

Modélisation de la sporulation de Bacillus subtillis BSB1 et liens physiologiques avec les cinétiques de croissance Emilie Gauvry

▶ To cite this version:

Emilie Gauvry. Modélisation de la sporulation de Bacillus subtillis BSB1 et liens physiologiques avec les cinétiques de croissance. Microbiologie et Parasitologie. Université de Bretagne occidentale - Brest, 2017. Français. NNT: 2017BRES0140. tel-01761913

HAL Id: tel-01761913 https://theses.hal.science/tel-01761913

Submitted on 9 Apr 2018 $\,$

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers. L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



UNIVERSITE BRETAGNE LOIRE

THÈSE / UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE

sous le sceau de l'Université Bretagne Loire

pour obtenir le titre de DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE Mention : Microbiologie, virologie, parasitologie École Doctorale EGAAL

présentée par Emilie Gauvry

Préparée au Laboratoire Universitaire de Biodiversité et d'Ecologie Microbienne LUBEM EA 3882

Modélisation de la sporulation de *Bacillus subtilis* BSB1 et liens physiologiques avec les cinétiques de croissance Thèse soutenue le 13 décembre 2017 devant le jury composé de :

Véronique BROUSSOLLE

Chargée de Recherche, UMR SQPOV - INRA Avignon / Examinatrice Louis COROLLER Professeur, Université de Bretagne Occidentale / Examinateur Michel GOHAR Chargé de recherche, Institut MICALIS, Pôle RISQUES - INRA / Rapporteur Matthieu JULES Professeur de l'enseignement supérieur, AgroParisTech / Examinateur Ivan LEGUERINEL Professeur, Université de Bretagne Occidentale / Directeur de thèse Anne-Gabrielle MATHOT Maitre de conférence, Université de Bretagne Occidentale / Examinatrice Jérôme MOUNIER Professeur, Université de Bretagne Occidentale / Examinateur Jean-Marie PERRIER-CORNET Professeur, Université de Dijon / Rapporteur

A mes parents ...

Table des matières

REMERCIEMENTS	8
INTRODUCTION GENERALE	12
Contexte	
Objectits Références	15 17
CHAPITRE 1 : ETAT DE L'ART SUR LA SPORULATION : PHYSIOLOGIE ET MODELES PREVISIONNELS	20
environment	00 21
1.1. Abstract	
1.2. Introduction	22
1.3. Sporulation triggers	23
1.3.1. Nutrient starvation	23
1.3.2. Quorum sensing	25
1.4. Environmental factors that modulate sporulation	27
1.4.1. Generalities on the effects of environmental factors on sporulation initiation	27
1.4.2. Effects of environmental factors	28
1.5. Combined effects of environmental factors throughout the food chain	32
1.5.1. The origin of spore prevalence in raw materials	32
1.5.2. Sporulation on equipment at the origin of cross-contamination	33
1.5.3. Complexity of sporulation niches	35
1.6. Conclusions and insights	36
1.7. References	37
Partie 2: Prévoir la sporulation bactérienne 2.1. La microbiologie prévisionnelle: un outil de gestion des risques en agroalimentaire	43 43
2.1.1. La microbiologie prévisionnelle : décrire et prévoir un processus biologique	43
2.1.2. Un exemple : la prévision de la croissance bactérienne	44
2.1.3. Les différentes catégories de modèles : définitions et caractéristiques	46
2.1.4. Enjeux en microbiologie prévisionnelle	48
2.2. Les modèles prévisionnels de sporulation	49
2.2.1. Modèles mécanistes de sporulation	49
2.2.2. Modèles phénoménologiques de sporulation : les modèles cinétiques	50
2.2.3. Vers des modèles hybrides: les modèles cinétiques de sporulation liés à la croissance végé	tative
	51
2.2.4. Comparaison des modèles : avantages et inconvénients	53
2.3. Références	57
Conclusions du chapitre 1	60
Annexe: Bacillus subtilis: un modèle bactérien d'étude	61
Références complémentaires	62

CHAPITRE 2: DEVELOPPEMENT D'UN MODELE CINETIQUE DE CROISSANCE-SPORULATION	64
1. Introduction et objectifs	65
2. Differentiation of vegetative cells into spores: a kinetic model applied to Bacillus subtilis	66
2.1. Abstract	66
2.2. Importance	67
2.3. Introduction	67
2.4. Materials and methods	68
2.4.1. Biological material and strain storage	68
2.4.2. Monitoring the kinetics of growth, sporulation and fluorescence	69
2.4.3. Development of the growth-sporulation model: theory	70
2.4.4. Methodology to assess the growth and the sporulation parameters	72
2.4.5. Statistical procedures and analysis	74
2.5. Results	75
2.5.1. Description of the growth, fluorescence and sporulation kinetics of <i>B. subtilis</i> BSB1 in favorable conditions for sporulation	75
2.5.2. Effects of temperature on the growth and sporulation abilities of <i>B. subtilis</i> BSB1	76
2.6. Discussion	79
2.6.1. A kinetic model of growth and sporulation which accurately describes the growth and sporulation curves	79
2.6.2. The fluorescence kinetics of the strain SpoIIAA-gfp provide qualitative and quantitative data on the sporulation behavior	79
2.6.3. Effects of environmental factors on the sporulation behavior	80
2.7. Conclusions	81
3. Focus 1 : Développement du modèle de croissance-sporulation: stratégie	82
3.1. Définir le modèle à développer : exigences, pré-requis et contraintes	82
3.2. Hypothèses sur le processus de sporulation	83
3.3. Le développement du modèle: différentes sous-populations co-existent dans une population bactérienne en cours de culture.	83
4. Focus 2 : Choix de la loi de probabilité pour la description de la probabilité d'engagement en sporulation a cours du temps	u .86
4.1. Rappel du contexte et principe de la stratégie utilisée	86
4.2. Méthode	87
4.2.1. Acquisition des cinétiques de croissance, de sporulation et de fluorescence.	87
4.2.2. Lois de probabilité testées	88
4.2.3. Ajustement des lois de probabilité	90
4.2.4. Critères de choix du meilleur modèle de probabilité	91
4.3. Résultats	91
4.3.1. Ajustement des cinétiques de fluorescence avec les 4 lois de probabilité	91
4.3.2. Signification biologique des paramètres	92
4.3.3. Ajustement des cinétiques de croissance-sporulation avec la loi de Weibull et la loi gaussienne	92 1
	4

4.4. Discussion et conclusion	
5. Focus 3: Comparaison du modèle de croissance-sporulation avec les modèles logistiques de sp littérature	oorulation de la 97
5.1. Méthode	
5.2. Résultats et discussion	
Conclusions du chapitre 2	
7. References	

CHAPITRE 3 : CARACTERISATION DE LA CROISSANCE DE Bacillus subtilis BSB1	108
1. Introduction	109
2. Determination of the cardinal values of growth of <i>Bacillus subtilis</i> BSB1 with a classical factorial design and sequential D-optimal design	l a L10
2.1. Abstract	110
2.2. Introduction	111
2.3. Material and methods1	112
2.3.1. Bacterial strain and conservation1	112
2.3.2. Medium preparation, bacterial cultures and monitoring of growth1	112
2.3.3. Models of growths1	L13
2.3.4. The factorial design1	L15
2.3.5. Computation of the optimal design1	L15
2.3.6. Data processing1	L18
2.4. Results and discussion1	L19
2.6. Conclusions1	123
3. Résultats complémentaires1	123
3.1. Introduction1	123
3.2. Matériels et méthodes1	124
3.3. Résultats et discussion1	125
3.3.1. Le plan factoriel1	125
3.3.2. Le plan D-optimal1	126
4. Conclusions du chapitre 3 1	127
5. Références1	29

CHAPITRE 4: EFFETS DES FACTEURS ENVIRONNEMENTAUX SUR LA CROISSANCE ET LA SPORULATION DE

Bacillus subtilis BSB1	132
1. Introduction	133
2. Modeling of the effects of temperature, pH and water activity, on the growth and sporulation abilities of <i>Bacillus subtilis</i> BSB1	134
2.1. Abstract	134
2.2. Introduction	135
2.3. Materials and methods	136

2.3.1. Biological material .	
2.3.2. Assessment of the in	npact of temperature, pH and water activity on growth136
2.3.3. Assessment of the in sporulation abilities	npact of pH, water activity and temperature on growth and
2.3.4. Primary and second	ary modellings138
2.3.5. Fitting of the growtl growth and sporulation	and sporulation curves and estimation of the cardinal values of
2.4. Results	
2.4.1. Characterization of water activity	the growth of <i>B. subtilis</i> BSB1 according to temperature, pH and
2.4.2. Prediction of the eff Bacillus subtilis BSB1	ects of environmental factors on the growth and sporulation of
2.5. Discussion	
3. Conclusions du chapitre 4	

1. Introduction		159
2. Matériel et mét	hodes	160
2.1. Maté	riel biologique et conservation des souches	160
2.2. Cond	litions testées	160
2.3. Suivi	de la croissance et de la sporulation	161
2.4. Mode	èles de croissance et de sporulation	162
2.	4.1. Modèles cinétiques de croissance, mort et sporulation bactériennes	162
2.	4.2. Modèle cardinal de croissance-sporulation	163
2. cc	.5.1. Prévision des cinétiques de croissance-sporulation de <i>B. subtilis</i> BSB1 dans des onditions et des milieux de culture différents	164
2.	5.2. Analyses statistiques : ajustements et erreurs de prévision	165
3. Résultats et dise	cussion	168
3.1. Evalu cinétique	uation de la robustesse des modèles de croissance et de sporulation pour prévoir les es de <i>B. subtilis</i> BSB1 dans des conditions et milieux de culture différents	168
3.	1.1. Effet de la condition de culture : fermenteur et erlen en milieu BHI	168
3.	1.2. Effet de la matrice : BHI, LB et lactosérum en erlen	168
3. m	1.3. Prévision des effets de la température sur la croissance et la sporulation dans les trois natrices.	s 171
3.2 Evalua cinétique	ation de la robustesse des modèles de croissance et de sporulation pour prévoir les es de <i>B. subtilis</i> BSB1 dans des conditions dynamiques de pH et de température	174
3. de	2.1. Méthodologie : comment évolue la probabilité de sporuler en fonction des changeme es facteurs environnementaux ?	ents 174
3. dy	2.2. Description et prévision des cinétiques de croissance-sporulation en conditions ynamiques de température.	175

3.2.3. Description et prévision des cinétiques de croissance-sporulation en conditions dynamiques de pH
3.3. Extrapolation des modèles de croissance et de sporulation pour la souche <i>Bacillus licheniformis</i> Ad978
3.3.1. Evaluation de la robustesse du modèle cinétique de croissance-sporulation pour décrire les cinétiques de <i>B. licheniformis</i> Ad978
3.3.2. Evaluation de l'impact des facteurs environnementaux sur les paramètres de croissance et de sporulation de <i>B. licheniformis</i> Ad978
3.3.3. Quel est le comportement général de sporulation des bactéries sporulées ?
4. Conclusion
5. Références
CONCLUSION GENERALE : SYNTHESE DES RESULTATS ET PERSPECTIVES
Perspectives
Références
VALORISATIONS DES TRAVAUX DE THESE
1. Publication avec comité de lecture 207
2. Publications en préparation
3. Communications orales
4. Communication affichée 208
ACTIVITES D'ENCADREMENT ET D'ENSEIGNEMENT
Activités d'enseignement
Encadrement de stagiaires
Résumé
AbstractErre ur ! Signet non défini.

REMERCIEMENTS

Ah! Mon Spoki ...



Mes premiers remerciements vont à M. Emmanuel Coton pour m'avoir accueillie au sein du LUBEM et pour m'avoir donné l'opportunité de travailler sur ce projet durant ces trois années.

J'exprime ma gratitude aux membres du jury de ma thèse : M. Perrier-Cornet, M. Gohar, Mme Broussolle, M. Jules, M. Mounier, Mme Mathot, M. Coroller et M. Leguérinel qui ont évalué ce travail.

Je tiens tout particulièrement à remercier mon directeur de thèse, le professeur Ivan Leguérinel pour avoir été le « chef de famille », car le LUBEM est une grande famille scientifique. Merci à toi pour avoir dirigé ces travaux mais aussi pour tes conseils, ta positivité, tes encouragements dans les moments de doute et de m'avoir toujours fait ressentir que tu avais confiance en moi et mon travail.

Viennent ensuite « Maman et Papa scientifiques », Mme Anne-Gabrielle Mathot et M. Louis Coroller ...

Un grand merci à « Maman-physio » ! Merci Anne-Gab, pour les discussions que nous avons pu avoir, pour m'avoir remise sur les rails de la physiologie bactérienne quand les maths commençaient à m'envahir un peu trop. Je te remercie pour ton investissement et le temps que tu m'as toujours accordé. Je félicite ton œil de lynx pour avoir déniché toutes les erreurs de ce document que je ne voyais plus. Je profite également de cette occasion pour te faire ces excuses par écrit : pardon pour l'odeur J'aurais aimé travailler avec une bactérie qui sent la rose.

Louis, « Papa-modèles » ... Merci pour TOUT ce que tu m'as apporté pendant ces trois années. Que ce soit en statistiques, en modélisation, en physio ou dans l'art de communiquer, j'ai beaucoup appris et tu as toujours su me guider pour me faire avancer (« Et pourquoi ? » ; « Qu'est-ce que tu as voulu dire ? », « Roger, on a un problème », « devise de l'OM : droit au but ! », « et GM, elle comprendrait ? »...). Je te remercie d'avoir bouleversé les codes spatio-temporels et d'avoir toujours réussi à mettre 36 h dans ta journée, 8 jours dans ta semaine et 400 jours dans ton année pour prendre le temps de t'investir à fond dans ce projet ! Je souhaite aussi te remercier pour ta bonne humeur et ... ton rire inimitable et communicateur ! J'en profite également pour remercier ta belle-maman qui a été d'un grand secours pour éradiquer tous ces contaminants orthographiques qui ont longtemps persisté dans ce manuscrit !

Dans la famille LUBEM, je remercie également Olivier Couvert (tonton Fox) qui a toujours eu un regard critique sur mes travaux et a été de bons conseils. Merci d'avoir fait garde d'enfants pendant les parties de Quake et pour les séances de défoulement au badminton. Je remercie Noémie pour sa bonne humeur, sa pèche (et ce, dès le matin), pour les conversations de couloir sur les *Bacillus* et d'avoir aussi eu le rôle de confidente quand j'avais besoin de parler. Je remercie également tous les doyens doctorants que j'ai côtoyés qui ont été collègues, amis et confidents. Je pense à toi Pinpin, tu étais ce petit grain de folie rafraichissant qui a gâché bien des chansons sur toutes les radios de France ! Mc Gyver, combien de tes expressions farfelues te vaudraient des droits d'auteur. Narjes, discrétion, efficacité et rigueur, tout en sympathie ont été exemplaires pour moi et ... Clément the 5th, grand frère scientifique, toujours la banane, toujours la « petite » touche d'humour, toujours le mot qui remonte le moral, et toujours partant pour un café... bref, toujours plus quoi ! J'exprime une pensée également pour les nouveaux doctorants (Lamia et « Junior ») qui ne savent pas encore ou sont en train de découvrir la chance qu'ils ont d'effectuer leur thèse dans cet environnement.

Je tiens également à remercier les stagiaires que j'ai encadrés pendant ma thèse : Rania, Yoann, Typhaine et Charlène. Merci pour votre contribution à ce travail et à votre contribution dans la vie de laboratoire. Votre passage au LUBEM a été plus qu'apprécié !

J'ai une pensée particulière pour Stéphanie Guegan, qui a été la (jeune) maman du LUBEM pendant mes deux premières années de thèse. Voisine de bureau, collègue et confidente... Quel vide tu as laissé quand tu as dû nous quitter ! Heureusement, la zumba nous réunit pour une petite heure par semaine de pur plaisir ! Je remercie également Anne Levant pour sa gentillesse et pour la gestion de toutes les parties administratives auxquelles on ne comprend rien. Lisa, tu as repris le flambeau à merveilles, un bon de livraison est toujours un bon prétexte pour venir papoter un peu avec toi.

Dans la famille plus éloignée de l'UMT Spore-risk je tiens également à remercier les collègues de l'ADRIA : Florence, Danièle, Véronique, ..., avec qui cela a toujours été un réel plaisir d'échanger et de partir en conférences avec vous.

La thèse n'a pas seulement été un projet de recherche mais aussi du monitorat en TP de biochimie. Je tiens donc à remercier tous les collègues qui ont été de bons conseils et qui m'ont épaulée pour mes débuts en enseignement (Isabelle, Benjamin, Laurent, Mehdi, Camille, ...merci !).

