis* 168, souche modèle largement utilisée pour l'étude de la sporulation, de la transformation naturelle et de l'expression génique. Cette souche présente une compétence naturelle qui peut être induite en conditions de carence en nutriments ou via des milieux spécifiques (Dubnau, 1991). L'induction de la compétence est contrôlée par une cascade régulée par *ComK*, activateur principal de l'absorption d'ADN.

B. licheniformis MW3/pMMcomK

La souche *Bacillus licheniformis* MW3/pMMcomK est une lignée génétiquement modifiée dérivée de la souche de référence *B. licheniformis* DSM13 (Veith et al., 2004), dans laquelle, deux endonucléases de restriction ont été inactivées ($\Delta hsdR1$, $\Delta hsdR2$), augmentant ainsi l'efficacité de transformation (Hoffmann et al., 2010) en évitant la dégradation de l'ADN plasmidique exogène.

Le plasmide pMMcomK porte le gène *comK* qui code pour un facteur de transcription maître de la régulation de la compétence naturelle. Dans cette construction, *comK* est placé sous le contrôle du promoteur xylose-inductible *PxyIA*, permettant une expression régulée et réversible en fonction de la présence de xylose dans le milieu de culture. Ce vecteur est un plasmide répliquatif porteur d'un marqueur de résistance à la tétracycline (*tetR*), permettant sa sélection dans la souche hôte.

L'induction de *comK* par le xylose entraîne l'activation transcriptionnelle des gènes de compétence tels que *comEA*, *comEC*, *comFA* et autres, permettant l'acquisition transitoire d'une compétence artificielle dans une espèce naturellement non compétente (Dubnau, 1991).

Grâce à cette stratégie, la souche de *B. licheniformis* MW3 pMMcomK a été transformée avec l'ADN plasmidique, par compétence naturelle (voir **III.2.6.2. Matériels et Méthodes**).

IV.2.5.2. Construction et validation des outils moléculaires

IV.2.5.2.1. Identification bio-informatique des promoteurs

Dans le cadre de l'étude de la dynamique transcriptionnelle des gènes impliqués dans la compétence naturelle et la sporulation, une approche bioinformatique a été mise en œuvre pour identifier et caractériser les promoteurs des gènes *spo0A*, *spoIIIE* et *spoIIIA* (*Pspo0A*, *PspoIIIE* et *PspoIIIAA*). Ces régions régulatrices ont été ensuite utilisées pour construire des plasmides rapporteurs permettant le suivi in situ de leur expression dans différentes souches de *Bacillus*. Les séquences génomiques des espèces cibles ; *B. subtilis* 168, *B. licheniformis* DSM13 ont été extraites de la banque nucléotidique GenBank au NCBI.

Pour chaque gène d'intérêt, une région d'environ 300 à 500 pb en amont du codon d'initiation (ATG) a été copiée à partir des fichiers d'annotations génomiques correspondant à la région promotrice putative.

Ces régions ont été soumises à une comparaison inter-espèce à l'aide de NCBI-Blastn afin d'identifier les séquences conservées entre les espèces étudiées, garantissant la conservation fonctionnelle des promoteurs. Par la suite, une analyse fine de ces régions a été réalisée à

l'aide de différents outils bio-informatique. Les boites consensus -10 et -35, caractéristiques des promoteurs bactériens dépendant de σ_A et σ_F , ont été localisées à l'aide de EMBOSS Explorer.

IV.2.5.2.2. Constructions des fusions promoteurs-fluorophore et clonage dans des vecteurs plasmidiques

L'assemblage précis des trois fragments : le promoteur, le gène codant le fluorophore, et le vecteur plasmidique, a été réalisé par la méthode de la triple PCR (voir **IV.2.4.1**). Les fragments amplifiés ont été insérés dans des vecteurs plasmidiques adaptés, en amont des gènes rapporteurs codant pour des fluorophores (GFPmut3 et CFP).

B. licheniformis

Chez *B. licheniformis* MW3/pMMcomK (Hoffmann et al., 2010), les séquences contenant les promoteurs de *spo0A*, *spolIE* et *spolIIAA* (*Pspo0A*, *PspolIE* et *PspolIIAA*) extraite du génome de *B. licheniformis* DSM13 ont été insérés en amont du gène *cfp* (*Cyan Fluorescent Protein*) dans le vecteur pCFP-star, donnant naissance respectivement aux plasmides, pULG172, pULG174 et pULG178 (**Figure IV.19 A**). Parallèlement, la région promotrice de *spolIE* (*PspolIE*) a été fusionnée en amont du gène codant pour la *Green fluorescent protein mut3* (GFPmut3) et clonée dans le plasmide pBGP242 dans son site BamHI pour donner le plasmide pULG8 (**Figure IV.20 A**).

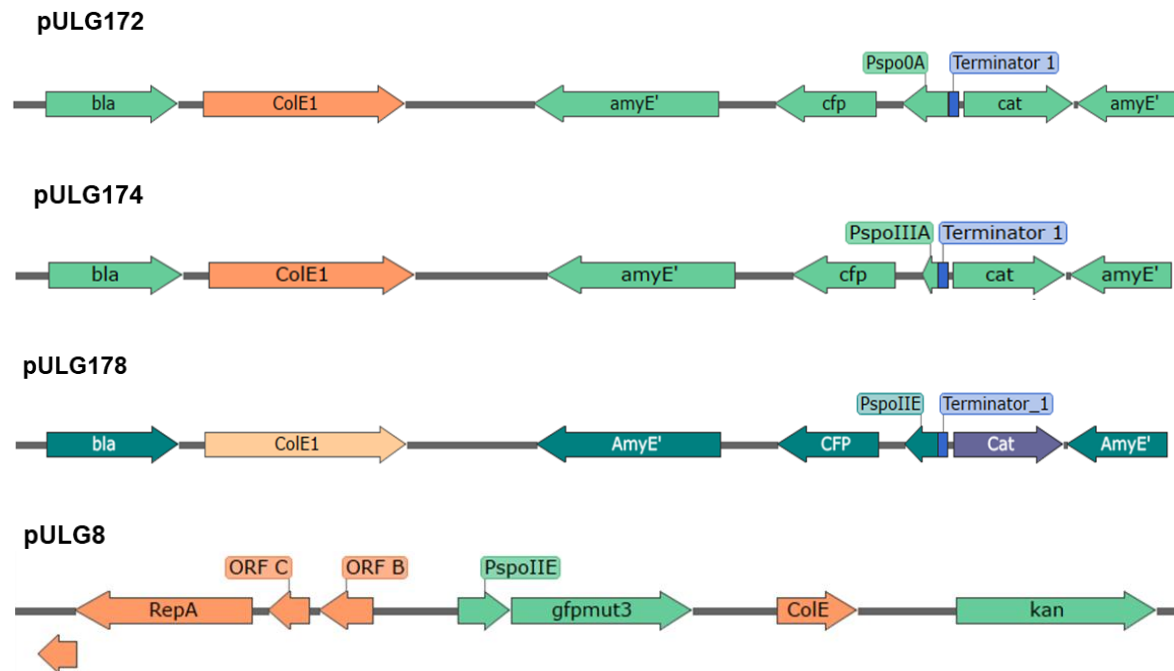
Les constructions ont été validées par séquençage, en utilisant les primers externes (**Tableau III.2**) utilisés dans la triple PCR pour confirmer les séquences nucléotidiques et les fusions entre les régions promotrices et les gènes rapporteurs. Ces constructions ont été ensuite introduites dans *B. licheniformis* MW3/pMMcomK par transformation via la compétence naturelle de la souche pour donner les souches *B. licheniformis* pULG172, 174, 178 et 8.

B. subtilis 168

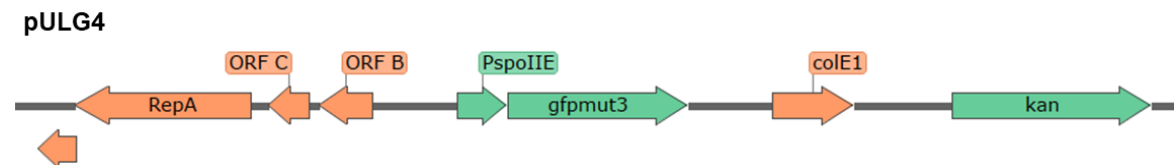
Chez *B. subtilis* 168, le développement de l'outil moléculaire s'est appuyé sur le vecteur navette pBPG242 et le vecteur pBPG211. Le vecteur pBPG211 a été utilisé pour l'amplification du gène rapporteur *gfpmut3*, lequel a été fusionné au promoteur spécifique de la sporulation *PspolIE* (extrait du génome de *B. subtilis* 168) par une technique de « triple PCR ». La construction ainsi obtenue, *PspolIE-gfpmut3*, a été ensuite clonée dans le vecteur pBPG242 au niveau du site de restriction BamHI. Le plasmide résultant, nommé pULG4, a été vérifié par PCR et séquençage de Sanger (**III.1.11**) et introduit dans *B. subtilis* 168 en utilisant la compétence naturelle de la souche pour donner la souche recombinante *B. subtilis* pULG4.

D'autre part, une souche dérivée de *B. subtilis* 168 dans laquelle le *PspoIIE* fusionné au gène codant pour la GFP et inséré dans le gène *amyE* de la souche (*B. subtilis amyE ::PspoIIE-spc*) est disponible au *Bacillus Genetic Stock Center* (ID :1A1036). La souche a été commandée pour être comparée à la souche *B. subtilis* pULG4.

A. Construction dans *B. licheniformis* DSM1 MW3 pMMcomK



B. Construction dans *B. subtilis* 168



Souche *B. subtilis AmyE ::PspoIIE-gfp spc* déposée au *Bacillus Genetic stock Center* (ref : 1A1036)

Figure IV.19. Constructions reportrices utilisées pour suivre l'initiation de la sporulation chez *B. licheniformis* (A) et *B. subtilis* (B)

IV.2.5.3. Expression de *Pspo0A-cfp* chez *B. licheniformis* pULG172

L' A^{600} ainsi que la fluorescence de la CFP (Fluo^{CFP}, λ^{exi} : 405 nm et λ^{emi} : 485 nm) d'une culture de *B. licheniformis* pULG172 dans du milieu M1 (50 ml, 37 °C, sous agitation) a été suivie pendant 72 h (**Figure IV.20**). La Fluo^{CFP} augmente régulièrement au cours de la croissance cellulaire sans présenter un pic transitoire (**Figure IV.20 A**). La fluorescence par cellule exprimée par le rapport Fluo^{CFP}/ A^{600} au cours du temps, met en évidence que ce rapport reste constant pendant les 40 premières heures et commence à augmenter après 48 h lorsque la

culture a atteint sa phase stationnaire. Après 72 h de culture $\text{Fluo}^{\text{CFP}}/\text{A}^{600}$ est $\cong 6x$ celle observée pendant la phase exponentielle de la culture, ce qui est en accord avec une augmentation de l'expression de *spo0A* au cours de la sporulation (**Figure IV.20 B**). Cependant, aucun pic transitoire de $\text{Fluo}^{\text{CFP}}/\text{A}^{600}$ n'a été observé. Afin de mettre en évidence l'état d'avancement de la sporulation et l'impact de l'addition de glucose ou de xylose sur l'initiation de celle-ci, l'apparition de la Flu^{CFP} ainsi que le taux de sporulation ont été déterminés et présentés dans le point suivant.

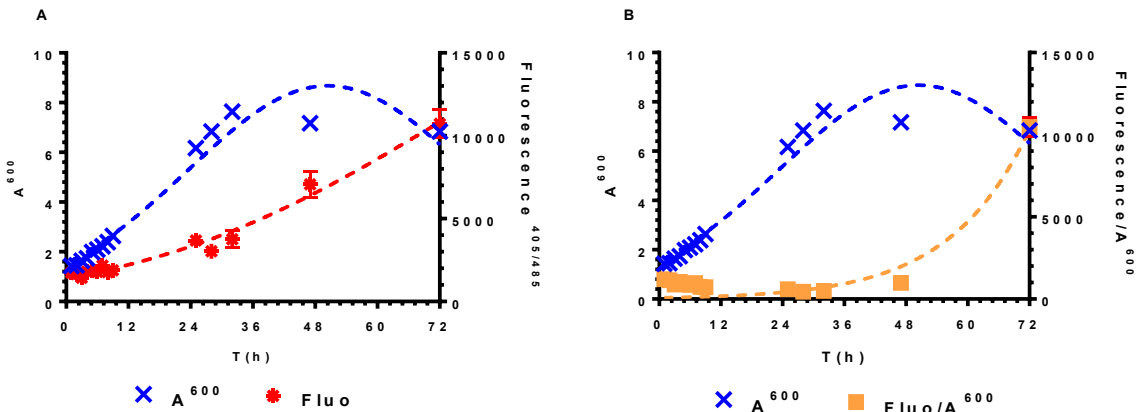


Figure IV.20. Suivi de la croissance et d'expression de *Pspo0A* au cours du temps chez *B. licheniformis* pULG172

(A) Suivi de la croissance A^{600} , croix bleues, et de la fluorescence (λ^{exc} : 405nm / λ^{emi} 485nm, cercles rouges) au cours du temps. (B) Fluorescence/cellule ($\text{Fluo}^{\text{CFP}}/\text{A}^{600}$, carrés oranges). Les courbes en pointillé représentent des ajustements polynomiaux pour visualiser les tendances. Les barres d'erreur indiquent l'écart-type ($n = 3$).

Suivi de l'expression de *Pspo0A-cfp* et de la production d'endospores en présence de glucose et de xylose chez *B. licheniformis* pULG172

Des cultures de *B. licheniformis* pULG172 ont été menées dans le milieu M1, supplémenté en glucose à différentes concentrations (5 %, 10 %, 15 % et 20 %), afin d'évaluer l'impact de la disponibilité de la source de carbone sur l'expression de *spo0A-cfp* et la sporulation. Les cultures ont été incubées pendant 6 jours à 37°C. En absence de glucose, le pH du milieu s'est maintenu à 7 jusqu'à 67 heures, moment auquel une alcalinisation progressive a été observée, atteignant un pH égal à 9 à la fin de la culture. Quant à l'augmentation de la $\text{Fluo}^{\text{CFP}}/\text{A}^{600}$ corrélée à l'augmentation de l'expression de *Pspo0A-cfp*, ainsi que l'apparition des spores, elle a été détectée dès 48 de culture (**Tableau IV.14**).

Pour une concentration de 5 % de glucose, une acidification a été observée dès les premières heures (pH=5), suivie d'un retour progressif à la neutralité (pH 7) après 67 h. Dans ces

conditions, l'expression de *Pspo0A-cfp* quantifiée par la Fluo^{CFP}/A⁶⁰⁰ et la formation de spores n'ont été observées qu'après six jours de cultures. En revanche, aux concentrations plus élevées de glucose (10 %, 15 % et 20 %), une acidification marquée (pH=5) a été maintenue tout au long de la culture et aucune endospore n'a été observée (résultats non montrés). De manière générale l'augmentation de la concentration de glucose retarde l'augmentation de la Fluo^{CFP} et l'apparition des endospores (**Tableau IV.14**). Les mêmes constatations sont observées pour l'addition de xylose (**Tableau IV.14**).

Pour raffiner ces observations, une seconde série d'expériences a été menée en testant des concentrations plus faibles (0 % à 5 %) de glucose et de xylose et en déterminant le nombre de cellules viables et le nombre d'endospores (**Tableau IV.15**).

Les cultures dans du milieu M1 (50 ml) ont été réalisées à 37 °C, dans un bain à eau thermostaté, avec un suivi du pH, de A⁶⁰⁰ et de la Fluo^{CFP} pendant 136 heures. Comme précédemment, la Fluo^{CFP} augmente après 70 h. Seulement les valeurs après 68 h et 136 h sont reprises dans le **Tableau IV 15**. Ces résultats indiquent une corrélation négative entre la concentration en sucres (glucose ou xylose) et la formation d'endospores : plus la concentration en sucre augmente plus le nombre d'endospores et le taux de sporulation diminuent après 136 h.

Tableau VI.14. Suivi de l'expression de *Pspo0A-cfp* chez *B. licheniformis* pULG172 en présence de glucose et xylose

En présence de glucose	% en glucose	0	1	2	3	4	5
	Activité promotrice	>46 h	>46 h	>70 h	>74 h	>95	>118 h
	Sporulation	>46 h	>70 h	>118 h	> 118 h	>118	> 118 h
En présence de xylose	% xylose %	0	1	2	3	4	5
	Activité promotrice	> 40 h	> 43 h	>70 h	> 74 h	>74	>95
	Sporulation	> 40 h	>62 h	>62 h	>130 h	>130 h	>130 h

Tableau IV.15. Suivi après 68 et 136 h de la population et de la sporulation de *B. licheniformis* pULG172 en présence du glucose et xylose

En présence de glucose									
Concentration en glucose %	A ⁶⁰⁰		Flore totale (CFU/ml)		Spores CFU/ml		Taux de sporulation (%)		
	68 h	136 h	68 h	136 h	68 h	136 h	68 h	136 h	
0	11,2	10,1	5,2x10 ⁹	4x10 ⁹	3,5x10 ⁹	3,4x10 ⁹	70	85	
1	12	12,4	4x10 ⁹	2x10 ⁹	2,3x10 ⁸	1,0x10 ⁹	6	50	
2	9	12,2	2,7x10 ⁹	1x10 ⁹	1,0x10 ⁸	4,0x10 ⁸	4	40	
3	4,6	14,2	1,3x10 ⁸	1,5x10 ⁹	1,0x10 ⁷	4,5x10 ⁸	7	30	
4	5,9	5,6	3x10 ⁸	3,5x10 ⁷	3,0x10 ⁶	1,0x10 ⁶	1	3	
5	5,8	5,4	6x10 ⁸	3,5x10 ⁷	1,3x10 ⁶	1,5x10 ⁶	0,2	5	
En présence du xylose									
Concentration en xylose %	A ⁶⁰⁰		Flore totale (CFU/ml)		Spores CFU/ml		Taux de sporulation (%)		
	68 h	136 h	68 h	136 h	68 h	136 h	68 h	136 h	
0	11,2	10,1	5,2x10 ⁹	4,0x10 ⁹	3,5x10 ⁹	3,4x10 ⁹	70	85	
1	10,1	15,8	5,4x10 ⁹	4,0x10 ⁹	4,4x10 ⁸	3,0x10 ⁹	8	75	
2	10,4	16	2,6x10 ⁹	2,0x10 ⁹	1,3x10 ⁸	1,1x10 ⁹	5	50	
3	10,8	20	3,6x10 ⁹	6,0x10 ⁹	7,3x10 ⁷	1,5x10 ⁹	2	25	
4	9,4	18	2,9x10 ⁹	4,0x10 ⁹	3,3x10 ⁷	6,0x10 ⁸	1,4	15	
5	91	16,4	4,3x10 ⁹	4,5x10 ⁹	1,3x10 ⁷	6,0x10 ⁸	0,3	13	

Les résultats obtenus dans cette étude mettent en évidence l'importance des conditions nutritionnelles, en particulier de la disponibilité de la source de carbone, dans la régulation du niveau d'expression de *Pspo0A-cfp* et du processus de sporulation chez *B. licheniformis*. L'utilisation d'un système rapporteur fluorescent a permis de mettre en évidence l'augmentation de l'expression de *spo0A*, gène clé de l'entrée en sporulation, et l'effet de la concentration en glucose ou en xylose sur celle-ci. Les observations montrent clairement que l'ajout de glucose à des concentrations modérées (< 5 %) entraîne un décalage significatif de l'expression de *spo0A-cfp* et la formation d'endospores, avec un effet encore plus marqué à des concentrations élevées (≥10 %), où la sporulation est totalement inhibée. Ce phénomène est en accord avec les données précédentes obtenues chez *B. subtilis*, où la présence de glucose est connue pour réprimer la sporulation via des mécanismes de régulation catabolique (Sonenshein, 2000). L'acidification du milieu observée en présence de glucose ou de xylose

pourrait également jouer un rôle inhibiteur indirect en perturbant l'activation de la voie de signalisation du phosphorelay, essentielle à l'induction de *spo0A* (Burbulys et al., 1991).

Conclusion

Cette étude valide l'utilisation du promoteur *Pspo0A* fusionné à un marqueur fluorescent comme outil spécifique pour étudier l'initiation de la sporulation chez *B. licheniformis*. Elle met également en évidence l'effet inhibiteur ou retardateur dose-dépendant du glucose et du xylose sur ce processus, fournissant ainsi des éléments déterminants pour l'optimisation des milieux de culture en vue d'une sporulation contrôlée.

D'une autre part, le suivi de l'activité promotrice de *Pspo0A* à l'aide du fluorophore CFP a révélé un signal de fluorescence relativement faible, qui n'est pas détectable au niveau d'une cellule comme c'est le cas en cytométrie en flux et limite l'utilisation de cette construction au suivi d'une population (Fluorimétrie en microplaque).

IV.2.5.4. Expression de *PspolIIAA-cfp* et *PspolIE-cfp* chez *B. licheniformis* pULG174 et pULG178

Le suivi de la fluorescence de la CFP sous le contrôle de *PspolIIAA* au cours de la croissance de *B. licheniformis* pULG174 dans le milieu M1, n'a montré aucune augmentation significative. Les essais avec le plasmide pULG178 qui porte le gène *cfp* sous la dépendance de *PspolIE* n'ont pas été réalisés en fonction des résultats obtenus en parallèle avec le gène codant pour la Green-fluorescent protein mut3 (GFPmut3) chez *B. subtilis* (voir IV.2.5.5).

IV.2.5.5. Expression du gène *gfp* ou *gfpmut3* chez *B. subtilis* *PspolIE-gfp::amyE-spc*, *B. subtilis* pULG4 (*PspolIE-gfpmut3*) et *B. licheniformis* pULG8 (*PspolIE-gfpmut3*)

Au début de nos travaux, nous avons à notre disposition la souche *B. subtilis* *PspolIE-gfp::amyE-spc* (Hoover et al 201) dans laquelle le gène codant pour la Green fluorescent protein (GFP) est sous le contrôle de *PspolIE*, et insérée dans le gène chromosomique *amyE* codant pour α -amylase afin de limiter les variations liées au nombre de copies du plasmide dans le cytoplasme au cours de la croissance cellulaire. La **Figure IV.19** montre le suivi de la fluorescence de la GFP dans cette souche au cours de sa croissance dans le milieu M1. Si un signal de fluorescence est bien mis en évidence et qui est au maximum quand la cellule entre dans sa phase stationnaire, celui-ci n'est pas suffisant pour être détecté par cytométrie de flux (résultat non montré). Cependant, ces résultats préliminaires montrent une expression transitoire de l'expression de la GFP qui a conduit à la construction du plasmide pULG4 dans

lequel le gène codant pour la *gfpmut3* est sous la dépendance du promoteur *PspolIE* de *B. subtilis*.

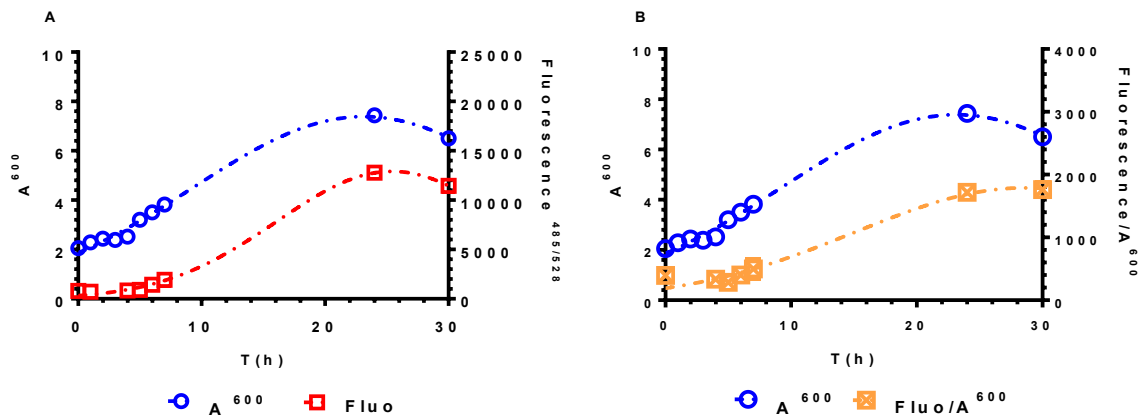


Figure IV.21. Suivi de la croissance et de l'expression de *PspolIE-gfp* au cours du temps chez *B. subtilis* *AmyE::PspolIE-gfp*.

(A) Évolution de l' A^{600} , et de la fluorescence de la GFP (λ^{exi} 485 nm, λ^{emi} 528 nm). (B) Rapport de la fluorescence par cellule ($Fluo^{GFP}/A^{600}$). Les courbes représentent la moyenne et l'écart type de triplicats.

La **Figure IV.22** montre les résultats obtenus pour *B. subtilis* pULG4. Pour cette souche le signal maximum pour la fluorescence est maintenant 50x le signal basal pour 3x chez *B. subtilis* *PspolIE-gfp::amyE*. Par conséquent, le signal est suffisant pour les expériences de cytométrie de flux.

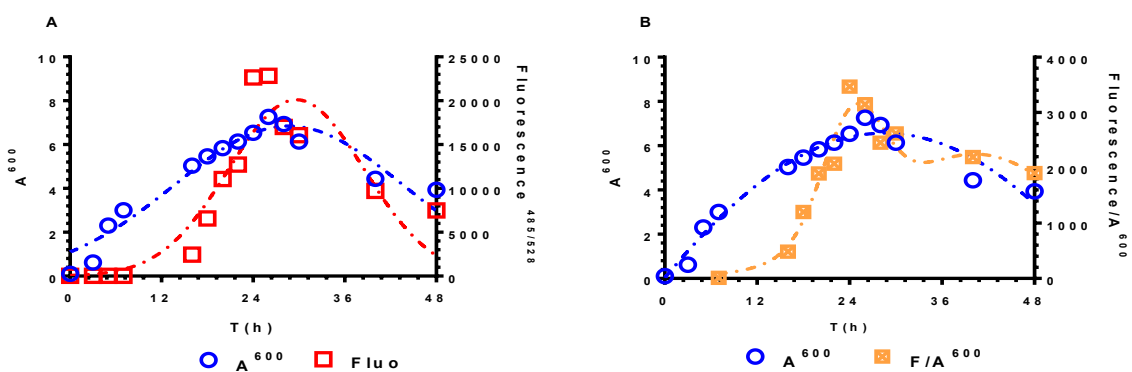


Figure IV.22. Suivi de l'expression de *PspolIE-gfpmut3* chez *B. subtilis* pULG4

(A) Évolution de l' A^{600} , et de la fluorescence de la GFPmut3 (λ^{exi} 485 nm, λ^{emi} 528 nm). (B) Rapport de la fluorescence par cellule ($Fluo^{GFP}/A^{600}$). Les courbes représentent la moyenne et l'écart type de triplicats.

La même construction a été réalisée pour *B. licheniformis* MW3 pour donner le plasmide pULG8 (**Figure IV. 19**). L'expression de la fusion *Pspoll-gfpmut3* et l'intensité importante du signal ont été confirmées par l'observation de colonies fluorescentes lorsque cette souche est cultivée sur un milieu gélosé (**Figure IV. 23**). Ce résultat a été confirmé en milieu liquide et donne un résultat similaire à celui obtenu pour *B. subtilis* pULG4.

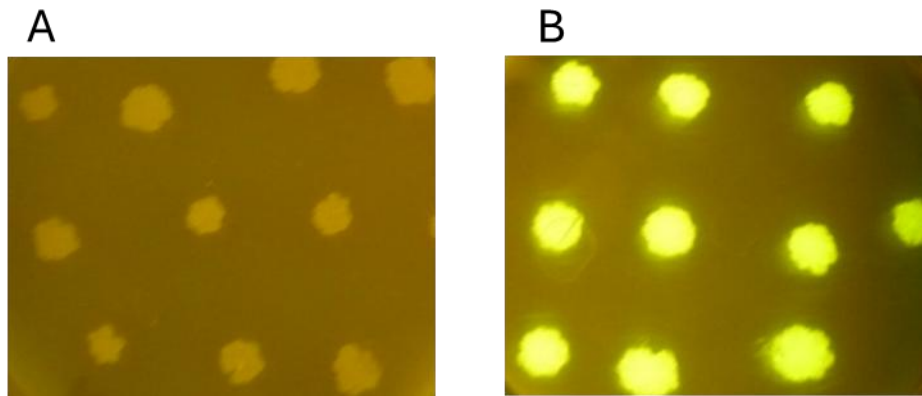


Figure IV.23. Les colonies de *B. licheniformis* MW3 (A) et *B. licheniformis* pULG8 (B) après transformation avec le plasmide pULG8.