Mes remerciements vont également à toutes les personnes avec qui j'ai eu l'occasion de travailler : Jean-Michel, Dominique, toujours disponibles et toujours un peu de temps à m'accorder pour papoter de choses et d'autres, Maude, cuisinière et blagueuse hor pair, M. Jean-Pierre Gauchi pour m'avoir fait découvrir un petit morceau de l'univers des plans d'expériences. Merci aux collègues du LABSTIC dont leur présence chaleureuse a toujours été un lot de réconfort (Roua, Tina, Pierre ...). Merci également aux membres du comité de pilotage de thèse qui ont eu regard critique sur mes travaux et ont contribu au bon déroulement de la thèse (Véronique Broussolle, Matthieu Jules, Frédéric Carlin, Eric Mettler). Je remercie toutes les personnes qui m'ont très bien accueillie lors de mon stage à l'INRA de Jouy-en-Josas. Merci à toi Matthieu pour m'avoir donné l'opportunité d'acquérir des compétences en biologie moléculaire et d'avoir fait la rencontre de toute l'équipe. Ces deux mois ont été enrichissants sur les points scientifiques et humains. C'est avec plaisir que je reviendrai agrémenter votre pause café de kouign amann et de galettes bretonnes. Merci à Loïc et Loona et aux collègues de LUBEM Plouzané. Je pense également à tous les stagiaires qui sont passés au labo : Mykee, Vincent, Karine, Aurélie, Huang, Thibaut, Sten, et Epilut ! Sacré Epilut, je crois qu'on n'aura jamais autant ris depuis que tu es parti vivre ta propre aventure de thésard à Bordeaux !

Parce qu'une thèse ne peut aboutir sans un épanouissement personnel, mes dernières pensées vont à mon entourage.

A mes amis les plus sincères (Elo, Alice, Nico, Seb et Julien) qui ont toujours répondu présents. A celle qui me côtoie tous les jours, Krispy, tu ne liras pas ces lignes mais je suis bien heureuse d'avoir eu ces petits 5 kg de réconfort tous les jours. Alex (Doud'...) tu as eu la malchance de me rencontrer à la période la plus délicate de ma thèse. Merci de m'avoir supportée et d'avoir été l'œil de lynx dans la correction d'une grosse moitié de ma thèse !

Finalement, c'est avec beaucoup d'émotion que je consacre ces dernières lignes pour **ma famille**. Si j'en suis arrivée là, c'est grâce à vous ! Vous m'avez toujours poussée, motivée, encouragée et soutenue dans mes choix, LE soutien moral sans failles.

INTRODUCTION GENERALE

Contexte

Les bactéries sporulées sont à l'origine de risques sanitaires et d'altération des produits alimentaires. Les deux espèces bactériennes sporulées *Bacillus cereus* et *Clostridium perfringens* sont en moyenne responsables de 30% des toxi-infections alimentaires collectives en France [1]. Plusieurs genres de bactéries sporulées sont responsables d'altération des produits alimentaires. Parmi ceux-ci, on retrouve les genres *Bacillus, Geobacillus, Thermoanaerobacterium* ou encore *Moorella*. Les bactéries d'altération produisent des enzymes conduisant à des modifications des propriétés organoleptiques des produits comme le changement de couleur, de texture, de goût ou la production d'odeurs désagréables [2–4].

Les sources de contamination des produits alimentaires par les bactéries sporulées sont diverses. Les spores bactériennes sont retrouvées à de fortes concentrations dans le sol, jusqu'à 10⁵ - 10⁶ spores/g de sol pour *Bacillus cereus* et *Clostridium spp*. [5]. Les formes végétatives des bactéries sporulées peuvent se développer dans de larges gammes de facteurs environnementaux (acidité, température, concentrations en sels ou en sucres, disponibilité en oxygène) et sont capables de former des biofilms et des spores qui sont résistants aux traitements physiques ou chimiques ainsi qu'aux plans de nettoyage-désinfection appliqués en industrie agroalimentaire. De par toutes ces propriétés physiologiques, les bactéries sporulées peuvent s'installer et persister dans l'environnement industriel et constituent de nouvelles sources de contamination dans l'industrie [6]. Le niveau de contamination des produits dépend également des pratiques de transport et d'hygiène [7] et du mode de conditionnement, sous atmosphère modifiée par exemple [8].

L'enjeu pour les industriels est de limiter l'occurrence des bactéries sporulées dans les produits finis et même d'éliminer les agents pathogènes. L'occurrence des bactéries sporulées dans l'environnement devient alors un problème complexe puisqu'il faut limiter leur présence sous leurs différents états physiologiques (végétative, sporulée ou de biofilms). Il est donc nécessaire de comprendre les différentes étapes du cycle de vie de ces bactéries afin de trouver des leviers qui permettent de maitriser la flore sporulée.

Pour maitriser la croissance bactérienne, la formation de biofilms, la sporulation et la résistance des spores, deux approches peuvent être utilisées. Une approche curative consiste à appliquer des traitements (thermiques, chimiques) permettant d'éliminer les bactéries. Cependant, ces méthodes ne sont pas toujours efficaces pour éliminer les spores ou les biofilms. A l'inverse, une approche préventive consiste à anticiper les différents

comportements bactériens en déterminant les conditions qui leur sont favorables ou défavorables. Pour anticiper ces processus biologiques il faut être capable de les prévoir en fonction des conditions environnementales rencontrées par le microorganisme tout au long de la chaine alimentaire. Cette seconde approche utilise les outils de la microbiologie prévisionnelle: des modèles mathématiques permettent de prévoir un phénomène biologique au cours du temps (modèles primaires ou cinétiques) et en fonction des conditions environnementales (modèles secondaires). Ces modèles sont ensuite mis à la disposition des utilisateurs en créant des outils de prévision des comportements bactériens. Par exemple, le logiciel Sym'Previus (*https://symprevius.eu/fr/*) est un outil d'aide à l'expertise en microbiologie alimentaire, reconnu par les autorités, les services de contrôle comme l'institut de veille sanitaire, et utilisé par la communauté scientifique et par les industriels.

Des modèles mathématiques permettent de décrire, et même de prévoir les différentes étapes du cycle de vie des bactéries sporulées (Fig. A).



Fig. A. Etapes du cycle de vie des bactéries sporulées

La croissance bactérienne est le comportement bactérien le plus étudié. De nombreux modèles prévoyant la croissance en fonction des conditions environnementales ont été développés et sont applicables pour différents milieux et matrices alimentaires [9–11]. Des modèles permettent également de prévoir la résistance des spores et leur reprise de croissance suite à des traitements physiques, notamment la température [12–14]. La capacité de germination des spores et leur reprise de croissance en fonction de l'environnement sont de plus en plus étudiées et des modèles ont été développés pour décrire ces comportement [15, 16]. Des

modèles cinétiques de sporulation ont été proposés [17, 18] mais sont encore peu utilisés. Même si de plus en plus d'études s'intéressent aux effets des facteurs environnementaux sur la sporulation bactérienne [17, 19], aucun modèle permettant de prévoir ces effets n'a été développé à notre connaissance.

L'environnement industriel peut être propice à la formation de spores. Des cas de sporulation ont été observés au cours de procédés de fabrication de produits laitiers [20, 21]. La sporulation conduit à l'augmentation de la charge en spores sur les lignes de fabrication, dans les ingrédients et dans les produits alimentaires en cours de stockage. Par ailleurs, les conditions environnementales dans lesquelles les spores sont formées ont un impact sur les propriétés des spores, notamment leur résistance au traitement thermique [22, 23]. Les spores produites à de hautes températures seront plus résistantes à des traitements thermiques subséquents que des spores nouvellement formées au cours du procédé alimentaire peuvent être résistantes à des traitements physiques ou chimiques subséquents [23]. Cette problématique de sporulation dans l'environnement industriel soulève alors ces questions : (i) Quelles sont les conditions environnementales favorables à la sporulation ? (ii) Existe-t-il des procédés de fabrication au cours desquels la sporulation peut avoir lieu ? (iii) Peut-on prévoir la sporulation en fonction des conditions environnementales ? Pour répondre à ces questions, il faut être capable de prévoir la sporulation en fonction des conditions environnementales.

Objectifs

Ce travail de thèse a pour objectif de répondre à la problématique générale soulevée: « comment prévoir la sporulation en agroalimentaire ? » Pour atteindre cet objectif, plusieurs questions scientifiques ont été posées et seront traitées sous forme de cinq chapitres (Fig. B) qui sont, pour la plupart constitués d'articles scientifiques publiés dans des journaux internationaux, à l'étape de soumission dans un journal, ou en cours de préparation.

L'objectif du chapitre 1 est de montrer que la physiologie de la sporulation bactérienne permet d'identifier les principaux facteurs environnementaux qui impactent ce comportement, permettant ainsi de situer les niches de sporulation dans la chaine alimentaire. En parallèle, un état des lieux des modèles prévisionnels de sporulation permet d'identifier les besoins en microbiologie prévisionnelle pour prévoir la sporulation en agroalimentaire.

Le chapitre 2 est dédié à la description de la sporulation sur des aspects dynamiques et quantitatifs, conduisant à la proposition d'un nouveau modèle cinétique de sporulation.

Le chapitre 3 est consacré à la caractérisation de la croissance de la souche d'étude *Bacillus subtilis* BSB1. L'objectif est d'évaluer les effets du pH, de la température et de l'activité de l'eau sur la croissance bactérienne.

Le chapitre 4 a pour objectif d'évaluer, de décrire et de prévoir par modélisation, la sporulation bactérienne en fonction du pH, la température et l'a_w.

Dans le chapitre 5, les modèles de sporulation développés sont testés dans des milieux de culture et conditions environnementales différents et pour une autre espèce, *Bacillus licheniformis* Ad978, afin d'évaluer la robustesse et les limites des modèles développés.



Fig. B : Diagramme récapitulatif du plan de thèse. Les numéros entourés correspondent aux 5 chapitres de la thèse.

Références

- [1] INVS. Données relatives aux toxi-infections alimentaires collectives déclarées en France en 2013 2013. http://www.invs.sante.fr/Dossiers-thematiques/Maladiesinfectieuses/Maladies-a-declaration-obligatoire/Toxi-infections-alimentairescollectives/Donnees-epidemiologiques (accessed August 20, 2015).
- [2] André S, Zuber F, Remize F. Thermophilic spore-forming bacteria isolated from spoiled canned food and their heat resistance. Results of a French ten-year survey. Int J Food Microbiol 2013;165:134–43. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2013.04.019.
- [3] André S, Vallaeys T, Planchon S. Spore-forming bacteria responsible for food spoilage. Res Microbiol 2017;168:379–87. doi:10.1016/j.resmic.2016.10.003.
- [4] Lücking G, Stoeckel M, Atamer Z, Hinrichs J, Ehling-Schulz M. Characterization of aerobic spore-forming bacteria associated with industrial dairy processing environments and product spoilage. Int J Food Microbiol 2013;166:270–9. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2013.07.004.
- [5] Lund BM. Anaerobes in relation to foods of plant origin. Soc Appl Bacteriol Symp Ser 1986;13:351–72.
- [6] Simmonds P, Mossel BL, Intaraphan T, Deeth HC. Heat resistance of Bacillus spores when adhered to stainless steel and its relationship to spore hydrophobicity. J Food Prot 2003;66:2070–5.
- [7] Carlin F. Origin of bacterial spores contaminating foods. Food Microbiol 2011;28:177– 82.
- [8] Pirttijärvi TS, Graeffe TH, Salkinoja-Salonen MS. Bacterial contaminants in liquid packaging boards: assessment of potential for food spoilage. J Appl Bacteriol 1996;81:445–58.
- [9] Augustin JC, Rosso L, Carlier V. A model describing the effect of temperature history on lag time for *Listeria monocytogenes*. Int J Food Microbiol 2000;57:169–81.
- [10] Pinon A, Zwietering M, Perrier L, Membre J-M, Leporq B, Mettler E, *et al.* Development and validation of experimental protocols for use of cardinal models for prediction of microorganism growth in food products. Appl Environ Microbiol 2004;70:1081–7.
- [11] Rosso L, Lobry JR, Bajard S, Flandrois JP. Convenient model to describe the combined effects of temperature and pH on microbial growth. Appl Environ Microbiol 1995;61:610–6.

- [12] Baril E. Quantification de l'influence de l'environnement sur la formation et la thermorésistance des spores bactériennes. 2011.
- [13] Mafart P, Leguerinel I. Modeling combined effects of temperature and pH on heat resistance of spores by a linear-Bigelow equation. J Food Sci 1998;63:6–8.
- [14] Tola YB, Ramaswamy HS. Combined effects of high pressure, moderate heat and pH on the inactivation kinetics of *Bacillus licheniformis* spores in carrot juice. Food Res Int 2014;62:50–8.
- [15] Mtimet N, Trunet C, Mathot A-G, Venaille L, Leguérinel I, Coroller L, *et al.* Modeling the behavior of *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 12980 throughout its life cycle as vegetative cells or spores using growth boundaries. Food Microbiol 2015;48:153–62.
- [16] Trunet C, Mtimet N, Mathot A-G, Postollec F, Leguerinel I, Sohier D, et al. Modeling the recovery of heat-treated *Bacillus licheniformis* Ad978 and *Bacillus weihenstephanensis* KBAB4 spores at suboptimal temperature and pH using growth limits. Appl Environ Microbiol 2015;81:562–8.
- [17] Baril E, Coroller L, Couvert O, El Jabri M, Leguerinel I, Postollec F, *et al.* Sporulation boundaries and spore formation kinetics of *Bacillus* spp. as a function of temperature, pH and a_w. Food Microbiol 2012:79–86.
- [18] Das S, Sen R. Kinetic modeling of sporulation and product formation in stationary phase by *Bacillus coagulans* RK–02 vis-à-vis other Bacilli. Bioresour Technol 2011;102:9659– 67.
- [19] Monteiro SM, Clemente JJ, Henriques AO, Gomes RJ, Carrondo MJ, Cunha AE. A procedure for high-yield spore production by *Bacillus subtilis*. Biotechnol Prog 2005;21:1026–31.
- [20] Burgess SA, Brooks JD, Rakonjac J, Walker KM, Flint SH. The formation of spores in biofilms of *Anoxybacillus flavithermus*. J Appl Microbiol 2009:1012–8.
- [21] Scott SA, Brooks JD, Rakonjac J, Walker KMR, Flint SH. The formation of thermophilic spores during the manufacture of whole milk powder. Int J Dairy Technol 2007:109–17.
- [22] Baril E, Coroller L, Couvert O, Leguérinel I, Postollec F, Boulais C, *et al.* Modeling heat resistance of *Bacillus weihenstephanensis* and *Bacillus licheniformis* spores as function of sporulation temperature and pH. Food Microbiol 2012:29–36.
- [23] Leguérinel I, Couvert O, Mafart P. Modelling the influence of the sporulation temperature upon the bacterial spore heat resistance, application to heating process calculation. Int J Food Microbiol 2007;114:100–4.

CHAPITRE 1:

ETAT DE L'ART SUR LA SPORULATION : PHYSIOLOGIE ET MODELES PREVISIONNELS

L'état de l'art sur la sporulation bactérienne a été présenté en deux parties dans ce chapitre. Une première partie établit l'état des connaissances sur la physiologie de la sporulation bactérienne des genres *Clostridium* et *Bacillus*. Ces connaissances permettent d'identifier les potentielles niches de sporulation et les principaux facteurs environnementaux qui peuvent être utilisés comme levier pour limiter la sporulation dans l'environnement industriel. La deuxième partie est consacrée à l'état de l'art sur les modèles prévisionnels de croissance et de sporulation disponibles dans la littérature. Une analyse comparative et critique a permis d'identifier les avantages et les inconvénients de chacun des modèles, et finalement, de déterminer les besoins en termes de modèles de sporulation pour répondre à la problématique générale : comment décrire et prévoir la sporulation bactérienne dans l'environnement industriel?

Partie 1: Knowledge of the physiology of sporeforming bacteria can explain the origin of spores in the food environment

A partir de la revue publiée dans *Research in Microbiology*, 168 (2017) 369-378 Elsevier, doi: 10.1016/j.resmic.2016.10.006.

Emilie Gauvry ^a *, Anne-Gabrielle Mathot ^a, Ivan Leguérinel ^a, Olivier Couvert ^a, Florence Postollec^b, Véronique Broussolle ^{c,d}, Louis Coroller ^a

^{*a*} Université de Brest, EA3882, Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Ecologie microbienne, UMT SPORE-RISK, 6 rue de l'Université, Quimper, France.

^b ADRIA Développement, UMT14.01 SPORE-RISK, Z.A. de Creac'h Gwen, Quimper, France ^c INRA, UMR408 Sécurité et Qualité des Produits d'Origine végétale, F-84000 Avignon, France

^d Avignon Université, UMR408 Sécurité et Qualité des Produits d'Origine végétale, F-84000 Avignon, France

emilie.gauvry@univ-brest.fr *Correspondance and reprints, Anne-Gabrielle.Mathot@univbrest.fr,ivan.leguerinel@univ-brest.fr,Olivier.Couvert@univ-brest.fr,

florence.postollec@adria.tm.fr, veronique.broussolle@avignon.inra.fr, louis.coroller@univbrest.fr
2.1. La microbiologie prévisionnelle: un outil de gestion des risques en agroalimentaire

2.1.1. La microbiologie prévisionnelle : décrire et prévoir un processus biologique.

Dans un contexte agroalimentaire où les enjeux économiques et sanitaires sont nombreux, les industriels cherchent à optimiser leurs procédés de fabrication et leurs pratiques d'hygiène pour limiter la présence de microorganismes pathogènes ou d'altération dans les produits alimentaires et sur les lignes de fabrication. Pour cela, il est nécessaire d'anticiper et prévoir les comportements des microorganismes en fonction des conditions environnementales au cours des procédés alimentaires, de la fourche à la fourchette. Les facteurs environnementaux généralement étudiés sont ceux qui ont le plus d'impact sur la croissance, la formation de biofilms, la sporulation ou encore la résistance des spores. Ces facteurs peuvent servir de leviers en industrie agroalimentaire, comme le pH, la température, l'activité de l'eau ou la présence de conservateurs tels que les acides organiques [1]. Pour décrire et prévoir un processus bactérien en fonction des conditions environnementales, des modèles mathématiques sont développés et utilisés en microbiologie prévisionnelle.

La modélisation mathématique d'un comportement bactérien se déroule généralement en deux étapes [2]. La première étape est la modélisation primaire et consiste à décrire l'évolution du comportement microbien en fonction du temps avec un modèle cinétique. La seconde étape consiste à décrire et quantifier l'impact des conditions environnementales sur les paramètres cinétiques du modèle primaire (modélisation secondaire). A partir de ces modèles primaires et secondaires, des outils informatiques sont développés comme par exemple, le logiciel français Sym'Previus (*www.symprevius.org*) ou le logiciel ComBase Predictor (*www.combase.cc/*). Différentes données d'entrée sont prises en considération par ces logiciels, telles que la souche bactérienne, les conditions physico-chimiques, la nature de la matrice alimentaire ou encore le taux de contamination initiale. Ceci permet de simuler des comportements bactériens dans des conditions environnementales représentatives des conditions rencontrées au cours des procédés alimentaires.

2.1.2. Un exemple : la prévision de la croissance bactérienne

Les outils de microbiologie prévisionnelle ont largement fait leurs preuves pour prévoir la croissance bactérienne. Les différents modèles de croissance sont bien répertoriés dans la littérature et ont déjà fait l'objet de synthèses [3, 4].

Les modèles cinétiques (modèle primaire) de croissance les plus connus sont le modèle de Baranyi et Roberts (1993), le modèle de Gompertz re-paramétré par Zwietering *et al.* (1990) [5] ou encore le modèle logistique avec délai et rupture [6, 7]. Ce dernier est largement adopté par les auteurs pour sa simplicité d'utilisation et la qualité d'ajustement des cinétiques avec un ralentissement de la croissance avant la phase stationnaire (équation 1).

$$\ln(N(t)) = \begin{cases} \ln(N_0), \ t < \lambda \\ \ln\left(\frac{N_{max}}{\left(1 + \frac{N_{max}}{N_0}\right) \times \exp(-\mu_{max} \times (t - \lambda))}\right), t \ge \lambda \end{cases}$$
(1)

avec N(t) la concentration en cellules (ln (UFC/ml)) à un instant t, N_0 est la concentration de l'inoculum (UFC/ml), N_{max} est la concentration maximale en cellules (UFC/ml), λ est la latence avant croissance (h) et μ_{max} est le taux de croissance maximal (h⁻¹).

Les modèles secondaires permettent de décrire les effets des facteurs environnementaux tels que le pH, la température ou encore l'activité de l'eau, sur la croissance microbienne. Le modèle le plus largement utilisé en microbiologie prévisionnelle est le modèle cardinal de croissance [8]. Il intègre des paramètres ayant une signification biologique : les valeurs cardinales de croissance, c'est-à-dire les valeurs minimales, optimales et maximales des facteurs environnementaux pour lesquelles le microorganisme est capable de se développer. Ce modèle permet de prévoir le taux de croissance maximal μ_{max} dans une condition environnementale donnée selon l'équation 2.1.

$$\mu_{max}(X) = \mu_{opt} \times \gamma_n(X) \tag{2.1}$$

où $\mu_{max}(X)$ est le taux de croissance maximal dans la condition environnementale *X*, μ_{opt} est le taux de croissance maximal obtenu dans les conditions optimales de croissance et γ (*X*) est le module représentant l'impact du facteur environnemental sur μ_{opt} . Il est calculé selon le rapport $\gamma = \frac{\mu_{max}}{\mu_{opt}}$. Il est donc compris entre 0 et 1 de telle manière qu'en condition optimale de croissance, sa valeur est 1 et lorsque la condition environnementale ne permet pas la croissance bactérienne, sa valeur est nulle.

Pour modéliser les effets combinés de plusieurs facteurs sur le taux de croissance, le concept modulaire ou concept gamma [9] est utilisé. L'effet $\gamma_n(X)$ de chaque facteur environnemental est un module et les modules sont multiplicatifs :

$$\mu_{max} = \mu_{opt} \times \gamma(T^{\circ}C) \times \gamma(pH) \times \gamma(aw)$$
(2.2)

Les valeurs $\gamma_n(X)$ sont calculées selon l'équation générale (équation 3) :

$$\gamma_{n}(X) = \begin{cases} \frac{(X - X_{max}) \times (X - X_{min})^{n}}{(X_{opt} - X_{min})^{n-1} \times [(X_{opt} - X_{min}) \times (X - X_{opt}) - (X_{opt} - X_{max}) \times (X_{opt} + X_{min} - nX)]}, & Xmin < X < Xmax\\ 0, X \le Xmin \text{ ou } X \ge Xmax \end{cases}$$
(3)

où *X* est le facteur environnemental, X_{min} , X_{max} et X_{opt} sont les valeurs minimales, maximales et optimales pour la croissance, et *n* est un paramètre de forme. Ce paramètre de forme vaut généralement 1 pour le pH et l'a_w (avec $a_{w max} = a_{w opt}$) et 2 pour la température de telle sorte que :

$$\gamma(T^{\circ}C) = \frac{(T - Tmax) \times (T - Tmin)^2}{(Topt - Tmin) \times [(Topt - Tmin) \times (T - Topt) - (T - Tmax) \times (Topt + Tmin - 2T)]}$$
(4)

$$\gamma(pH) = \frac{(pH-pHmin) \times (PHmax-pH)}{(pHopt-pHmin) \times (pHmax-pHopt)}$$
(5)

$$\gamma(a_w) = \frac{a_w - a_{w_{min}}}{1 - a_{w_{min}}} \tag{6}$$

En dernier lieu, il est important de prendre en compte les interactions entre les facteurs environnementaux, particulièrement aux bornes du domaine de croissance. Ainsi, un dernier module est alors ajouté: le module d'interaction entre les facteurs : $\xi(T^{\circ}C, pH, a_w)$

$$\mu_{max} = \mu_{opt} \times \gamma(T^{\circ}C) \times \gamma(pH) \times \gamma(a_w) \times \xi(T^{\circ}C, pH, a_w)$$
(2.2)

Le module d'interaction est calculé selon l'équation 7 (équations 7.1 à 7.3) :

$$\xi \begin{cases} 1, \ \Psi \le 0.5 \\ 2 \times (1 - \Psi), \ 0.5 \le \Psi \le 1 \\ 0, \ \Psi \ge 1 \end{cases}$$
(7.1)

avec :

$$\Psi = \frac{\omega_T}{2 \times (1 - \omega_{a_W}) \times (1 - \omega_{pH})} + \frac{\omega_{a_W}}{2 \times (1 - \omega_T) \times (1 - \omega_{pH})} + \frac{\omega_{pH}}{2 \times (1 - \omega_T) \times (1 - \omega_{a_W})}$$
(7.2)
et :

$$\omega = \left(\frac{X_{opt} - X}{X_{opt} - X_{min}}\right)^3 \tag{7.3}$$

où X est le facteur environnemental (pH, température ou a_w).

Les modèles de croissance (primaire et secondaire) sont efficaces pour prévoir la croissance bactérienne en fonction des facteurs environnementaux tels que le pH, la température, l'aw ou encore la concentration en acides organiques. Leur efficacité a également été démontrée pour prévoir la croissance bactérienne dans diverses matrices alimentaires. Par exemple, la croissance de *Salmonella, Listeria monocytogenes, Escherichia coli* et *Bacillus cereus* a pu être prévue dans différentes matrices alimentaires telles que des produits de la mer, des produits carnés ou encore des produits laitiers [10, 11]. Les modèles de croissance sont largement utilisés dans les outils de prévision des comportements bactériens comme par exemple l'outil Sym'previus. Ce type d'outils propose une interface simple permettant de prévoir et simuler les comportements de plusieurs souches bactériennes, dans différentes matrices et différentes conditions environnementales.

2.1.3. Les différentes catégories de modèles : définitions et caractéristiques

Les modèles développés peuvent être classés dans différentes catégories et opposés selon différents critères. Les avantages et inconvénients de chaque catégorie de modèle ont été reportés et confrontés par Ferrer et ses collaborateurs (2009) [12]. Par exemple, les modèles mécanistes, qui sont construits sur un raisonnement théorique, peuvent être opposés

aux modèles phénoménologiques, basés sur l'observation et sur l'expérience. Ensuite, ces deux catégories de modèles peuvent s'appliquer à différentes échelles pour décrire un comportement cellulaire à l'échelle de l'individu ou à l'échelle de la population.

Les modèles mécanistes sont des modèles basés sur la théorie des mécanismes biologiques. Le principal avantage des modèles mécanistes est qu'ils sont explicatifs. Ils permettent, d'expliquer un comportement général à l'échelle de la population, à partir des comportements individuels. De plus, les paramètres utilisés ont un sens biologique qui rendent comptent explicitement du comportement cellulaire étudié (comme par exemple, des concentrations en molécules et des vitesses enzymatiques). L'inconvénient des modèles mécanistes est qu'ils requièrent de nombreuses données expérimentales nécessitant la mise en place de méthodologies plus ou moins fastidieuses. De plus, le traitement des données peut nécessiter des capacités informatiques importantes. Pour ces raisons, les modèles mécanistes sont généralement difficilement utilisables pour une application en milieux industriels.

Les modèles phénoménologiques décrivent mathématiquement la réponse du phénomène étudié, sans prendre en compte la dimension biologique du processus décrit. Les principaux avantages de ces modèles sont leurs simplicités de développement, d'application et d'utilisation. Les données expérimentales sont également plus faciles et plus rapides à collecter et à exploiter que les données nécessaires à un modèle mécaniste. En revanche, ces modèles contiennent des paramètres descriptifs qui n'ont pas de signification biologique et qui sont difficilement interprétables. Ces modèles ne permettent pas de rendre compte directement ou explicitement des caractéristiques ou capacités physiologiques du microorganisme étudié. Ainsi, le risque est que le modèle phénoménologique ne soit approprié que pour le microorganisme étudié et dans le domaine de conditions environnementales utilisées pour son développement. En d'autres termes, l'inconvénient d'un modèle phénoménologique est qu'il ne soit pas ou peu extrapolable à d'autres espèces ou genres bactériens ou d'autres conditions environnementales.

Les modèles développés à l'échelle cellulaire sont souvent qualifiés de mécanistes. Il est à noter tout de même qu'un modèle mécaniste est toujours phénoménologique à une certaine échelle. En effet, un comportement plus global est expliqué par des variables observées à l'échelle inférieure. Par exemple, un comportement observé à l'échelle cellulaire peut être expliqué par une combinaison ou une succession de processus métaboliques, et ces processus métaboliques sont eux-mêmes régis par des combinaisons ou successions de processus moléculaires.

Les modèles développés à l'échelle populationnelle sont généralement descriptifs du comportement global de la population et sont donc plutôt qualifiés de modèles phénoménologiques. Ces modèles sont facilement utilisables et les données expérimentales sont faciles à obtenir au niveau populationnel, avec des méthodes classiques [12]. En revanche, ils négligent la variabilité individuelle dans la population ou contiennent des approximations. Développer un modèle mécaniste à l'échelle populationnelle implique d'expliquer le comportement global de la population par la somme des comportements individuelles. Ceci a par exemple été utilisé pour modéliser la latence de la population à partir des latences individuelles de *Listeria monocytogenes* [13]. Cependant, pour aller plus loin, les comportements observés à l'échelle de l'individu sont eux-mêmes expliqués par des variables moléculaires et métaboliques (Fig. 1.3). Ainsi, plus on s'intéresse aux échelles supérieures, plus les variables explicatives s'accumulent et compliquent le développement et l'utilisation de modèles mécanistes aux échelles plus larges.



2.1.4. Enjeux en microbiologie prévisionnelle

Fig. 1.3. Stratégies ascendante et descendante en microbiologie prévisionnelle (inspiré de Bruggemean et Westerhoff, 2007 [16]).

Initialement, la microbiologie prévisionnelle a eu pour objectif de décrire et modéliser un comportement bactérien (la croissance, la destruction, la germination ou encore la sporulation bactériennes) sur des aspects dynamiques et quantitatifs. Dans cet objectif descriptif, des modèles purement empiriques ont été proposés. Par exemple, le modèle de Gompertz re-paramétré [5, 14] a permis de décrire la cinétique de croissance bactérienne. Des modèles polynomiaux ont également été proposés pour décrire l'effet des facteurs environnementaux [15] sur la vitesse de croissance bactérienne, mais ils sont peu robustes. En effet, ces modèles ont été ajustés sur un jeu de données particulier. Ils sont alors spécifiques de ce jeu de données et sont difficilement extrapolables à d'autres espèces, d'autres matrices et d'autres conditions environnementales.

Ainsi, un des enjeux en microbiologie prévisionnelle est le développement de modèles prévisionnels selon une double stratégie ascendante et descendante (Fig. 1.3). Le modèle développé doit permettre de décrire un processus biologique (stratégie ascendante) et doit rendre compte des caractéristiques et des capacités physiologiques du microorganisme (stratégie descendante).

2.2. Les modèles prévisionnels de sporulation

2.2.1. Modèles mécanistes de sporulation

Des modèles mécanistes décrivant mathématiquement le processus de décision d'entrée en sporulation ont été proposés. Ces modèles décrivent le moment où la cellule entre en sporulation sous l'effet d'une carence nutritionnelle [17] ou décrivent la décision d'une cellule à opter pour un comportement cellulaire ou un autre (compétence ou sporulation par exemple) [18]. Jabbari et ses collaborateurs (2011) [19] ont également proposé un modèle du réseau d'initiation de la sporulation avec autant d'équations que de molécules impliquées dans le processus de la sporulation. Dans ce modèle, les concentrations de chaque molécule sont modélisées en fonction des concentrations des autres molécules ayant un rôle régulateur et de constantes cinétiques décrivant chaque évènement moléculaire, telles que des constantes de synthèse, de dégradation ou de phosphorylation.

2.2.2. Modèles phénoménologiques de sporulation : les modèles cinétiques

Contrairement aux modèles de croissance, peu de modèles cinétiques de sporulation au niveau populationnel ont été développés jusqu'à aujourd'hui. Parmi eux, Das et Sen (2011) ont proposé de décrire la cinétique de sporulation de *Bacillus coagulans* selon l'équation 8:

$$N_{s}(t) = N_{T} \times \left(1 - \exp\left(-\frac{t-T}{k+T}\right)\right)$$
(8)

où *t* est le temps (h), N_T est le nombre maximal de spores (UFC/ml), *T* est le temps auquel ce nombre maximal de spores est atteint (h) et *k* est une constante correspondant à l'inverse du taux de sporulation (h).