Après la sélection sur milieu contenant la kanamycine (10 µg/ml), les colonies de la souche transformée (*B. licheniformis* pULG8) présentent une fluorescence nettement visible sous une lampe UV, contrairement à la souche parentale MW3, ce qui indique l'expression fonctionnelle du gène rapporteur porté par le plasmide et l'intensité de la fluorescence produite par la GFPmut3.

La Figure IV.24 résume les constructions finales présentent dans les plasmides pULG4 et pULG8.

A -----> Psp_oIIE_Bs1_up
 1 TCGAATTCGC GGATCCCATCC TAACAAATCG GTTTCTCTTG CAGAAGCCGA TTTTTTTCAT
 61 TTTTAGACAA CATTCCGGAA ATTCTTTTCA TAAACGAATA TCAAGGCAGA AACCGTCGAA
 121 GATTTCTTTG GTATTGTTAC CTTCTTTTGA CAAAATCCTA TCTGTGCTTT CGCTATAATG

 181 ACAGGCAACG AATATAACAG GTGGGAGATG AGAGGAaATGC GTAAAGGAGA AGAACTTTTC
 <----- Psp_oIIE_Bs2_rev
 ---> Psp_oIIE_Bs3_up
 241 ACTGGAGTTG TCCAATTCT TGTTGAATTA GATGGTGATG TTAATGGGCA CAAATTTTCT
 301 GTCAGTGGAG AGGGTGAAGG TGATGCAACA TACGGAAAAC TTACCCTTAA ATTTATTTGC
 361 ACTACTGGAA AACTACCTGT TCCATGGCCA ACACCTGTCA CTACTTTCGG TTATGGTGT
 421 CAATGCTTTG CGAGATACCC AGATCATATG AAACGGCATG ACTTTTTCAA GAGTGCCATG
 481 CCCGAAGGTT ATGTACAGGA AAGAACTATA TTTTCAAAG ATGACGGGAA CTACAAGACA
 541 CGTGCTGAAG TCAAGTTTGA AGGTGATACC CTTGTTAATA GAATCGAGTT AAAAGGTATT
 601 GATTTTAAAG AAGATGGAAG CATTCTTGGG CACAAATTGG AATACAACATA TAACTCACAC
 661 AATGTATACA TCATGGCAGA CAAACAAAAG AATGGAATCA AAGTTAACTT CAAAATTAGA
 721 CACAACATTG AAGATGGAAG CGTTCAACTA GCAGACCATT ATCAACAAAA TACTCCAATT
 781 GGCGATGGCC CTGTCCTTTT ACCAGACAAC CATTACCTGT CCACACAATC TGCCCTTTCG
 841 AAAGATCCCA ACGAAAAGAG AGACCACATG GTCCTTCTTG AGTTTGTAAC AGCTGCTGGG
 901 ATTACACATG GCATGGATGA ACTATACAAA TAAGGATCCC CCTGCATTA
 <----- GFP_end_rev

B -----> Psp_oIIE_B11_up
 1 TCGAATTCGC GGATCCCATTC CGGAaACCGG CTTCTTCTGA AGCCGGTTTT TTGCTGCATA
 61 AAAATATGCA AAATAACGGG AATGGACTCG ACTTATCAAG AGTGATTGAA GCATGCTACA
 121 AAAAGCGTCG AACAGTTCCT TGAATTCGTT ACCTTCTTTT GACAAAATCC TATTTTCATCT

 181 TTGCTATAA TGGCAAGCAA CGAATAAACG AGTGGGAGAT GAGAGCATGC GTAAAGGAGA
 <----- Psp_oIIE_B12_rev
 -----> PSp_oIIE-B13_up
 241 *Agaa*CTTTTC ACTGGAGTTG TCCAATTCT TGTTGAATTA GATGGTGATG TTAATGGGCA
 301 CAAATTTTCT GTCAGTGGAG AGGGTGAAGG TGATGCAACA TACGGAAAAC TTACCCTTAA
 361 ATTTATTTGC ACTACTGGAA AACTACCTGT TCCATGGCCA ACACCTGTCA CTACTTTCGG
 421 TTATGGTGT CAATGCTTTG CGAGATACCC AGATCATATG AAACGGCATG ACTTTTTCAA
 481 GAGTGCCATG CCCGAAGGTT ATGTACAGGA AAGAACTATA TTTTCAAAG ATGACGGGAA
 541 CTACAAGACA CGTGCTGAAG TCAAGTTTGA AGGTGATACC CTTGTTAATA GAATCGAGTT
 601 AAAAGGTATT GATTTTAAAG AAGATGGAAG CATTCTTGGG CACAAATTGG AATACAACATA
 661 TAACTCACAC AATGTATACA TCATGGCAGA CAAACAAAAG AATGGAATCA AAGTTAACTT
 721 CAAAATTAGA CACAACATTG AAGATGGAAG CGTTCAACTA GCAGACCATT ATCAACAAAA
 781 TACTCCAATT GGCGATGGCC CTGTCCTTTT ACCAGACAAC CATTACCTGT CCACACAATC
 841 TGCCCTTTCG AAAGATCCCA ACGAAAAGAG AGACCACATG GTCCTTCTTG AGTTTGTAAC
 901 AGCTGCTGGG ATTACACATG GCATGGATGA ACTATACAAA TAAGGATCCC CCTGCATTA
 <----- GFP_end_rev

Figure.IV.24. Séquences nucléotidiques des fragments obtenus par OE-PCR, incluant les promoteurs de *spolIE* de *B. subtilis* (A) ou *B. licheniformis* (B) fusionnés au gène *gfp-mut3*.

Les séquences des promoteurs sont indiquées en gras. Les séquences correspondant au gène *gfp-mut3* sont en italique. Les sites de restriction *Bam**HI* sont soulignés par des vagues. Les séquences nucléotidiques des amplimères sont représentées par des flèches en pointillés, et leurs extrémités flottantes sont en police normale. Pour plus de détails, voir le texte et la section Matériels et Méthodes.

Conclusion

Les souches *B. subtilis* pULG4 et *B. licheniformis* PULG 8 répondent aux critères que nous cherchions : (i) l'expression de la protéine rapportrice lorsque la population bactérienne atteint sa phase stationnaire et engage la sporulation, (ii) une expression qui est transitoire (un pic de fluorescence) et un signal de fluorescence/cellule qui permet une analyse par cytométrie de flux. Par la suite, seul ces deux souches seront utilisées dans nos travaux.

IV.2.5.6. Dynamique de l'expression du promoteur *PspolIE-gfpmut3* au cours de la croissance de *B. subtilis* pULG4

Pour un suivi temporel de l'expression, nous avons cultivé *B. subtilis* pULG4 dans un milieu liquide et mesuré l'évolution de l'absorbance A^{600} pour estimer la croissance cellulaire. Les échantillons ont été dilués régulièrement pour obtenir une A^{600} inférieure à 0,5 afin d'assurer une mesure fiable de l' A^{600} et de la fluorescence de la GFPmut3, qui pourrait être affectée par la densité de la suspension bactérienne.

Le signal de fluorescence, correspondant à l'expression de GFPmut3 sous contrôle du promoteur *PspolIE* a été aussi mesuré par fluorimétrie (λ^{exc} 485 nm et λ^{emi} 528nm). L'expression de *spolIE-gfpmut3* a ainsi été suivie pendant 48 heures.

La **Figure IV.25.A**, présentent les résultats obtenus pour quatre milieux de culture, M1, M2, SSM et M4. Les trois premiers sont ceux décrits précédemment (point **IV.1.5** des résultats) et le quatrième, M4, est un milieu optimisé par la société ARTECHNO pour la production d'endospores. Pour des raisons de confidentialité la composition de ce milieu ne sera pas décrite. Les cultures de 48 h en erlenmeyer (50 ml) ont été réalisées en parallèle et l' A^{600} ainsi que la fluorescence de la GFPmut3 ont été mesurées à intervalles réguliers. La fluorescence moyenne par cellule a également été calculée ($Fluo/A^{600}$) ainsi que la détermination de la flore totale et du nombre d'endospores après 48 h de culture (**Tableau IV.16 et 17**).

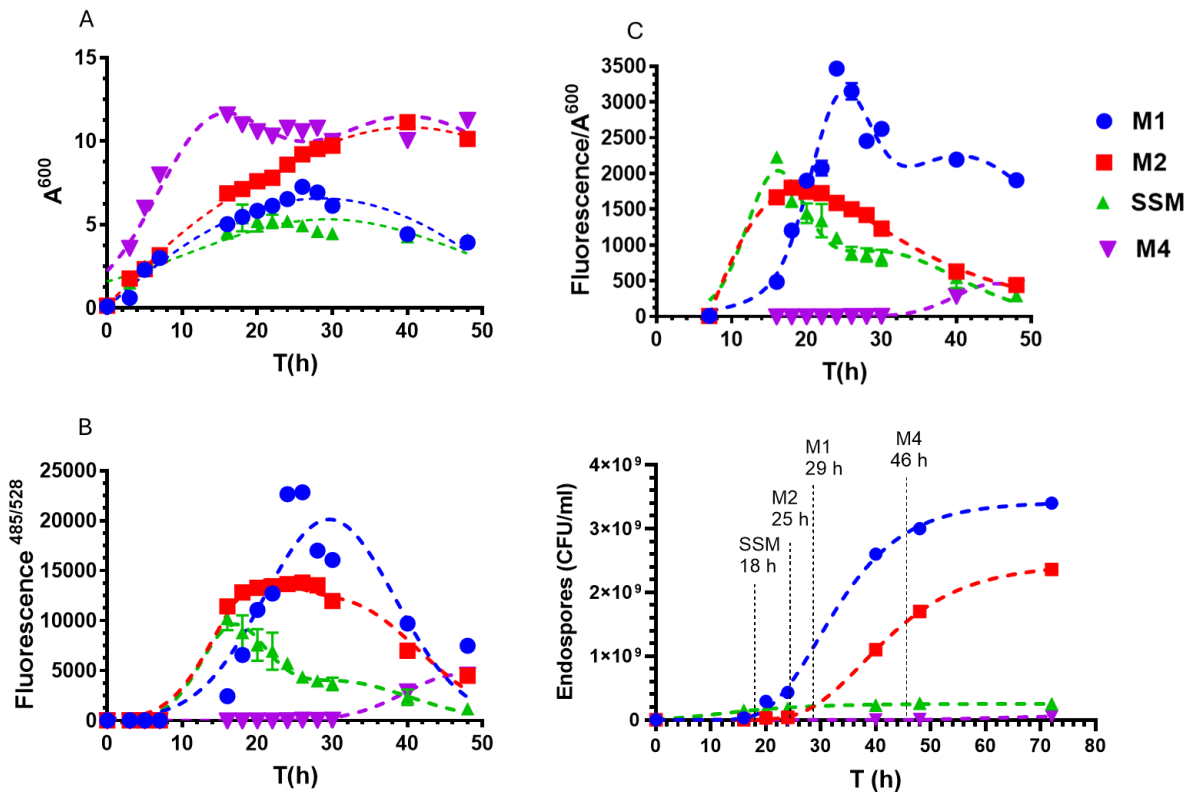


Figure IV.25. Suivi de la croissance, de l'expression de *PspollE-gfpmut3* et du nombre d'endospores chez *B. subtilis* pULG4 dans quatre milieux de culture distincts (M1, M2, SSM et M4).

(A) Évolution de la croissance (A^{600}), (B) Fluorescence brute de la GFPmut3 (λ^{exc} : 485 nm, λ^{emi} : 525 nm), (C) Fluorescence/ A^{600} (fluorescence moyenne/cellule), (D) Détermination du nombre d'endospores/ml à partir de 16 h de culture. Dans le graphe D, la valeur à 72 h a été estimée à partir des données d'endospores obtenues entre 16 h et 48 h, en les ajustant à une courbe sigmoïde suivant l'équation de Gompertz. Les droites verticales en pointillé représentent temps de culture pour laquelle la Fluo/ A^{600} est maximale pour chaque culture. Pour les points expérimentaux A, B et C, les données ont été ajustées par un modèle gaussien (simple ou double) afin de faire ressortir la tendance globale, de réduire les fluctuations ponctuelles et d'extraire des paramètres clés (amplitude, temps du pic, largeur à mi-hauteur) reflétant l'intensité, la cinétique et la durée de l'expression. Les courbes représentent la moyenne et l'écart type de trois réplicats indépendants.

Le milieu M4 se distingue par une croissance rapide et soutenue, atteignant une absorbance maximale A^{600} de 11,6 dès 16 h. Cette forte prolifération suggère des conditions hautement favorables probablement liées à une composition nutritive optimisée. La phase stationnaire est atteinte précocement, avec une densité stable entre 24 h et 48 h, traduisant un arrêt de croissance possiblement induit par une limitation nutritionnelle ou l'accumulation des métabolites inhibiteurs.

Le milieu M2 présente également une croissance robuste, bien que légèrement plus progressive que M4, avec une A^{600} culminant à 11,2 à 40 h. Ce profil indique une transition plus lente vers la phase stationnaire, traduisant une disponibilité prolongée des ressources ou une meilleure gestion des conditions de culture. A l'inverse, les milieux M1 et M3 présentent des croissances plus modérées. Dans M1, l'Absorbance maximale ($A^{600} \approx 7,2$) est atteinte à 26 h suivie d'une diminution progressive de l' A^{600} . Cela pourrait refléter des conditions nutritionnelles plus limitées ou un stress environnemental plus prononcé. Le milieu SSM, quant à lui, présente la plus faible densité cellulaire, ne dépassant pas 5,2, suggérant des conditions peu propices à la croissance bactérienne, possiblement liées à une carence en nutriments ou un pH défavorable. Ces différences de croissance sont susceptibles d'influencer significativement l'expression de *PspoIIIE-gfpmut3*, dont l'activation est intimement liée à l'entrée en phase stationnaire et à la mise en place de réponses au stress.

L'analyse de l'expression de *PspoIIIE-gfpmut3* (Figure IV.25.B) via la fluorescence brute de la GFPmut3, révèle une régulation fine et dépendante du contexte physiologique chez *B. subtilis* pULG4. Cette expression est étroitement corrélée à la dynamique de croissance observée dans les différents milieux de culture testés. Dans le milieu M1, M2 et SSM, la fluorescence augmente significativement à partir de 16 h, ce qui coïncide avec le ralentissement de la croissance et marque typiquement l'entrée en phase stationnaire. Cette activation du promoteur *PspoIIIE* est cohérente avec son rôle dans les étapes précoces de la sporulation, notamment dans l'établissement de l'asymétrie cellulaire et l'initiation de la formation polaire du septum (Arigoni et al., 1996). En particulier, le milieu M2, qui supporte une croissance soutenue jusqu'à une A^{600} de l'ordre de 12, présente également une expression rapide et marquée de *PspoIIIE-gfpmut3* culminant à 26 h avec une fluorescence brute supérieure à 13 000 unités. Ce comportement suggère une transition bien définie entre phases exponentielle et stationnaire, conduisant à une activation efficace de la cascade régulatrice de la sporulation. Le milieu M1, avec une croissance plus modérée ($A^{600} \approx 7,2$), montre une induction similaire bien que légèrement plus tardive, ce qui pourrait refléter une entrée en sporulation plus progressive ou un stress nutritionnel prolongé.

En revanche le milieu SSM, dans lequel la croissance plafonne précocement autour de $A^{600} \approx 5,2$, montre une activation de *PspoIIIE* qui, bien que rapide, reste de moindre amplitude. Cela pourrait indiquer que les cellules entrent en sporulation plus précocement. Le milieu M4 offre un contraste net : bien qu'il permette une croissance très rapide (atteinte de $A^{600} = 11,6$ après 16 h de culture), il ne provoque qu'une expression quasi nulle de *PspoIIIE-gfpmut3* après 28 h de culture. Cette absence d'activation de *PspoIIIE*, malgré une biomasse élevée, suggère qu'un des composants du milieu ou un produit de dégradation inhibe l'engagement du processus de sporulation chez *B. subtilis*. Ces observations illustrent la sensibilité du

promoteur *PspoII*E aux signaux métaboliques et environnementaux et soulignent la complexité de la régulation transcriptionnelle associée à la sporulation de *B. subtilis*. Elles confirment que la modulation des conditions de culture peut influencer de manière décisive l'activation temporelle et l'intensité de l'expression de gènes clés de développement sporulé, avec comme implications importantes, l'optimisation industrielle des processus liés à la sporulation.

L'étude de fluorescence par cellule (Fluo/A⁶⁰⁰, **Figure. IV.25.C**) confirme les résultats observés pour la fluorescence brute.

Quant à la valeur de Fluo/A⁶⁰⁰, elle est interprétée comme la fluorescence moyenne de la GFPmut3 par cellule. Nos résultats montrent qu'elle varie en fonction des conditions de culture (**Figure IV.25 C**). Si la vitesse d'expression de *PspoII*E-*gfpmut3* est identique pour toutes les cellules qui ont débuté leur sporulation et cela, indépendamment du milieu de culture, alors la Fluo/A⁶⁰⁰ peut être interprétée comme un indicateur de l'hétérogénéité phénotypique de la population bactérienne ou d'un état bistable. Ainsi, une valeur élevée de Fluo/A⁶⁰⁰ suggérerait une fraction plus importante de cellules exprimant la GFPmut3 par rapport à une autre population bactérienne possédant une valeur de Fluo/A⁶⁰⁰ plus faible. Si ce raisonnement est correct, alors l'hétérogénéité au sein de la population bactérienne devrait être moins marquée lorsque *B. subtilis* pULG4 est cultivée dans le milieu M1 que dans le milieu M2.

L'évolution du nombre d'endospores en fonction du temps mis en relation avec le maximum de Fluo/A⁶⁰⁰ met en évidence que ce maximum arrive juste avant l'apparition dans le milieu de culture des premières endospores, soit, respectivement, 16, 18 et 24 h pour les milieux SSM, M2 et M1 (**Figure IV.25, D**). L'ajustement des valeurs des endospores/ml au cours du temps avec l'équation d'une courbe sigmoïdale (Equation de Gompertz) permet d'extrapoler le nombre d'endospores à 72 h ; temps auquel la courbe a atteint son plateau. Pour les trois milieux qui ont conduit à la formation d'endospores, le maximum de production d'endospores est atteint 48 h après que le maximum de Fluo/A⁶⁰⁰ soit atteint. Ainsi, le maximum Fluo/A⁶⁰⁰ est un bon marqueur du début de la sporulation et de sa fin pour *B. subtilis* pULG4. Il faut aussi remarquer que pour le milieu SSM, le pic maximum de fluorescence aurait pu être manqué et situé dans l'intervalle de temps 8 à 16 h pendant lesquelles aucune mesure n'a été réalisée.

Le **Tableau IV.16** présente la flore totale, le nombre d'endospores et le taux de sporulation après 48 h de culture pour *B. subtilis* pULG4 dans les quatre milieux de culture étudiés. Ces taux sont respectivement, 56,6, 87,5, 100 et 0,1 % pour les milieux M1, M2, SSM et M4. Si, les valeurs d'endospores extrapolées à 72 h de culture pour les milieux M1, M2 et SSM sont utilisées et en prenant la flore totale après 48 h de culture, les taux de sporulation calculés sont de 64, 120 et 96 % pour M1, M2 et SSM. Quant à la quantité totale de spores produites (rendement de sporulation), aucune relation directe entre celui-ci n'a pu être déduit de la

mesure de la fluorescence de la GFPmut3. Excepté qu'une densité cellulaire importante mesurée par l'A⁶⁰⁰ couplée à un pic de Fluo/A⁶⁰⁰ sont les conditions pour un rendement élevé en endospores.

Tableau IV.16. Flore totale, nombre d'endospores et rendement de sporulation après 48 h de culture dans les milieux de référence pour *B. subtilis* pULG4

<i>B. subtilis</i> pULG4			
Milieu de culture	Flore totale CFU/ml	Spores CFU/ml	Taux de sporulation (%)
M1	5,3 x10 ⁹	3,0 x10 ⁹	56,6
M2	2,0 x10 ⁹	1,7 x10 ⁹	87,5
M3	2,6 x10 ⁸	2,6 x10 ⁸	100
M4	4,3 x 10 ⁹	4,6 x 10 ⁶	0,1

Conclusion

L'analyse comparative des quatre milieux chez *B. subtilis* pULG4, montrent que M1 est le plus propice à l'induction de fluorescence, avec des valeurs maximales observées bien que plus élevées que dans les autres milieux. Cette observation suggère que M1 offre les conditions les plus favorables pour l'expression du gène rapporteur ou l'activité fluorescente mesurée. En revanche, M2 et SSM, bien qu'efficaces, semblent induire une réponse moins forte, ce qui pourrait être dû à des différences dans les nutriments ou les facteurs spécifiques présents dans ces milieux. Le milieu M4, avec sa fluorescence faible est le moins adapté pour activer l'expression de *PspolIE-gfpmut3*, suggérant que les conditions de ce milieu ne sont pas optimales pour la production d'endospores. De manière générale, à l'exception du milieu M4, pour les milieux M1 et M2 une prolongation des cultures de 24 h serait bénéfique pour obtenir un rendement en endospores plus élevé et probablement maximum.

Tableau.IV.17. Comparaisons des milieux M1 M2 SSM et M4 chez *B. subtilis* pULG4

Milieu	Croissance (A ⁶⁰⁰)	Fluorescence brute	Fluorescence/A ⁶⁰⁰	Interprétation	Applications potentielles
M1	Moyenne	Très élevée	Très élevée	Forte induction de <i>PspII_E</i> . Condition optimale pour l'expression de la GFPmut3	Optimisation du promoteur <i>PspII_E-gfpmut3</i> , production ciblée de protéines fluorescentes ou recombinante
M2	Elevée	Moyenne	Faible à modérée	Expression faible. Bonne croissance mais expression spécifique très faible.	Biosynthèse en phase végétative, production de biomasse ou de métabolites primaires.
SSM	Moyenne à basse	Moyenne	Modérée	Expression partielle. Bonne croissance mais expression spécifique très faible.	Tests fonctionnels de promoteurs, expression modérée en conditions contrôlées
M4	Très élevée	Très faible	Très faible	Expression faible malgré une forte biomasse	Culture de maintenance, propagation de souches sans activation d'éléments inductibles.

IV.2.5.7. Dynamique de l'expression du promoteur *PspolIE-gfpmut3* au cours de la croissance de *B. licheniformis* pULG8

La **Figure IV.26.A**, présente les courbes de croissance de *B. licheniformis* pULG8 cultivé dans quatre milieux (M1, M2, SSM et M4), ainsi que la fluorescence brute et fluorescence/ A^{600} de la GFPmut3 au cours de la culture.

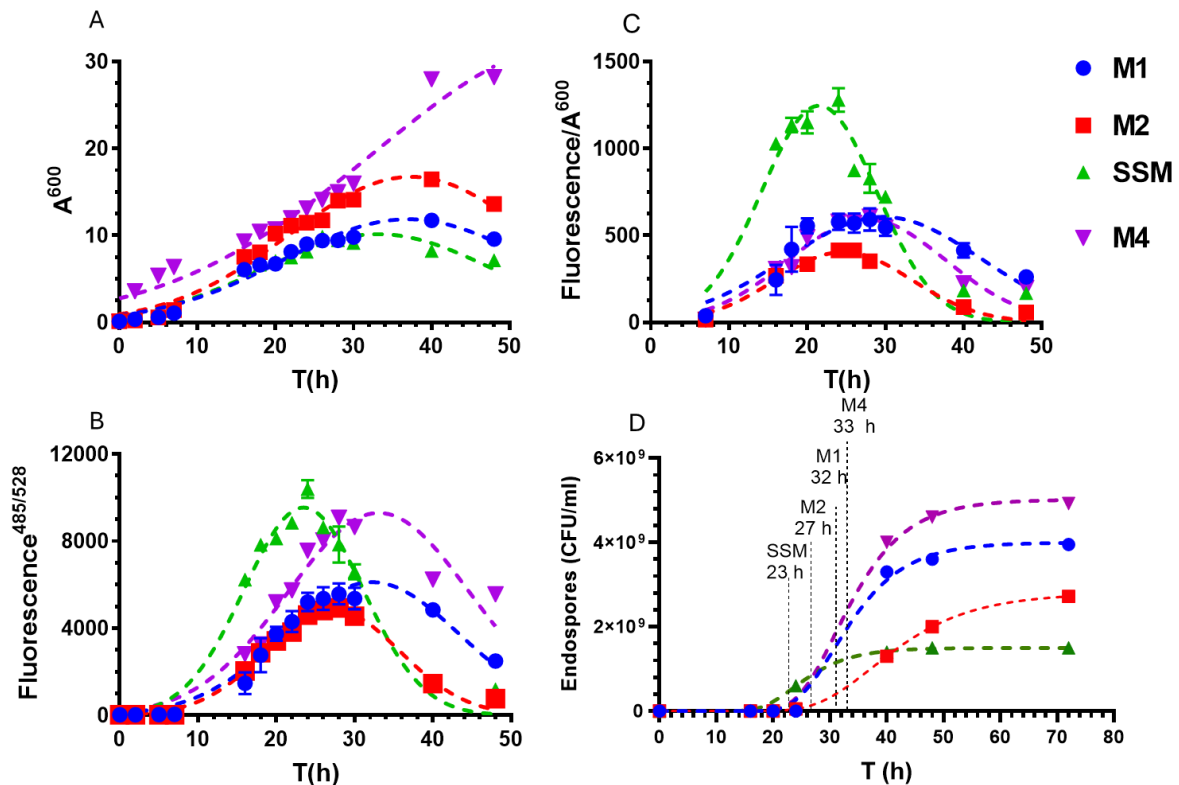


Figure IV.26. Suivi de la croissance, de l'expression de *PspolIE-gfpmut3* et du nombre d'endospores chez *B. licheniformis* pULG8 dans quatre milieux de culture distincts (M1, M2, SSM et M4).

(A) Évolution de la croissance (A^{600}), (B) Fluorescence brute de la GFPmut3 (λ^{exc} : 485 nm, λ^{emi} : 525 nm), (C) Fluorescence/ A^{600} (fluorescence moyenne/cellule), (D) Détermination du nombre d'endospores/ml à partir de 16 h de culture. Dans le graphe D, la valeur à 72 h a été estimée à partir des données d'endospores obtenues entre 16 h et 48 h, en les ajustant à une courbe sigmoïde suivant l'équation de Gompertz. Les droites verticales en pointillé représentent temps de culture pour laquelle la Fluo/ A^{600} est maximale pour chaque culture. Pour les points expérimentaux A, B et C, les données ont été ajustées par un modèle gaussien (simple ou double) afin de faire ressortir la tendance globale, de réduire les fluctuations ponctuelles et d'extraire des paramètres clés (amplitude, temps du pic, largeur à mi-hauteur) reflétant l'intensité, la cinétique et la durée de l'expression. Les courbes représentent la moyenne et l'écart type de trois replicats indépendants.

Les résultats obtenus mettent en évidence des comportements de croissance différenciés, révélant l'influence significative de la composition du milieu sur les performances de *B. licheniformis* pULG8.

Le milieu M1 a permis une croissance progressive atteignant un plateau à une absorbance d'environ 10 après 30 heures. Cette croissance modérée pourrait être suffisante dans des applications où une faible densité cellulaire est acceptable, comme certaines formulations de probiotiques où la stabilité est priorisée sur la biomasse. Le milieu M2 favorise une croissance plus rapide et atteint une A^{600} maximale de 15, ce qui indique une meilleure adaptation de la souche à ce milieu. Une telle performance est intéressante pour la production des spores à des fins probiotiques, notamment dans des contextes industriels où la rentabilité dépend d'un bon rendement cellulaire sans perte de viabilité.

Le milieu SSM a induit une croissance initiale rapide mais plafonne précocement, ce qui pourrait être lié à une limitation nutritionnelle ou l'accumulation de métabolites inhibiteurs ($A^{600}=10$). Ce type de milieu, bien qu'optimal pour étudier des phases précoces de croissance ou de réponses au stress, semble moins adapté à la production de biomasse ou de spores à grande échelle.

Enfin, le milieu M4 s'est démarqué nettement avec une croissance soutenue au-delà de 30 heures, atteignant une densité cellulaire $A^{600}\approx 28$. Ce profil est particulièrement favorable pour les applications nécessitant une production massive de biomasse, telles que la formulation de biofertilisants ou de biopesticides à base de cellules vivantes ou sporulées. Un tel rendement est également stratégique pour les souches destinées à la fermentation à grande échelle, où la croissance robuste en conditions prolongées est cruciale.

En résumé M4 représente le milieu le plus prometteur pour des applications industrielles à forte exigence de biomasse, tandis que M2 peut convenir à des applications probiotiques ciblées. Ces résultats soulignent l'importance de l'optimisation du milieu en fonction des objectifs d'utilisation, qu'il s'agit d'améliorer la productivité, la sporulation ou la stabilité des formulations finales.

Parallèlement, l'analyse de la fluorescence de la GFPmut3 produite lors de la croissance bactérienne (**Figure IV.26.B**) et indicatrice de l'expression de *PspolIE-gfpmut3*, montre un pic transitoire dans tous les milieux, avec des intensités et des cinétiques variables. Le milieu SSM présente la fluorescence maximale, indiquant une expression forte et précoce de *PspolIE-gfpmut3*. Le milieu M4 affiche également une activation marquée de *PspolIE*, bien que légèrement inférieure, mais plus étalée dans le temps. En revanche, M2, malgré une croissance élevée, produit peu de la protéine reportrice suggérant que ce milieu n'est pas

propice à la sporulation ou à l'expression de *PspolIE-gfpmut3*. Le milieu M1, quant à lui, a montré une induction modérée.

L'analyse du rapport fluorescence/A⁶⁰⁰ (**Figure IV.26.C**) montre une tout autre vue. Maintenant seul le milieu SSM possède un rapport Fluo/A⁶⁰⁰ ≈ 2 fois plus élevé que celui des trois autres milieux et les valeurs maximales sont obtenues, respectivement, après 21, 24, 26 et 26 h pour les cultures dans les milieux SSM, M2, M1 et M4. Il faut remarquer que les cultures dans les milieux M1 et M4 possèdent des profils quasi identiques pour leurs rapports Fluo/A⁶⁰⁰. Si ce rapport reflète la fluorescence moyenne/cellule et l'hétérogénéité de la population bactérienne dont une partie a entrepris le processus de sporulation (**voir Figure IV.26.D**), le milieu SSM possède une population plus homogène ou plus synchronisée du point de vue de la sporulation que celles présentes dans les trois autres milieux. L'examen de l'évolution du nombre d'endospores au cours du temps (**Figure IV.26 D**) confirme les observations décrites pour *B. subtilis* pULG4 : le maximum de Fluo/A⁶⁰⁰ est atteint juste avant l'apparition des endospores dans le milieu de culture et qu'une prolongation de 24 h permettrait d'obtenir un taux de sporulation maximum pour les cultures dans les milieux M1, M2 et M4.

Quant à la sporulation, le **Tableau IV.18** présente la flore totale, le nombre d'endospores et le taux de sporulation après 48 h de culture pour *B. licheniformis* pULG8 dans les quatre milieux de culture étudiés. Ces taux sont respectivement, 52, 66,6, 83 et 92 % pour les milieux M1, M2, SSM et M4. Si les valeurs d'endospores extrapolées à 72 h de culture pour les milieux M1, M2, SSM et M4 sont utilisées et en prenant la flore totale après 48 h de culture, les taux de sporulation calculés sont de 58, 91, 83 et 98% pour M1, M2, SSM et M4. Quant à la quantité totale de spores produite (rendement de sporulation), aucune relation directe entre celui-ci n'a pu être déduit de la mesure de la fluorescence de la GFPmut3 comme observé précédemment pour *B. subtilis* pULG4. Excepté qu'une densité cellulaire importante mesurée par l'A⁶⁰⁰ couplée à un pic de Fluo/A⁶⁰⁰ sont les conditions pour un bon rendement élevé en endospores

Tableau IV.18. Flore totale, nombre d'endospores et rendement de sporulation après 48 h de culture dans les milieux de référence pour *B. licheniformis* pULG8

<i>B. licheniformis</i> pULG8			
	Flore totale CFU/ml	Spores CFU/ml	Taux de sporulation
M1	6,9 x10 ⁹	3,6 x10 ⁹	60
M2	3,0 x10 ⁹	2,0 x10 ⁹	66,6
SSM	1,8 x10 ⁹	1,5 x10 ⁹	83
M4	5,0 x 10 ⁹	4,6 x 10 ⁹	92

Conclusion

Le **Tableau IV.19** résume les résultats obtenus dans les 4 milieux (M1, M2, SSM et M4) de cultures et met en évidence les différences significatives en termes de leurs performances biologiques.

Tableau IV.19. Analyse comparative des milieux M1, M2, SSM et M4 chez *B. licheniformis* pUL8

Milieu	Croissance (A600)	Fluorescence brute	Fluorescence/A600	Interprétation	Applications potentielles
M1	Moyenne	Moyenne	Moyenne-haute (900)	Expression correcte, mais moins marquée qu'en M3. Croissance modérée.	Bon compromis pour production équilibrée spores/biomasse
M2	Moyenne-Haute	Faible	Faible (300-400)	Expression diluée malgré la biomasse.	Culture végétative sans sporulation (enzymes, métabolites).
M3	Moyenne	Haute	Très haute (>1300)	Expression rapide et efficace par cellule, malgré croissance modérée.	Ideal pour maximiser la production de spores à partir de faible biomasse.
M4	Très haute	Très haute	Moyenne (700)	Forte croissance, mais induction diluée. Ration correcte mais sous optimal.	Production massive spores + biomasse (rendement global).

IV.2.6. Suivi de l'expression de *PspolIE-gfpmut3* par cytométrie en flux

Les analyses en cytométrie de flux constituent une méthode analytique de référence pour l'étude des populations microbiennes en suspension, notamment dans les environnements complexes et dynamiques des procédés biotechnologiques. Cette technique permet l'analyse multiparamétrique de cellules individuelles, en mesurant simultanément des propriétés physiques (taille, granularité) et la fluorescence à très haut débit. Elle est particulièrement adaptée au suivi de l'hétérogénéité cellulaire au sein d'une culture, ce qui est essentiel dans le développement de produits microbiens de qualité, tels que les probiotiques et tout particulièrement ceux basés sur des souches sporulantes comme *B. subtilis* et *B. licheniformis*.

Dans nos travaux, la cytométrie de flux a été utilisée pour évaluer l'expression de *PspolIE-gfpmut3* chez *B. subtilis* pULG4 et *B. licheniformis* pULG8. Ces souches ont été cultivées en milieu M1 (50 ml), simulant les conditions de production industrielle des probiotiques. Pour ce faire, des prélèvements ont été effectués à différents temps de culture (7 h à 48 h), puis analysés par cytométrie de flux pour discriminer les sous populations cellulaires exprimant ou non la GFPmut3, ce qui correspond aux bactéries qui sont au stade de la sporulation chez *B. subtilis* et par extension à tous les *Bacillus sp* qui forment des endospores. Cette approche permet de suivre précisément la dynamique de la sporulation et d'évaluer la robustesse des souches *Bacillus*, critères essentiels pour les applications probiotiques. Comparée à une souche contrôle sans *PspolIE-gfpmut3*, cette analyse permet de valider l'initiation de la sporulation au sein de la population bactérienne et de mieux comprendre le rôle de différenciation cellulaire dans la viabilité et la stabilité des probiotiques.

Pour toutes les expériences, les échantillons destinés à la cytométrie de flux ont été préparés comme suit : un volume de 1 ml de culture a été prélevé à toutes les heures. Chaque échantillon a été immédiatement centrifugé à $4000 \times g$ pendant 10 minutes à $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ afin de concentrer les cellules. Le culot obtenu a été délicatement resuspendu dans 1 ml de glycérol stérile à 20 % (v/v), qui agit comme cryoprotecteur pour préserver la fluorescence de la GFP lors du stockage. Les échantillons ainsi préparés ont été conservés à $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ jusqu'à la fin de la série temporelle.

À la fin de la période d'incubation, tous les échantillons congelés ont été simultanément décongelés à température ambiante, puis resuspendus dans 500 μl de solution physiologique stérile (solution saline isotonique) pour standardiser la concentration cellulaire et les conditions d'analyse. Cette étape assure une homogénéité des mesures et limite les variations dues à la manipulation. Les échantillons ont été analysés par le cytomètre de flux Facs Cytoflex (Beckman coulter), configuration optique : $A^{\text{exci}} = 488\text{ nm}$ (laser bleu) et $A^{\text{emi}} = 524\text{ nm}$ filtre avec une bande passante de 40 nm.

IV.2.6.1. Cinétique d'expression de *PspolIE-gfpmut3* chez *B. subtilis* pULG4 (milieu de culture, M1)

B. subtilis 168 ne contenant pas de construction exprimant *gfpmut3*, a été utilisée pour évaluer le niveau de fluorescence intrinsèque de la souche et/ou la diffusion lumineuse liée à la présence de la bactérie en suspension dans la solution. Les résultats obtenus sont représentés dans la **Figure IV.27**.

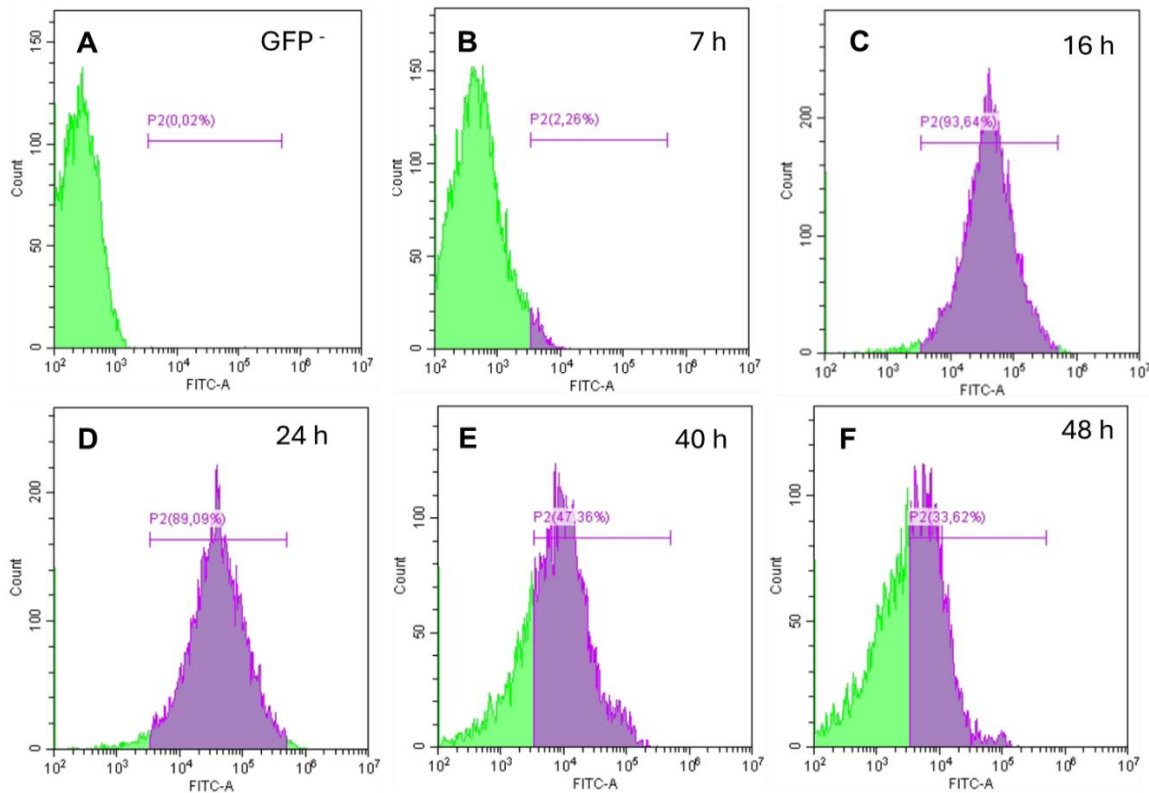


Figure IV. 27. Analyse par cytométrie en flux de l'expression de *PspolIE-gfpmut3* chez *B. subtilis* pULG4.

(A) **GFP⁻**: Souche contrôle de *B. subtilis* 168, cultivée en milieu M1. La population principale (P1) représente 99,97 % des cellules, tandis que seul 0,02 % des événements (P2) possède une fluorescence/cellule supérieure à la valeur seuil choisie. (B à F) Distribution de la fluorescence de la *gfpmut3* d'une culture de *B. subtilis* pULG4 au temps 7, 16, 20, 24, 40 et 48 h. La fluorescence/cellule supérieure à la valeur seuil est en mauve et représente les cellules qui expriment *PspolIE-gfpmut3*. Pour chaque analyse, 10 003 évènements ont été enregistrés. La longueur du LASER est $A^{exci} = 488$ nm (laser bleu) et $A^{emi} = 524$ nm filtre avec une bande passante de 40 nm. Cette analyse par cytométrie de flux a été réalisée à partir de la culture en milieu M1 présentée à la **Figure IV.25**.

La fluorescence intrinsèque de *B. subtilis* 168 et/ou la diffusion lumineuse liée à sa présence dans le flux a permis de déterminer la valeur seuil de la fluorescence au-delà de laquelle la cellule bactérienne exprime la *PspolIE-gfpmut3* (**Figure IV.27. A**) Dans ces conditions, la population principale (P1) représente 99,97 % des événements, tandis que 0,02 % des cellules (population P2) possède une fluorescence supérieure à la valeur seuil.

Ces résultats confirment le bruit de fond très faible lié à la présence de *B. subtilis* 168 validant la spécificité de la détection de la GFPmut3 dans les souches exprimant *PspolIE-gfp-mut3*.

Pour permettre une analyse complète, les résultats obtenus lors des expériences de cytométrie de flux ont été obtenus à partir d'échantillons prélevés lors de la culture de *B. subtilis* pULG4 en milieu M1 présentés dans la **Figure IV.25**. Après, 7 h de culture, l'expression de *PspolIE-gfpmut3* est relativement faible : elle représente seulement 2,26 % des cellules exprimant la *gfp-mut3* (**Figure IV.27 B**).

Après 16 heures de culture, 93,64 % des cellules produisent de la fluorescence. Cette forte proportion indique une activation homogène et étendue de *PspolIE-gfpmut3*, ce qui suggère que la majorité des cellules de la population sont engagées dans l'étape II de la sporulation et qu'elles expriment la GFPmut3 à un niveau variable d'une cellule à l'autre. Après 24 h, la proportion de cellules produisant de la GFPmut3 commence à diminuer (P2 = 89%) et des cellules ne produisant plus de la GFPmut3 commencent à apparaître (intensité de fluorescence/cellule inférieure au seuil).

Ensuite, après 40 et 48 h de culture, la population bactérienne possédant une fluorescence supérieure au seuil décroît progressivement : P2 (40 h) = 47,36 % et P2 (48 h) = 33,62 %. Il est intéressant de remarquer que pour ce dernier temps de culture le taux de sporulation déterminé expérimentalement est de 57 %. Une valeur proche de 64 % pour la population P1 (24 h) qui représente très probablement les endospores. Il faut aussi noter que le maximum du rapport Fluo/A⁶⁰⁰ pour cette même culture a été atteint après 20 h de culture (**Figure IV.25.C**), en accord avec les résultats de cytométrie de flux pour laquelle le maximum de bactéries émettant de la fluorescence est atteint après 16 h de culture.

En conclusion, les résultats montrent une activation transitoire et différenciée du promoteur *PspolIE* tout au long de la sporulation, avec une forte expression aux premiers temps (16 h et 24 h), suivie d'une diminution progressive au fur et à mesure que les cellules terminent leur programme de sporulation. Ces observations confirment que *PspolIE* est un marqueur précis des stades précoces de la sporulation et permette de suivre la dynamique de l'induction à travers les différentes phases du processus.

IV.2.6.2. Cinétique d'expression de *PspollE-gfpmut3* chez *B. licheniformis* pULG8

Chez *B. licheniformis* pULG8, l'expression du gène rapporteur *gfpmut3* a été suivie par cytométrie en flux au cours de 48 heures. La culture a été réalisée dans le milieu M1 et les échantillons analysés sont issus de la culture présentée dans la **Figure IV.26**. *B. licheniformis* MW3 a servi de témoin négatif afin de définir la valeur seuil de la fluorescence au-dessus de laquelle une cellule est considérée comme produisant de la GFPmut3 (**Figure IV.28. A**).

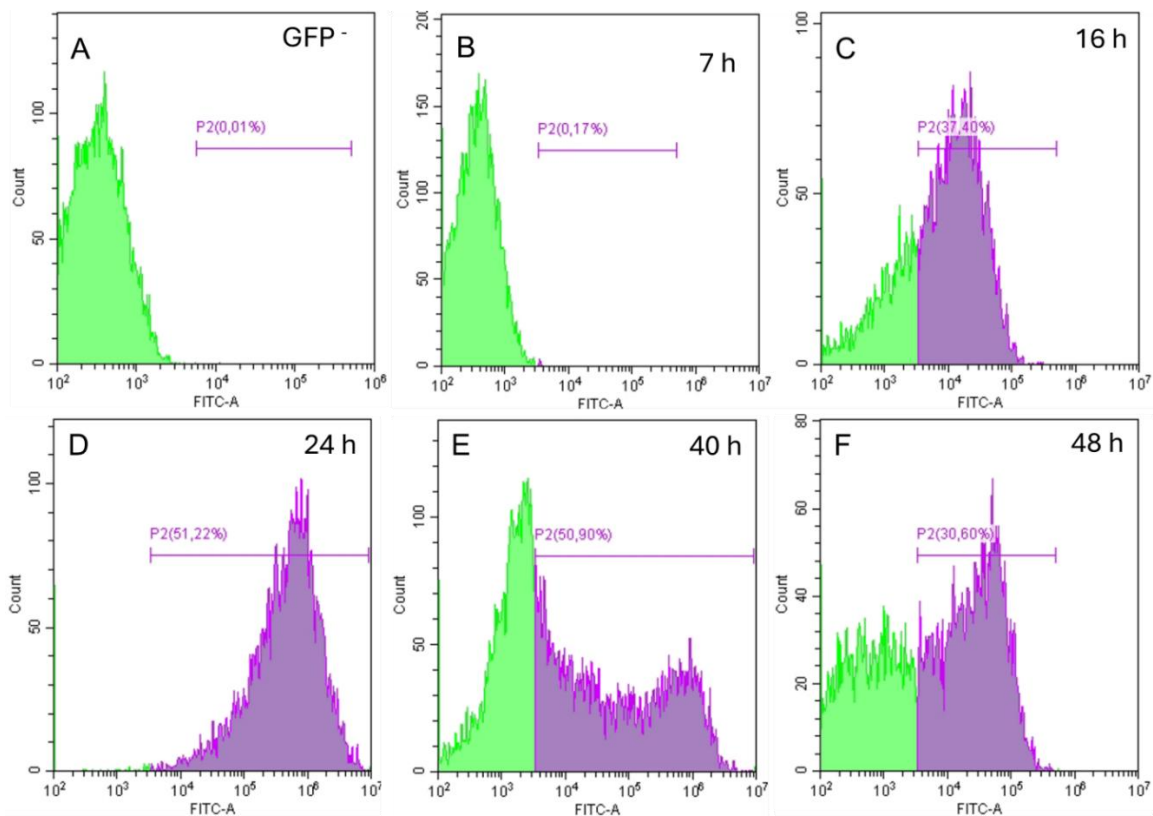


Figure.IV.28. Evolution temporelle de l'expression de *PspollE-gfpmut3* chez *B. licheniformis* pULG8 cultivé dans du milieu M1 et suivie par cytométrie en flux.

(A) Fluorescence intrinsèque de *B. licheniformis* MW3 et/ou la diffusion lumineuse due à la présence de la bactérie dans la solution à analyser. La valeur seuil est représentée par le segment de droite délimitant la population P2 (0,01 %). Les panneaux B à F représentent les analyses à 7, 16, 24, 40 et 48 h. Les Cellules bactériennes possédant une fluorescence supérieure à la valeur seuil sont en mauve (population P2) et leur pourcentage dans la population analysée est repris entre parenthèses. Pour plus de détail, voir la légende de la **Figure. IV.26**.

Pour *B. licheniformis* pULG8, les premières cellules présentant une valeur de fluorescence supérieure à la valeur seuil, sont détectées après 7 h de culture (**Figure IV.28, B** ; P2 = 0,17 %). Une augmentation marquée de l'expression est observée après 16h de culture avec P2 = 37,28 %, indiquant une expression active de *PspolIE-gfpmut3*. Après 24 h de culture toutes les bactéries sont fluorescentes (P2 = 51,22 %).

Après 40 et 48 heures, une diminution significative de la fluorescence/cellule est observée et le pourcentage de la population bactérienne qui produit de la GFPmut3 est maintenant de 30,60 %. Ce qui pourrait signifier que 69,4 % de la population est sous forme d'endospores. Une valeur différente de celle du taux de sporulation déterminé pour cette culture après 48 h est de 60 % (**Tableau IV.18**). Enfin, le maximum du rapport Fluo/A⁶⁰⁰ pour une culture de *B. licheniformis* pULG8 est obtenu après 26 h de culture.

En conclusion, ces données révèlent une cinétique d'expression dynamique de *PspolIE-gfpmut3* chez *B. licheniformis* pULG8, cultivée dans le milieu M1 : une induction lente dans les premières heures, une forte activation autour de 16 à 24 heures, suivie d'une phase plateau, puis d'un déclin à 48 heures. Ces observations soulignent l'importance de l'environnement nutritif et du temps de culture sur la stabilité et la régulation de l'expression hétérologue. Elles constituent une base précieuse pour l'optimisation des stratégies de production de protéines recombinantes chez cette espèce.

IV.2.6.3. Déconvolution temporelle de la cytométrie en flux de *B. subtilis* pULG4 et *B. licheniformis* pULG8 (milieu M1)

Les profils de fluorescence obtenus lors des expériences de cytométrie en flux de *B. subtilis* pULG4 cultivé dans du milieu M1 (**Figure IV.27**) et de *B. licheniformis* pULG8 en milieu M4 (données non-présentés) révèlent une distribution hétérogène caractéristique de la coexistence de plusieurs sous-populations de cellules produisant de la *GFPmut3*. Pour quantifier la dynamique de ces sous-populations au cours du temps, nous avons appliqué une méthode de déconvolution temporelle aux résultats obtenus lors de la cytométrie en flux. Les résultats de cette analyse sont présentés dans les **Figures IV.29. A et B**.

***B. subtilis* pULG4**

Pour *B. subtilis* pULG4 cultivé dans du milieu M1, la déconvolution montre l'existence de deux états limites ; une sous-population pour laquelle la fluorescence est inférieure au seuil de fluorescence déterminé à partir de *B. subtilis* 168 sans le plasmide pULG4, représentative du niveau basal, et (ii) une sous-population pour laquelle la fluorescence de la *GFPmut3* est maximale (la sous-population présente après 16 h de culture, **Figures IV 29.A**). Au cours du

temps, l'intensité de fluorescence liée à une cellule peut varier entre ces deux états limites mais ne donne pas la même information. Avant 16 h de culture, les faibles intensités de fluorescence indiquent le début de l'expression de *PspolIE-gfpmut3* pour atteindre son degré maximum d'expression. A partir de 24 h de culture, la décroissance de l'intensité de fluorescence liée à une cellule signifie la sortie du stade II de la sporulation pour conduire finalement à l'endospore mature qui possède une intensité de fluorescence inférieure au seuil de fluorescence. Cette constatation est confirmée par les comptages de la flore totale et du nombre d'endospores qui sont en accord avec les résultats de la déconvolution. Pour exemple le taux d'endospores après 40 et 48 h de cultures : 50 et 56 % à partir des comptages et 48,3 et 62,5 % pour la déconvolution.

B. licheniformis pULG8

Pour *B. licheniformis* pULG8 cultivé dans le milieu M1, la déconvolution temporelle des résultats obtenus par cytométrie en flux conduit à la même interprétation que celle proposée pour *B. subtilis* pULG4 : elle confirme que les endospores matures sont bien observées en fin de culture et qu'elles présentent une fluorescence intrinsèque inférieure à la valeur seuil déterminée pour *B. licheniformis* MW3 dépourvu plasmide.

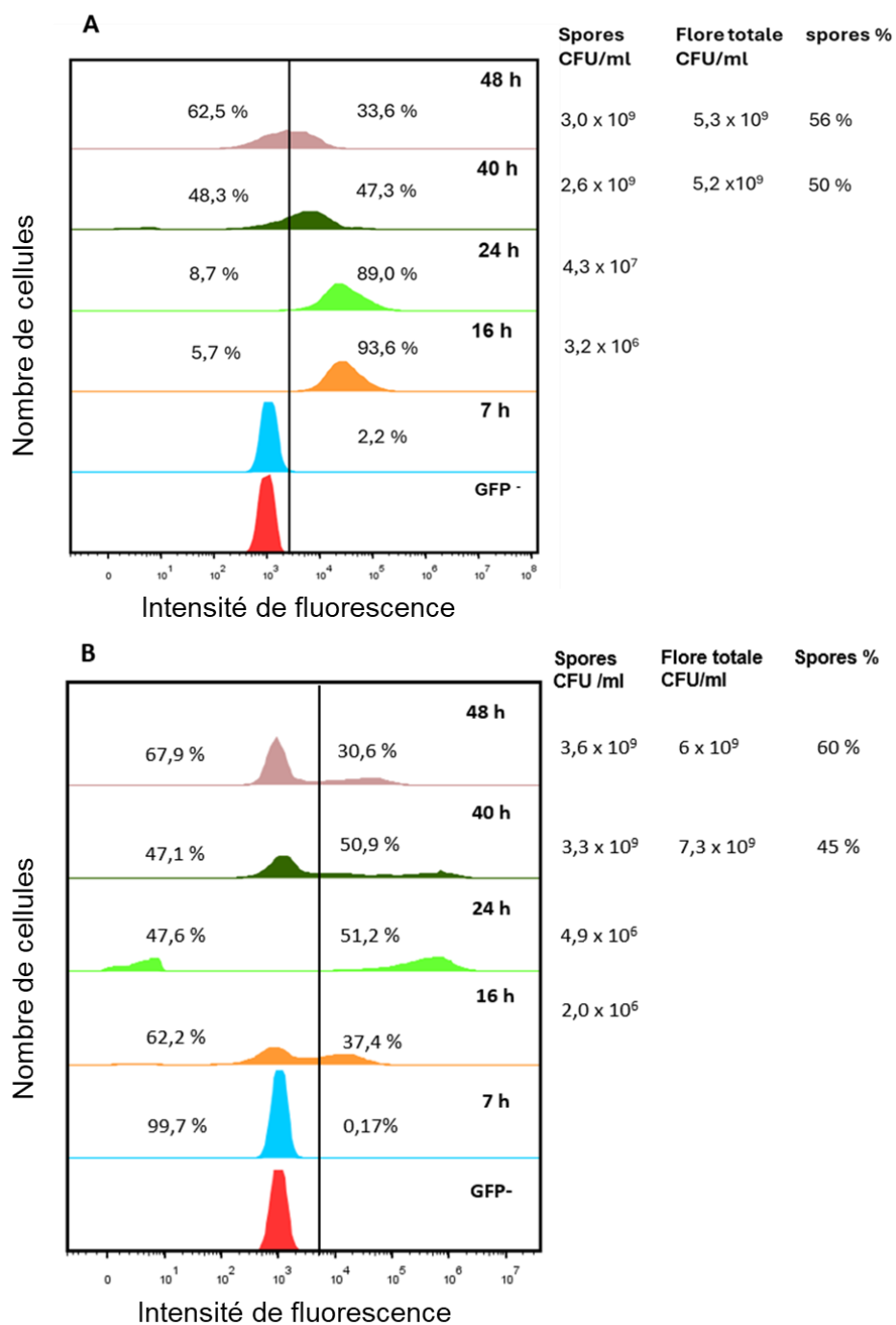


Figure IV. 29. Déconvolution temporelle de la cytométrie en flux d'une culture de *B. subtilis* pULG4 (A) et de *B. licheniformis* pULG8 (B) dans le milieu M1

Pour *B. subtilis* pULG4, la déconvolution a été obtenue à partir des résultats de cytométrie en flux présentés dans la **Figure IV.27**. Les temps d'échantillonnage, représentés par différentes couleurs, sont indiqués dans le coin supérieur gauche de chaque bandeau. Le pic unique observé pour la *B. subtilis* 168 et *B. licheniformis* MW3 sans plasmide (GFP⁻) correspond à la fluorescence intrinsèque des cellules végétatives. La ligne verticale représente la valeur seuil au-delà de laquelle les cellules expriment *PspolIE-gfpmut3*. Les

pourcentages de cellules en dessous et au-dessus du seuil de fluorescence déduits de la déconvolution sont indiqués à l'intérieur de chaque bandeau et ont été calculés en intégrant les aires sous les différents pics. Les décomptes des spores, de la Flore totale et du Taux de sporulation ont été déterminés expérimentalement et sont présentés à droite des bandeaux. Pour plus de détails voir texte.