Ce modèle est simple et permet de décrire des cinétiques d'apparition abrupte des spores au cours du temps. En revanche, ce modèle est peu adapté pour décrire des cinétiques d'apparition plus progressive des spores au cours du temps car ce modèle est peu flexible pour l'ajustement des faibles concentrations en spores. Le principal inconvénient est que ce modèle décrit la concentration en spores en UFC/ml et n'est pas exprimé sous la forme logarithmique.

Par ailleurs, un modèle pour décrire la cinétique de sporulation de *Bacillus weihenstephanensis* et *Bacillus licheniformis* a également été proposé [21] (équation 9) :

$$log_{10}(S(t)) = \begin{cases} 0, \ t < t1s\\ log_{10}(S_f).\left(\frac{1 - \exp(-\mu_s \times (t - t_{1s}))}{1 + \exp(-\mu_s \times (t - t_{1s}))}\right), \ t \ge t1s \end{cases}$$
(9)

avec S(t) la quantité finale en spores (UFC/ml), μ_s est le taux de sporulation (h⁻¹) et t_{Is} est le temps d'apparition des premières spores (h).

2.2.3. Vers des modèles hybrides: les modèles cinétiques de sporulation liés à la croissance végétative

Une seconde catégorie de modèle cinétique de sporulation permet de prendre en compte sa dimension physiologique, à savoir que c'est un processus de différenciation des cellules végétatives en spores. Ce sont des modèles cinétiques de sporulation liés à la croissance végétative.

Un des premiers modèles de ce type est celui de Rivera et ses collaborateurs [22] qui a permis de faire le lien entre les cellules végétatives et les spores avec l'hypothèse principale que la vitesse de disparition des cellules végétatives est liée à la sporulation et la mort cellulaire (équation 10).

$$\frac{dXv}{dt} = \mu_{max} \times Xv - Ks \times Xv - Ke \times Xv$$
(10)

avec μ_{max} le taux de croissance (h⁻¹), K_s est le taux de sporulation (h⁻¹), K_e est le taux de mortalité (h⁻¹) et X_v est le nombre de cellules végétatives (UFC/ml).

Cependant, ce modèle ne permet pas de décrire la différenciation des cellules végétatives en spores.

Le modèle de Atehortùa *et al.* (2007) [23] décrit la vitesse d'apparition des spores à partir des cellules végétatives selon l'équation 11 (11.1 et 11.2):

$$\frac{dXs}{dt} = k_s \times X_v \tag{11.1}$$

et :

$$k_s = k_{s_{max}} \times \left(\frac{1}{1 + e^{G_s \times (S - P_s)}}\right) - k_{s_{max}} \times \left(\frac{1}{1 + e^{G_s \times (S_{initial} - P_s)}}\right)$$
(11.2)

où X_s et X_v sont les concentrations en spores et en cellules végétatives respectivement (UFC/ml) et k_s est le taux de formation des spores (h⁻¹). Ce paramètre k_s correspond à une vitesse d'apparition des spores à partir des cellules végétatives. Il est décrit avec la vitesse d'apparition maximale k_{smax} (h⁻¹), la constante de gain de l'équation sigmoïde pour le taux de

formation des spores $G_{s,}$ (L/g), un paramètre de forme de l'équation sigmoïde P_{s} (g/L) et la concentration initiale en glucose $S_{initial}$ (g/L).

Huang et ses collaborateurs (2003) [24] ont développé un modèle dans lequel la différenciation des cellules végétatives en spores a été décrite en intégrant le temps de maturation de la spore τ_m (h) qui correspond au temps entre l'engagement en sporulation de la cellule végétative et la formation d'une préspore résistante à la température. Ce modèle a été développé pour décrire l'évolution du nombre de spores au cours du temps en alimentation continue. En l'appliquant dans une condition de culture en batch (milieu non renouvelé), l'équation 12 (12.1 à 12.3) décrivant l'évolution du nombre de spores est :

$$\frac{dx_e}{dt} = \mu_s \times (t - \tau_m) \times x_v \times (t - \tau_m)$$
(12.1)

avec :

$$\mu_{s} = \begin{cases} (k_{1} - k_{2}) \times \mu_{v}, \ \mu_{v} \ge 0.1 \\ k_{3} + (\frac{k_{1} - k_{3}}{0.1} - k_{2}) \times \mu_{v}, \ \mu_{v} < 0.1 \end{cases}$$
(12.2)

et :

$$\frac{dx_{v}}{dt} = \begin{cases} (\mu_{v} - \mu_{s}) \times x_{v}, & \text{si le glucose } n'\text{est pas entièrement consommé} \\ (-k_{d} - \mu_{s}) \times x_{v}, & \text{si le glucose est consommé} \end{cases}$$
(12.3)

avec x_e , la concentration en spores (UFC/ml), μ_s est le taux de sporulation (h⁻¹), x_v est la concentration en cellules végétatives non engagées en sporulation (UFC/ml), k_1 et k_2 sont des constantes (h⁻¹), k_d est la constante de mort cellulaire (h⁻¹) et μ_v est le taux de croissance des cellules végétatives (h⁻¹).

Morimoto *et al.* (2011) ont également proposé un modèle qui décrit en trois équations, la croissance (équation 13), la sporulation (équation 14) et la mort cellulaire (équation 15.1 à 15.3).

$$m_{\nu}(t+1) = 2 \times \left(1 - p(t)\right) \times \left(1 - q(t)\right) \times m_{\nu}(t) \tag{13}$$

$$m_s(t+1) = m_s(t) + p(t) \times m_v(t)$$
 (14)

$$q(t+1) \begin{cases} 0, \ z(t) < 0\\ z(t), \ 0 \le z(t) \le 1\\ 1, \ z(t) > 1 \end{cases}$$
(15.1)

où:

$$z(t) = q(t) + K \times M(t+1)$$
(15.2)

et:

$$M(t) = m_{\nu}(t) - \delta p(t - \Delta) - N(t)$$
(15.3)

avec $m_{\nu}(t)$ le nombre de cellules végétatives en croissance, $m_s(t)$ est le nombre de cellules engagées en sporulation, p(t) est la variable de décision pour la fraction de cellules qui s'engagent en sporulation, q(t) est la fraction de cellules qui meurent au cours d'un cycle cellulaire, N(t) est la quantité de nutriments ajoutés au-delà d'une génération, δ est le paramètre qui décrit la quantité de nutriments libérés par la lyse de la cellule mère, Δ est le temps entre l'engagement en sporulation et la lyse de la cellule-mère et K est le paramètre décrivant la consommation des nutriments par les cellules qui se développent.

2.2.4. Comparaison des modèles : avantages et inconvénients

L'analyse des forces et des faiblesses des modèles développés à l'échelle populationnelle ou cellulaire [12] (Fig. 1.4) a permis de confronter et de synthétiser les critères qui caractérisent les différents types de modèles de la littérature (Fig. 1.5). Ces critères sont la signification biologique des paramètres, la capacité du modèle à prendre en compte la variabilité individuelle, à décrire le comportement global, la capacité à rendre compte du processus physiologique décrit, la facilité de développement et d'application et la facilité d'obtention des données expérimentales.

Les modèles de sporulation de la littérature présentés dans ce chapitre, ont été développés dans des objectifs différents, répondant plus ou moins à ces différents critères (Fig. 1.5). Chacun d'eux présente des avantages et des inconvénients.

Le modèle de Jabbari *et al.* (2011) [19] est un modèle mécaniste qui permet de décrire le processus de sporulation au niveau moléculaire et physiologique pour expliquer un comportement global observé à l'échelle cellulaire. Comme il a été précisé précédemment, extrapoler l'utilisation de ce modèle à l'échelle de la population s'avère difficile à entreprendre. En effet, le comportement global observé à l'échelle de la population s'explique par la somme de tous les comportements individuels et de leurs interactions aux niveaux spatio-temporels. Dans le cadre d'une application en agroalimentaire, pour prévoir quantitativement l'évolution des spores au cours d'un procédé alimentaire, ce type de modèle n'est pas envisageable.



Fig. 1.4. Forces et faiblesses des modèles développés à l'échelle de la population (souvent phénoménologiques) et à l'échelle cellulaire (souvent mécaniste), adapté de Ferrer *et al.* (2009).

Les forces d'un type de modèle sont souvent les faiblesses de l'autre (double flèche).

Les modèles cinétiques de sporulation à l'échelle populationnelle, proposés jusqu'alors, permettent de décrire l'évolution du nombre de spores en fonction du temps. Le modèle de Baril *et al.* (2012) ajuste des profils cinétiques plus variés que celui de Das et Sen (2011). Il permet de décrire des cinétiques d'apparition rapide ou plus progressive des spores au cours du temps. En revanche, la signification biologique des paramètres est discutable. En effet, le taux de sporulation est défini comme une vitesse d'apparition des spores. Dans le cas des modèles cinétiques de croissance, le taux de croissance est directement lié au temps de doublement des cellules végétatives. Cependant, cette analogie ne peut pas être faite avec le

taux de sporulation étant donné que les spores ne se dupliquent pas mais proviennent des cellules végétatives. De plus, il a été récemment démontré que l'entrée en sporulation est directement liée à la vitesse de duplication des cellules végétatives [26]. C'est pourquoi des cinétiques de sporulation associées à la croissance ont été développées et permettent de rendre compte du processus physiologique de la sporulation.

Dans le modèle d'Atehortùa *et al.* (2007) [23], le lien avec les cellules végétatives a été proposé. Contrairement au modèle de Baril *et al.* (2012) [21] qui utilise un taux d'apparition des spores, ces auteurs proposent un taux de formation des spores à partir des cellules végétatives. Cependant, l'inconvénient de ce modèle est que l'évolution du taux d'apparition des spores a été décrite en fonction de la concentration en substrat qui représente une donnée expérimentale supplémentaire à acquérir pour utiliser le modèle. D'autre part, les paramètres utilisés pour décrire l'évolution du taux de formation des spores en fonction de la concentration en substrat n'ont pas de significations biologiques avec notamment un paramètre de forme pour décrire une courbe cinétique sigmoïde.



Fig. 1.5. Comparaison des modèles de sporulation de la littérature sur différents critères. Les modèles de Jabbari et al. (2011) (_____), Das et Sen (2011) et Baril et al. (2012) (____), Atehortua et al. (2007) (_____), Huang et al. (2003) (_____) et Morimoto et al. (2011) (_____) ont été comparés sur différents critères, en attribuant une valeur de 0, 1, 2 ou 3 selon si le critère est complètement remplit (3) ou non (0).

Le modèle de Huang *et al.* (2003) intègre un paramètre qui permet de rendre compte d'une caractéristique du microorganisme étudié: le temps de maturation de la spore. Cependant, les équations du modèle sont différentes selon la phase de croissance (croissance végétative, la phase stationnaire et le déclin) et l'utilisation du modèle est d'autant plus complexe que la mesure expérimentale de concentration en glucose est nécessaire. De plus, ce modèle contient de nombreux paramètres sans signification biologique.

Le modèle de Morimoto *et al.* (2011) est un des modèles les plus aboutis et répond plus ou moins aux différents critères (Fig. 1.5). Il intègre des paramètres qui ont une signification biologique. Ces paramètres sont la variable de décision d'entrée en sporulation p(t) qui rend compte de la variabilité individuelle, et Δ qui a été défini par le temps entre l'engagement en sporulation et la lyse de la cellule mère. Cependant ce modèle contient des approximations. En effet, le modèle décrit l'évolution du nombre de cellules engagées en sporulation et ne décrit pas explicitement le nombre de spores au cours du temps. De plus, les cellules engagées ne sont pas distinguées des spores déjà formées. D'autre part, aucune méthode expérimentale n'a été proposée pour quantifier la variable de décision d'entrée en sporulation. Un dernier inconvénient est que ce modèle tient compte de la consommation ou la libération de nutriments dans le milieu et de la mort cellulaire qui sont autant de variables supplémentaires à mesurer, ce qui complexifie l'utilisation du modèle.

2.3. Références

- [1] Pérez-Rodríguez F, Valero A. Predictive microbiology in foods. New York: Springer; 2013.
- [2] McMeekin TA, editor. Predictive microbiology: theory and application. Taunton, Somerset, England : New York: Research Studies Press Ltd. ; J. Wiley & Sons; 1993.
- [3] Delhalle L, Daube G, Adolphe Y, Crevecoeur S, Clinquart A. Les modèles de croissance en microbiologie prévisionnelle pour la maitrise de la sécurité des aliments (synthèse bibliographique). Agron Soc Environ 2012.
- [4] Sanaa M. Microbiologie prévisionnelle : Principaux modèles de croissance utilisés en appréciation quantitative des risques. Epidémiol Santé Anim 2002;41:169–77.
- [5] Zwietering MH, Jongenburger I, Rombouts FM, van 't Riet K. Modeling of the bacterial growth curve. Appl Environ Microbiol 1990;56:1875–81.
- [6] Broughall JM, Anslow PA, Kilsby DC. Hazard analysis applied to microbial growth in foods: Development of mathematical models describing the effect of water activity. J Appl Bacteriol 1983;55:101–10.
- [7] Kono T. Kinetics of microbial cell growth. Biotechnol Bioeng 1968;10:105–31.
- [8] Rosso L, Lobry JR, Bajard S, Flandrois JP. Convenient model to describe the combined effects of temperature and pH on microbial growth. Appl Environ Microbiol 1995;61:610–6.
- [9] Zwietering MH, Wijtzes T, Rombouts FM, Riet K. A decision support system for prediction of microbial spoilage in foods. J Ind Microbiol 1993;12:324–9.
- [10] Pinon A, Zwietering M, Perrier L, Membre J-M, Leporq B, Mettler E, *et al.* Development and validation of experimental protocols for use of cardinal models for prediction of microorganism growth in food products. Appl Environ Microbiol 2004;70:1081–7.
- [11] McDonald K, Sun D-W. Predictive food microbiology for the meat industry: a review. Int J Food Microbiol 1999;52:1–27.
- [12] Ferrer J, Prats C, López D, Vives-Rego J. Mathematical modelling methodologies in predictive food microbiology: A SWOT analysis. Int J Food Microbiol 2009;134:2–8.
- [13] Guillier L, Pardon P, Augustin J-C. Influence of stress on individual lag time distributions of *Listeria monocytogenes*. Appl Environ Microbiol 2005;71:2940–8.

- [14] Gibson AM, Bratchell N, Roberts TA. Predicting microbial growth: growth responses of salmonellae in a laboratory medium as affected by pH, sodium chloride and storage temperature. Int J Food Microbiol 1988;6:155–78.
- [15] Baty F, Delignette-Muller M-L. Estimating the bacterial lag time: which model, which precision? Int J Food Microbiol 2004;91:261–77.
- [16] Bruggeman FJ, Westerhoff HV. The nature of systems biology. Trends Microbiol 2007;15:45–50.
- [17] Dejong H, Geiselmann J, Batt G, Hernandez C, Page M. Qualitative simulation of the initiation of sporulation in *Bacillus subtilis*. Bull Math Biol 2004;66:261–99.
- [18] Schultz D, Wolynes PG, Ben Jacob E, Onuchic JN. Deciding fate in adverse times: sporulation and competence in *Bacillus subtilis*. Proc Natl Acad Sci U S A 2009;106:21027–34.
- [19] Jabbari S, Heap JT, King JR. Mathematical modelling of the sporulation-initiation network in *Bacillus subtilis* revealing the dual role of the putative quorum sensing signal molecule PhrA. Bull Math Biol 2011;73:181–211.
- [20] Das S, Sen R. Kinetic modeling of sporulation and product formation in stationary phase by *Bacillus coagulans* RK–02 vis-à-vis other Bacilli. Bioresour Technol 2011;102:9659–67.
- [21] Baril E, Coroller L, Couvert O, El Jabri M, Leguerinel I, Postollec F, *et al.* Sporulation boundaries and spore formation kinetics of *Bacillus* spp. as a function of temperature, pH and a(w). Food Microbiol 2012;32:79–86.
- [22] Rivera D, Margaritis A, de Lasa H. A sporulation kinetic model for batch growth of *B*. *thuringiensis*. Can J Chem Eng 1999;77:903–10.
- [23] Atehortúa P, Alvarez H, Orduz S. Modeling of growth and sporulation of *Bacillus thuringiensis* in an intermittent fed batch culture with total cell retention. Bioprocess Biosyst Eng 2007;30:447–56.
- [24] Huang H, Ridgway D, Gu T, Moo-Young M. A segregated model for heterologous amylase production by *Bacillus subtilis*. Enzyme Microb Technol 2003;32:407–13.
- [25] Morimoto M, Arkin A, Poolla K. Modeling sporulation decisions in *Bacillus subtilis* as optimal evolutionary decision-making 2011:3508–13.
- [26] Narula J, Kuchina A, Lee DD, Fujita M, Süel GM, Igoshin OA. Chromosomal arrangement of phosphorelay genes couples sporulation and DNA replication. Cell 2015;162:328–37.
- [27] Vlamakis H, Chai Y, Beauregard P, Losick R, Kolter R. Sticking together: building a biofilm the *Bacillus subtilis* way. Nat Rev Microbiol 2013;11:157–68.