Conclusion

L'analyse par déconvolution temporelle des analyses en flux des cultures de *B. subtilis* pULG4 et *B. licheniformis* pULG8 sont en accord avec les résultats obtenus par : (i) le suivi de la fluorescence totale de la GFPmut3 pendant la culture et du rapport Fluo/A⁶⁰⁰ (**Figures IV. 25 et 26**) et (ii) le nombre d'endospores et le taux de sporulation.

Le résultat le plus inattendu de la déconvolution est l'absence de cellules végétatives après 16 h de culture pour *B. subtilis* pULG4 et pour *B. licheniformis* pULG8 entre 24 et 32 h ou autrement dit : toutes les cellules bactériennes ont entamé le processus de sporulation. Cependant toutes n'ont pas eu le temps de former une endospore mature pendant la durée de la culture, sauf pour *B. licheniformis* pULG8 pour lequel un taux de sporulation de 60 % est observé après 48 h.

IV.2.6.4. Influence de différentes sources de carbone sur la croissance, l'expression de *PspolIE-gfpmut3* et la sporulation chez *B. subtilis* pULG4 et *B. licheniformis* pULG8

Chez les bactéries du genre *Bacillus* la croissance, la différenciation cellulaire et l'expression des gènes associés à la sporulation sont fortement conditionnées par la nature des sources de carbone disponibles dans le milieu de culture. Bien que les sucres simples tels que le glucose, le fructose ou le saccharose favorisent une croissance rapide, ils ont malgré tout, tendance à inhiber la mise en place du programme de sporulation. A l'inverse des sources de carbone plus complexe, semblent favoriser l'entrée en sporulation en limitant les effets de la réponse catabolique.

L'objectif principal de ce chapitre est d'évaluer l'effet des sources de carbone dans le milieu de culture sur la croissance bactérienne et l'expression du gène de sporulation *spolIE* chez *B. subtilis* et *B. licheniformis*. En particulier, cette étude vise à mieux comprendre comment la disponibilité de certains sucres peut moduler la régulation des gènes impliqués dans l'initiation de la sporulation.

Afin d'étudier l'impact des sucres sur la croissance cellulaire et l'expression de *spolIE*, plusieurs formulations de milieux de culture ont été testées dans des cultures en Erlenmeyer sous agitation. Deux sources de carbones ont été choisies : le glucose sucre facilement

métabolisable, et le xylose, sucre pentose connu pour activer certains promoteurs inductibles chez *Bacillus*. Les cultures ont été réalisées en présence ou en absence de ces sucres, à 37 °C, afin d'évaluer leur influence sur la physiologie bactérienne.

Pour chaque condition, la croissance cellulaire a été suivie par la mesure de l' A^{600} . Le pH du milieu de culture ainsi que la fluorescence globale de la GFPmut3 ont également été mesurés. La fluorescence moyenne par cellule (rapport Fluo/ A^{600}) a été calculée afin d'obtenir une estimation de l'expression relative. Pour une quantification plus précise de l'expression du *PspollE-gfpmut3* au niveau cellulaire, des analyses par cytométrie en flux ont été réalisées, comme décrit précédemment.

IV.2.6.5. Effet du glucose, du xylose et d'un sucre complexe sur la croissance et l'expression de *PspollE-gfpmut3* chez *B. subtilis* pULG4 et *B. licheniformis* pULG8

IV.2.6.5.1. Analyse par spectrophotométrie

La croissance de *B. subtilis* pULG4 et *B. licheniformis* pULG8 a été suivie par la mesure de l' A^{600} en fonction du temps dans le milieu M1 additionné de glucose (0,5 %, M1G) ou de xylose (0,5 %, M1X) et dans le milieu M4 contenant un sucre complexe (**Figure IV.30.A**). Au cours de la même culture, l'expression de *PspollE-gfpmut3* (Fluo) a été suivie ainsi que le calcul de la fluorescence moyenne par cellule (Fluo/ A^{600} , **Figure IV.30. B et C**).

***B. subtilis* pULG4**

L'analyse de la croissance de *B. subtilis* pULG4 dans différents milieux carbonés révèle des différences marquées en fonction du substrat disponible (**Figure VII.30.A**). Dans le milieu M1, la croissance reste modeste : l' A^{600} culmine autour de 7 avant de décroître progressivement après 30 h. Cette courbe de croissance suggère une consommation rapide des nutriments disponibles. Pour le milieu M1G, l'ajout de glucose accélère fortement la phase exponentielle, indiquant une assimilation efficace de ce monosaccharide via la glycolyse. Néanmoins, un plateau est atteint vers 30 h, avec une absorbance A^{600} stabilisée $\approx 7,6$, suggérant l'apparition d'un facteur limitant secondaire (épuisement d'azote, accumulation de métabolites inhibiteurs, ou limitation en oxygène).

La croissance dans le milieu M1 supplémenté en xylose (M1X) est plus soutenue, atteignant un pic d' $A^{600} \approx 10,2$ après 40 h de culture, ce qui témoigne d'une bonne aptitude de *B. subtilis* pULG4 à métaboliser ce pentose. Le métabolisme du xylose, bien qu'impliquant des voies secondaires comme celle des pentoses phosphates, semble ici efficacement mis en œuvre. Dans le milieu M4, contenant un sucre complexe comme source de carbone principal, *B. subtilis* pULG4 présente une croissance rapide au début de la culture, atteignant un maximum

vers 16 h ($A^{600} \approx 11,6$), suivie d'un plateau. Cette dynamique reflète probablement une capacité de cette souche à dégrader le sucre complexe via des enzymes exo-cellulaires.

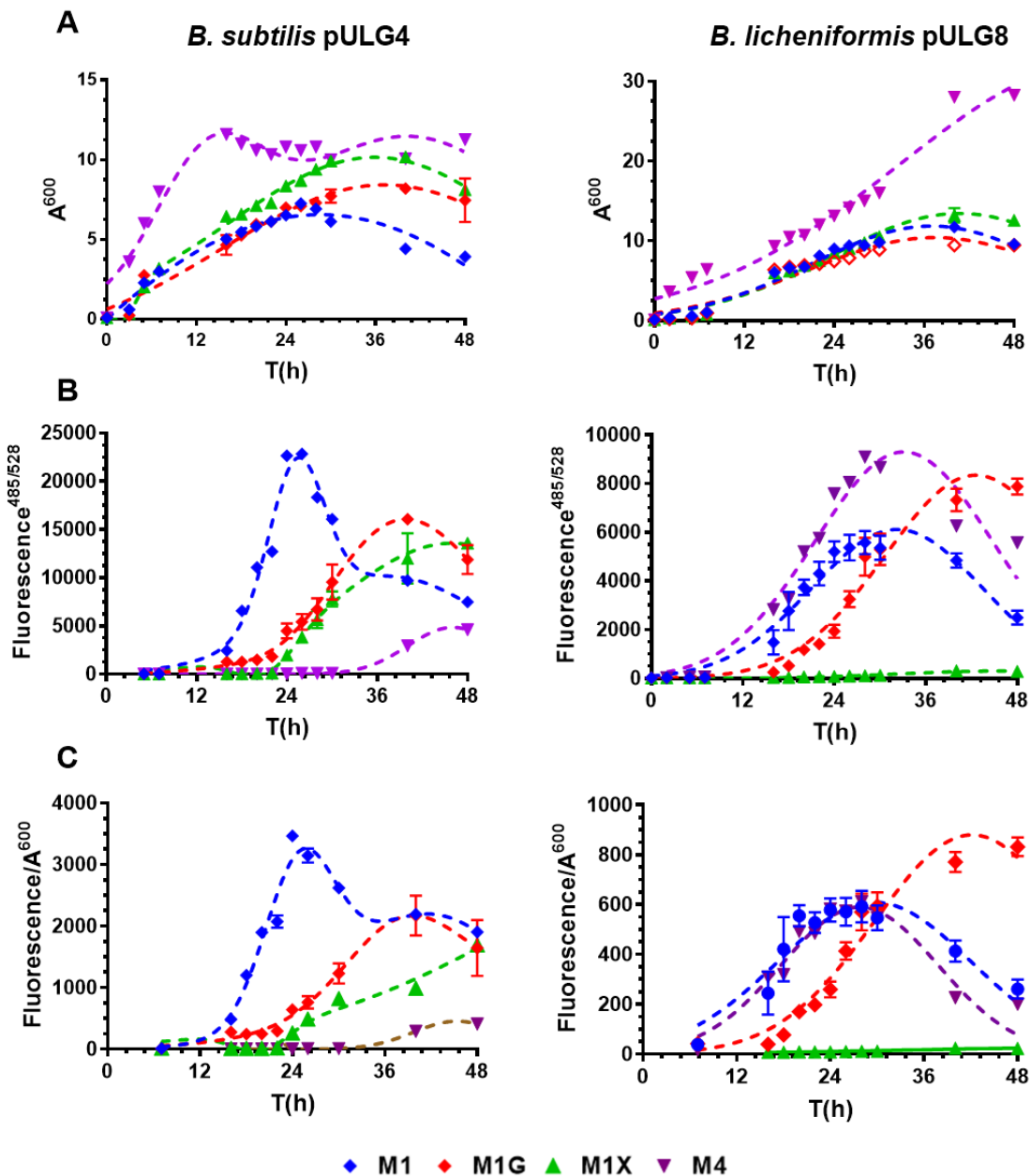


Figure IV.30 Analyse de la croissance (A) et de l'expression du gène rapporteur *PspolIE-gfpmut3* (B et C) chez *B. subtilis* pULG4 et *B. licheniformis* pULG8 cultivés dans les milieux M1, M1G, M1X et M4

M1G et M1X : milieux M1, respectivement supplémenté en glucose (0,5 %) et de xylose (0,5%). M4 : milieu industriel contenant un sucre complexe. (A) Courbes de croissance suivie par l' A^{600} . (B) Expression de *PspolIE-gfpmut3* au cours du temps suivie par la mesure de la fluorescence de la GFPmut3. (C) Fluorescence moyenne/cellule ($Fluo/A^{600}$). Les courbes représentent la moyenne et l'écart type de triplicats.

B. licheniformis pULG8

La seconde série d'expériences menée avec *B. licheniformis* pULG8 cultivée dans les milieux M1, M1G, M1X et M4 met en évidence une croissance globale plus importante que celle de *B. subtilis* pULG4 cultivée dans les mêmes milieux (**Figure IV.30.A**). Cela pourrait signifier que *B. licheniformis* pULG8 possède une physiologie mieux adaptée à l'exploitation de diverses sources de carbone.

Dans le milieu M1, *B. licheniformis* pULG8 atteint une A^{600} de 11,8 après 40 h, ce qui suggère une utilisation efficace des ressources du milieu de base. La supplémentation en glucose (M1G) améliore légèrement cette performance, avec un plateau autour de 9,4, indiquant une assimilation du sucre. La croissance dans le milieu contenant du xylose (M1X) est encore plus marquée, avec une A^{600} maximale de 13, ce qui témoigne de l'activation efficace de la voie des pentoses phosphates et des systèmes de transport spécifiques. Cette aptitude confirme l'adaptabilité métabolique de *B. licheniformis* pULG8 à métaboliser des sucres secondaires.

La croissance observée dans le milieu M4 contenant un sucre complexe comme source principale de carbone, se révèle particulièrement élevée. Après 48 heures de culture, l' A^{600} atteint 28,4, soit plus du double de celle mesurée pour *B. subtilis* pULG4 cultivé dans les mêmes conditions. Ce résultat témoigne d'une production d'enzymes exo-cellulaires par *B. licheniformis* pULG8, ce qui est cohérent avec les données de la littérature décrivant son profil enzymatique. L'hydrolyse efficace du sucre complexe par ces enzymes favorise ainsi, une croissance prolongée et soutenue, permettant à la bactérie d'atteindre une densité cellulaire élevée, y compris en phase de croissance tardive.

Conclusion

La comparaison des deux souches étudiées révèle des différences fondamentales dans leurs métabolismes des sources de carbone. *B. subtilis* pULG4 présente une croissance correcte dans des milieux contenant des sucres simples, mais montre une faible capacité à valoriser un substrat complexe. En revanche, *B. licheniformis* pULG8 affiche une supériorité nette dans tous les milieux testés, en particulier pour le milieu M4. Cette performance est cohérente avec son profil biotechnologique connu, qui inclut une forte capacité à sécréter des enzymes exo-cellulaires thermostables.

IV.2.6.5.2. Analyse par fluorimétrie

B. subtilis pULG4

L'évolution de la fluorescence de la GFPmut3 au cours du temps dans le milieu de culture M1 présente un pic maximal observé après 26 heures de culture (**Figure IV.30. B**). Ce maximum est toutefois décalé vers des temps de culture plus longs lorsque *B. subtilis* pULG4 est cultivé dans le milieu M1 supplémenté en glucose (0,5 % ; M1G) ou en xylose (0,5 % ; M1X). En effet, le maximum de fluorescence est atteint après 38 heures en milieu M1G et après 48 heures en milieu M1X. Ces observations sont corroborées par l'évolution de la fluorescence normalisée par la densité cellulaire (Fluo/A⁶⁰⁰, **Figure IV.30.C**), pour laquelle les valeurs maximales sont respectivement obtenues après 26 h (M1), 38 h (M1G) et plus de 48 h (M1X).

Dans le cas du milieu M1G, le décalage du pic de fluorescence, correspondant à un retard dans l'expression de *PspolIE-gfpmut3*, est typique du phénomène de répression catabolique induite par le glucose. Concernant le milieu M1X, le retard observé dans l'initiation de la sporulation, comparé au milieu M1, pourrait s'expliquer par la consommation simultanée du xylose et des autres sources de carbone présentes dans le milieu. La sporulation ne serait déclenchée qu'après épuisement complet des sources de carbone, ce qui retarderait l'expression de *PspolIE-gfpmut3*.

Enfin, dans le milieu M4, une expression faible du gène rapporteur est détectée après 36 heures de culture. Toutefois, comme observé précédemment, le milieu M4 inhibe la sporulation de *B. subtilis* pULG4, ce qui explique le faible niveau d'expression de *PspolIE-gfpmut3* dans ce milieu de culture.

B. licheniformis pULG4

Chez *B. licheniformis* pULG8, les profils d'expression du gène rapporteur diffèrent de ceux observés pour *B. subtilis* pULG4 (**Figure IV.30. B**). Lors de la culture en milieu M1, le maximum de fluorescence de la GFPmut3 est atteint après 28 heures de culture. L'ajout de glucose dans le milieu M1 (M1G) décale ce maximum d'expression de *PspolIE-gfpmut3* vers un temps de culture plus long, avec un pic de fluorescence mesuré à 38 heures. En revanche, en présence de xylose (M1X), la sporulation de *B. licheniformis* pULG8 est complètement inhibée pendant toute la durée de la culture étudiée. Dans le milieu M4, le maximum de fluorescence de la GFPmut3 est atteint après 38 heures de culture, identique à celui observé en milieu M1.

Ces observations sont confirmées par l'évolution du rapport Fluo/A⁶⁰⁰ (**Figure IV.30. C**), qui reflète les mêmes tendances. Comme pour *B. subtilis* pULG4, le décalage du pic de fluorescence observé lorsque *B. licheniformis* est cultivé en milieu M1G est très probablement attribuable au phénomène de répression catabolique induite par le glucose.

Suivi chez *B. subtilis* pULG4 et *B. licheniformis* pULG8 de la concentration en glucose et de l'expression de *PspolIE-gfpmut3* dans le milieu M1G.

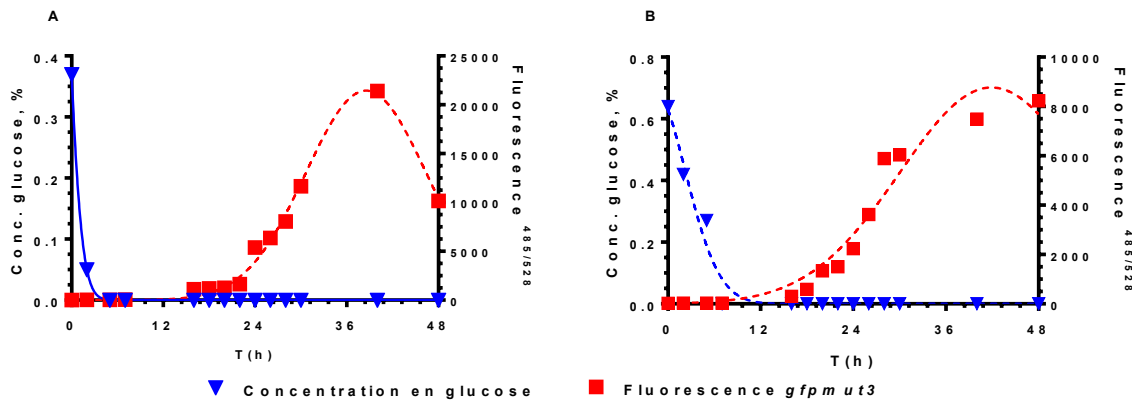


Figure IV.31. Suivi de la concentration en glucose et de la fluorescence de la GFPmut3 au cours de croissance de *B. subtilis* pULG4 (A) et *B. licheniformis* pULG8 (B) cultivés dans du milieu M1G

Afin de mettre en évidence la relation entre la répression catabolique par le glucose et l'initiation de la sporulation, l'évolution de la concentration en glucose et la fluorescence de la GFPmut3 ont été suivies simultanément au cours du temps, dans les mêmes cultures de *B. subtilis* pULG4 et *B. licheniformis* pULG8 cultivées dans le milieu M1G. La quantification du glucose a été réalisée par HPLC à l'aide d'une colonne IC Sep ICE-ION 300 (voir **Section III.6** du Matériel et Méthodes).

Les résultats obtenus montrent que, pour les deux souches, l'initiation de l'expression du gène rapporteur *PspolIE-gfpmut3* coïncide avec l'épuisement du glucose présent dans le milieu M1G. Toutefois, un délai est observé entre la fin de la consommation du glucose et l'apparition de la fluorescence de la GFPmut3. Ce décalage temporel est vraisemblablement dû à l'utilisation des nutriments non glucidiques, tels que les peptides issus de la peptone et de la tryptone composant le milieu M1, avant qu'une carence nutritive globale ne soit perçue par la cellule et que le processus de sporulation ne s'amorce. Ainsi, il existe une corrélation inverse entre la consommation de glucose et l'activation des gènes de la sporulation.

En conclusion, l'ajout de glucose au milieu M1 permet d'augmenter la densité cellulaire avant le déclenchement de la sporulation et d'en moduler le moment d'initiation en fonction de sa concentration. Ces observations, combinées à nos résultats précédents montrant qu'un taux de sporulation maximal est atteint 48 heures après le pic d'expression de *PspolIE-gfpmut3*, soulignent l'intérêt d'ajuster la disponibilité en glucose pour contrôler finement la dynamique de la sporulation.

IV.2.6.5.3. Evolution du pH chez *B. subtilis* pULG4 et *B. licheniformis* pULG8 cultivés dans les milieux M1, M1G, M1X et M4

L'évolution du pH lors de la croissance de bactéries telles que *B. subtilis* et *B. licheniformis* constitue un indicateur du métabolisme cellulaire. Elle permet d'apprécier les processus de fermentation, la consommation des nutriments, ainsi que la nature des métabolites excrétés. Dans cette étude, nous avons comparé l'évolution du pH dans les milieux M1, M1G, M1X et M4 au cours de la croissance de ces deux souches en Erlenmeyer (volume de culture : 50 ml, T= 37 °C) pendant 48 h (**Figure IV. 32**) et tenté de corréler l'évolution du pH avec l'expression de *PspolIE-gfpmut3*.

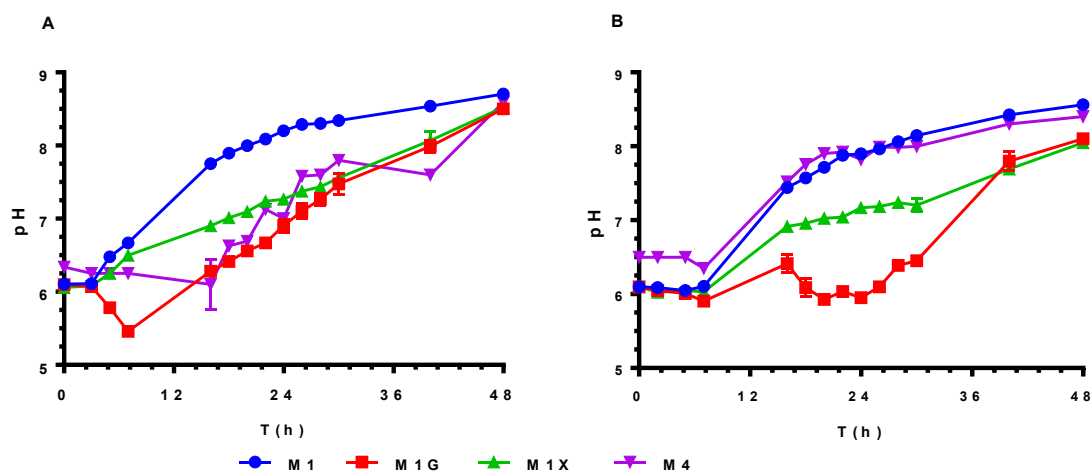


Figure IV.32. Evolution du pH au cours du temps chez *B. subtilis* pULG4 (A) et *B. licheniformis* pULG8 (B) dans les milieux de culture M1, M1G, M1X et M4

Évolution du pH chez *B. subtilis* pULG4

Dans les milieux M1, M1G, M1X et M4, le pH initial est de 6,1 et reste stable durant les 5 à 7 premières heures de culture. Au-delà de cette phase, le milieu M1G se distingue des autres. Dans les milieux M1, M1X et M4, le pH augmente progressivement après ces 7 heures pour atteindre un plateau à pH 8,5 entre 40 et 48 heures de culture.

En revanche, dans le milieu M1G, après une phase initiale de stabilité de 5 heures, le pH diminue jusqu'à 5,4. Cette acidification résulte probablement de la métabolisation du glucose, qui conduit à la production et à l'excrétion d'acides organiques dans le milieu. Une fois le glucose consommé, le pH remonte graduellement pour atteindre lui aussi 8,5. Cette alcalinisation tardive, observée dans tous les milieux testés, est vraisemblablement liée à la dégradation des acides aminés présents dans la peptone et la tryptone, entraînant la libération d'ammoniaque.

Évolution du pH chez *B. licheniformis* pULG8

Chez *B. licheniformis* pULG8, l'évolution du pH dans les quatre milieux suit une dynamique très similaire à celle de *B. subtilis* pULG4, à quelques variations près. Notamment, dans le milieu M1G, la baisse de pH est moins prononcée, atteignant 5,9 contre 5,4 pour *B. subtilis* pULG4.

Expression de *PspolIE-gfpmut3* et évolution du pH dans le milieu M1

Afin d'explorer un lien potentiel entre l'évolution du pH et l'initiation de l'expression du gène rapporteur *PspolIE-gfpmut3*, nous avons mesuré la fluorescence de la GFPmut3 en parallèle du suivi du pH dans le milieu M1, pour *B. subtilis* pULG4 et *B. licheniformis* pULG8. Les résultats (**Figure IV.33**) révèlent des comportements similaires pour les deux souches. Tant que le pH demeure constant à 6,1, aucune fluorescence GFPmut3 n'est détectée.

L'apparition de la fluorescence coïncide avec l'alcalinisation du milieu. Son intensité augmente ensuite progressivement, atteint un maximum avant de décroître et de revenir à son niveau basal lorsque le pH atteint son plateau à 8,5.

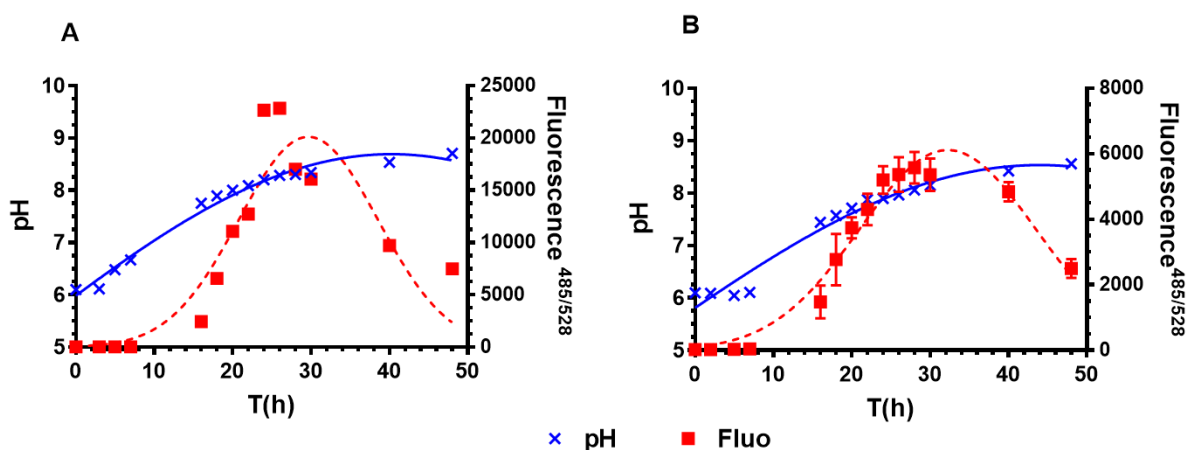


Figure IV.33. Evolution du pH et de la fluorescence de la GFPmut3 au cours de la croissance de *B. subtilis* pULG4 (A) et *B. licheniformis* pULG8 (B) dans le milieu M1

Les courbes représentent la moyenne et l'écart type de triplicats.

Il est important de noter qu'à pH 7 - 7,5, la fluorescence atteint environ 50 % de son intensité maximale, ce qui suggère que cette plage de pH pourrait caractériser l'engagement de la sporulation (phase II). La fin de cette phase serait atteinte lorsque le pH se stabilise au plateau de 8,5.

Dans le milieu M1G, pour *B. subtilis* pULG4 (**Figure IV.32. A**), le pH atteint la valeur de 7 après 20 heures de culture, contre seulement 10 heures pour le milieu M1 (même **Figure IV.32. A**). Ce décalage temporel est du même ordre que celui observé précédemment et confirme le retard introduit par la présence de glucose (**Figure IV. 30** bandeaux **B et C**).

Les résultats obtenus ont mis en évidence que, pour les milieux M1, M1G, M1X et M4 une valeur seuil de pH 7-7,5 pourrait être la signature de l'entrée au stade II de la sporulation pour les deux souches étudiées. Il est aussi raisonnable de penser que l'augmentation du pH n'est pas le déclencheur de la sporulation, mais un effet secondaire du métabolisme cellulaire. Cette argumentation est confortée par le fait que pour *B. subtilis* pULG4 cultivé dans le milieu M4, malgré une excellente croissance et une augmentation du pH à 8,5, la bactérie ne sporule pas ou très faiblement. Le même commentaire peut être fait pour *B. licheniformis* pULG8 cultivé dans le milieu M1X dans lequel la souche ne sporule pas malgré l'augmentation du pH.

Pour une application industrielle, la mesure du pH est aisée. Cependant, dans les procédés de fermentation industriels, les paramètres physicochimiques, dont le pH, sont régulés et maintenus à des valeurs de consigne. Si c'est le cas, le monitoring du flux d'ajustement du pH (acide/base) serait une stratégie pour suivre l'évolution du pH dans le fermenteur et de repérer quand le métabolisme de la bactérie est modifié. Enfin, il serait utile de corrélérer cette méthode indirecte avec une méthode directe sur quelques expériences pilotes pour valider la correspondance du monitoring du flux et de la sporulation.

IV.2.6.5.4. Analyse en cytométrie de flux

L'effet du glucose (0,5 % final) sur l'initiation de la sporulation chez *B. subtilis* pULG4 et *B. licheniformis* pULG8 a été évalué par cytométrie en flux pour des cultures en milieu M1G, aux temps 7, 16 et 24 h. En parallèle, la même analyse a été effectuée en milieux M1 (contrôle) et M4 (comparaison) (**Figures IV.34 et IV.35**).

***B. subtilis* pULG4**

Après 7 h de culture, dans les milieux M1 et M1G, presque toutes les bactéries analysées présentent une fluorescence par cellule inférieure à la valeur seuil (fluorescence maximale par cellule) obtenue pour une culture de *B. subtilis* sans plasmide. À ce stade, la population bactérienne n'exprime donc *PspoIIE-gfpmut3* et n'a pas initié la sporulation (P2,

correspondant à la population en cours de sporulation, $\approx 2\%$, **Figures IV.34 : A et D**). Après 16 h, 93 % de la population cultivée en milieu M1 exprime *PspoIIE-gfpmut3* et a initié la sporulation, contre seulement 50,38 % en milieu M1G. La même tendance se maintient à 24 h (**Figures IV.34 : B, C, E et F**).

En milieu M4, la production de GFPmut3 reste très faible ($P2 < 2\%$) pour tous les temps de culture analysés (**Figures IV.34 G à I**).

Ces résultats confirment les observations précédentes obtenues par fluorimétrie et par dénombrement des endospores (**Figure IV.30 et Tableau IV.22**) : l'ajout de glucose au milieu M1 retarde l'initiation de la sporulation chez *B. subtilis* pULG4. Les résultats en milieu M4 sont également cohérents avec les données précédentes (**Figure IV.30**) : malgré une croissance optimale, *B. subtilis* pULG4 ne sporule pas dans ce milieu. La nature de cette inhibition reste inconnue et mériterait d'être élucidée.

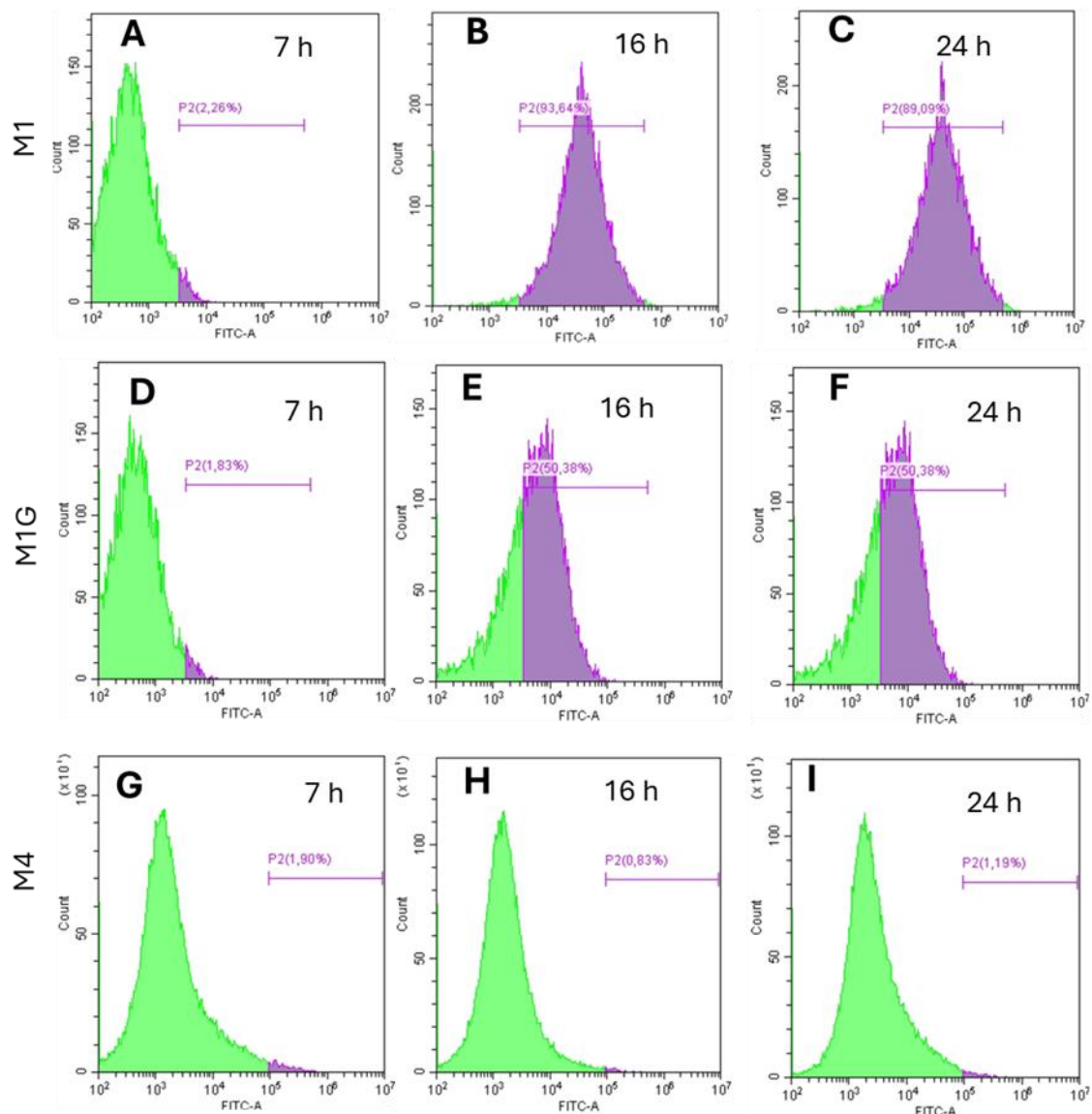


Figure IV.34. Analyse par cytométrie en flux des cultures de *B. subtilis* pULG4 dans les milieux M1, M1G et M4 aux temps 7 h (A, D et G), 16 h (B, E et H) et 24 h (C, F, et I)

La fraction de la population bactérienne présentant une fluorescence/cellule supérieure à celle observée chez *B. subtilis* sans plasmide (Population P2, correspondant aux bactéries en cours de sporulation) est indiquée en mauve. Les pourcentages de cellules exprimant GFP-mut3 au-delà du seuil sont précisés sur chaque histogramme. Chaque distribution est obtenue à partir de l'analyse de 10 000 événements. Pour plus de détails, se reporter au texte et à la section *Matériel et Méthodes*.

***B. licheniformis* pULG8**

Contrairement à *B. subtilis* pULG4, l'analyse des résultats obtenus pour *B. licheniformis* pULG8 se révèle plus complexe. En effet, en fonction du temps de culture et de la nature du milieu, au moins trois types de populations pourraient coexister. On observe une population P1 correspondant aux cellules végétatives, une population P2 qui regroupe les cellules engagées dans la sporulation et produisant la GFP-gfpmut3 et une population P0 présentant une fluorescence par particule plus faible que la fluorescence par cellule observée chez les cellules végétatives (cas spécifique de *B. licheniformis* pULG8). La coexistence de ces trois populations pourrait expliquer le pourcentage de 51,22 % observé pour la population P2 après 24 h de culture, et ce, malgré la présence d'un seul pic sur le graphe et l'absence de cellules végétatives (P1 = 0 %) (**Figure IV.35, C**). Pour cette raison, notre analyse sera qualitative et se limitera aux deux premiers points de mesure (7 h et 16 h) pour lesquels la population P0 semble plus faible. La nature exacte des particules composant la population P0 reste inconnue ; il pourrait s'agir de débris cellulaires ou d'endospores libérées dans le milieu, contrairement à celles de *B. subtilis* pULG4 qui demeureraient à l'intérieur des « fantômes » de cellules mortes.

Pour *B. licheniformis* pULG8 cultivée dans les milieux M1, M1G et M4, après 7 h de culture, la population est majoritairement en phase végétative et n'exprime pas le gène *PspoIIIE-gfpmut3* (P2 \approx 0,1 %). Après 16 h d'incubation, 37,4 % des bactéries cultivées dans le milieu M1 sont entrées en sporulation, contre 29,69 % pour celles du milieu M1G et 43,34 % pour celles du milieu M4 (**Figure IV.35**). Ces résultats sont cohérents avec les données de fluorimétrie, qui montrent que l'addition de glucose au milieu M1 retarde la sporulation (**Figure IV. 31**).

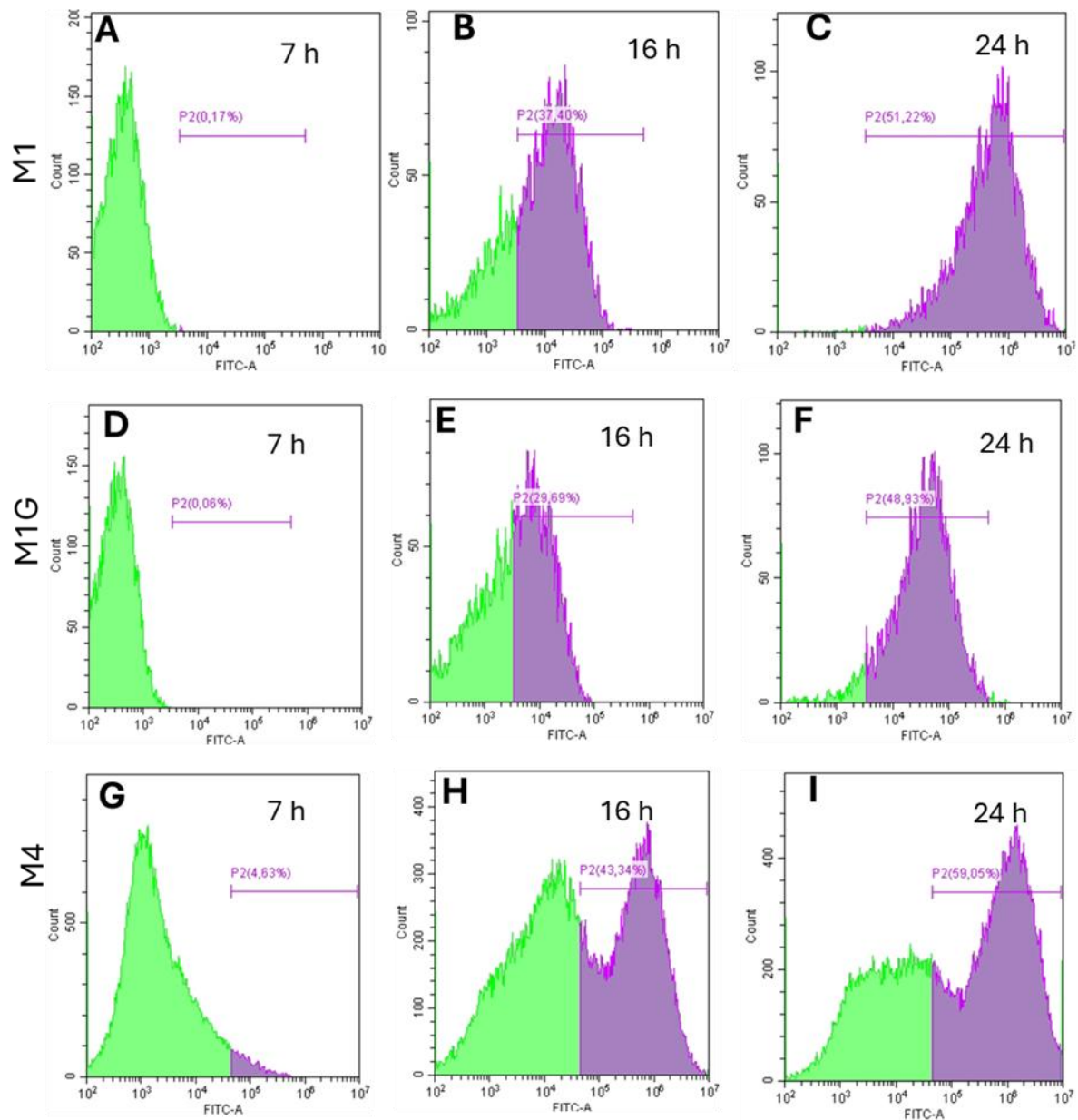


Figure IV.35. Analyse par cytométrie en flux des cultures de *B. licheniformis* pULG8 dans les milieux M1, M1G et M4 aux temps 7 h (A, D et G), 16 h (B, E et H) et 24 h (C, F, et I)

La fraction de la population bactérienne présentant une fluorescence/cellule supérieure à celle observée chez *B. licheniformis* sans plasmide (Population P2, correspondant aux bactéries en cours de sporulation) est indiquée en mauve. Les pourcentages de cellules exprimant GFP-mut3 au-delà du seuil sont précisés sur chaque histogramme. Chaque distribution est obtenue à partir de l'analyse de 10 000 événements. Pour plus de détails, se reporter au texte et à la section *Matériel et Méthodes*.

IV.2.7. Etude de la sporulation dans différents milieux de cultures

L'étude de la sporulation des souches recombinantes *B. subtilis* pULG4 et *B. licheniformis* pULG8 dans divers milieux de culture a permis de mettre en évidence l'impact significatif des conditions environnementales sur l'initiation et la cinétique du processus de sporulation.

Les Figures IV.36 et IV. 37 reprend l'évolution du nombre d'endospores chez *B. subtilis* pULG4 et *B. licheniformis* pULG8 à partir de 16 à 48 h de cultures en erlenmeyer (50 ml) et pour les milieux M1, M2, SSM et M4 ainsi que les milieux supplémentés en glucose ou en xylose (M1G, M1X, M2G, M2X, SSMG et SSMX). Le temps de génération et les paramètres après 48 de culture : l'A⁶⁰⁰, la flore totale, le nombre d'endospores et le taux de sporulation (T%) sont repris dans le **Tableau IV.22**. De manière générale, ces résultats sont en accord avec les résultats obtenus dans les chapitres précédents. Les observations générales déduites de ces deux tableaux sont reprises, ci-dessous et séparément pour chaque souche.

B. subtilis pULG4

A l'exception du milieu SSM, tous les neuf autres milieux testés produisent à 48 h une flore totale > 1 x 10⁹ CFU/ml. Les T % à 48 h, supérieurs à 50 % sont obtenus lorsque *B. subtilis* pULG4 est cultivé dans les milieux M1 (56,6 %), M2 (87,5 %), SSM (83 %) et SSMX (85%). Cependant de ces 4 milieux, celui qui génère le plus d'endospores/ml est le milieu M1 (3 x 10⁹ CFU/ml) et le moins le milieu SSM avec 2,6 x 10⁸ CFU/ml. Ainsi si la culture dans le milieu M1 était prolongée, le T % serait probablement plus élevé et le rendement en endospores maximum.

L'ajout de glucose (0,5 % final), entraîne une augmentation de la flore totale pour tous les milieux de culture et abaisse le T % et, comme discuté précédemment, déplace le pic d'expression de *PspoIIE-gfpmut3* et retarde la mise en place de la sporulation.

En ce qui concerne l'ajout de xylose (0,5 % final) il entraîne une augmentation de la flore totale dans les trois milieux testés mais diminue le T % de 14 fois pour le milieu M1X et 35 fois pour le milieu M2X : comme si l'ajout de xylose inhibait la sporulation. Au contraire, pour le milieu SSMX, le T % est de 85 % et le nombre d'endospores est de 2 x 10⁹ CFU/ml : 10 fois le nombre obtenu pour le milieu SSM.

Pour le milieu M4, de manière inattendue et comme observé précédemment, la culture dans ce milieu inhibe l'initiation de la sporulation chez *B. subtilis* pULG4. La nature de cette inhibition reste inconnue.

A partir des résultats obtenus, la sélection des meilleurs milieux pour produire le maximum d'endospores avec un T % \approx 90 % et un temps de culture de 48 ou 72 h sont repris dans le **Tableau IV. 20.**

Tableau IV.20 Sélection des meilleurs milieux de culture pour la production d'endospores chez *B. subtilis* PULG4

<i>B. subtilis</i> pULG4			
Milieu	Temps de culture	T% (48 h)	Flore totale (48h, CFU/ml)
M2	48 h	87,5 %	2×10^9
SSMX	48 h	85 %	2×10^9
M1*	48 h	56,6 %	$5,3 \times 10^9$

* Un T% proche de 90% devrait être atteint si le temps de culture est prolongé jusqu'à 72 h.

***B. licheniformis* pULG8**

A l'exception du milieu SSMX, les neuf autres milieux testés produisent à 48 h une Flore totale $> 1 \times 10^9$ CFU/ml. Les T% à 48 h supérieurs à 50 % sont obtenus lorsque les cultures qui ont été réalisées dans les milieux : M1 (60 %), M2 (66,6 %), SSM (83 %) et M4 (92 %). Parmi ces quatre cultures, celle qui contient le nombre le plus élevé d'endospores/ml est celle réalisée dans le milieu M4 ($4,6 \times 10^9$ CFU/ml).

L'addition de glucose ou de xylose (0,5 % final) dans les milieux M1 et M2 entraîne une diminution de la flore totale de *B. licheniformis* pULG8 après 48 h de culture tandis qu'elle l'augmente pour les milieux SSMG et SSMX. Ce comportement différencié en fonction des milieux reste inexplicé. L'examen des T % en présence de glucose ou de xylose est diminué pour tous les milieux et plus drastiquement lorsque le xylose est ajouté (par exemple pour SSM) l'ajout de xylose fait passer T % de 83 à 10,9 %).

Contrairement à ce qui est observé chez *B. subtilis* pULG4, le milieu M4 favorise, à la fois pour *B. licheniformis* pULG8, la flore totale (5×10^9 CFU/ml) et T % (92 %). Le facteur expliquant cette observation reste inconnu.

A partir des résultats obtenus, la sélection des meilleurs milieux pour produire le maximum d'endospores avec un T% \approx 90 % et un temps de culture de 48 ou 72 h sont repris dans le **Tableau IV. 21.**

Tableau IV.21 Sélection des meilleurs milieux de culture pour la production d'endospores chez *B. licheniformis* PULG8

<i>B. licheniformis</i> pULG8			
Milieu	Temps de culture	T% (48 h)	Flore totale (48h, CFU/ml)
M4	48 h	92 %	5 x 10 ⁹
SSM	48 h	83 %	1,8 x 10 ⁹
M1*	72 h	60 %	6,9 x 10 ⁹
M2*	72 h	66,6 %	3 x 10 ⁹

* Un T% proche de 90 % devrait être atteint si le temps de culture est prolongé jusqu'à 72 h.

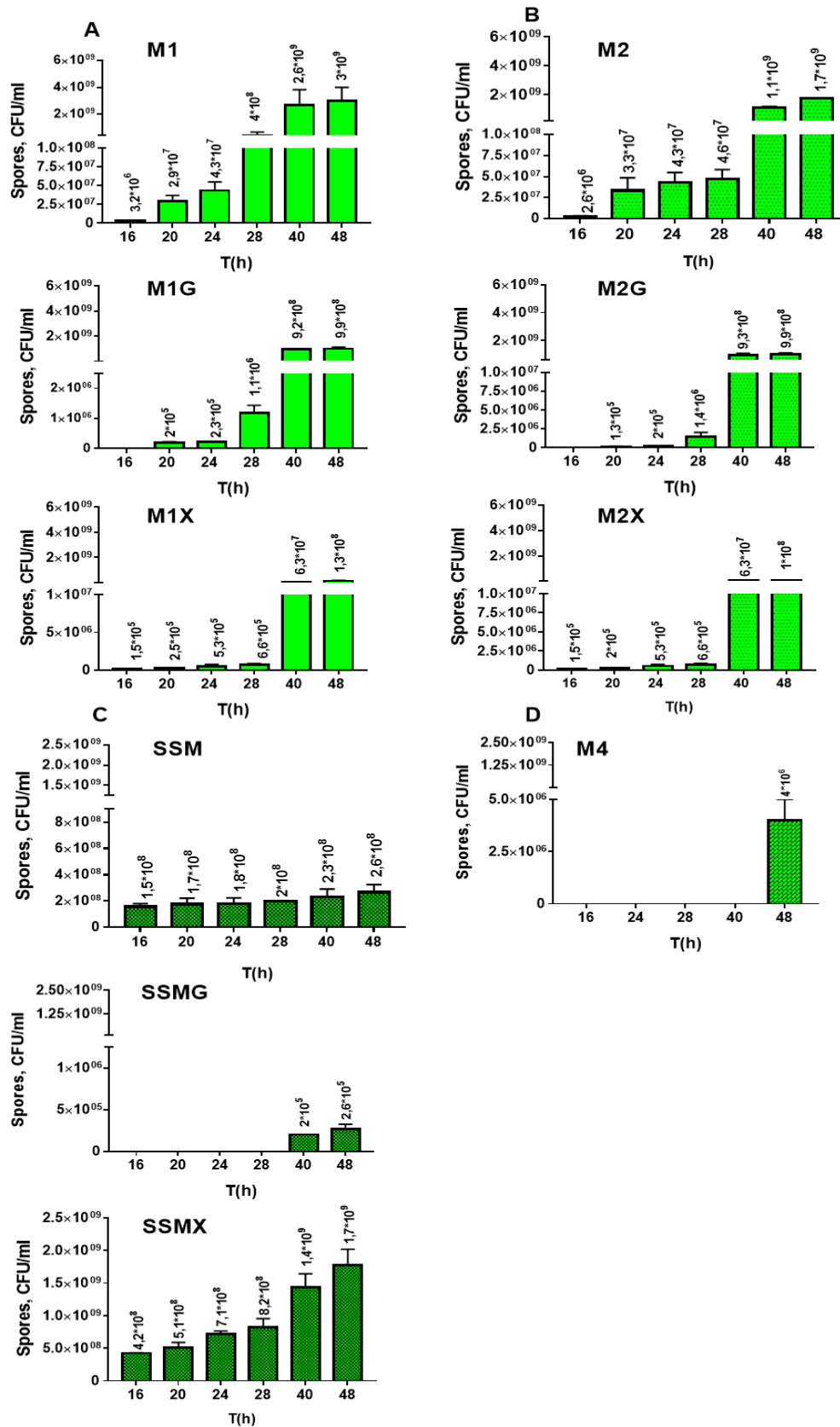


Figure IV.36 Évolution du nombre de spores au cours du temps pour *B. subtilis* pULG4 cultivés dans les milieux (A) M1, (B) M2 et (C) SSM, supplémentés ou non en glucose ou xylose, ainsi que dans le milieu M4 (D) contenant un sucre complexe

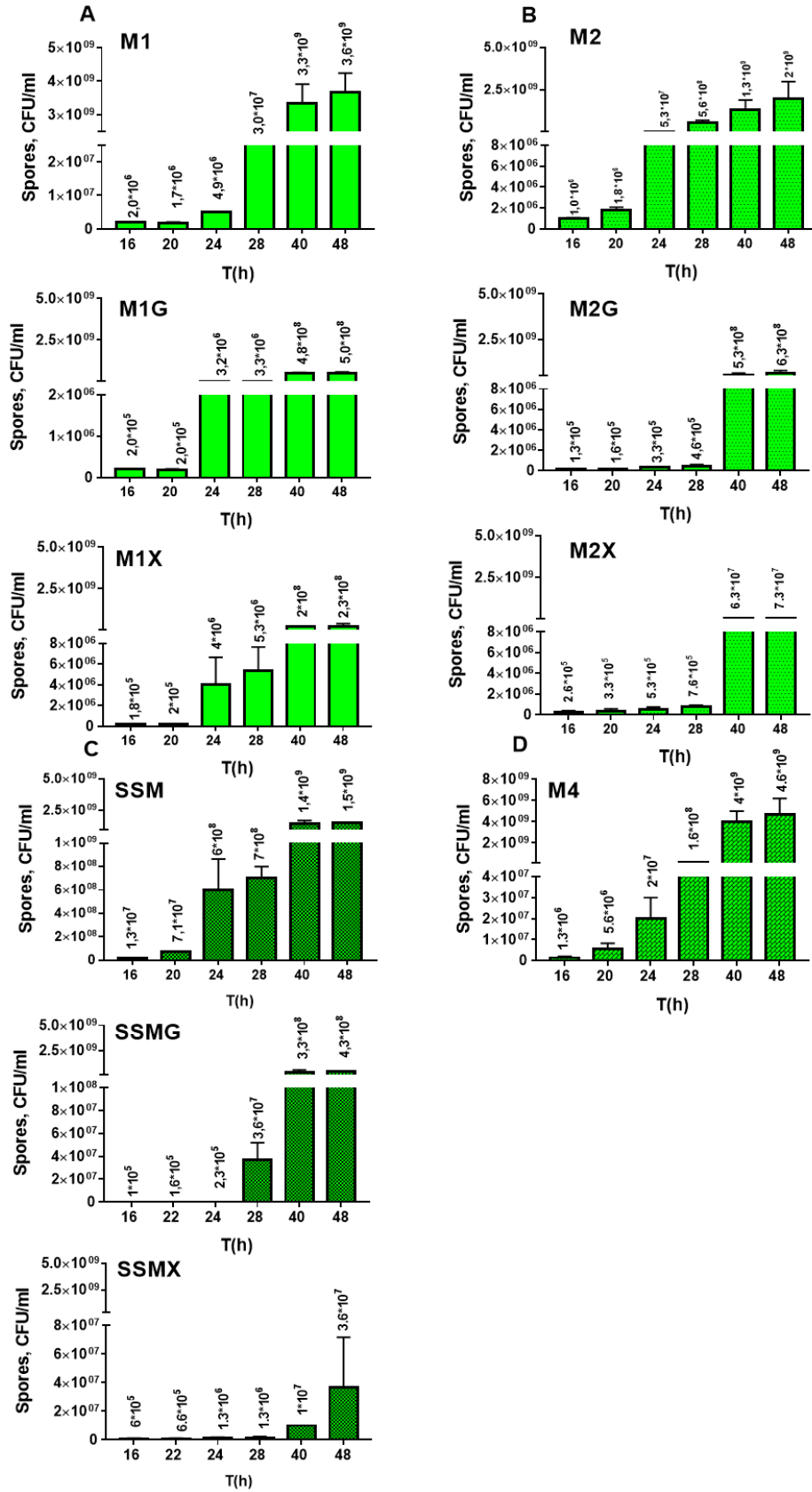


Figure IV.37. Évolution du nombre de spores au cours du temps pour *B. licheniformis* pULG8 cultivés dans les milieux M1 (A), M2 (B) et SSM (C), supplémentés ou non en glucose ou xylose, ainsi que dans le milieu M4 (D) contenant un sucre complexe

Tableau IV.22 Synthèse des caractéristiques de croissance (temps de génération) et de sporulation après 48 h de culture dans les différents milieux testés (flore totale, spores totales et taux de sporulation)

<i>B. subtilis</i> pULG4					
Milieu de culture	Temps de génération	A ⁶⁰⁰ à 48h	Flore totale CFU/ml	Spores CFU/ml	Taux de sporulation %
M1	2,2 h	3,9	5,3 x 10 ⁹	3,0 x 10 ⁹	56,6
M1G	1,8 h	7,4	7,3 x 10 ⁹	9,9 x 10 ⁸	13,5
M1X	1,8 h	8,13	3,3 x 10 ⁹	1,3 x 10 ⁸	3,9
M2	3 h	7,4	2,0 x 10 ⁹	1,7 x 10 ⁹	87,5
M2G	3,5 h	11,8	4,6 x 10 ⁹	1,0 x 10 ⁹	21,7
M2X	3 h	7,13	4,0 x 10 ⁹	1,0 x 10 ⁸	2,5
SSM	2,8 h	8,1	2,6 x 10 ⁸	2,6 x 10 ⁸	83
SMMG	1,3 h	2,2	1,7 x 10 ⁹	2,6 x 10 ⁸	15,3
SSMX	2 h	13,2	2,0 x 10 ⁹	1,7 x 10 ⁹	85
M4	3 h	11,2	4,3 x 10 ⁹	4 x 10 ⁶	0,1
<i>B. licheniformis</i> pULG8					
	Temps de génération	A ⁶⁰⁰ à 48 h	Flore totale CFU/ml	Spores CFU/ml	Taux de sporulation %
M1	2,6 h	9,6	6,9 x 10 ⁹	3,6 x 10 ⁹	60
M1G	1,6 h	9,47	1,5 x 10 ⁹	5,0 x 10 ⁸	33
M1X	3 h	12,6	1,5 x 10 ⁹	2,3 x 10 ⁸	15
M2	3 h	13,6	3,0 x 10 ⁹	2,0 x 10 ⁹	66,6
M2G	3 h	20,3	1,5 x 10 ⁹	6,3 x 10 ⁸	42
M2X	3 h	18,13	1,5 x 10 ⁹	7,3 x 10 ⁸	4,9
SSM	1,5 h	7,13	1,8 x 10 ⁹	1,5 x 10 ⁹	83
SMMG	1,3 h	10,8	2,3 x 10 ⁹	4,3 x 10 ⁸	18,6
SSMX	2,5 h	9,8	3,3 x 10 ⁸	3,6 x 10 ⁷	10,9
M4	3,2 h	28,2	5,0 x 10 ⁹	4,6 x 10 ⁹	92

IV.3. Mise à l'échelle du laboratoire en fermenteur 20 l

Afin de mieux caractériser la dynamique de sporulation dans des conditions représentatives d'un procédé industriel, les souches *B. subtilis* pULG4 et *B. licheniformis* pULG8 ont été cultivées dans un fermenteur de 20 litres dans les milieux M1 et M4. Cette montée en échelle visait à valider la reproductibilité des cinétiques observées à l'échelle du laboratoire, tout en permettant un suivi plus précis de la physiologie cellulaire et du rendement de sporulation dans des conditions contrôlées.