- [28] Carlin F. Origin of bacterial spores contaminating foods. Food Microbiol 2011:177–82.
- [29] Postollec F, Mathot A-G, Bernard M, Divanac'h M-L, Pavan S, Sohier D. Tracking spore-forming bacteria in food: from natural biodiversity to selection by processes. Int J Food Microbiol 2012:1–8.
- [30] Kunst F, Ogasawara N, Moszer I, Albertini AM, Alloni G, Azevedo V, *et al.* The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. Nature 1997;390:249–56.

La sporulation bactérienne est un processus de différenciation cellulaire très bien décrit au niveau physiologique, et plus particulièrement chez l'espèce modèle B. subtilis. L'état de l'art sur la physiologie de la sporulation bactérienne a permis de rappeler les éléments impliqués dans le processus de la sporulation, du déclenchement à l'aboutissement d'une spore mature. Le processus de sporulation est déclenché et modulé par des éléments extrinsèques: des facteurs environnementaux physiques (pH, température, pression osmotique), des facteurs environnementaux moléculaires ou chimiques (acides, sel), des facteurs moléculaires inhérents à la physiologie cellulaire (phéromones, molécules du quorum sensing, de communication cellulaire) et des éléments intrinsèques à la cellule, au niveau subcellulaire (boucles rétroactives, d'autorégulation, bruit cellulaire généré par des variabilités d'expression génique par exemple). Cette synthèse bibliographique a notamment permis de rappeler les facteurs environnementaux ayant un impact sur la sporulation dans la chaine alimentaire (le pH, la température, l'activité de l'eau et la disponibilité en oxygène) et pouvant être utilisés comme leviers pour limiter ce processus dans l'environnement industriel. La question qui se pose alors est: « comment ces facteurs environnementaux d'intérêt impactent la sporulation ? ». Peut-on prévoir leur impact pour mieux gérer le risque de sporulation au cours d'un procédé alimentaire?

La gestion des risques microbiologiques en agroalimentaire repose en partie sur les outils de microbiologie prévisionnelle. Contrairement à la croissance bactérienne, les modèles prévisionnels de sporulation sont peu nombreux et peu utilisés. Différents critères permettent de caractériser les modèles tels que la simplicité d'utilisation, la facilité de récolte des données expérimentales ou encore la signification biologique des paramètres. Les modèles cinétiques de sporulation présentés répondent à des critères différents selon l'objectif pour lequel ils ont été développés. Certains modèles sont simples et efficaces pour décrire les cinétiques de sporulation mais n'intègrent pas des paramètres représentatifs du processus de sporulation. D'autres modèles décrivent la cinétique de sporulation en tenant compte de la dimension physiologique de ce processus. Cependant, ces modèles présentent divers inconvénients comme la difficulté d'acquisition des données expérimentales, la difficulté d'application du modèle ou encore la signification de certains paramètres. Finalement, il est important de souligner qu'aucun modèle secondaire permettant de prévoir la sporulation en fonction des facteurs environnementaux, n'a été proposé à ce jour.

Annexe: Bacillus subtilis: un modèle bactérien d'étude

L'état de l'art sur la sporulation bactérienne et plus particulièrement aux niveaux physiologiques et moléculaires a permis de mettre en lumière l'étendue des connaissances apportées sur l'espèce modèle *Bacillus subtilis*. *B. subtilis* est une bactérie gram-positive, aéroanaérobie, catalase positive, sporulée et mésophile, retrouvée principalement dans le sol [1]. Elle est en forme de bâtonnet de 2 à 4 µm et possède une ciliature péritriche qui la rend mobile. Elle appartient à l'embranchement des *Firmicutes*, à la classe des *Bacilli*, à l'ordre des *Bacillales*, à la famille des *Bacillacées* et au genre *Bacillus*. Elle est non pathogène et est un organisme d'altération des produits alimentaires [2, 3]. Elle est capable de se développer dans de larges gammes de facteurs environnementaux, de sporuler et de former des biofilms. Elle est capable de cannibalisme pour survivre au détriment d'autres cellules. Elle peut également entrer dans un état de compétence c'est-à-dire qu'elle peut capter de l'ADN exogène pour acquérir de nouvelles capacités métaboliques. Par ailleurs, *B. subtilis* BSB168 est la première bactérie gram positif dont l'intégralité du chromosome a été séquencé [4]. Son génome est bien annoté et de nombreux outils moléculaires sont disponibles pour cette souche.

L'objectif des travaux de cette thèse étant le développement d'un modèle de sporulation et sa validation expérimentale, la question du choix du modèle bactérien s'est posée. Les vastes connaissances du mécanisme de sporulation au niveau moléculaire de *B. subtilis* permet de proposer des stratégies expérimentales pour valider la théorie du modèle développé. De plus, cette espèce est facilement manipulable génétiquement et de nombreux mutants sont disponibles dans les banques ou dans d'autres laboratoires qui étudient la sporulation. Ainsi, des outils moléculaires sont disponibles pour valider expérimentalement le modèle de sporulation. Dans cette étude, nous avons utilisé la souche BSB1, dérivée trp+ (autotrophe pour le tryptophane) de la souche modèle BSB168 qui est trp- (auxotrophe pour le tryptophane). Cette souche a été fournie par l'institut MICALIS de l'INRA de Jouy-en-Josas.

Références complémentaires

[1] Vlamakis H, Chai Y, Beauregard P, Losick R, Kolter R. Sticking together: building a biofilm the Bacillus subtilis way. Nat Rev Microbiol 2013;11:157–68.

[2] Carlin F. Origin of bacterial spores contaminating foods. Food Microbiol 2011:177-82.

[3] Postollec F, Mathot A-G, Bernard M, Divanac'h M-L, Pavan S, Sohier D. Tracking sporeforming bacteria in food: from natural biodiversity to selection by processes. Int J Food Microbiol 2012:1–8.

[4] Kunst F, Ogasawara N, Moszer I, Albertini AM, Alloni G, Azevedo V, *et al.* The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. Nature 1997;390:249–56.

CHAPITRE 2:

DEVELOPPEMENT D'UN MODELE CINETIQUE DE CROISSANCE - SPORULATION

1. Introduction et objectifs

Dans le chapitre précédent, les différentes catégories de modèles, leurs avantages et leurs inconvénients ont été comparés. Plus particulièrement, les différences entre les modèles descriptifs (plus phénoménologiques) et les modèles explicatifs (plus mécanistes) ont été présentées. Ces deux types de modèles sont développés pour des objectifs différents. De manière générale, les modèles descriptifs sont souvent empiriques et ne permettent pas de rendre compte de la dimension biologique du phénomène étudié. A l'inverse, les modèles mécanistes permettent d'expliquer le phénomène à différentes échelles (moléculaire, cellulaire, métabolique, etc ...) mais sont très complexes et difficilement applicables. La microbiologie prévisionnelle en agroalimentaire nécessite de disposer de modèles prévisionnels qui décrivent correctement les phénomènes biologiques étudiés. Ainsi, dans le cadre de ces travaux, le modèle cinétique de sporulation à développer doit répondre à cette double contrainte : décrire la cinétique de sporulation et prendre en compte la dimension physiologique du processus de sporulation.

L'objectif général de ces travaux de thèse est de quantifier l'impact des facteurs environnementaux sur les capacités de sporulation de *Bacillus subtilis* et de prévoir ces effets. La première étape est de développer un modèle cinétique de sporulation qui permet de décrire l'évolution de la concentration en spores dans une culture bactérienne, au cours du temps.

Dans ce chapitre, le modèle de sporulation développé est présenté sous forme de publication soumise dans le journal *Applied and Environmental Microbiology*. Des précisions et résultats complémentaires, indiqués par « Focus 1, 2 ou 3 », sont ensuite présentés en trois parties. Le développement théorique du modèle sera détaillé dans le « Focus 1 ». Pour construire ce modèle, certains choix ont été nécessaires pour construire et seront présentés dans le « Focus 2 ». La comparaison entre le modèle développé et deux modèles de sporulation de la littérature au niveau de leur efficacité à décrire des cinétiques de sporulation sera l'objet du « Focus 3 ».

2. Differentiation of vegetative cells into spores: a kinetic model applied to *Bacillus* subtilis

A partir de l'article proposé pour soumission dans le journal Applied and Environmental Microbiology

Emilie Gauvry^a, Anne-Gabrielle Mathot^a, Olivier Couvert^a, Ivan Leguérinel^a, Matthieu Jules^b, Louis Coroller^a

 ^a Université de Brest, EA 3882, Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Ecologie Microbienne, IBSAM, UMT Spore-Risk, 6 rue de l'université, 29334 Quimper.
 ^b Microbiologie et Génétique Moléculaire, INRA, UMR1238/CNRS UMR2585/AgroPArisTech, F-78850 Thivernal-Grignon, France

emilie.gauvry@univ-brest.fr, Anne-Gabrielle.Mathot@univ-brest.fr, Olivier.Couvert@univbrest.fr, ivan.leguerinel@univ-brest.fr, matthieu.jules@inra.fr, louis.coroller@univ-brest.fr *Correspondance and reprints

Keywords Spore-forming bacteria, sporulation, growth, modelling

Conflicts of interest The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements This work was supported by Quimper Communauté and Région Bretagne.

2.1. Abstract

Spore-forming bacteria are natural contaminants of food raw materials. Spores are bacterial cells that are resistant to physical and chemical treatments. Sporulation can occur in many environments from farm to fork, and the formation of these resistant cells allows the persistence and the dissemination of the species. In order to predict spore formation over time, we proposed a kinetic model that describes both the growth kinetics and the differentiation of vegetative cells into spores. From the growth model, the addition of only two sporulation parameters was necessary to describe the sporulation kinetics: the probability of a vegetative cell sporulating and the time necessary to form a spore once the cell is committed to sporulation. The biological meaning of these parameters was checked by using an experimental procedure that involves a variant strain of *Bacillus subtilis* that produces the Green Fluorescent Protein as a marker of sporulation initiation. The developed model accurately describes the growth and the sporulation kinetics. Moreover, it provides physiological information on the temporal abilities of vegetative cell to differentiate into spores.

2.2. Importance

The growth-sporulation model we developed accurately describes growth and sporulation kinetics. It describes the progressive transition from vegetative cells to spores with sporulation parameters which are meaningful and relevant to the sporulation process. The first parameter is the mean time required for a vegetative cell to differentiate into a spore (i.e. the duration of the sporulation process). The second sporulation parameter is the probability of each vegetative cell forming a spore over time. This parameter assesses how efficient the sporulation process is, how fast vegetative cells sporulate and how synchronous the bacterial population is for sporulation. The model constitutes a good tool to describe the growth and the sporulation kinetics in different environmental conditions. Moreover, with its sporulation parameters, it offers qualitative information on the sporulation behavior of a bacterial population over culturing time.

2.3. Introduction

Spore-forming bacteria are common contaminants of food, often leading to food poisoning or food spoilage. Many studies aim to gain a better understanding of the ecological niches of spore-formers to prevent raw material contamination (1–3). Others aim at preventing vegetative growth in foods according to environmental factors (4–6) or at inactivating spores by chemical or physical treatments (7–12). Some studies reveal that sporulation can occur during a food process such as in the milk powder process (13–15). In this case, sporulation leads to an increase in the spore concentration in foods and the sporulation conditions affect the quantity and the resistance properties of spores to subsequent chemical or thermal treatments (12, 16).

While predictive microbiology has proven its efficiency to describe the growth of vegetative cells, the sporulation process is sparsely modeled. On the one hand, more mechanistic (explicative) models of sporulation have been suggested to describe the decision-making process to initiate sporulation at cellular and molecular level, according to environmental stimuli (17–19). These models are too complex for a food application because they contain numerous parameters, and they need too many experimental data that are experimentally complicated to obtain. On the other hand, more empirical models of sporulation can be found in the literature. Most of them are simpler to use and can be used to describe the

evolution of spore counts over time. However, they work independently of vegetative growth (20, 21), without taking into account the fact that sporulation is a differentiation process of vegetative cells into spores. Nevertheless, growth and sporulation are closely interdependent physiological processes (22). Sporulation occurs following different signals such as nutrient starvation and communication molecules of quorum sensing, that require previous bacterial growth.

The objective of this work was to develop a model that describes the sporulation kinetics from the growth kinetics of vegetative cells. Therefore, the parameters required to assess the temporal heterogeneity of the sporulation of the vegetative population over time, the time that the vegetative cells needed to complete the sporulation process and the sporulation efficiency. To assess the biological meaning of the sporulation parameters, the *Bacillus subtilis* variant SpoIIAA-gfp (*amyE::(P_{spoIIAA}-gfp-cat)*) was used. This variant produces a fluorescent molecule when the promoter of the gene *spoIIAA* is activated, i.e. when the sporulation process is initiated.

2.4. Materials and methods

2.4.1. Biological material and strain storage

The strain BSB1, which is an autotrophic derivative of *B. subtilis* 168 for tryptophane (trp^+) (23, 24), and *B. subtilis* strain AC699 (*amyE::(P_{spoIIAA}-gfp-cat) thrC::P_{sdp}-cherry*) (25) were kindly provided by the MICALIS institute, at the Jouy-en-Josas center of the French National Institute for Agricultural Research (INRA).

The variant strain SpoIIAA-gfp ($amyE::(P_{spoIIAA}-gfp-cat)$) of *B. subtilis* BSB1 was built. It contains the fusion of the *gfp* gene that codes for the Green Fluorescent Protein GFP_{mut2} (26) with the promotor of the gene *spoIIAA* ($P_{spoIIAA}$) that is a marker of the early stage of sporulation and controls the initiation of sporulation. The activity of this promotor is high enough to produce a sufficient amount of GFP to be detectable by spectrophotometry (24). Moreover, the GFP_{mut2} is stable for 7 days (27) and in a pH range of 5.0 to 10.0 (28). These environmental conditions were in agreement with our experimental conditions described above.

This strain was obtained by transformation of the wild type strain *B. subtilis* BSB1 with the genomic DNA of the strain *B. subtilis* AC699, by using the natural competence of *B. subtilis*.

To do so, *B. subtilis* BSB1 was grown overnight on Luria Bertani plates, (DifcoTM, Becton, Dickinson and Company) at 37 °C. After incubation, a colony was re-suspended in MG1 medium composed of MG medium (2g/L (NH₄)₂SO₄, 1 g/L Na₃C₆H₅O₇, 14 g/L K₂HPO₄, 3H₂O, 6 g/L KH₂PO₄, 0.5% Glucose and 15.6 mM MgSO₄) with an added 0.025% casamino acids and 0.1%, yeast extract for 4 h 30 min at 37 °C under 200 rpm agitation. A 10-fold dilution was then carried out in MG2 composed of MG medium to which 0.012% casamino acids, 0.025% yeast extract, MgSO₄ 25mM and Ca(NO₃)₂ 8mM had been added. The suspension was incubated for 1 h 30 min at 37 °C under 200 rpm agitation (29). 200 µL of the suspension in MG2 was added to 0.1 µL of genomic DNA extracted from the strain AC699 with a High Pure PCR Template Extraction Kit (Roche Dignostics, Meylan, France) and incubated for 30 minutes at 37 °C. The cells were plated on LB containing 100 µg/mL of chloramphenicol and the colonies which developed were selected after incubation for 24 h at 37 °C. The inability of the strain SpoIIAA-gfp to degrade starch was also verified on starch plates with iodine revelation in order to check the insertion of the cassette in the locus *amyE*.

Each selected colony was isolated on LB plates and incubated overnight at 37 °C. A colony was re-suspended in Luria Bertani Broth, Miller (DifcoTM, Becton, Dickinson and Company) under 100 rpm agitation at 37 °C for 4 hours. From this pre-culture, a 100-fold dilution was performed in 100 mL of LB broth in flasks, in the same culture conditions for 3 hours. A second dilution was then performed in the same conditions. When the early stationary phase was reached after a 5-hour culture, glycerol was added to the bacterial suspension at a final concentration of 25 % w/w in cryovials. The bacterial cells in cryovials were stored at -80 °C.

2.4.2. Monitoring the kinetics of growth, sporulation and fluorescence

Vegetative cells of the two strains *B. subtilis* BSB1 and SpoIIAA-gfp were inoculated from the cryovials at an initial concentration of 1000 CFU/mL in 250 mL flasks filled with 100 mL LB broth, supplemented with sporulation salts (30). The bacterial cultures were performed under 100 rpm agitation, at 40 °C, which is close to the optimal growth temperature, and at two suboptimal temperatures for growth and sporulation (27 °C and 49 °C). The incubation was performed in darkness to prevent excitation and degradation of the GFP produced by the strain SpoIIAA-gfp.

The growth kinetics were monitored by pouring 1 mL of the relevant dilution into nutrient agar (BIOKAR Diagnostics, Beauvais, France). Enumeration of colonies was performed after incubation of the plates for 24 hours at 37 °C (ISO 7218). Sporulation was monitored by enumerating cells resistant to a 10-minute heat treatment at 80 °C. The heat treatment was applied to the suspension samples using the capillary method (16).

The green fluorescence emitted by the total suspensions of the strains BSB1 (used as a background) and SpoIIAA-gfp was monitored over time. 100 μ L of the suspensions obtained in shaking flasks (as previously described) were distributed in microplates and measurements were performed with a microplate photometer (VICTORTM X, PerkinElmer) equipped with an excitation filter at 485 nm and emission filter at 535 nm for green fluorescence measurement. The duration of the excitation was 1.0 s.

2.4.3. Development of the growth-sporulation model: theory (for more details, see "Focus 1")

The model of growth and sporulation can be divided into two modules: the first one describes the growth of vegetative cells and the second describes the sporulation kinetics from the growth kinetics.

The vegetative cells' growth could be described by a classical primary model that has been previously developed: the modified logistic model of Kono (31):

$$\ln(N(t_i)) = \begin{cases} \ln(N_0), \ t_i < \lambda\\ \ln\left(\frac{N_{max}}{\left(1 + \frac{N_{max}}{N_0}\right) \times \exp\left(-\mu_{max} \times (t_i - \lambda)\right)}\right), t_i \ge \lambda \end{cases}$$
(1)

with N_0 the concentration of the inoculum (CFU/mL), λ the lag before growth (h), μ_{max} the maximum vegetative growth rate (h⁻¹), and N_{max} the maximal concentration of total cells (CFU/mL). More precisely, N_{max} corresponds to the maximal concentration of vegetative cells reached at the stationary phase. Once the first spores appear, N_{max} corresponds to the total cells, i.e. the spores and the remaining vegetative cells that have not differentiated into spores.

At each time of culture, the vegetative cells have a sporulation probability P that could be estimated by the proportion of vegetative cells that initiate the sporulation per unit of time (h⁻¹). Once a vegetative cell is committed to sporulation, the differentiation process needs some time complete the sporulation process. This duration defines the time to form a mature spore (*t_f*). Following our experimental process (see below), we defined a mature spore as a cell which is resistant to a heat treatment of 10 min at 80 °C (32).

From these assumptions, the sporulation kinetics could be defined by equation 2, which describes the concentration of spores $S(t_i)$, at a given time t_i from the concentration of spores $S(t_{i-1})$ that were previously present at time t_{i-1} added to the spores that appear between times t_{i-1} and t_i . The spores that appear between t_{i-1} and t_i come from the proportion of vegetative cells which initiated sporulation at time $t_i - t_f$ (Fig. 2.1).

This fraction of cells that commit to sporulation corresponds to the whole population of vegetative cells $(N(t_i - t_f) - S(t_i))$ which had a sporulation probability $P(t_i - t_f)$ at time $t_i - t_f$ in equation 3 (Fig 2.1).

$$S(t_i) = \begin{cases} 0, \ t_i < t_f \\ S(t_{i-1}) + \left(\left[N(t_i - t_f) - S(t_{i-1}) \right] \times P(t_i - t_f) \right), t_i > t_f \end{cases}$$
(2)

where $N(t_i - t_f)$ are the total cells at time $t_i - t_f$, $S(t_{i-1})$ are the spores at time t_{i-1} and $P(t_i - t_f)$ is the probability of the vegetative cells committing to sporulation at time $t_i - t_f$ given in equation 1.

The probability to commit to sporulation was defined as the proportion of cells that commit to sporulation over time. It was described with the normal (or Gaussian) probability density which was weighted by the maximal proportion P_{max} of the vegetative cells to sporulate (equation 3). (For more details, see "Focus 2")

$$P(t_i) = P_{max} \times \left[\frac{1}{\sigma \times \sqrt{2\pi}} \times \exp\left(-0.5 \times \left(\frac{t_i - t_{max}}{\sigma \times \sqrt{2}} \right)^2 \right) \right]$$
(3)

with $P(t_i)$ the probability of forming a spore at time t (h⁻¹), P_{max} is the maximal proportion of vegetative cells forming spores (unitless). P_{max} was obtained at the time t_{max} (h) at which the cell has the maximal probability of initiating sporulation and σ the standard deviation around t_{max} (h).


Fig. 2.1. Schematic representation of the growth and sporulation model. The new spores that appear at time t_i come from vegetative cells not committed to sporulation $N(t_i - t_f) - S(t_{i-1})$ which were present t_f hours earlier and had a sporulation probability $P(t_i - t_f)$. This probability was described with a Gaussian law as a function of time with three parameters: P_{max} which corresponds to the maximal proportion of cells able to sporulate in the same amount of time, t_{max} which is the time at which the cells have the highest probability of sporulating (h), and σ which is the probability scattering.

Let us note that the maximal propability to sporulate obtaines at time $t_{max} P(t_{max})$ could be calculated as follows: $P(t_{max}) = P_{max} \times \frac{1}{\sigma \times \sqrt{2\pi}}$.

Finally, the sporulation module of the global model of growth and sporulation becomes equation 4:

$$S(t_i) = \begin{cases} 0, \ t_i < t_f \\ S(t_{i-1}) + \left[N(t_i - t_f) - S(t_{i-1}) \right] \times P_{max} \times \left[\frac{1}{\sigma \times \sqrt{2\pi}} \times \exp\left(-0.5 \times \left(\frac{t_i - t_{max}}{\sigma \times \sqrt{2}} \right)^2 \right) \right], \ t_i \ge t_f \end{cases}$$
(4)

2.4.4. Methodology to assess the growth and the sporulation parameters

The growth and the sporulation parameters of the model in equations 1 and 4 were estimated in a three-step procedure.

In the first step, the primary growth model was fitted to the experimental counts (ln (CFU/mL)) to estimate the growth parameters (N_0 , λ , μ_{max} and N_{max}). Then, we considered

that each cell of the strain SpoIIAA-gfp that commits to sporulation produces the same amount of GFP, i.e. has the same fluorescence intensity. A sporulating cell is composed of a mother cell and a forespore. The mature spore is released into the medium after lysis of the mother cell. Consequently, the fluorescence measured in a bacterial population corresponds to the fluorescence emitted by sporulating cells in addition to the fluorescence of the medium linked to the GFP molecules released in the medium following the lysis of the mother cell. Consequently, the accumulation of fluorescence could be directly related to the accumulation of cells that have initiated the sporulation and ultimately, to the accumulation of spores i.e. the sporulation kinetics.

In the second step, the experimental fluorescence data in \log_{10} (AU) were plotted against time in order to estimate the mean time taken to initiate the sporulation (t_{max}) and the probability scattering σ . The fluorescence of the wild type strain BSB1 was used as a background as the wild type strain displayed auto-fluorescence. The two strains BSB1 and SpoIIAA-gfp were cultivated concomitantly. The fluorescence emitted by the strain BSB1 was subtracted from the fluorescence emitted by the strain SpoIIAA-gfp at each measuring point to assess the fluorescence associated with the production of GFP by the strain SpoIIAA-gfp, hereafter referred as the "fluorescence". The fluorescence kinetics were fitted with the cumulative distribution function for the normal distribution (equation 5). This function is used to assess the probability of a cell initiating the sporulation over time (equation 3 and Fig. 2.1).

$$F(t_i) = F_{max} \times \frac{1}{2} \times \left(1 + \operatorname{erf}\left(\frac{t_i - t_{max}}{\sigma \times \sqrt{2}}\right)\right)$$
(5)

with $F(t_i)$ the fluorescence at time t_i (AU), F_{max} the maximal fluorescence (AU), t_{max} (h) the time at which F_{max} (UA) is obtained, σ the standard deviation around t_{max} and erf, the error function of Gauss.

In the third step, the time taken to form a spore (t_f) and the maximal proportion of sporulating P_{max} were estimated: the sporulation curves were fitted with the Gaussian distribution function (equation 6) modified as follows:

$$P(t_i) = P_{max} \times N(t_i) \times \frac{1}{2} \times \left(1 + \operatorname{erf}\left(\frac{t_i - t_{max} - t_f}{\sigma \times \sqrt{2}}\right)\right)$$
(6)

with $N(t_i)$ the concentration of total cells (equation 1), t_{max} (h) the time at which F_{max} (UA) was obtained, P_{max} was the maximal proportion of sporulating cells, and σ (h) the standard deviation

around t_{max} (h). P_{max} and t_{max} were estimated in the previous step, by fitting the fluorescence kinetics in equation 5, and were used as inputs in equation 6 to fit the sporulation kinetics. The two parameters fitted on the sporulation kinetics were P_{max} , and the time to form a spore t_f .

2.4.5. Statistical procedures and analysis

The growth and sporulation parameters of equations 1 to 6 were estimated by minimizing the Error Sum of Squares (fmincon, Optimization Toolbox; MATLAB 7.9.0; The Math-works, Natick, USA) (Eq. 7). 95% confidence intervals were estimated with the nlparci function of the Optimization Toolbox (MATLAB 7.9.0; The Math-works, Natick, USA).

$$ESS = \sum (y_i - \hat{y}_i)^2 \tag{7}$$

with y_i the experimental data for the concentration of total cells or spores (ln (CFU/mL)) or fluorescence (AU) and \hat{y}_i the value calculated with the model.

The goodness of fit of the model was assessed with the RMSE (Root Mean Square Error):

$$RMSE = \sqrt{\frac{ESS}{n-p}}$$
(8)

with ESS, the Error sum of squares calculated in equation 7, n, the number of experimental data and p the number of parameters of the model.

The likelihood ratio test (33) was used to check that the growth and sporulation kinetics were not significantly different between the wild strain BSB1 and the strain SpoIIAA-gfp which produces the GFP. The growth and sporulation parameters were estimated for both strains and the ESS were calculated (ESS_{unconstrained}). Then, the values the parameter estimates obtained with the wild type strain BSB1 were used as inputs to describe the kinetics of the strain SpoIIAA-gfp. The corresponding ESS was calculated (ESS_{constrained}). To compare the quality of fit with the model with fitted parameters or inputs, the likelihood ratio (S_L) was calculated as follows (Huet *et al.*, 2003):

$$S_L = n \times ln\left(\frac{ESS_{constrained}}{ESS_{unconstrained}}\right)$$

where *n* is the number of experimental data, $ESS_{unconstrained}$ is the ESS obtained by fitting the 8 growth and sporulation parameters to the kinetics of the strain SpoIIAA-gfp and $ESS_{constrained}$ is the ESS obtained with the 8 parameters estimated on the strain BSB1 as inputs. The value was compared with the Chi-squared value (15.51) that corresponds to a degree of freedom of 8 and a tolerance threshold α of 5%.

2.5. Results

2.5.1. Description of the growth, fluorescence and sporulation kinetics of *B. subtilis* BSB1 in favorable conditions for sporulation.

The growth and sporulation kinetics were not significantly different between the wild type strain BSB1 and the variant SpoIIAA-gfp for the three temperatures tested. The values of the likelihood ratio test were 8.37, 7.43 and 3.00 at 27 °C, 40 °C and 49 °C respectively, *i.e.* inferior to 15.51 (α <5%). This allowed the wild type strain to be used as a background to calculate the fluorescence linked to the production of GFP by the strain SpoIIAA-gfp.

The suggested model (equations 1 and 4) accurately described the growth and the sporulation kinetics. The qualities of fit for growth and sporulation reached a global RMSE value of 0.90 ln (UFC/mL). At 40 °C, growth was fast with a maximal concentration of total cells of 3.8×10^8 CFU/mL reached at 10 hours of culture. The lag time was estimated at 1.6 h and the growth rate at 1.61 h⁻¹ (Fig. 2.2f and Table 2.1). During the growth kinetics, the strain SpoIIAA-gfp produced GFP which was detected by its fluorescence. The fluorescence started from zero and increased until it reached a maximal fluorescence value F_{max} of 4.0×10^4 AU at 50 hours of culture. The maximal accumulation of fluorescence per unit of time was obtained at 33 h of incubation (t_{max}) and with a standard deviation of 6.8 (Fig. 2.2d and 2e, and Table 2.1). The sporulation kinetics displayed a first phase of abrupt appearance of 10^3 CFU/mL and a second phase with a more gradual appearance of spores over time. These two phases were correctly described by the predicted kinetics. The maximal concentration of spores was 4.86×10^5 CFU/mL (Fig. 2.2f) and was directly linked to the maximal sporulation probability P(t_{max}) which was estimated at 3.6×10^{-5} h⁻¹ (Fig. 2.2e). The first spore per milliliter was estimated to appear at 9.0 h of culture. This was consistent with experimental observations as

the first spores were experimentally detected at 12 h of culture. Lastly, the time to form a spore was estimated at 5.2 h.

2.5.2. Effects of temperature on the growth and sporulation abilities of *B. subtilis* BSB1

At 49 °C, the growth of *B. subtilis* was enhanced compared to 40 °C with a growth rate almost twice than at 40 °C. However, the maximal concentrations of total cells reached and the lag time were not significantly different (Table 2.1). The fluorescence due to the production of GFP was detected sooner, evolved more rapidly and the maximal fluorescence was 5 times lower (Fig. 2.2g compared to Fig. 2.2d). The concentration of spores was affected almost 20,000-fold at 49 °C compared to 40 °C but the maximal probability to commit to sporulation was affected only 2,000-fold. Thus, the maximal probability strongly impacted the maximal concentration of spores but was not sufficient to explain this difference in the spore yield. Nevertheless, the maximal probability was obtained 25.1 h sooner, when the concentration of cells was much lower at 49 °C than at 40 °C. Consequently, the maximal concentration of cells which were able to sporulate in the same time was also lower at 49 °C. Furthermore, the probability was much less scattered with a standard deviation σ around t_{max} of 6.8 h at 49 °C compared to 10.4 h at 40 °C (Fig 2.2h and e). The probability scattering had an impact on the temporal accumulation of sporulating cells. When the probability scattering was low, cells were able to sporulate in a shorter time frame which led to fewer cells that were able to sporulate over time. Lastly, the sporulation process was faster at 49 °C than at 40 °C with times required to form a heat-resistant spore (t_f) which were estimated at 4.1 h and 7.0 h at 49 °C and 40 °C respectively.

At 27 °C, the growth rate was slightly affected. The growth rate was 35% lower and the lag time was twice as high (with λ values of 1.6 h and 3.1 h at 40 °C and 27 °C respectively), compared to growth at 40 °C (Table 2.1). The fluorescence evolved more gradually from 0 h to 70 h at 27 °C compared to 40 °C (Fig. 2.2a). This led to a more scattered probability of committing to sporulation at 27 °C with a σ value of 15.9 h compared to 10.4 h at 40 °C (Fig 2.2b) which explains the more gradual appearance of spores at 27 °C (Fig 2.2c). The maximal fluorescence was 20% lower at 27 °C, leading to the estimatation that the maximal sporulation probability was about 3-fold lower at 27 °C. This explains why the maximal concentration of spores was 4-fold lower at 27 °C compared to 40 °C. The time taken to form a spore was estimated at 9 hours at 27 °C (as for 49 °C) compared to 5.2 h at 40 °C.

Table 2.1. Estimations of the fluorescence, the growth and the sporulation parameters of *B. subtilis* at 27 °C, 40 °C and 49 °C.