IV.3.1. Conditions expérimentales

Le dispositif utilisé était un fermenteur Biostat® B (Sartorius) d'un volume total de 20 l, avec un volume de travail de 10 l. L'inoculum a été préparé à partir d'une préculture en Erlenmeyer (500 ml) cultivée pendant 16 à 18 heures à 37 °C sous agitation (180 rpm).

Les cultures ont été conduites à 37 °C avec un pH maintenu à $7,0 \pm 0,1$ par une régulation automatique (KOH 12,5 % ou H₃PO₄ 1 M). L'aération a été assurée à 1 vvm avec régulation du taux d'oxygène dissous (DO) via une cascade de contrôle combinant l'augmentation du débit de l'air, enrichissement en O₂ et ajustement de l'agitation (300–400 rpm). Une attention particulière a été portée à la prévention de la formation de mousse, en particulier chez *B. licheniformis* pULG8, par adjonction contrôlée d'un agent antimousse compatible.

Des échantillons ont été prélevés toutes les 2 à 3 heures afin de suivre la croissance A^{600} et le dénombrement d'endospores.

Les échantillons destinés aux mesures de l' A^{600} , ont été dilués dans l'eau distillée pour obtenir une $A^{600} < 1$, et ceux destinés aux mesures de la fluorescence ($A^{exc}485/A^{emi}528$), ont été centrifugés (5 min, 5000 g) le culot a été suspendu dans 200 µl du glycérol 10 % et congelés à -20 °C pour préserver la fluorescence de la GFPmut3 en attendant la fin de la culture.

IV.3.2. Fermentation de *B. subtilis* pULG4

Les cultures ont été conduites dans deux fermenteurs indépendants et durant des temps différents et dans les mêmes conditions. La température a été maintenue à 37 °C de 0 à 48 h. Les échantillons ont été collectés toutes les heures tout au long de la culture pour mesurer l' A^{600} , la fluorescence ($A^{exc}485/A^{emi}528$), le comptage des spores et de la flore totale.

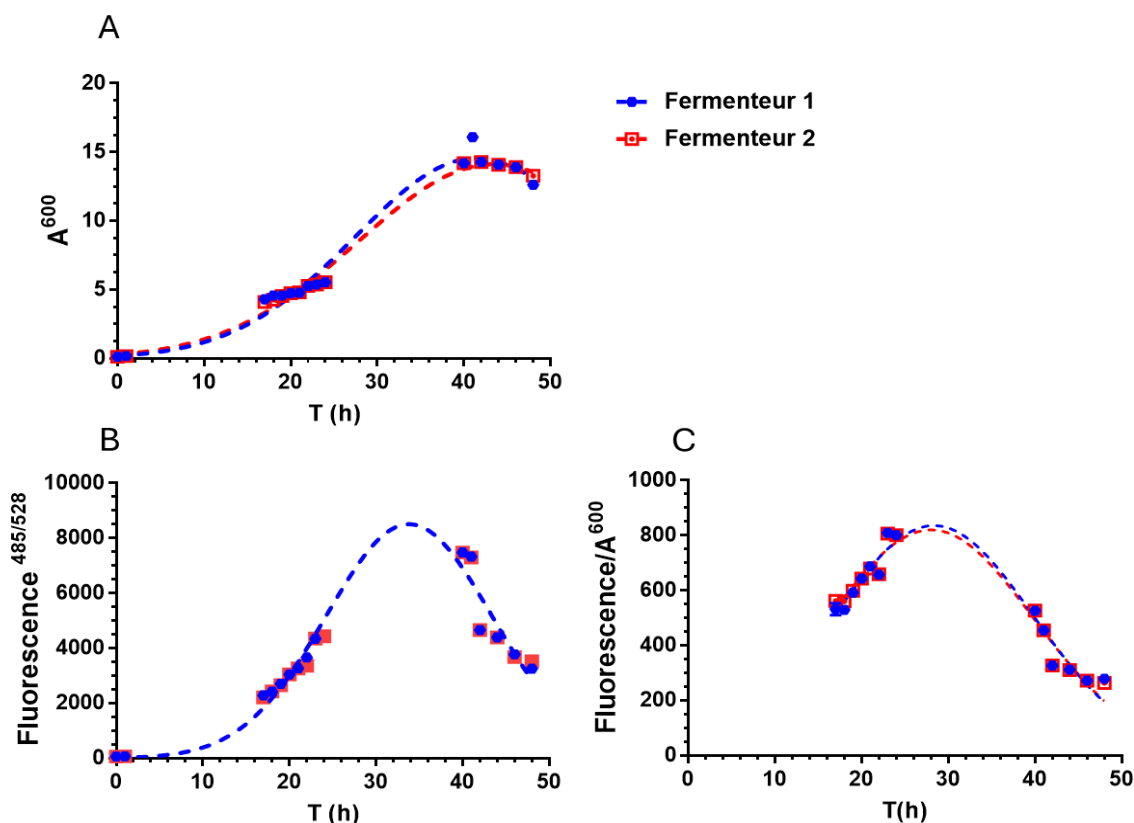


Figure IV.38. Dynamique de la croissance, de l'expression de *PspolIE-gfpmut3* et de la fluorescence/cellule chez *B. subtilis* pULG4 dans les deux fermenteurs

Les données représentent la moyenne des deux fermenteurs (Ferm1 et Ferm2), montrant une activation transcriptionnelle de *PspolIE-gfpmut3* entre 17 h et 40 h, culminant autour de 34 h. La décroissance de la fluorescence/cellule Fluo/A^{600} après 24 h indique une désactivation du promoteur en lien avec l'avancement de la sporulation.

La courbe de croissance A^{600} montre une phase exponentielle à partir de 16 h de culture. Cette croissance a été suivie d'une phase de stabilisation, puis d'une diminution progressive, probablement liée à la lyse cellulaire et à la réduction de la viabilité en fin de culture (**Figure IV.38.A**). Les données de fluorescence mesurées entre 0 h et 48 h (**Figure IV.38.B**) montrent une évolution parallèle et fortement corrélée entre les deux fermenteurs, ce qui reflète une excellente reproductibilité expérimentale. En phase initiale (0–1 h), la fluorescence est faible (66 à 72 unités), ce qui est attendu en l'absence d'expression significative de *PspolIEgfpmut3*.

À partir de 17 h, une augmentation nette du signal fluorescent est observée, atteignant plus de 2200 unités. L'intensité du signal continue d'augmenter pour culminer à 8077 unités à 34 h, reflétant une forte activation de *PspolIE-gfpmut3* et une activité maximale de la sporulation.

Le rapport Fluo/A^{600} a augmenté de façon marquée à partir de 17 h, culminant vers 34 h, puis diminue lentement jusqu'à 48 h. Ce profil en cloche, typique d'un promoteur transitoirement

actif, renforce l'hypothèse d'une activation précoce de *PspolIE-gfpmut3* lors de l'engagement dans la sporulation, suivie de sa désactivation ensuite la fin de l'étape II de la sporulation.

La superposition des trois dynamiques (croissance, fluorescence brute et Fluo/A⁶⁰⁰) met en lumière la séquence d'événements physiologiques qui caractérisent la transition de *B. subtilis* de la phase végétative vers la sporulation :

- une croissance active jusqu'à 30h (A⁶⁰⁰),
- une activation massive de *PspolIE-gfpmut3* dès 17 h, culminant entre 23 et 40 h.

Tableau IV.23. Suivi de la croissance et de la fluorescence

	A ⁶⁰⁰ max.	Phase stationnaire	Fluorescence globale max.	Fluorescence par cellule	Vitesse max. d'apparition de la fluorescence
F1	41 h	40 h	34 h	28 h	20 h
F2	43 h	40 h	34 h	28 h	20 h

Corrélation entre la croissance, l'expression de *PspolIE-gfpmut3* et la sporulation

L'évolution du nombre de spores viables (CFU/ml) de *B. subtilis* pULG4 a été suivie au cours du temps dans deux fermenteurs (F1 et F2) soumis à des conditions de culture identiques. Les résultats représentés dans la **Figure IV.40.A** et B montrent une croissance bactérienne soutenue et une progression rapide de la sporulation entre 16 h et 48 h.

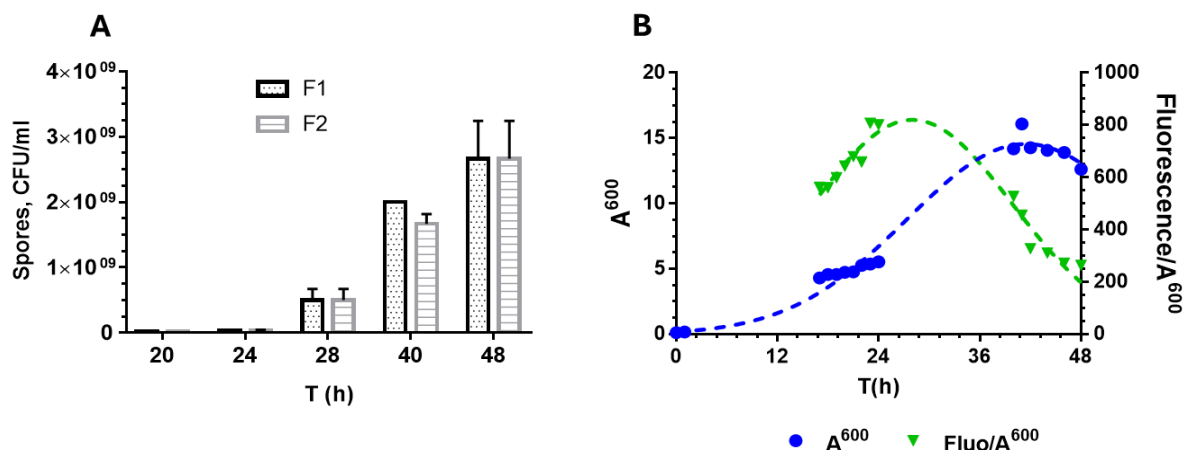


Figure IV.39. Synchronisation de l'activation de *PspolIE-gfpmut3* et de la production de spores dans les deux fermenteurs

(A) Le nombre de spores (CFU/ml), (B) L'A⁶⁰⁰ reflète la courbe de croissance

Dès 20 h, les cultures des fermenteurs 1 et 2 contiennent de faibles concentrations d'endospores de $2,5 \times 10^7$ CFU/ml, traduisant une multiplication active des cellules végétatives.

Une forte augmentation est observée à partir de 28 h, avec une densité atteignant $4,0 \times 10^8$ CFU/ml. Après 40 h, la concentration d'endospores atteint 2×10^9 CFU/ml pour F1 et $1,7 \times 10^9$ CFU/ml pour F2, traduisant une intense activité de sporulation.

Enfin, à 48 h, les deux fermenteurs atteignent un plateau à 3×10^9 CFU/ml, indiquant que le processus de sporulation a été largement complété. Cette stabilité du nombre de spores entre 40 h et 48 h suggère que la majorité des cellules ont terminé leur cycle de sporulation et que les conditions du milieu ne permettent plus la germination des spores.

Les profils très similaires observés entre F1 et F2 témoignent d'une bonne reproductibilité des conditions fermentaires.

Cette approche intégrative fournit des informations essentielles pour le pilotage des cultures industrielles de *B. subtilis*, en permettant d'identifier les phases critiques de la transition physiologique et d'optimiser le moment de récolte pour un rendement de spores maximal.

Le nombre de spores, de la flore totale et du taux de sporulation : les résultats obtenus des cultures réalisées dans les deux fermenteurs et en Erlenmeyer

Tableau IV.24. Flore totale et spores

	Temps (h)	Flore totale CFU/ml	Spores CFU/ml	Taux de sporulation %
Fermenteur 1	40	$4,0 \times 10^9$	$2,0 \times 10^9$	50
	48	$3,8 \times 10^9$	$2,6 \times 10^9$	69
Fermenteur 2	40	$4,0 \times 10^9$	$1,6 \times 10^9$	40
	48	$3,8 \times 10^9$	$2,8 \times 10^9$	74
Erlenmeyer	40	$5,2 \times 10^9$	$2,6 \times 10^9$	50
	48	$5,3 \times 10^9$	$3,0 \times 10^9$	56

Les résultats (**Tableau IV.24**) montrent que la sporulation progresse dans tous les systèmes entre 40 h et 48 h, mais avec des dynamiques différentes. En fermenteur, l'augmentation est marquée, surtout dans le fermenteur 2 qui, malgré un démarrage plus lent, atteint le taux de sporulation le plus élevé à 48 h (74 %). Le fermenteur 1 présente une progression régulière, passant de 50 % à 69 %. En revanche, la culture en Erlenmeyer évolue peu après 40 h, avec seulement 56 % du taux de sporulation, suggérant que les conditions y sont moins favorables à une sporulation complète. Globalement, le contrôle des paramètres en fermenteur semble favoriser à la fois l'efficacité et l'achèvement de la sporulation.

Conclusion

Les résultats obtenus pour *B. subtilis* pULG4, démontrent que le signal fluorescent émis par la GFPmut3 est efficacement transposable des cultures en Erlenmeyer à celles réalisées en fermenteur de 20 l, sans perte de signal ni altération significative. De plus, le système rapporteur construit à partir de *B. subtilis* portant le plasmide pULG4 présente une bonne reproductibilité, confirmant sa fiabilité pour l'analyse de l'expression génique en conditions de fermentation à l'échelle pilote et la comparaison avec les résultats en Erlenmeyer.

IV.3.3. Fermentation de *B. licheniformis* pULG8

Afin d'optimiser la sporulation et l'expression de *PspolIE-gfpmut3*, une première culture dans du milieu M4 [(Fermenteur 1 (F1))] a été réalisée à 37 °C avec un pH régulé à 6,8, une agitation de 300 rpm et une aération fixée à 1 vvm. Ce protocole visait à étudier la dynamique de croissance et l'activation de l'expression de *PspolIE-gfpmut3* chez *B. licheniformis* pULG8.

Les résultats obtenus (**Figure IV.41.A**), montrent que la croissance cellulaire est plus rapide, avec une A^{600} de 12, atteinte dès 16 h. En parallèle, la fluorescence augmente également plus rapidement à partir de 16 h. L'expression de *PspolIE-gfpmut3* semble donc plus précoce et plus soutenue en condition constante à 37 °C. Le rapport Fluo/ A^{600} reste relativement stable entre 16 h et 24 h, avant d'augmenter progressivement jusqu'à 46 h. Ce profil indique une activation plus homogène de *PspolIE-gfpmut3* dès les premières phases de croissance, ce qui suggère une entrée plus progressive mais continue des cellules en sporulation.

À partir de 40 h, bien que l' A^{600} commence à diminuer la fluorescence reste élevée, témoignant d'un maintien de l'expression de *PspolIE-gfpmut3* dans les cellules différenciées. La Fluo/ A^{600} atteint un maximum à 46 h, puis reste stable. Enfin, à 64 h, l' A^{600} est réduite à 10, et la fluorescence diminue, ce qui suggère soit une dégradation partielle du signal, soit une disparition des cellules fluorescentes au profit de spores non métaboliquement actifs.

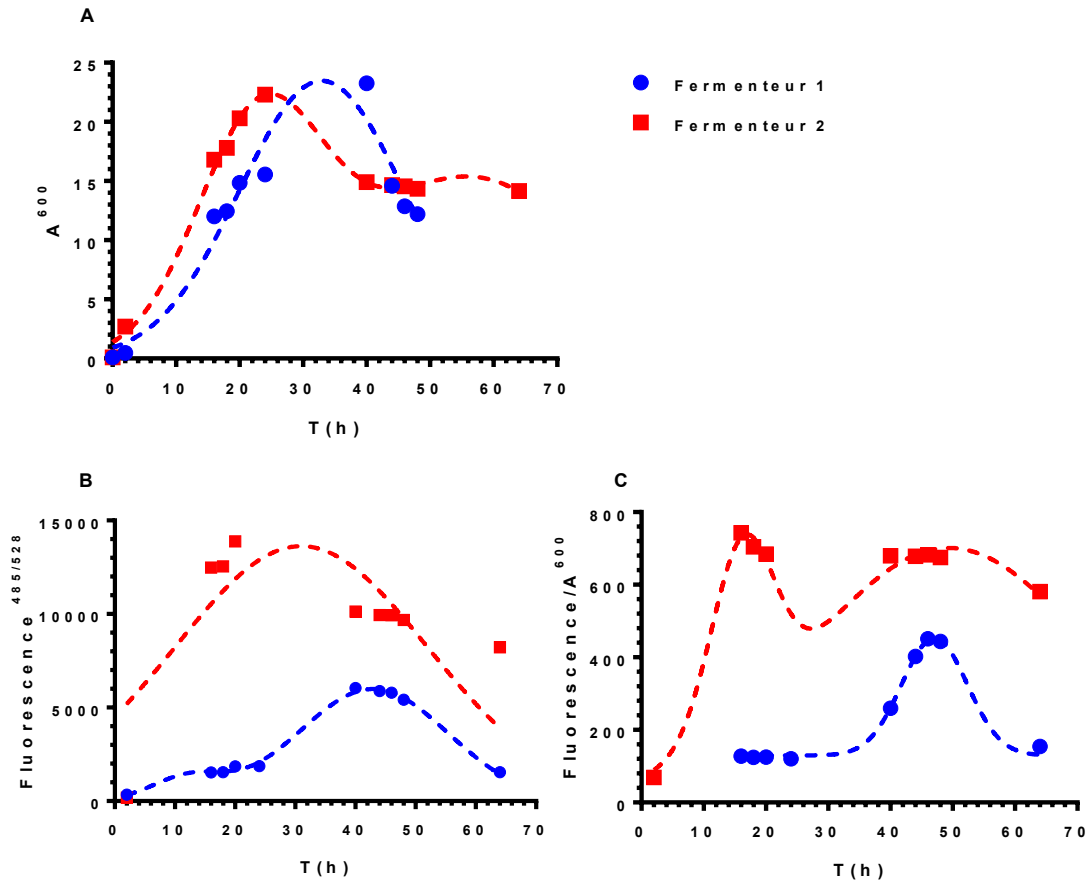


Figure IV.40. Suivi de la croissance et de la fluorescence chez *B. licheniformis* pULG8.

Les données représentent la moyenne des deux fermenteurs (Fermenteur 1 et Fermenteur 2), montrant une expression de *PspollE-gfpmut3* entre 17 h et 40 h, culminant autour de 34 h (F1) et 40 h (F2). Pour plus de détails voir texte.

Un deuxième fermenteur (F2) a été ensemencé dans des conditions de culture identiques au premier fermenteur.

Dès 2 heures, F2 présente une A^{600} plus élevée (2,69) comparée au fermenteur 1, tandis que la fluorescence est modérée. Rapidement, entre 18 et 21 heures, on observe une forte induction de la fluorescence, atteignant un pic maximal à 21 h, accompagné d'une A^{600} de 20,3. La fluorescence/ A^{600} est particulièrement élevée à ce stade, indiquant une activation massive et précoce de *PspollE-gfpmut3*.

À partir de 22 heures, bien que la A^{600} se stabilise voire diminue légèrement (autour de 14–22), la fluorescence reste élevée, pendant plus de 40 heures.

Le rapport Fluo/A⁶⁰⁰ reste lui aussi élevé témoignant d'une expression soutenue dans une proportion importante des cellules sporulantes. La comparaison met en évidence des différences nettes de cinétique et d'amplitude entre les deux fermenteurs : le fermenteur 2 favorise une expression rapide et en deux phases, tandis que le fermenteur 1 présente une activation de *PspollE-gfpmut3* retardée. Ces écarts peuvent résulter de paramètres physico-chimiques distincts influençant la régulation du promoteur ou la physiologie cellulaire (**Tableau IV.25**).

Tableau IV.25. Les paramètres de suivi de la croissance et de la fluorescence

	A ⁶⁰⁰ max.	Phase stationnaire	Fluorescence globale max.	Fluorescence par cellule max.	Vitesse max. d'apparition de la fluorescence
F1	34 h	24 h	41 h	47 h	20 h
F2	31 h	26 h	33 h	46 h	20 h

Le nombre de spores, de la flore totale et du taux de sporulation : les résultats obtenus des cultures réalisées dans les deux fermenteurs et en Erlenmeyer

Le comptage des spores a été réalisé à partir de 16 h de culture. L'évolution du nombre de spores au cours du temps dans les deux fermenteurs est présentée dans le **Tableau IV.32**. Ces données mettent en évidence l'influence déterminante des paramètres de culture sur la capacité sporulante de *B. licheniformis* pULG8 et confirment la reproductibilité des résultats obtenus en fermenteur.

Tableau IV.26. Le nombre de spores, de la flore totale et du taux de sporulation : les résultats obtenus des cultures réalisées dans les deux fermenteurs et en Erlenmeyer

	Temps (h)	Flore totale CFU/ml	Spores CFU/ml	Taux de sporulation %
Fermenteur 1	48	2,1 x 10 ⁹	1,7 x 10 ⁹	76
	64	1,5 x 10 ⁹	1,3 x 10 ⁹	86
Fermenteur 2	48	2,6 x 10 ⁹	1,3 x 10 ⁹	50
	64	1,4 x 10 ⁹	1,3 x 10 ⁹	95
Erlenmeyer	48	5,0 x 10 ⁹	4,6 x 10 ⁹	92

L'analyse comparative des deux essais réalisés en fermenteur et en Erlenmeyer, met en évidence une forte variabilité de la sporulation de *B. licheniformis* pULG8 en fonction des conditions de culture.

Après 48 h, la culture en Erlenmeyer présente les meilleures performances, avec une flore totale atteignant $5,0 \times 10^9$ CFU/ml et un taux de sporulation déjà très élevé (92 %). Les deux fermenteurs montrent à ce stade une production plus faible : $2,1 \times 10^9$ CFU/ml pour le Fermenteur 1 (76 %) et $2,6 \times 10^9$ CFU/ml pour le Fermenteur 2 (50 %). Après 64 h, les fermenteurs enregistrent une baisse de la flore totale ($1,5 \times 10^9$ pour le Fermenteur 1 et $1,4 \times 10^9$ pour le Fermenteur 2), mais avec une nette amélioration du taux de sporulation, atteignant respectivement 86 % et 95 %. Ces résultats indiquent que la sporulation est plus rapide et efficace en Erlenmeyer, tandis que les fermenteurs nécessitent un temps plus long pour atteindre des taux comparables, au prix d'une diminution de la biomasse totale.

Corrélation entre la croissance, l'expression de *PspolIE* et la sporulation

Afin de mieux comprendre la dynamique de sporulation chez *B. licheniformis* pULG8 un suivi combiné de l' A^{600} , de l'expression du promoteur *PspolIE-gfpmut3* (Fluo/ A^{600}) et du nombre de spores a été réalisé dans le fermenteur 2.

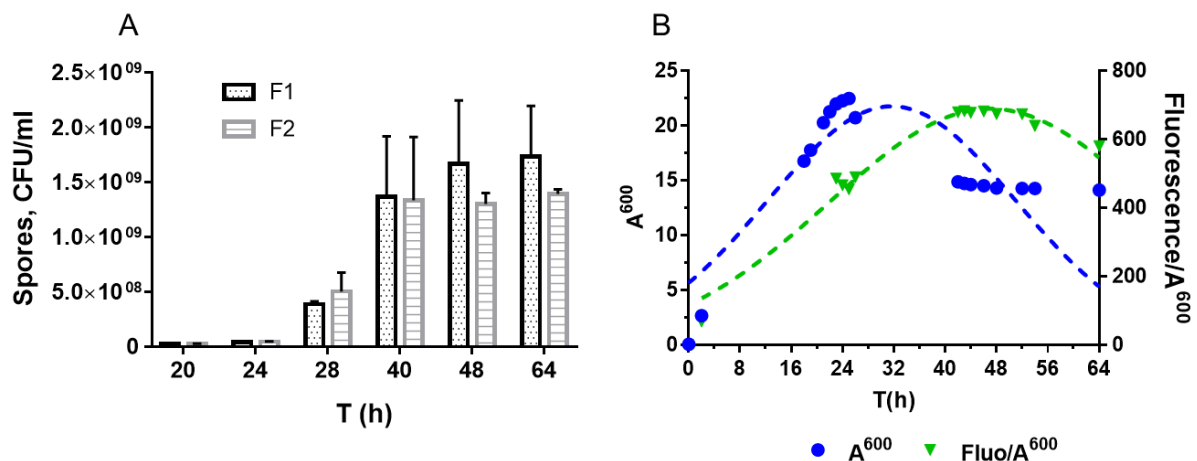


Figure IV.41 : Suivi de la sporulation, de la croissance et le rapport Fluorescence/ A^{600} et chez *B. licheniformis* pULG8 dans les deux fermenteurs

A) Le nombre de spores (CFU/ml) est mesuré pour évaluer l'efficacité de la sporulation. B) La courbe A^{600} reflète la croissance cellulaire et le rapport Fluorescence/ A^{600} indique l'expression de *PspolIE-gfpmut3/cellule*. L'ensemble des données permet de visualiser la corrélation temporelle entre la croissance, l'activation de *PspolIE-gfpmut3* et la production d'endospores.

Les résultats (**Figure IV.41.B**) montrent que, les premiers signaux de fluorescence spécifiques apparaissent dès 2 h de culture, alors que l' A^{600} reste relativement basse (2,69). Cette fluorescence augmente rapidement pour atteindre un maximum à 18 h ($\text{Fluo}/A^{600} = 743$), suggérant une activation intense du promoteur *PspolIE-gfpmut3* au moment de la transition entre la phase exponentielle de croissance et la phase stationnaire. Ce point correspond à l'initiation du processus de sporulation, moment clé où les premières cellules s'engagent dans la différenciation.

Après ce pic, le signal de fluorescence diminue progressivement entre 19 h et 24 h (de 704 à 467), bien que la A^{600} continue d'augmenter. Cette diminution traduit la progression de la différenciation cellulaire : une fois le promoteur *PspolIE-gfpmut3* activé, les cellules poursuivent le processus de sporulation, ce qui se manifeste ensuite par une augmentation du nombre de spores viables.

En effet, la cinétique de sporulation montre une nette augmentation du nombre de spores entre 24 h ($4,5 \times 10^7$ CFU/ml) et 48 h ($1,3 \times 10^9$ CFU/ml). Cette période correspond à la phase principale de sporulation massive. Le nombre de spores atteint un plateau à 64 h ($1,44 \times 10^9$ CFU/ml), indiquant que la majorité des cellules sporulantes ont complété leur différenciation.

Parallèlement, la A^{600} commence à diminuer après 26 h, ce qui peut être attribué à la lyse partielle des cellules végétatives. Cette tendance est compatible avec l'entrée en phase stationnaire.

Entre 42 h et 48 h, la fluorescence reste relativement stable, malgré une A^{600} plus faible (14,3), ce qui peut être interprété comme une expression résiduelle du promoteur dans une fraction mineure de la population bactérienne. En fin de culture (64 h), la baisse du signal de fluorescence confirme que la phase de différenciation est globalement terminée.

Conclusion

À la suite des optimisations initiales menées en Erlenmeyer, le processus a été transféré en bioréacteur pilote afin de reproduire des conditions proches de la production industrielle et d'évaluer des stratégies de réduction des coûts. Les analyses de la sporulation et de la fluorescence, ont confirmé la robustesse du protocole. Le transfert d'échelle s'est avéré efficace, démontrant que les conditions optimisées en laboratoire permettent d'obtenir, en fermenteur, une densité cellulaire élevée ainsi qu'un taux de sporulation satisfaisant. Ces résultats valident la pertinence de l'approche et ouvrent la voie à l'optimisation raisonnable du procédé en vue d'une production industrielle à grande échelle.