Parameter	Meaning	Related data	27°C	40°C	49°C
No	Initial concentration of vegetative		10.2	13.12	11.5
(ln (CFU/mL)	cells: inoculum size		[9.6-10.7]	[12.4-13.8]	[11.1-11.9]
λ (h)	Lag before growth		3.1	1.6	1.2
		Growth	[2.2-3.9]	[1.1-2.1]	[0.9-1.4]
$\mu_{max}(h^{-1})$	Maximal growth rate	kinetics	1.05	1.61	2.90
			[0.88-1.22]	[1.33-1.88]	[2.48-3.32]
N _{max}	Maximal concentration of total		20.1	20.0	19.1
(ln (CFU/mL)	cells		[19.7-20.4]	[19.8-20.2]	[18.8-19.4]
$F_{max}(AU)$	Maximal fluorescence of the	Fluorescence	4.11×10^4	5.13×10^{4}	9.79×10^{3}
	bacterial suspension AU	kinetics	$[3.85 \times 10^4 - 4.35 \times 10^4]$	$[4.79 \times 10^4 - 5.47 \times 10^4]$	$[7.39 \times 10^3 - 1.22 \times 10^4]$
	(485/535nm)				
σ (h)	Standard deviation around t _{max}		15.9	10.43	6.8
			[12.5-19.4]	[5.1-15.7]	[-3.3-17.0]
$t_{max}(\mathbf{h})$	Time at which the maximal		40.0	36.7	11.6
	probability is reached		[37.2-42.8]	[33.1-40.3]	[3.0-20.2]
P _{max}	Maximal proportion of vegetative	Sporulation	8.86 10 ⁻⁴	2.42 10 ⁻³	4.25 10-7
	cells sporulating	kinetics	$[4.30 \times 10^{-4} - 1.43 \times 10^{-3}]$	$[9.14 \times 10^{-4} - 3.03 \times 10^{-3}]$	$[1.01 \times 10^{-7} - 7.51 \times 10^{-7}]$
$P(t_{max})$ (h ⁻¹)	Maximal probability to sporulate		2.22×10^{-5}	5.44 ×10 ⁻⁵	2.49×10^{-8}
$t_f(h)$	Time to form a spore from		7.4	7.0	4.1
	commitment to the formation of a		[7.4-7.4]	[7.0-7.0]	[4.0-4.3]
	heat-resistant spore				



Fig. 2.2. Fluorescence, growth and sporulation kinetics of *B. subtilis* at 27°C (a, b and c), 40°C (d, e and f) and 49°C (g, h and i). The values of fluorescence (o) were fitted with the normal density function (solid lines in a, d and g) and the corresponding probability densities (b, e and h) with the three sporulation parameters of equation 6: P_{max} , t_{max} and σ . The concentration of total cells (o) and the concentration of spores (\Box) over time were fitted with the growth sporulation model in equations 1 and 4 (in c, f and i).

2.6. Discussion

2.6.1. A kinetic model of growth and sporulation which accurately describes the growth and sporulation curves

A model was proposed to jointly describe the growth and the sporulation kinetics of *B*. *subitlis* BSB1. This model was based on theories on the physiology of the sporulation process. It was developed as a differentiation model of vegetative cells into spores. This model integrated two meaningful parameters which characterize the sporulation process: the probability of forming a spore that accounted for the temporal heterogeneity of the sporulation decision over time and the time taken to form a spore.

The growth-sporulation model was efficient to describe the growth and sporulation curves at the three temperatures tested. Indeed, it allowed the time at which the first spores appeared and the maximal concentrations of spores to be accurately computed. It was even more accurate than previous sporulation models with lower RMSE values (results not shown) (20, 21). In particular, these models did not succeed in describing the smooth emergence of the spores as observed at 40 °C and 27 °C. In some cases, the use of these models led to aberrant estimations of the time needed to see the first spores and the maximal concentration of spores (results not shown, for more details, see "Focus 3").

2.6.2. The fluorescence kinetics of the strain SpoIIAA-gfp provide qualitative and quantitative data on the sporulation behavior

The strategy used to experimentally assess the sporulation parameters consisted in the use of the strain SpoIIAA-gfp. This strain produces a fluorescent protein GFP_{mut2} (26) when sporulation is initiated. As the GFP is stable over the time of culture (27, 28), the accumulation of fluorescence emitted by the strain SpoIIAA-gfp was directly linked to the accumulation of sporulating cells. The fluorescence curves followed a Gaussian law (or normal law). This law gives information on sporulation efficiency with the maximal proportion of vegetative cells sporulating P_{max} , and assesses how fast the cells sporulate with the time t_{max} . The scattering probability σ accounted for the temporal heterogeneity of sporulation, in other words, how heterogeneous or synchronous the bacterial population is over time, for initiating sporulation. For many biological processes, heterogeneity is the result of the multiscale organization of life as explained elsewhere (34). This heterogeneity can be explained by both intrinsic and extrinsic factors. As an example, the stochastic variations at cellular and molecular levels could explain the heterogeneity of sporulation behavior between cells of the same population (35). Sporulation also depends on external factors such as nutrient starvation, which becomes increasingly severe over time, and quorum sensing molecules that accumulate over time. Moreover sporulation heterogeneity also rises with the heterogeneity of other behaviors such as entry into competence, cannibalism or dormancy (36, 37) that could delay the entry into sporulation.

Little information is available in the literature on the time taken to form a spore according to environmental conditions. The experimental strategy we used allowed the time to form a spore to be estimated in the three conditions tested. Sporulation takes 7 to 10 hours to complete from the early stages of sporulation to the formation of a free spore, in optimal conditions (32). Numerous authors have studied the temporal activation of sporulation genes through this process (38–40). This has led to estimations that about 1 h elapses between the first stage of sporulation (the activation of master regulator Spo0A) and the initiation of sporulation (the activation of *spoIIAA*). These observations were consistent with the data of this study where the time taken to form a heat-resistant cell (assumed to be a spore) was estimated at between 4.0 and 7.4 h for the environmental conditions we tested.

2.6.3. Effects of environmental factors on the sporulation behavior

Different aspects of the sporulation process could be assessed with the sporulation parameters: the time taken to form a spore (t_f) and the probability $(P_{max}, t_{max}, \sigma)$ of sporulation being initiated over time.

The sporulation process was completed more rapidly at 49 °C. At this temperature, growth was also higher than at 27 °C and 40 °C. This supports the hypothesis that a common machinery is used for growth and sporulation, which is more efficient at 49 °C than at lower temperatures. However, sporulation was more efficient at 40 °C at which the first spores appeared sooner and the maximal concentration of spores was the highest. The low proportions of cells which could sporulate at 49 °C could be explained by the rapid physico-chemical degradation of the medium provoked by such a high temperature. Deterioration of the medium could disadvantage further physiological processes such as sporulation; this hypothesis is supported by the rapid cell decline observed at 49 °C (Fig. 2.2i).

The bacterial population sporulated more synchronously at 49 °C whereas at 40 °C, the bacterial cells sporulated more heterogeneously over time. Various hypotheses could explain this result. First, the temperature affects the membrane fluidity by modifying the composition of fatty acids, which finally affects the activity of the sensors such as the histidine kinase KinA (41). Moreover, the other differentiation processes such as entry into competence or cannibalism are also impacted by the environmental factors. For instance, *B. subtilis* displays cannibalistic behavior at 40 °C but not at 45 °C (42). Consequently, we could argue that fewer differentiation opportunities are possible at 49 °C, which leads to a lower heterogeneity of behaviors at this temperature.

2.7. Conclusions

A kinetic model was developed to describe both growth and sporulation as a differentiation process from vegetative cells into spores. On the one hand, the model describes the growth with the classical logistic model of Kono modified by Rosso (31). On the other hand, the models can be used to describe the sporulation kinetics from the growth kinetics with parameters which are specific to sporulation: the time to form a spore and the probability of forming a spore over time. The biological meaning of the sporulation parameters was assessed experimentally, providing both quantitative and qualitative information at the physiological level on the sporulation process. The sporulation parameters led us to determine that at suboptimal sporulation temperatures, the vegetative cells commit to sporulation more synchronously, in lower amounts and belatedly. In the literature, few data are available on the time needed to complete the sporulation process and on the temporal behavior of vegetative cells for sporulation, according to environmental conditions of culture. The experimentally offers opportunities to better assess and understand spore formation according to environmental conditions.

3. Focus 1 : Développement du modèle de croissance-sporulation: stratégie

3.1. Définir le modèle à développer : exigences, pré-requis et contraintes

L'objectif de ce chapitre est de proposer un modèle cinétique de sporulation en utilisant le modèle bactérien *Bacillus subtilis* BSB1. Le modèle doit répondre à la double contrainte de (i) décrire quantitativement la sporulation dans le temps et (ii) de rendre compte des capacités physiologiques de sporulation du microorganisme :

(i) Le premier rôle du modèle est de décrire la dynamique de sporulation et de quantifier des données d'intérêt en agroalimentaire tels que le temps de formation des premières spores, la vitesse d'apparition des spores ainsi que la concentration maximale en spores. La variable d'intérêt est donc la concentration en spores, ce qui conduit à proposer un modèle développé à l'échelle populationnelle.

(ii) Le modèle doit également rendre compte du comportement de sporulation au niveau physiologique. Afin de répondre à cette contrainte, le processus de sporulation doit être défini. C'est un processus de différenciation des cellules végétatives en spores. En d'autres termes, le lien entre les spores et les cellules végétatives dont elles proviennent doit être établi. La sporulation est déclenchée par la carence nutritionnelle et la communication cellulaire en lien avec une forte densité cellulaire. L'engagement en sporulation est directement liée à la vitesse de division des cellules végétatives (43). Ces connaissances font donc ressortir une deuxième contrainte, à savoir qu'à l'échelle populationnelle, une croissance bactérienne est nécessaire avant que les premières cellules ne s'engagent en sporulation. La croissance végétative des cellules doit donc être prise en compte également pour décrire la sporulation.

En conclusion, le modèle à développer est un modèle à l'échelle populationnelle qui associe la cinétique de sporulation à la cinétique de croissance, en décrivant la différenciation des cellules végétatives en spores.

3.2. Hypothèses sur le processus de sporulation

Le modèle de croissance-sporulation a été développé à partir des hypothèses, des simplifications et des observations suivantes :

(i) Au début de la culture bactérienne, seules des cellules végétatives sont inoculées dans un milieu riche et frais, à une concentration de l'ordre de 10³ UFC/ml. Les cellules végétatives constituant cette population initiale sont dans un état physiologique et des conditions environnementales qui ne permettent pas l'initiation de la sporulation dès l'inoculation. En effet, à cette première étape, le milieu est riche en nutriments et les cellules n'ont pas encore produit de métabolites (et plus particulièrement, des molécules de communication cellulaire).

(ii) A tout instant de la culture, les cellules végétatives ont plusieurs options d'évolution: se multiplier, entrer en dormance, former un biofilm, entrer dans un état de compétence, s'engager un comportement cannibale, se lyser, ou sporuler. Nous avons simplifié ces possibilités d'évolutions en trois options : la croissance, le maintien cellulaire ou la sporulation. Par ailleurs, les cellules engagées dans le processus de sporulation peuvent se lyser avant de former une spore mature (44). Cependant, par simplification, seules les cellules qui conduiront à la formation d'une spore mature seront prises en compte dans l'option de sporuler.

(iii) Une fois la cellule engagée en sporulation, ce processus requiert un certain temps pour aboutir à la formation d'une spore mature. Ce temps a été défini par le temps de formation de la spore. Plusieurs définitions de la spore mature existent (32). Ici, pour des raisons expérimentales, une spore a été considérée mature lorsqu'elle est thermorésistante (résistante à un traitement de 10 minutes à 80°C qui élimine les formes végétatives).

3.3. Le développement du modèle: différentes sous-populations co-existent dans une population bactérienne en cours de culture.

D'après notre première hypothèse, seules des cellules végétatives sont initialement présentes dans la suspension bactérienne en début de culture. Ces cellules végétatives inoculées se développent suivant une cinétique classique de croissance : le modèle logistique avec délai de Kono modifié par Rosso (31) rappelée ci-dessous (équation 1).

$$\ln(N(t_i)) = \begin{cases} \ln(N_0), \ t_i < \lambda \\ \ln\left(\frac{N_{max}}{\left(1 + \frac{N_{max}}{N_0}\right) \times \exp(-\mu_{max} \times (t_i - \lambda))}\right), t_i \ge \lambda \end{cases}$$
(1)

avec $N(t_i)$ la concentration en cellules (ln (UFC/ml)) à un instant t_i , N_0 est la concentration de l'inoculum (UFC/ml), N_{max} est la concentration maximale en cellules (UFC/ml), λ est la latence avant croissance (h) et μ_{max} est le taux de croissance maximal (h⁻¹).

Pour décrire la différenciation des cellules végétatives en spores, différentes sous-populations bactériennes coexistent dans la population bactérienne distinguées et sont (Tableau 2.2 et Fig. 2.3). A chaque instant de la culture, toute cellule végétative a la possibilité de s'engager en sporulation. A l'échelle de la population, cette probabilité de sporuler P a été définie par la proportion de cellules qui s'engagent en sporulation Ve parmi les cellules végétatives non engagées (Vne) et par unité de temps (ici, le aps de temps choisi a été 1 h). Une fois les cellules engagées en sporulation, elles conduiront à la formation de nouvelles spores mâtures (S_a) qui apparaitront après un certain temps (t_f) correspondant au temps de formation de la spore. L'évolution du nombre de spores au cours du temps a donc été décrite selon une relation de récurrence rappelée en équation 2.

$$S(t_i) = \begin{cases} 0, \ t_i < t_f \\ S(t_{i-1}) + \left(\left[N(t_i - t_f) - S(t_{i-1}) \right] \times P_{t_i - t_f} \right), t_i \ge t_f \end{cases}$$
(2)

avec $S(t_i)$ la concentration en spores à l'instant t_i , $S(t_{i-1})$ est la concentration en spores à l'instant précédent t_{i-1} , $N(t_i - t_f)$ est la concentration en cellules totales à l'instant $(t_i - t_f)$ et $P_{t_i-t_f}$ est la probabilité des cellules végétatives de sporuler (h⁻¹) à l'instant $(t_i - t_f)$. Les concentrations sont exprimées en UFC/ml.

	Spores ^a S (t _i)	
Cellules totales ^a		Cellules végétatives déjà engagées en sporulation (ou cellules sporulantes) ^b $V_s(t) = S(t_i+t_f) - S(t_{i+1})$
$\mathbf{N}\left(t_{\mathrm{i}} ight)$	Cellules végétatives ^b V (t) =N (t _i)-S (t _i)	Cellules végétatives qui s'engagent en sporulation ^b $V_e(t) = S(t_i+t_f) - S(t_i+t_f-1)$
		Cellules végétatives pas encore engagées en sporulation ^b $V_{ne}(t) = V(t) - V_s(t) - V_e(t)$

Tableau 2.2. Sous-populations coexistant dans une suspension bactérienne sporulante et quantification de leurs concentrations.

Les concentrations en cellules totales et en spores sont déterminées expérimentalement (^a) et les concentrations des autres sous-populations sont déduites par le calcul (^b).



Fig. 2.3. Représentation schématique de l'évolution temporelle des sous-populations constituant une suspension bactérienne.

Les cellules totales $N(\square)$ comprennent les cellules végétatives V et les spores $S(\square)$. Les cellules végétatives sont elles-mêmes distinguées en 3 sous-populations : les cellules nonengagées en sporulation $V_{ne}(\square)$, les cellules déjà engagées en sporulation ou sporulantes V_s (\square) et les cellules qui s'engagent en sporulation V_e (\square) à un instant donné t_i . Parmi les spores, on distingue les spores déjà présentes S de celles qui apparaissent S_a à un instant donné t_i .

Le modèle de sporulation développé décrit de manière théorique, la cinétique de sporulation à partir de la cinétique de croissance avec des paramètres qui reflètent le processus de sporulation: le temps de formation de la spore t_f et la probabilité des cellules végétatives de sporuler *P*. Dans la section précédente (2. Differntiation of vegetative cells into spores: a kinetic model applied to *Bacillus subtilis*), la signification biologique de ces paramètres a été évaluée expérimentalement. Plus particulièrement, nous avons déterminé que la probabilité des cellules à s'engager en sporulation évoluait au cours du temps. Il a donc été nécessaire de décrire cette évolution (Focus 2).

4. Focus 2 : Choix de la loi de probabilité pour la description de la probabilité d'engagement en sporulation au cours du temps

4.1. Rappel du contexte et principe de la stratégie utilisée

Dans l'article présentant le modèle cinétique de croissance-sporulation, une stratégie expérimentale a été proposée et utilisée pour évaluer la probabilité des cellules végétatives à s'engager en sporulation au cours du temps. Cette probabilité étant définie par la proportion de cellules s'engageant en sporulation parmi les cellules végétatives totales, la stratégie a consisté à décrire l'évolution du nombre de cellules initiant la sporulation au cours du temps (Fig. 2.4).



Fig. 2.4. Représentation schématique de la stratégie expérimentale pour évaluer la probabilité d'engagement en sporulation.