CHAPITRE V. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

V.1. Optimisation de la sporulation

L'optimisation de la sporulation constitue une étape essentielle dans la production industrielle des bacilles sporulants, notamment pour leurs applications en tant que probiotiques, biostimulants, agents de bioremédiation ou encore en industrie pharmaceutique. Le rendement en spores dépend fortement de la composition du milieu de culture, en particulier des sources de carbone et d'azote, des minéraux, des vitamines et de l'eau. Nos résultats ont mis en évidence que l'enrichissement du milieu avec des sucres simples favorise la croissance cellulaire mais inhibe ou retarde significativement la sporulation. En revanche, l'ajout de 1,5 % d'un sucre complexe, bien que ne conduisant pas à une forte densité de spores, a permis d'atteindre un taux de sporulation élevé. Ces observations soulignent l'importance d'un équilibre métabolique optimal dans le choix des sources nutritionnelles du milieu, en vue de maximiser la sporulation tout en limitant les effets délétères associés à un excès de nutriments facilement assimilables.

V.2. Suivi de l'expression de *spoII*E au cours de la sporulation

L'objectif principal de ce travail était de concevoir un outil génétique permettant de suivre l'engagement des cellules bactériennes dans le processus de sporulation au cours de la fermentation, dans un contexte de production industrielle. Pour ce faire, des constructions plasmidiques comportant le gène *gfp* sous le contrôle des promoteurs *Pspo0A* et *PspoII*E-*gfpmut3* ont été réalisées et introduites dans plusieurs espèces sporulantes du genre *Bacillus*, notamment *B. subtilis*, *B. licheniformis* et *H. coagulans*.

À la suite de ces essais, le travail s'est recentré sur les souches *B. subtilis* 168 et *B. licheniformis* MW3, pour lesquelles les transformations se sont révélées plus efficaces et adaptées aux conditions d'étude.

L'analyse de l'expression des fusions a mis en évidence une très faible activité du promoteur *Pspo0A*, tant en phase exponentielle qu'en phase stationnaire, limitant considérablement son utilité pour le suivi précis du processus de sporulation. En revanche, le promoteur *PspoII*E a montré une activité plus marquée, en particulier au moment où la sporulation devient irréversible (stade II), justifiant son utilisation exclusive pour les expériences ultérieures.

Le suivi du signal fluorescent au cours du temps, réalisé par fluorimétrie et cytométrie en flux, a permis d'observer une augmentation de l'intensité de fluorescence durant la phase exponentielle de croissance, suivie d'une décroissance progressive à l'entrée en phase stationnaire. Cette dynamique est corrélée à l'augmentation du nombre de spores, observée par comptage de spores, et s'explique par la séquestration progressive de la protéine SpoIIIE dans le compartiment du présore, comme décrit dans la littérature.

En outre, les analyses en cytométrie en flux ont permis de caractériser l'hétérogénéité des populations cellulaires et d'identifier les sous-populations exprimant *PspoIIIE-gfpmut3*, c'est-à-dire les cellules effectivement engagées dans le processus sporulant.

Ces résultats confirment la pertinence de *gfpmut3* en tant que gène rapporteur pour suivre l'expression de *PspoIIIE-gfpmut3* et, par conséquent, le déclenchement de la sporulation chez *B. subtilis* 168 et *B. licheniformis* MW3.

Ainsi, la construction *PspoIIIE-gfpmut3* constitue un outil robuste et adapté à l'étude dynamique de la sporulation au cours d'une fermentation. Elle offre des perspectives intéressantes pour le contrôle et l'optimisation des procédés industriels impliquant des bacilles sporulants, en permettant une meilleure compréhension de la cinétique de différenciation cellulaire et une évaluation en temps réel de l'hétérogénéité physiologique au sein des cultures.

V.3. Effet des différentes sources carbonées sur la sporulation

Afin d'évaluer l'influence de différentes sources carbonées sur la sporulation et l'expression de gènes clés de ce processus, deux sucres — le glucose et le xylose — ont été ajoutés séparément aux milieux de culture M1, M2 et SSM, à une concentration de 0,5 %. Ces milieux correspondent à des formulations de base, généralement utilisées pour la fermentation, caractérisées par l'absence de glucides. L'objectif principal de cet enrichissement était de stimuler la croissance bactérienne, tout en analysant les conséquences sur l'induction des gènes *spo0A* et *spoIIIE*, ainsi que sur la capacité sporulante globale.

Les résultats ont montré que l'augmentation de la concentration en glucose entraîne une diminution significative de l'activité du promoteur testé, une acidification du milieu de culture et un retard de la sporulation. En présence de xylose, bien que la croissance cellulaire soit satisfaisante, l'expression des gènes *spo0A* et *spoIIIE* est fortement réprimée, accompagnée d'une faible sporulation, sans toutefois provoquer d'acidification du milieu.

En l'absence de glucose et de xylose, les bactéries ont montré une croissance adéquate et une sporulation notable, suggérant que des conditions de carence en sucres simples favorisent l'induction de la voie sporulante.

Par ailleurs, l'utilisation d'un quatrième milieu (M4), enrichi d'un sucre complexe (1,5 %), a permis d'atteindre une densité cellulaire optimale ainsi qu'un taux de sporulation significativement supérieur chez *B. licheniformis* pULG8, faisant de ce milieu un candidat prometteur pour les applications industrielles nécessitant une production élevée de spores.

Enfin, le décalage de l'expression de *PspoIIIE-gfpmut3* vers des temps de culture plus tardifs en présence de sucre est cohérent avec la régulation du gène *spoIIIE*, dont l'expression dépend à la fois du facteur sigma F (spécifique de la préspore) et de Spo0A (Elfmann et al., 2025).

Ce dernier est un facteur de transcription essentiel, agissant comme un régulateur central dans la décision d'initier la sporulation en réponse à une carence nutritive. L'activation de Spo0A se fait par phosphorylation (Spo0A~P) via un système de phosphorelais.

La présence de sucre, tel que le glucose, dans le milieu retarde la sporulation en réprimant la cascade de phosphorylation responsable de l'activation de Spo0A. Cela maintient un faible niveau de Spo0A~P, entraînant un retard global du processus de sporulation et, par conséquent, un décalage de l'expression de *spoIIIE* (Errington, 2003).

Perspectives

Ces résultats ouvrent la voie à de nouvelles approches expérimentales visant à mieux comprendre les mécanismes de régulation métabolique de la sporulation, en réponse aux différentes sources carbonées. Il serait particulièrement pertinent, dans les travaux futurs, d'examiner l'effet combiné de plusieurs sucres sur la croissance et la sporulation de souches mutantes de *B. subtilis* et *B. licheniformis*. À cette fin, des cultures pourraient être conduites dans le milieu M1, enrichi en sucres simples ou complexes, individuellement (glucose, xylose, amidon) puis en combinaisons binaires (glucose + xylose ; glucose + amidon ; xylose + amidon), chacune à une concentration de 0,5 %.

Ces essais pourraient être complétés par des mesures de matière sèche, du rendement cellulaire et du taux de sporulation.

Une telle approche permettrait non seulement d'identifier les conditions optimales de sporulation, mais également de mieux comprendre l'intégration des signaux métaboliques dans la régulation génétique du processus sporulant, en vue de son exploitation rationnelle en milieu industriel.

Dans cette perspective, plusieurs axes de travail apparaissent prioritaires :

- Mettre en place un suivi cinétique de la sporulation par la mesure en continu du pH afin de mieux comprendre la dynamique physiologique des cultures.

- Éclaircir les raisons pour lesquelles le milieu M4 favorise la sporulation de *B. licheniformis* mais non celle de *B. subtilis*.
- Identifier le ou les composés limitants présents dans l'extrait de viande et déterminants pour l'initiation de la sporulation.
- Développer une approche de criblage robotisé à haut débit pour sélectionner des formulations de milieux optimisées favorisant la sporulation.
- Déterminer les facteurs génétiques et physiologiques expliquant pourquoi *H. coagulans* Artech_1 sporule alors que *H. coagulans* DSM 1 ne sporule pas.

BIBLIOGRAPHIE

- Alfred Fischer. (1895). *Untersuchungen über Bakterien* (Vol. 27). Jahrbuch für Wissenschaftliche Botanik.
- Allende, A., Alvarez-Ordóñez, A., Bortolaia, V., Bover-Cid, S., De Cesare, A., Dohmen, W., Guillier, L., Jacxsens, L., Nauta, M., Mughini-Gras, L., Ottoson, J., Peixe, L., Perez-Rodriguez, F., Skandamis, P., Suffredini, E., Cocconcelli, P. S., Fernández Escámez, P. S., Maradona, M. P., Querol, A., ... Herman, L. (2025). Update of the list of qualified presumption of safety (QPS) recommended microbiological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA 21: Suitability of taxonomic units notified to EFSA until September 2024. *EFSA Journal*, 23(1). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2025.9169>
- Anuradha S. Nerurkar. (2010). Structural and Molecular Characteristics of Lichenysin and Its Relationship with Surface Activity. *Springer*, 1, 304–315.
- Arigoni, F., Duncan, L., Alper, S., Losick, R., & Stragier, P. (1996). SpoII E governs the phosphorylation state of a protein regulating transcription factor sigma F during sporulation in *Bacillus subtilis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(8), 3238–3242. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.8.3238>
- Arigoni, F., Pogliano, K., Webb, C. D., Stragier, P., & Losick, R. (1995). Localization of Protein Implicated in Establishment of Cell Type to Sites of Asymmetric Division. *Science*, 270(5236), 637–640. <https://doi.org/10.1126/science.270.5236.637>
- Ash, C., Priest, F. G., & Collins, M. D. (1994). Molecular identification of rRNA group 3 Bacilli (Ash, Farrow, Wallbanks and Collins) using a PCR probe test. *Antonie van Leeuwenhoek*, 64(3–4), 253–260. <https://doi.org/10.1007/bf00873085>
- Bachem, S., Faires, N., & Stülke, J. (2006). Characterization of the presumptive phosphorylation sites of the *Bacillus subtilis* glucose permease by site-directed mutagenesis: implication in glucose transport and catabolite repression. *FEMS Microbiology Letters*, 156(2), 233–238. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1997.tb12733.x>
- Bampidis, V., Azimonti, G., Bastos, M. de L., Christensen, H., Dusemund, B., Kouba, M., Kos Durjava, M., López-Alonso, M., López Puente, S., Marcon, F., Mayo, B., Pechová, A., Petkova, M., Ramos, F., Sanz, Y., Villa, R. E., Woutersen, R., Glandorf, B., Herman, L., ... Pizzo, F. (2019). Safety and efficacy of Probian forte® (*Bacillus subtilis* KCCM 10941P and *Bacillus coagulans* KCCM 11093P) for chickens for fattening. *EFSA Journal*, 17(3). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2019.5644>
- Bampidis, V., Azimonti, G., de Lourdes Bastos, M., Christensen, H., Dusemund, B., Kouba, M., Kos Durjava, M., López-Alonso, M., López Puente, S., Marcon, F., Mayo, B., Pechová, A., Petkova, M., Ramos, F., Sanz, Y., Villa, R. E., Woutersen, R., Anguita, M., Galobart, J., Pizzo, F. (2019). Safety and efficacy of *Bacillus subtilis* DSM 28343 for pigs for fattening. *EFSA Journal*, 17(6). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2019.5725>

- Barák, I., & Muchová, K. (2018). The positioning of the asymmetric septum during sporulation in *Bacillus subtilis*. *PlosOne*, *13*(8), e0201979. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201979>
- Baron, M. (2009). Original Research: A Patented Strain of *Bacillus coagulans* Increased Immune Response to Viral Challenge. *Postgraduate Medicine*, *121*(2), 114–118. <https://doi.org/10.3810/pgm.2009.03.1971>
- Bartolini, M., Cogliati, S., Vileta, D., Bauman, C., Rateni, L., Leñini, C., Argañaraz, F., Francisco, M., Villalba, J. M., Steil, L., Völker, U., & Grau, R. (2019). Regulation of biofilm aging and dispersal in *Bacillus subtilis* by the alternative sigma factor SigB. *Journal of Bacteriology*, *201*(2). <https://doi.org/10.1128/JB.00473-18>
- Begley, M., Gahan, C. G. M., & Hill, C. (2005). The interaction between bacteria and bile. *FEMS Microbiology Reviews*, *29*(4), 625–651. <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2004.09.003>
- Bhardwaj, D., Ansari, M. W., Sahoo, R. K., & Tuteja, N. (2014). Biofertilizers function as key player in sustainable agriculture by improving soil fertility, plant tolerance and crop productivity. *Microbial Cell Factories*, *13*(1), 66. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-13-66>
- Borrell Fontelles, J., & Korkeaoja, J. (2006). *Règlement (CE) N o 1924/2006 du parlement européen et du conseil concernant les allégations nutritionnelles et de santé portant sur les denrées alimentaires.*
- Boylan, S. A., Thomas, M. D., & Price, C. W. (1991). Genetic Method to Identify Regulons Controlled by Nonessential Elements: Isolation of a Gene Dependent on Alternate Transcription Factor c0B of *Bacillus subtilis*. In *Journal of bacteriology* (Vol. 173, Issue 24).
- Bozue, J. A., Welkos, S., & Cote, C. K. (2015). The *Bacillus anthracis* Exosporium: What's the Big "Hairy" Deal? *Microbiology Spectrum*, *3*(5). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.TBS-0021-2015>
- Bridier, A., Le Coq, D., Dubois-Brissonnet, F., Thomas, V., Aymerich, S., & Briandet, R. (2011). The Spatial Architecture of *Bacillus subtilis* Biofilms Deciphered Using a Surface-Associated Model and In Situ Imaging. *PLoS ONE*, *6*(1), e16177. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016177>
- Burbulys, D., Trach, K. A., & Hoch, J. A. (1991). Initiation of sporulation in *B. subtilis* is controlled by a multicomponent phosphorelay. *Cell*, *64*(3), 545–552. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90238-T](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90238-T)
- Buzek, J. (2009). Règlement (CE) n° 1107/2009 du Parlement européen et du Conseil du 21 octobre 2009. *Journal Officiel de l'Union Européenne.*
- Camp, A. H., & Losick, R. (2008). A novel pathway of intercellular signalling in *Bacillus subtilis* involves a protein with similarity to a component of type III secretion channels. *Molecular Microbiology*, *69*(2), 402–417. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06289.x>

- Carlin, F. (2011). Origin of bacterial spores contaminating foods. *Food Microbiology*, 28(2), 177–182. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.07.008>
- Catinean, A., Neag, M. A., Krishnan, K., Muntean, D. M., Bocsan, C. I., Pop, R. M., Mitre, A. O., Melincovici, C. S., & Buzoianu, A. D. (2020). Probiotic *Bacillus* Spores Together with Amino Acids and Immunoglobulins Exert Protective Effects on a Rat Model of Ulcerative Colitis. *Nutrients*, 12(12), 3607. <https://doi.org/10.3390/nu12123607>
- Catinean, Neag, Nita, Buzea, & Buzoianu. (2019). *Bacillus spp.* Spores—A Promising Treatment Option for Patients with Irritable Bowel Syndrome. *Nutrients*, 11(9), 1968. <https://doi.org/10.3390/nu11091968>
- Cendrowicz, E., de Sousa Borges, A., Kopacz, M., & Scheffers, D.-J. (2017). Metal-dependent SpoIIIE oligomerization stabilizes FtsZ during asymmetric division in *Bacillus subtilis*. *PLOS ONE*, 12(3), e0174713. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174713>
- Charlton, S., Moir, A. J. G., Baillie, L., & Moir, A. (1999). Characterization of the exosporium of *Bacillus cereus*. *Journal of Applied Microbiology*, 87(2), 241–245. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1999.00878.x>
- Charteris, Kelly, Morelli, & Collins. (1998). Development and application of an in vitro methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract. *Journal of Applied Microbiology*, 84(5), 759–768. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1998.00407.x>
- Chen, I., Christie, P. J., & Dubnau, D. (2005). The Ins and Outs of DNA Transfer in Bacteria. *Science*, 310(5753), 1456–1460. <https://doi.org/10.1126/science.1114021>
- Chen, Y.-C., & Yu, Y.-H. (2020). *Bacillus licheniformis*–fermented products improve growth performance and the fecal microbiota community in broilers. *Poultry Science*, 99(3), 1432–1443. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2019.10.061>
- Chen, Z.-M., Li, Q., Liu, H.-M., Yu, N., Xie, T.-J., Yang, M.-Y., Shen, P., & Chen, X.-D. (2010). Greater enhancement of *Bacillus subtilis* spore yields in submerged cultures by optimization of medium composition through statistical experimental designs. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85(5), 1353–1360. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2162-x>
- Chibazakura, T., Kawamura, F., & Takahashi, H. (1991). Differential regulation of spo0A transcription in *Bacillus subtilis*: glucose represses promoter switching at the initiation of sporulation. *Journal of Bacteriology*, 173(8), 2625–2632. <https://doi.org/10.1128/jb.173.8.2625-2632.1991>
- Commichau, F. M., Alzinger, A., Sande, R., Bretzel, W., Meyer, F. M., Chevreux, B., Wyss, M., Hohmann, H.-P., & Prágai, Z. (2014). Overexpression of a non-native deoxyxylulose-dependent vitamin B6 pathway in *Bacillus subtilis* for the production of pyridoxine. *Metabolic Engineering*, 25, 38–49. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2014.06.007>

- Contesini, F. J., Melo, R. R. de, & Sato, H. H. (2018). An overview of *Bacillus* proteases: from production to application. *Critical Reviews in Biotechnology*, 38(3), 321–334. <https://doi.org/10.1080/07388551.2017.1354354>
- Cormack, B. P., Valdivia, R. H., & Falkow, S. (1996). FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene*, 173(1), 33–38. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(95\)00685-0](https://doi.org/10.1016/0378-1119(95)00685-0)
- 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*, 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*, 101(20), 7733–7738. <https://doi.org/10.1073/pnas.0306859101>
- Cui, T. B., Chai, H. Y., & Jiang, L. X. (2012). Isolation and partial characterization of an antifungal protein produced by *Bacillus licheniformis* BS-3. *Molecules*, 17(6), 7336–7347. <https://doi.org/10.3390/molecules17067336>
- Cui, W., Han, L., Suo, F., Liu, Z., Zhou, L., & Zhou, Z. (2018). Exploitation of *Bacillus subtilis* as a robust workhorse for production of heterologous proteins and beyond. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 34(10), 145. <https://doi.org/10.1007/s11274-018-2531-7>
- Cutting, S. M. (2011a). *Bacillus* probiotics. *Food Microbiology*, 28(2), 214–220. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.03.007>
- Cutting, S. M. (2011b). *Molecular Biology Methods for Bacillus*. Wiley-Blackwell.
- Czerucka, D., Piche, T., & Rampal, P. (2007). Review article: yeast as probiotics – *Saccharomyces boulardii*. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 26(6), 767–778. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2007.03442.x>
- Das, A., Das, N., Rajkumari, J., Pandey, P., & Pandey, P. (2024). Exploring the bioremediation potential of *Bacillus spp.* for sustainable mitigation of hydrocarbon contaminants. *Environmental Sustainability*, 7(2), 135–156. <https://doi.org/10.1007/s42398-024-00309-9>
- Deng, W., Dong, X. F., Tong, J. M., & Zhang, Q. (2012). The probiotic *Bacillus licheniformis* ameliorates heat stress-induced impairment of egg production, gut morphology, and intestinal mucosal immunity in laying hens. *Poultry Science*, 91(3), 575–582. <https://doi.org/10.3382/ps.2010-01293>
- Dimidi, E., Cox, S., Rossi, M., & Whelan, K. (2019). Fermented Foods: Definitions and Characteristics, Impact on the Gut Microbiota and Effects on Gastrointestinal Health and Disease. *Nutrients*, 11(8), 1806. <https://doi.org/10.3390/nu11081806>

- Doan, T. (2003). Etude fonctionnelle du génome de *Bacillus subtilis* : de nouvelles régulations transcriptionnelles du métabolisme central du carbone. INAPG (AgroParisTech).
- Drago, L., & De Vecchi, E. (2009). Should *Lactobacillus sporogenes* and *Bacillus coagulans* Have a future? *Journal of Chemotherapy*, 21(4), 371–377. <https://doi.org/10.1179/joc.2009.21.4.371>
- Driks, A., & Eichenberger, P. (2016). The Spore Coat. *Microbiology Spectrum*, 4(2). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.TBS-0023-2016>
- Dubnau, D. (1991). Genetic competence in *Bacillus subtilis*. *Microbiological Reviews*, 55(3), 395–424. <https://doi.org/10.1128/mr.55.3.395-424.1991>
- Duc, L. H., Hong, H. A., Barbosa, T. M., Henriques, A. O., & Cutting, S. M. (2004). Characterization of *Bacillus* Probiotics Available for Human Use. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(4), 2161–2171. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.4.2161-2171.2004>
- Ehling-Schulz, M., Fricker, M., & Scherer, S. (2004). Identification of emetic toxin producing *Bacillus cereus* strains by a novel molecular assay. *FEMS Microbiology Letters*, 232(2), 189–195. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(04\)00066-7](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(04)00066-7)
- Elowitz, M. B., Levine, A. J., Siggia, E. D., & Swain, P. S. (2002). Stochastic Gene Expression in a Single Cell. *Science*, 297(5584), 1183–1186. <https://doi.org/10.1126/science.1070919>
- Elshaghabee, F. M. F., Rokana, N., Gulhane, R. D., Sharma, C., & Panwar, H. (2017). *Bacillus* As Potential Probiotics: Status, Concerns, and Future Perspectives. *Frontiers in Microbiology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01490>
- Endres, J. R., Clewell, A., Jade, K. A., Farber, T., Hauswirth, J., & Schauss, A. G. (2009). Safety assessment of a proprietary preparation of a novel Probiotic, *Bacillus coagulans*, as a food ingredient. *Food and Chemical Toxicology*, 47(6), 1231–1238. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2009.02.018>
- Errington, J. (2001). Septation and chromosome segregation during sporulation in *Bacillus subtilis*. *Current Opinion in Microbiology*, 4(6), 660–666. [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(01\)00266-1](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(01)00266-1)
- Errington, J. (2003). Regulation of endospore formation in *Bacillus subtilis*. *Nature Reviews Microbiology*, 1(2), 117–126. <https://doi.org/10.1038/nrmicro750>
- Food and Agriculture Organization. (2006). Probiotics in food Health and nutritional properties and guidelines for evaluation.
- Food and Agriculture Organization/World Health Organization. (2006). *Probiotics in Food: Health and Nutritional Properties and Guidelines for Evaluation*.
- Farrera, R. R., Pérez-Guevara, F., & de la Torre, M. (1998). Carbon: nitrogen ratio interacts with initial concentration of total solids on insecticidal crystal protein and spore

- production in *Bacillus thuringiensis* HD-73. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 49(6), 758–765. <https://doi.org/10.1007/s002530051243>
- Felis, G. E., & Dellaglio, F. (2007). Taxonomy of Lactobacilli and Bifidobacteria. *Current Issues in Intestinal Microbiology*, 8(2), 44–61.
- Fiegler, H., Bassias, J., Jankovic, I., & Brückner, R. (1999). Identification of a Gene in *Staphylococcus xylosus* Encoding a Novel Glucose Uptake Protein. *Journal of Bacteriology*, 181(16), 4929–4936. <https://doi.org/10.1128/JB.181.16.4929-4936.1999>
- Fuhrer, T., Fischer, E., & Sauer, U. (2005). Experimental Identification and Quantification of Glucose Metabolism in Seven Bacterial Species. *Journal of Bacteriology*, 187(5), 1581–1590. <https://doi.org/10.1128/JB.187.5.1581-1590.2005>
- Fujita, M., & Losick, R. (2005). Evidence that entry into sporulation in *Bacillus subtilis* is governed by a gradual increase in the level and activity of the master regulator Spo0A. *Genes & Development*, 19(18), 2236–2244. <https://doi.org/10.1101/gad.1335705>
- Gaggia, F., Mattarelli, P., & Biavati, B. (2010). Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production. *International Journal of Food Microbiology*, 141, S15–S28. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.02.031>
- Galperin, M. Y., Yutin, N., Wolf, Y. I., Vera Alvarez, R., & Koonin, E. V. (2022). Conservation and Evolution of the Sporulation Gene Set in Diverse Members of the *Firmicutes*. *Journal of Bacteriology*, 204(6). <https://doi.org/10.1128/jb.00079-22>
- Gibson, G. R., Hutkins, R., Sanders, M. E., Prescott, S. L., Reimer, R. A., Salminen, S. J., Scott, K., Stanton, C., Swanson, K. S., Cani, P. D., Verbeke, K., & Reid, G. (2017). Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. In *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology* (Vol. 14, Issue 8, pp. 491–502). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2017.75>
- González-Pastor, J. E., Hobbs, E. C., & Losick, R. (2003). Cannibalism by Sporulating Bacteria. *Science*, 301(5632), 510–513. <https://doi.org/10.1126/science.1086462>
- Goyal, P., Belapurkar, P., & Kar, A. (2024). Evaluation of Bioremediation Potential of Two Commercial Probiotics for Cr (VI): An In vitro Study. *Biosciences Biotechnology Research Asia*, 21(2), 713–722. <https://doi.org/10.13005/bbra/3258>
- Granum, P. E., & Lund, T. (2006). *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiology Letters*, 157(2), 223–228. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1997.tb12776.x>
- Gudiña, E. J., Fernandes, E. C., Rodrigues, A. I., Teixeira, J. A., & Rodrigues, L. R. (2015). Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* using corn steep liquor as culture medium. *Frontiers in Microbiology*, 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00059>
- Hageman, J. H., Shankweiler, G. W., Wall, P. R., Franich, K., McCowan, G. W., Cauble, S. M., Grajeda, J., & Quinones, C. (1984). Single, chemically defined sporulation medium for *Bacillus subtilis*: growth, sporulation, and extracellular protease production. *Journal of Bacteriology*, 160(1), 438–441. <https://doi.org/10.1128/jb.160.1.438-441.1984>

- Harwood, C. R., & Cutting, S. M. (1990). *Molecular Biological Methods for Bacillus* (Colin R. Harwood & Simon M. Cutting, Eds.; Willey). Wiley.
- Henriques, A. O., & Moran, Jr., 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>
- Hertadi, R., Umriani Permatasari, N., & Ratnaningsih, E. (2021). Box-Wilson Design for Optimization of in vitro Levan Production and Levan Application as Antioxidant and Antibacterial Agents. *Iranian Biomedical Journal*, *25*(3), 202–212. <https://doi.org/10.29252/ibj.25.3.202>
- 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>
- Hilbert, D. W., & Piggot, P. J. (2004). Compartmentalization of Gene Expression during *Bacillus subtilis* Spore Formation. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *68*(2), 234–262. <https://doi.org/10.1128/MMBR.68.2.234-262.2004>
- Hoffmann, K., Wollherr, A., Larsen, M., Rachinger, M., Liesegang, H., Ehrenreich, A., & Meinhardt, F. (2010). Facilitation of Direct Conditional Knockout of Essential Genes in *Bacillus licheniformis* DSM13 by Comparative Genetic Analysis and Manipulation of Genetic Competence. *Applied and Environmental Microbiology*, *76*(15), 5046–5057. <https://doi.org/10.1128/AEM.00660-10>
- Hong, H. A., Duc, L. H., & Cutting, S. M. (2005). The use of bacterial spore formers as probiotics: Table 1. *FEMS Microbiology Reviews*, *29*(4), 813–835. <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2004.12.001>
- Hun, L. (2009). Original Research: *Bacillus coagulans* Significantly Improved Abdominal Pain and Bloating in Patients with IBS. *Postgraduate Medicine*, *121*(2), 119–124. <https://doi.org/10.3810/pgm.2009.03.1984>
- Ibrahim, D., Zhu, H. L., Yusof, N., Isnaeni, & Hong, L. S. (2013). *Bacillus licheniformis* BT5.9 Isolated from Changar Hot Spring, Malang, Indonesia, as a Potential Producer of Thermostable α -amylase. *Tropical Life Sciences Research*, *24*(1), 71–84.
- Jin, S., Levin, P. A., Matsuno, K., Grossman, A. D., & Sonenshein, A. L. (1997). Deletion of the *Bacillus subtilis* isocitrate dehydrogenase gene causes a block at stage I of sporulation. *Journal of Bacteriology*, *179*(15), 4725–4732. <https://doi.org/10.1128/jb.179.15.4725-4732.1997>
- Johnson, S. L., Daligault, H. E., Davenport, K. W., Jaissle, J., Frey, K. G., Ladner, J. T., Broomall, S. M., Bishop-Lilly, K. A., Bruce, D. C., Gibbons, H. S., Coyne, S. R., Lo, C. C., Meincke, L., Christine Munk, A., Koroleva, G. I., Nicole Rosenzweig, C., Palacios, G. F., Redden, C. L., Minogue, T. D., & Chain, P. S. (2016a). Complete genome sequences for 35 biothreat assay-relevant *Bacillus* species. *Genome Announcements*, *3*(2). <https://doi.org/10.1128/genomeA.00151-15>

- Johnson, S. L., Daligault, H. E., Davenport, K. W., Jaissle, J., Frey, K. G., Ladner, J. T., Broomall, S. M., Bishop-Lilly, K. A., Bruce, D. C., Gibbons, H. S., Coyne, S. R., Lo, C. C., Meincke, L., Christine Munk, A., Koroleva, G. I., Nicole Rosenzweig, C., Palacios, G. F., Redden, C. L., Minogue, T. D., & Chain, P. S. (2016b). Complete genome sequences for 35 biothreat assay-relevant *Bacillus* species. *Genome Announcements*, 3(2). <https://doi.org/10.1128/genomeA.00151-15>
- Johnson, W. C., Moran, C. P., & Losick, R. (1983). Two RNA polymerase sigma factors from *Bacillus subtilis* discriminate between overlapping promoters for a developmentally regulated gene. *Nature*, 302(5911), 800–804. <https://doi.org/10.1038/302800a0>
- Khadem, A., Lourenço, M., Delezie, E., Maertens, L., Goderis, A., Mombaerts, R., & Janssens, G. P. J. (2018). Comparing two techniques for viscosity measurements in poultry feedstuffs: does it render similar conclusions? *Poultry Science*, 97(9), 3138–3148. <https://doi.org/10.3382/ps/pey190>
- Khanna, K., Lopez-Garrido, J., Sugie, J., Pogliano, K., & Villa, E. (2021). Asymmetric localization of the cell division machinery during *Bacillus subtilis* sporulation. *ELife*, 10. <https://doi.org/10.7554/eLife.62204>
- Klobutcher, L. A., Ragkousi, K., & Setlow, P. (2006). The *Bacillus subtilis* spore coat provides “eat resistance” during phagocytic predation by the protozoan *Tetrahymena thermophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(1), 165–170. <https://doi.org/10.1073/pnas.0507121102>
- Koopman, N., Remijas, L., Seppen, J., Setlow, P., & Brul, S. (2022). Mechanisms and Applications of Bacterial Sporulation and Germination in the Intestine. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(6), 3405. <https://doi.org/10.3390/ijms23063405>
- Kreuzer-Martin, H. W., Lott, M. J., Dorigan, J., & Ehleringer, J. R. (2003). Microbe forensics: Oxygen and hydrogen stable isotope ratios in *Bacillus subtilis* cells and spores. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(3), 815–819. <https://doi.org/10.1073/pnas.252747799>
- Ku, Y., Yang, N., Pu, P., Mei, X., Cao, L., Yang, X., & Cao, C. (2021). Biocontrol Mechanism of *Bacillus subtilis* C3 Against Bulb Rot Disease in *Fritillaria taipaiensis* P.Y.Li. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.756329>
- Kunst, F., Ogasawara, N., Moszer, I., Albertini, A. M., Alloni, G., Azevedo, V., Bertero, M. G., Bessières, P., Bolotin, A., Borchert, S., Borriss, R., Boursier, L., Brans, A., Braun, M., Brignell, S. C., Bron, S., Brouillet, S., Bruschi, C. V., Caldwell, B., ... Danchin, A. (1997). The complete genome sequence of the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature*, 390(6657), 249–256. <https://doi.org/10.1038/36786>
- Laaberki, M.-H., & Dworkin, J. (2008). Role of Spore Coat Proteins in the Resistance of *Bacillus subtilis* Spores to *Caenorhabditis elegans* Predation. *Journal of Bacteriology*, 190(18), 6197–6203. <https://doi.org/10.1128/JB.00623-08>
- Lan, R., & Kim, I. H. (2019). Effects of *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis* complex on growth performance and faecal noxious gas emissions in growing-finishing pigs. *Journal*

- of the Science of Food and Agriculture*, 99(4), 1554–1560.
<https://doi.org/10.1002/jsfa.9333>
- Larparent Jean-Paul, C. N., C. M. I., L. J.-L. (1994). Les probiotiques en alimentation animale et humaine. *Lavoisier*.
- Lee, N.-K., Kim, W.-S., & Paik, H.-D. (2019). *Bacillus* strains as human probiotics: characterization, safety, microbiome, and probiotic carrier. *Food Science and Biotechnology*, 28(5), 1297–1305. <https://doi.org/10.1007/s10068-019-00691-9>
- 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>
- Lei, K., Li, Y. L., Yu, D. Y., Rajput, I. R., & Li, W. F. (2013). Influence of dietary inclusion of *Bacillus licheniformis* on laying performance, egg quality, antioxidant enzyme activities, and intestinal barrier function of laying hens. *Poultry Science*, 92(9), 2389–2395. <https://doi.org/10.3382/ps.2012-02686>
- Li, S., Wen, J., & Jia, X. (2011). Engineering *Bacillus subtilis* for isobutanol production by heterologous Ehrlich pathway construction and the biosynthetic 2-ketoisovalerate precursor pathway overexpression. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 91(3), 577–589. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3280-9>
- Lima, Lí. J. R., Almeida, M. H., Rob Nout, M. J., & Zwietering, M. H. (2011). Theobroma cacao L., ‘the food of the gods’: Quality determinants of commercial cocoa beans, with particular reference to the impact of fermentation. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51(8), 731–761. <https://doi.org/10.1080/10408391003799913>
- Logan, N. A. (2012). *Bacillus* and relatives in foodborne illness. *Journal of Applied Microbiology*, 112(3), 417–429. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.05204.x>
- López, D., Vlamakis, H., Losick, R., & Kolter, R. (2009). Cannibalism enhances biofilm development in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, 74(3), 609–618. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06882.x>
- Makowski, K., Leszczewicz, M., Broncel, N., Lipińska-Zubrycka, L., Głębski, A., Komorowski, P., & Walkowiak, B. (2021). Isolation, Biochemical Characterisation and Identification of Thermotolerant and Cellulolytic *Paenibacillus lactis* and *Bacillus licheniformis*. *Food Technology and Biotechnology*, 59(3), 325–336. <https://doi.org/10.17113/ftb.59.03.21.7096>
- Mallappa, R., Rokana, N., Duary, R., Panwar, H., Batish, V., & Grover, S. (2012). Management of metabolic syndrome through probiotic and prebiotic interventions. *Indian Journal of Endocrinology and Metabolism*, 16(1), 20. <https://doi.org/10.4103/2230-8210.91178>
- Malusá, E., & Vassilev, N. (2014). A contribution to set a legal framework for biofertilisers. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(15), 6599–6607. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5828-y>

- McKenney, P. T., Driks, A., & Eichenberger, P. (2013). The *Bacillus subtilis* endospore: assembly and functions of the multilayered coat. *Nature Reviews Microbiology*, 11(1), 33–44. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2921>
- Meisner, J., Wang, X., Serrano, M., Henriques, A. O., & Moran, C. P. (2008). A channel connecting the mother cell and forespore during bacterial endospore formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(39), 15100–15105. <https://doi.org/10.1073/pnas.0806301105>
- Meyer, A., and G. O. (1901). In: Gottheil, O. 'Botanische beschreibung einiger bodenbakterien.' *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr.*, 7, 680–691.
- Monteiro De Souza, P. (2010). Application of microbial-amylase in industry-a review. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41, 850–861.
- Moran Jr, C. P., Lang, N., LeGrice, S. F., Lee, G., Stephens, M., Sonenshein, A., Pero, J., & Losick, R. (1982). *Nucleotide Sequences that Signal the Initiation of Transcription and Translation in Bacillus subtilis* (Vol. 186).
- Muchová, K., Pospíšil, J., Kalocsaiová, E., Chromiková, Z., Žarnovičanová, S., Šanderová, H., Krásný, L., & Barák, I. (2024). Spatio-temporal control of asymmetric septum positioning during sporulation in *Bacillus subtilis*. *Journal of Biological Chemistry*, 300(6), 107339. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2024.107339>
- Nakamura, L. K., Roberts, M. S., & Cohan, F. M. (1999). Note: Relationship of *Bacillus subtilis* clades associated with strains 168 and W23: A proposal for *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* subsp. nov. and *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* subsp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 49(3), 1211–1215. <https://doi.org/10.1099/00207713-49-3-1211>
- Nakano, M. M., & Zuber, P. (1998). Anaerobic growth of a "strict aerobe" (*Bacillus subtilis*). *Annual Review of Microbiology*, 52(1), 165–190. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.52.1.165>
- Narsing Rao, M. P., Banerjee, A., Liu, G.-H., & Thamchaipenet, A. (2023). Genome-based reclassification of *Bacillus acidicola*, *Bacillus pervagus* and the genera *Heyndrickxia*, *Margalitia* and *Weizmannia*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 73(7). <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.005961>
- 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>
- Nicholson, W. L., Sun, D., Setlow, B., & Setlow, P. (1989). Promoter Specificity of oG-Containing RNA Polymerase from Sporulating Cells of *Bacillus subtilis*: Identification of a Group of Forespore-Specific Promoters. In *Journal of Bacteriology* (Vol. 171, Issue 5). <https://journals.asm.org/journal/jb>
- Nissle, A. (1918). The antagonistic treatment of chronic intestinal disorders with coli bacteria. *Medical Clinic*, 14(2), 29–33.

- Permatasari, N.U., & Hertadi. E. R. R. (2019). Molecular cloning and expression of levansucrase gene from *Bacillus licheniformis* BK1 isolated from Bledug Kuwu Mud Crater. *EurAsian Journal of BioSciences*, 13, 223–230.
- Ongena, M., & Jacques, P. (2008). *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends in Microbiology*, 16(3), 115–125. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2007.12.009>
- Orchidali. (2023, January 16). Le terme “probiotique” peut maintenant être utilisé sur les compléments alimentaires en France. <https://Science-Nutrition.Com/2023/01/16/Probiotic-Term-Can-Now-Be-Used-on-Food-Supplements-in-France/>.
- Food and Agricultural Organization/World Health Organization. (2001). « Report of a joint FAO/WHO expert consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. « Cordoba (Argentina): FAO/WHO (Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization).
- Osadchaia, A. I., Kudriavtsev, V. A., Safronova, L. A., Kozachko, I. A., & Smirnov, V. V. (1997). [Stimulation of growth and spore formation of *Bacillus subtilis* by optimization of carbohydrate nutrition during submerged cultivation]. *Prikladnaia Biokhimiia i Mikrobiologija*, 33(3), 321–324.
- Panwar, H., Calderwood, D., Grant, I. R., Grover, S., & Green, B. D. (2016). Lactobacilli possess inhibitory activity against dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4). *Annals of Microbiology*, 66(1), 505–509. <https://doi.org/10.1007/s13213-015-1129-7>
- Petrova, P., Arsov, A., Ivanov, I., Tsigoriyna, L., & Petrov, K. (2021). New Exopolysaccharides produced by *Bacillus licheniformis* 24 display substrate-dependent content and antioxidant activity. *Microorganisms*, 9(10), 2127. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9102127>
- Piggot, P. J., & Hilbert, D. W. (2004). Sporulation of *Bacillus subtilis*. *Current Opinion in Microbiology*, 7(6), 579–586. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2004.10.001>
- Popham, D. L., & Bernhards, C. B. (2015). Spore Peptidoglycan. *Microbiology Spectrum*, 3(6). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.TBS-0005-2012>
- Postma, P. W., Lengeler, J. W., & Jacobson, G. R. (1993). Phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria. *Microbiological Reviews*, 57(3), 543–594. <https://doi.org/10.1128/mr.57.3.543-594.1993>
- Predich, M., Nair, G., & Smith, I. (1992). *Bacillus subtilis* Early Sporulation Genes *kinA*, *spoOF*, and *spoOA* Are Transcribed by the RNA Polymerase Containing crH. In *Journal of Bacteriology* (Vol. 174, Issue 9). <https://journals.asm.org/journal/jb>
- Ragkousi, K., Cowan, A. E., Ross, M. A., & Setlow, P. (2000). Analysis of Nucleoid Morphology during Germination and Outgrowth of Spores of *Bacillus* Species. *Journal of Bacteriology*, 182(19), 5556–5562. <https://doi.org/10.1128/JB.182.19.5556-5562.2000>

- Ranji, P., Akbarzadeh, A., & Rahmati-Yamchi, M. (2015). Associations of Probiotics with Vitamin D and Leptin Receptors and their Effects on Colon Cancer. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 16(9), 3621–3627. <https://doi.org/10.7314/APJCP.2015.16.9.3621>
- Reagin, M. J., Giesler, T. L., Merla, A. L., Resetar-Gerke, J. M., Kapolka, K. M., & Mamone, J. A. (2003). TempliPhi: A Sequencing Template Preparation Procedure That Eliminates Overnight Cultures and DNA Purification. In *ABRF F R AB Journal of biomolecular techniques* (Vol. 14, Issue 2).
- Règlement (UE). (2019). Règlement (UE) 2019/1009 du parlement européen et du conseil du 5 juin 2019. *Journal Officiel de l'Union Européenne*.
- Rhee, M. S., Kim, J., Qian, Y., Ingram, L. O., & Shanmugam, K. T. (2007a). Development of plasmid vector and electroporation condition for gene transfer in sporogenic lactic acid bacterium, *Bacillus coagulans*. *Plasmid*, 58(1), 13–22. <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2006.11.006>
- Rodriguez Ayala, F., Bartolini, M., & Grau, R. (2020). The Stress-Responsive Alternative Sigma Factor SigB of *Bacillus subtilis* and Its Relatives: An Old Friend with New Functions. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 11). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01761>
- Roels, S., Driks, A., & Losick, R. (1992). Characterization of spoIVA, a Sporulation Gene Involved in Coat Morphogenesis in *Bacillus subtilis*. In *journal of bacteriology* (Vol. 174, Issue 2). <https://journals.asm.org/journal/jb>
- Romeo, T. (Ed.). (2008). *Bacterial Biofilms* (Vol. 322). Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-540-75418-3>
- Roy, A. (2018). A Review on the Biosurfactants: Properties, Types and its Applications. *Journal of Fundamentals of Renewable Energy and Applications*, 08(01). <https://doi.org/10.4172/2090-4541.1000248>
- Rozs, M., Manczinger, L., Vágvölgyi, C., & Kevei, F. (2001). Secretion of a trypsin-like thiol protease by a new keratinolytic strain of *Bacillus licheniformis*. *FEMS Microbiology Letters*, 205(2), 221–224. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2001.tb10951.x>
- Safitri, R., Priadie, B., Miranti, M., & Astuti, A. W. (n.d.). and *Pseudomonas putida* in bioremediation of wastewater in cisirung wastewater treatment plant. <https://cabidigitallibrary.org>
- Sanders, M. E., Morelli, L., & Tompkins, T. A. (2003). Sporeformers as Human Probiotics: *Bacillus*, *Sporolactobacillus*, and *Brevibacillus*. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2(3), 101–110. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2003.tb00017.x>
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors (DNA polymerase/nucleotide sequences/bacteriophage 4X174)* (Vol. 74, Issue 12).

- Schommer, V. A., Vanin, A. P., Nazari, M. T., Ferrari, V., Dettmer, A., Colla, L. M., & Piccin, J. S. (2023). Biochar-immobilized *Bacillus spp.* for heavy metals bioremediation: A review on immobilization techniques, bioremediation mechanisms and effects on soil. In *Science of the Total Environment* (Vol. 881). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.163385>
- Sella, S. R. B. R., Vandenberghe, L. P. S., & Soccol, C. R. (2015). *Bacillus atrophaeus*: main characteristics and biotechnological applications – a review. *Critical Reviews in Biotechnology*, 35(4), 533–545. <https://doi.org/10.3109/07388551.2014.922915>
- Seo, J. K., Park, T. S., Kwon, I. H., Piao, M. Y., Lee, C. H., & Ha, J. K. (2013). Characterization of Cellulolytic and Xylanolytic Enzymes of *Bacillus licheniformis* JK7 Isolated from the Rumen of a Native Korean Goat. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 26(1), 50–58. <https://doi.org/10.5713/ajas.2012.12506>
- 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. (2014). Spore Resistance Properties. *Microbiology Spectrum*, 2(5). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.TBS-0003-2012>
- Setlow, P., & Johnson, E. A. (2019). Spores and Their Significance. In *Food Microbiology* (pp. 23–63). ASM Press. <https://doi.org/10.1128/9781555819972.ch2>
- Shah, A. A., Hameed, A., & Hasan, F. (2007). Isolation, identification and optimization of bacitracin produced by *Bacillus sp.* In *Article in Pakistan Journal of Botany*. http://biology.kenyon.edu/Microbial_Biorealm/bacteria/gram-
- Shaner, N. C., Steinbach, P. A., & Tsien, R. Y. (2005). A guide to choosing fluorescent proteins. *Nature Methods*, 2(12), 905–909. <https://doi.org/10.1038/nmeth819>
- Shobharani, P., Padmaja, R. J., & Halami, P. M. (2015). Diversity in the antibacterial potential of probiotic cultures *Bacillus licheniformis* MCC2514 and *Bacillus licheniformis* MCC2512. *Research in Microbiology*, 166(6), 546–554. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2015.06.003>
- Sneath, P. H. A., McGowan, V., & Skerman, V. B. D. (1980). Approved Lists of Bacterial Names. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 30(1), 225–420. <https://doi.org/10.1099/00207713-30-1-225>
- Sonenshein, A. L. (2000). Control of sporulation initiation in *Bacillus subtilis*. *Current Opinion in Microbiology*, 3(6), 561–566. [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(00\)00141-7](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(00)00141-7)
- Souza, P. M. de, & Magalhães, P. de O. e. (2010). Application of microbial α -amylase in industry - A review. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41(4), 850–861. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822010000400004>

- Stoica, R.-M., Moscovici, M., Tomulescu, C., Cășărică, A., Băbeanu, N., Popa, O., & Kahraman, H. A. (2019). Antimicrobial compounds of the genus *Bacillus*: A review. *Romanian Biotechnological Letters*, 24(6), 1111–1119. <https://doi.org/10.25083/rbl/24.6/1111.1119>
- Storz, G., & Hengge-Aronis, R. (2010). *Bacterial stress responses*. ASM Press.
- Strauch, M., Webb, V., Spiegelman, G., & Hoch, J. A. (1990). The SpoOA protein of *Bacillus subtilis* is a repressor of the *abrB* gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(5), 1801–1805. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.5.1801>
- Sumi, H., Yanagisawa, Y., Yatagai, C., & Saito, J. (2004). *Bacillus Natto* as an Oral Fibrinolytic Agent: Nattokinase Activity and the Ingestion Effect of *Bacillus subtilis* natto. *Food Science and Technology Research*, 10(1), 17–20. <https://doi.org/10.3136/fstr.10.17>
- Sun, D., Fajardo-Cavazos, P., Sussman, M. D., Tovar-Rojo, F., Cabrera-Martinez, R.-M., & Setlow, P. (1991). Effect of Chromosome Location of *Bacillus subtilis* Forespore Genes on Their *spo* Gene Dependence and Transcription by Eo': Identification of Features of Good EorF-Dependent Promoters. In *Journal of bacteriology* (Vol. 173, Issue 24). <https://journals.asm.org/journal/jb>
- Tajabadi, N., Ebrahimpour, A., Baradaran, A., Rahim, R. A., Mahyudin, N. A., Manap, M. Y. A., Bakar, F. A., & Saari, N. (2015). Optimization of γ -aminobutyric acid production by *Lactobacillus plantarum* Taj-Apis362 from honeybees. *Molecules*, 20(4), 6654–6669. <https://doi.org/10.3390/molecules20046654>
- Tan, I. S., & Ramamurthi, K. S. (2014). Spore formation in *Bacillus subtilis*. *Environmental Microbiology Reports*, 6(3), 212–225. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12130>
- Tännler, S., Decasper, S., & Sauer, U. (2008). Maintenance metabolism and carbon fluxes in *Bacillus* species. *Microbial Cell Factories*, 7(1), 19. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-7-19>
- Tian, Z., Hou, L., Hu, M., Gao, Y., Li, D., Fan, B., Wang, F., & Li, S. (2022). Optimization of Sporulation Conditions for *Bacillus subtilis* BSNK-5. *Processes*, 10(6), 1133. <https://doi.org/10.3390/pr10061133>
- Tissier, H. (1900). *Recherches sur la flore intestinale des nourrissons : état normal et pathologique* (G Carre & C Naud, Eds.).
- Tzeng, Y.-M., Rao, Y. K., Tsay, K.-J., & Wu, W.-S. (2008). Effect of cultivation conditions on spore production from *Bacillus amyloliquefaciens* B128 and its antagonism to *Botrytis elliptica*. *Journal of Applied Microbiology*, 104(5), 1275–1282. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03683.x>
- Van Dijl, J. M., & Hecker, M. (2013). *Bacillus subtilis*: from soil bacterium to super-secreting cell factory. *Microbial Cell Factories*, 12(1), 3. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-12-3>
- Van Kranenburg, R., Van Hartskamp, M., Heintz, E. A. J., Van Mullekom, Ms. E. J. G., & Snelders, Mr. J. (2007). *Genetic modification of homolactic thermophilic bacilli* (Patent WO/2007/085443). European Patent Office.

- Veening, J., Igoshin, O. A., Eijlander, R. T., Nijland, R., Hamoen, L. W., & Kuipers, O. P. (2008a). Transient heterogeneity in extracellular protease production by *Bacillus subtilis*. *Molecular Systems Biology*, 4(1). <https://doi.org/10.1038/msb.2008.18>
- Veening, J., Igoshin, O. A., Eijlander, R. T., Nijland, R., Hamoen, L. W., & Kuipers, O. P. (2008b). Transient heterogeneity in extracellular protease production by *Bacillus subtilis*. *Molecular Systems Biology*, 4(1). <https://doi.org/10.1038/msb.2008.18>
- Veith, B., Herzberg, C., Steckel, S., Feesche, J., Maurer, K. H., Ehrenreich, P., Bäumer, S., Henne, A., Liesegang, H., Merkl, R., Ehrenreich, A., & Gottschalk, G. (2004). The complete genome sequence of *Bacillus licheniformis* DSM13, an organism with great industrial potential. *Microbial Physiology*, 7(4), 204–211. <https://doi.org/10.1159/000079829>
- Vergin, F. (1954). [Antibiotics and probiotics]. *Hippokrates*, 25(4), 116–119.
- Vidali, M. (2001). Bioremediation. An overview. *Pure and Applied Chemistry*, 73(7), 1163–1172. <https://doi.org/10.1351/pac200173071163>
- Wang, S., Hou, Q., Guo, Q., Zhang, J., Sun, Y., Wei, H., & Shen, L. (2020). Isolation and Characterization of a Deoxynivalenol-Degrading Bacterium *Bacillus licheniformis* YB9 with the Capability of Modulating Intestinal Microbial Flora of Mice. *Toxins*, 12(3), 184. <https://doi.org/10.3390/toxins12030184>
- Wang, Y., Du, W., Lei, K., Wang, B., Wang, Y., Zhou, Y., & Li, W. (2017). Effects of Dietary *Bacillus licheniformis* on Gut Physical Barrier, Immunity, and Reproductive Hormones of Laying Hens. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 9(3), 292–299. <https://doi.org/10.1007/s12602-017-9252-3>
- Warriner, K., & Waites, W. M. (1999). Enhanced sporulation in *Bacillus subtilis* grown on medium containing glucose:ribose. *Letters in Applied Microbiology*, 29(2), 97–102. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1999.00593.x>
- Waschkau, B., Waldeck, J., Wieland, S., Eichstädt, R., & Meinhardt, F. (2008). Generation of readily transformable *Bacillus licheniformis* mutants. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 78(1), 181–188. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-1278-0>
- Westers, L., Westers, H., & Quax, W. J. (2004). *Bacillus subtilis* as cell factory for pharmaceutical proteins: a biotechnological approach to optimize the host organism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1694(1–3), 299–310. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2004.02.011>
- Westphal, A. J., Price, P. B., Leighton, T. J., & Wheeler, K. E. (2003). Kinetics of size changes of individual *Bacillus thuringiensis* spores in response to changes in relative humidity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(6), 3461–3466. <https://doi.org/10.1073/pnas.232710999>
- Xu, Y., Yu, Y., Shen, Y., Li, Q., Lan, J., Wu, Y., Zhang, R., Cao, G., & Yang, C. (2021). Effects of *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* on growth performance, immunity, short chain fatty acid production, antioxidant capacity, and caecal microflora in broilers. *Poultry Science*, 100(9), 101358. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2021.101358>

- Yemchenko, Y., Bardova, K., Akimov, O., Levkov, A., Kostenko, H., Kostenko, V., Mishchenko, A., Solovyova, N., & Kostenko, V. (2024). Probiotic innovations: *Bacillus species* in dermatology and cosmetology. In *Surgical and Cosmetic Dermatology* (Vol. 16). Sociedade Brasileira de Dermatologia 1. <https://doi.org/10.5935/SCD1984-8773.2024160333>
- Zafar, A., Aftab, M. N., Din, Z. ud, Aftab, S., Iqbal, I., Shahid, A., Tahir, A., & Haq, I. ul. (2016). Cloning, Expression, and Purification of Xylanase Gene from *Bacillus licheniformis* for Use in Saccharification of Plant Biomass. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 178(2), 294–311. <https://doi.org/10.1007/s12010-015-1872-z>
- Zhao, J., Liu, S., Gao, Y., Ma, M., Yan, X., Cheng, D., Wan, D., Zeng, Z., Yu, P., & Gong, D. (2021). Characterization of a novel lipase from *Bacillus licheniformis* NCU CS-5 for applications in detergent industry and biodegradation of 2,4-D butyl ester. *International Journal of Biological Macromolecules*, 176, 126–136. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.01.214>
- Zhaolin, J. I., Huiwen, H. E., Huijuan, Z., Feng, H., Yunhui, T., Zhengwen, Y. E., & Jingyou, X. U. (2015). Horticultural Plant Journal the Biocontrol Effects of the *Bacillus licheniformis* W10 Strain and Its Antifungal Protein Against Brown Rot in Peach. *Horticultural Plant Journal*, 1(3), 131–138. <https://doi.org/10.16420/j.issn.2095-9885.2016-0011>
- Zheng, L., Halberg, R., Roels, S., Ichikawa, H., Kroos, L., & Losick, R. (1992). Sporulation regulatory protein gerE from *Bacillus subtilis* binds to and can activate or repress transcription from promoters for mother-cell-specific genes. *Journal of Molecular Biology*, 226(4), 1037–1050. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(92\)91051-P](https://doi.org/10.1016/0022-2836(92)91051-P)

Annexe

Tableau 1. Liste des communications scientifiques

Date	Type de communication	Evènements	Titre
Avril 2025	Article scientifique	Revue BASE	A new tool for monitoring and optimizing the sporulation of probiotic <i>Bacillus</i> for Industrial applications
28-30 octobre 2024 (Virtuel)	Présentation orale	Subtillery 2024	A New Tool to optimize Sporulation of Probiotic <i>Bacillus sp</i> for an Industrial use
30 mai 2024 (Louvain-la-neuve)	Poster	Interuniversity PhD day	<i>SpoII</i> E promoter fused to <i>gfp</i> gene: a good reporter promoter to monitor sporulation initiation in <i>Bacillus sp</i> .
24 novembre 2023 (Liège)	Poster	EDT SFMBBM	<i>SpoII</i> E promoter fused to <i>gfp</i> gene: a good reporter promoter to monitor sporulation initiation in <i>Bacillus sp</i> .
27-30 juin 2023 (Virtuel)	Présentation orale	EMBO/EMBL Symposium: New approaches and concepts in microbiology (VP)	Influence of the carbon source on expression of sporulation gene <i>SpoII</i> E in <i>Bacillus</i> species
3/2/2023 (Liège)	Poster	InBios day 6th	Influence of the carbon source on sporulation gene <i>spoII</i> E in <i>Bacillus species</i>
8 - 11 Février 2023 Heidelberg, Germany (Virtuel)	Abstract	EMBO Workshop In-situ structural biology: From cryo-EM to multi-scale modelling	Influence of the carbon source on sporulation genes in <i>Bacillus species</i>
19-22 Septembre 2022 (Virtuel)	Présentation orale	Subtillery 2022	Influence of the carbon source on sporulation genes in <i>Bacillus species</i>
2019 (Liège)	Poster	InBios Day	Influence of the carbon source on sporulation genes in <i>Bacillus species</i>
19-22 Septembre 2022 (Virtuel)	Abstract	EMBL2022	Influence of the carbon source on sporulation genes in <i>Bacillus species</i>