La stratégie expérimentale repose sur le suivi de la fluorescence de la suspension de B. subtilis SpoIIAA-gfp au cours du temps de culture (a). Les cellules végétatives qui ne se sont pas engagées en sporulation (\Box) ne produisent pas de fluorescence. Les cellules qui sont engagées dans la sporulation ou cellules sporulantes (\Box) produisent de la fluorescence. Lorsque la cellule mère se lyse (\Box), la fluorescence est libérée dans le milieu de culture avec la spore mâture (\cdots).

Expérimentalement, ceci a été réalisé en mesurant l'augmentation de la fluorescence de la souche SpoIIAA-gfp qui produit la Green Fluorescent Protein (GFP) lorsque le promoteur du gène spollAA contrôlant l'initiation en sporulation, est activé (Fig. 2.4a). La courbe de fluorescence avait une allure sigmoïdale pouvant être décrite par une loi de probabilité. Pour une même loi de probabilité, deux fonctions existent: la fonction de répartition et la fonction de densité qui sont composées des mêmes paramètres. La fonction de répartition est la fonction cumulative de la variable étudiée. Dans notre étude, la fonction de répartition permet de décrire la courbe de fluorescence (UA) qui correspond, plus précisément, à l'accumulation de la fluorescence au cours du temps (Fig. 2.4b). En considérant que chaque cellule s'engageant en sporulation émet une fluorescence moyenne, l'accumulation de la fluorescence (UA) correspondait à l'accumulation de cellules (UFC/ml) qui ont initié la sporulation ou cellules sporulantes (Fig. 2.4c). Cette cumulative de cellules sporulantes est également décrite par la fonction de répartition de la loi de probabilité. Ensuite, afin de convertir cette cumulative de cellules sporulantes en évolution des cellules qui sporulent au cours du temps, c'est la densité de probabilité de la loi qui est utilisée (Fig. 2.4c). Cette fonction de densité permet alors de décrire le nombre de cellules s'engageant en sporulation par unité de temps, autrement dit l'évolution de la vitesse d'engagement en sporulation (UFC/ml/h). Finalement, la probabilité d'engagement en sporulation est calculée avec le rapport entre les cellules s'engageant en sporulation et les cellules végétatives qui ne sont pas encore engagées en sporulation. Cette dernière opération permet d'avoir accès à l'évolution de la probabilité d'engagement en sporulation au cours du temps (h^{-1}) (Fig. 2.4d).

Quatre lois de probabilité ont été envisagées et testées pour décrire la probabilité d'engagement en sporulation au cours du temps: la loi normale centrée, la loi log-Normale, la loi de Weibull et la loi Gamma.

4.2. Méthode

4.2.1. Acquisition des cinétiques de croissance, de sporulation et de fluorescence.

Les courbes de croissance, de sporulation et de fluorescence en unité arbitraire (UA) de la souche de *B. subtilis* SpoIIAA-gfp ont été obtenues en milieu Luria Bertani à 27°C en erlens, conformément au « Matériel et Méthodes » présenté dans la section précédente (2. Differentiation of vevetative cells into spores : a kinetic model applied to *Bacillus subtilis*).

D'autre part, 14 cinétiques de croissance-sporulation de la souche sauvage *B. subtilis* BSB1 ont été obtenues en fermenteurs, dans 21 de bouillon cœur-cervelle, dans différentes conditions de température, pH et a_w. Les conditions de culture seront précisées dans le chapitre 4 (Effet des facteurs environnementaux sur la sporulation bactérienne). Brièvement, un seul facteur environnemental variait d'une expérience à l'autre (température, pH ou a_w), les deux autres étant maintenus constants. Six niveaux de températures (20° C ; 25° C ; 30° C ; 37° C ; 45° C ; 49° C), cinq niveaux de pH (5,0 ; 5,2; 7,0 ; 8,0 et 8,8) et cinq niveaux d'a_w (0,996; 0,985; 0,975; 0,960 et 0,945, par addition de chlorure de sodium) ont été testés avec une condition commune entre les trois facteurs qui était la condition standard à 37°C, pH 7,0, a_w 0,996.

4.2.2. Lois de probabilité testées

Pour chaque loi de probabilité, une fonction de répartition et une fonction de densité correspondante existent. La fonction de densité de probabilité de la loi représente l'évolution d'une variable dans le temps et sa fonction de répartition associée est la cumulative de la variable.

4.2.2.1.Loi normale centrée ou loi gaussienne

Sa fonction de répartition est rappelée avec l'équation 6 :

$$P(t_i) = P_{max} \times \frac{1}{2} \times \left(1 + \operatorname{erf}\left(\frac{t_i - t_{max}}{\sigma \times \sqrt{2}}\right)\right)$$
(6)

Et sa fonction de densité est rappelée avec l'équation 3 :

$$P(t_i) = P_{max} \times \frac{1}{\sigma \times \sqrt{2\pi}} \times exp\left(-0.5 \times \left(\frac{t_i - t_{max}}{\times \sqrt{2}}\right)^2\right)$$
(3)

avec $P(t_i)$ la probabilité à l'instant t_i (h⁻¹), P_{max} est la proportion maximale de cellules sporulantes, t_{max} est le temps moyen de sporulation auquel P_{max} est obtenu, et σ est l'écart-type autour de t_{max} (h), la fonction erf est la fonction d'erreur de Gauss.

4.2.2.2.Loi log-Normale

Sa fonction de répartition est donnée par :

$$P(t_i) = \frac{P_{max}}{2} + \frac{1}{2} \times erf\left(\frac{\ln(t_i) - \mu}{\sigma \times \sqrt{2}}\right)$$
(10)

Et sa fonction de densité est donnée par :

$$P(t_i) = \frac{P_{max}}{t_i \times \sigma \times \sqrt{2\Pi}} + \exp\left(-\frac{(ln(t_i) - \mu)^2}{2 \times \sigma^2}\right)$$
(11)

avec $P(t_i)$ et P_{max} qui sont les mêmes paramètres que pour la loi normale, μ est l'espérance de la variable (h), σ est l'écart-type (h), et erf est la fonction d'erreur de Gauss.

4.2.2.3. Loi de Weibull

Sa fonction de répartition est donnée par :

$$P(t_i) = P_{max} \times \left(1 - exp\left(-\left(\frac{t_i - t_{max}}{t_{1e}}\right) \right)^k \right)$$
(12)

Et sa fonction de densité est donnée par :

$$P(t_i) = P_{max} \times \frac{k}{t_{1e}} \times \left(\frac{t_i}{t_{1e}}\right)^{k-1} \times exp\left(-\left(\frac{t_i - t_{max}}{t_{1e}}\right)^k\right)$$
(13)

avec $P(t_i)$ la probabilité à l'instant t_i (h⁻¹), P_{max} et t_{max} , les mêmes paramètres que dans la loi normale centrée, t_{1e} est le temps auquel les premières cellules s'engagent en sporulation (h) et k est un paramètre de forme.

4.2.2.4.Loi Gamma

Sa fonction de répartition est donnée par :

$$P(t_i) = P_{max} \times \frac{\gamma(\alpha, \frac{t_i}{\beta})}{\Gamma(\alpha)}$$
(14)

Sa fonction de densité de probabilité est :

$$P(t_i) = P_{max} \times \frac{1}{\beta^{\alpha} \times \Gamma(\alpha)} \times t_i^{\alpha - 1} \times \exp(-\frac{t_i}{\beta})$$
(15)

avec $P(t_i)$ et P_{max} qui ont la même définition que les paramètres des lois présentées précédemment, et α et β sont des paramètres de forme.

4.2.3. Ajustement des lois de probabilité

Les cinétiques de sporulation ont été ajustées avec le modèle de croissance-sporulation (en utilisant les différentes lois de probabilité) en minimisant la somme des carrés des écarts (*SCE* ou *ESS* en équation 7) entres les valeurs expérimentales et les valeurs calculées par le modèle, rappelée ci-après :

$$SCE = \sum (y_i - \hat{y}_i)^2 \tag{7}$$

où y_i est la valeur expérimentale (observée) de la concentration en spores (ln (UFC/ml)) et \hat{y}_i est la valeur calculée par le modèle.

Les qualités d'ajustement des modèles aux données expérimentales ont été évaluées avec la *RMSE* (équation 8) et ont été comparées entre deux modèles avec le critère d'information d'Akaike ou AIC (équation 16) (33, 45).

$$RMSE = \sqrt{\frac{SCE}{n-p}}$$
(8)

$$AIC = n \times ln\left(\frac{SCE}{n}\right) + n \times ln(2\pi) + n + 2 \times (p+1)$$
(16)

où *n* est le nombre de points expérimentaux, *SCE* est la somme des carrés des écarts (équation 11) et *p* est le nombre de paramètres.

Pour la loi de Weibull, le test de maximum de vraisemblance (équation 9 rappelée ciaprès) a été utilisé pour vérifier si le paramètre k pouvait être fixé à une constante, et non estimé pour chacune des courbes de sporulation.

$$S_L = n \times ln(\frac{SCE_{k=5}}{SCE_k a just\acute{e}})$$
(9)

où *n* est le nombre de points expérimentaux, *SCE* est la somme des carrés des écarts entre les valeurs calculées et les valeurs expérimentales dans le cas où *k* a été imposé à 5 (*SCE*_{*k*=5}) et dans le cas où *k* a été ajusté (*SCE*_{*k* ajusté}).

L'hypothèse du test est que les qualités d'ajustement sont comparables entre les deux modèles. L'hypothèse est vraie si $S_L < 3,84$ d'après la table du khi-deux pour un degré de liberté valant 1 (c'est-à-dire qu'une seule contrainte a été imposée, à savoir sur le paramètre *k*) et un risque α de 5%.

4.2.4. Critères de choix du meilleur modèle de probabilité

Le choix entre ces quatre lois de probabilités a été fait sur quatre critères.

- Le modèle doit tout d'abord ajuster correctement la courbe de fluorescence cumulée de la souche SpoIIAA-gfp (*amyE* :: *P*_{spoIIAA}-gfp). Le critère d'ajustement de la courbe de fluorescence est prioritaire sur l'ajustement de la courbe de sporulation car la loi de probabilité doit rendre compte de la réalité biologique qui est évaluée avec la fluorescence de cette souche.
- 2) Le modèle doit contenir des paramètres ayant une signification biologique.
- Une fois implémentée dans le modèle de croissance-sporulation (équation 4), la loi de probabilité doit également, permettre d'ajuster correctement la courbe d'apparition des spores.
- 4) Le modèle doit comporter un minimum de paramètres.

4.3. Résultats

4.3.1. Ajustement des cinétiques de fluorescence avec les 4 lois de probabilité

Les cinétiques de fluorescence de *B. subtilis* SpoIIAA-gfp obtenues en milieu LB ont été correctement décrites avec les quatre lois de probabilités (résultats non montrés). Par exemple, la cinétique de fluorescence (\log_{10} (UA)) obtenue à 27°C a été ajustée avec la loi normale, la loi de Weibull, la loi Gamma et la loi log-Normale avec des RMSE respectives de 0,104, 0,102, 0,099 et 0,075. Les cinétiques de sporulation ont été correctement ajustées également, avec des

RMSE allant de 0,062 pour la loi normale à 0,079 pour la loi de Weibull. Sur ce seul critère d'ajustement des cinétiques de fluorescence et de sporulation, le choix de la loi n'a pas pu être effectué.

4.3.2. Signification biologique des paramètres

Selon le deuxième critère qui concerne la signification biologique des paramètres de la loi de probabilité, la loi Gamma et la loi log-Normale ont été écartées. La loi Gamma possède deux paramètres de forme α et β qui n'ont pas de sens biologique, et la loi log-Normale possède un paramètre, l'espérance, qui est également difficilement interprétable au niveau biologique. A l'inverse la loi de Weibull et la loi normale possèdent des paramètres qui sont interprétables biologiquement. Par exemple, ces deux lois contiennent un paramètre qui rend compte de la probabilité maximale de sporuler P_{max} et du temps auquel les cellules ont le plus de chances de sporuler noté t_{max} . La loi de Weibull contient aussi le paramètre t_{le} qui correspond au temps auquel la première cellule s'engage et la loi normale contient un paramètre qui reflète le caractère hétérogène ou synchrone de la population pour l'engagement en sporulation, avec la dispersion de la probabilité σ . Nous nous sommes donc intéressés par la suite à ces deux lois de probabilité pour leur capacité à répondre au $3^{ème}$ critère à savoir, leur capacité à ajuster les cinétiques de croissance-sporulation de *B. subtilis* BSB1.

4.3.3. Ajustement des cinétiques de croissance-sporulation avec la loi de Weibull et la loi gaussienne

Dans un premier temps, les 14 cinétiques de sporulation obtenues en fermenteur, ont été ajustées avec la fonction de densité de la loi de Weibull (équation 13). Cette loi contient un paramètre supplémentaire par rapport à la loi normale (le paramètre k) et ce paramètre n'a pas de signification biologique. Afin de s'affranchir de ce paramètre k, sa valeur a été imposée à une constante. La valeur moyenne de k a été déterminée en moyennant ses valeurs estimées avec le modèle de Weibull pour les 14 cinétiques. La moyenne obtenue sur les 14 cinétiques était de 4,7 (Fig. 2.5) qui a été arrondie à 5 pour son utilisation dans le modèle de Weibull.

Dans un deuxième temps, les 14 cinétiques ont été ajustées avec la fonction de densité de la loi de Weibull modifiée, avec k=5. Sa fonction de répartition devient alors:

$$P_t = P_{max} \times \left(1 - \exp\left(-\left(\frac{t_i - t_{max}}{t_{1e}}\right)^5\right)$$
(17)
92

avec P_t la probabilité à l'instant t (h⁻¹), P_{max} est la proportion maximale de cellules s'engageant en sporulation (h⁻¹), t_{max} est le temps auquel P_{max} est atteint et t_{1e} le temps auquel les premières cellules s'engagent en sporulation (h).



Fig. 2.5 : Répartition des valeurs de k du modèle de Weibull pour 14 cinétiques de croissance-sporulation. La moyenne des valeurs de k pour les 14 cinétiques de croissance sporulation (•) était de 4,67 (----).

Les qualités d'ajustement de la loi de Weibull à 4 paramètres (équation 13) et de la loi de Weibull modifiée à 3 paramètres (équation 17) ont été comparées avec le critère statistique l'Alkaike Information Criterion (AIC). L'AIC permet de pénaliser le modèle qui contient le plus de paramètres. Sur ce critère, la loi de Weibull modifiée à 3 paramètres, était plus satisfaisante pour 11 cinétiques sur 14. Pour les 3 autres cinétiques (25° C, 49° C et a_w 0,985), les qualités d'ajustement étaient significativement différentes entre les deux lois de Weibull (test du maximum de vraisemblance S_L>3,84) mais graphiquement, les courbes de sporulation étaient tout de même convenablement décrites en utilisant la loi de Weibull modifiée (Fig. 2.6). Ainsi, la loi de Weibull modifiée ave *k*=5, a été jugée plus satisfaisante que la loi de Weibull à 4 paramètres pour décrire les cinétiques de sporulation.

Finalement, la loi de Weibull avec k=5 et la loi normale contiennent trois paramètres qui ont une signification biologique. Pour les confronter et décider de la loi la plus adaptée, les qualités d'ajustement des cinétiques de sporulation ont été comparées entre ces deux lois sur le critère de la RMSE. L'ajustement des cinétiques était meilleur avec le modèle gaussien dans 8 cas sur 14 (résultats non montrés). Les descriptions des 6 autres cinétiques de croissance et de sporulation étaient néanmoins satisfaisantes avec la loi gaussienne avec des RMSE faibles allant de 0,30 à 1,21 (log₁₀ UFC/ml). Les trois cinétiques qui ont été le moins bien ajustées parmi les 6, ont été obtenues à 37°C, pH 5,0, aw 0,996, à 20°C, pH 7,0, a_w 0,996 et à 30°C, pH 7,0, a_w 0,996 et sont présentées en Fig. 2.7.



Fig. 2.6. Cinétiques de croissance (—) et de sporulation (—) de *B. subtilis* en fermenteur, en milieu BHI à 25°C, pH 7,0, a_w 0,996 (a et b), à 49°C, pH 7,0, a_w 0,996 (c et d) et à 37°C, pH 7,0, a_w 0,985 (e et f).

Les concentrations en cellules totales (\mathbf{O}) et en spores thermorésistantes (\mathbf{O}) (a,c et e) ont été ajustées avec le modèle de croissance sporulation (équations 1 et 2) en utilisant la fonction de densité de la loi de probabilité de Weibull modifiée avec k=5 (b, d et f).



Fig. 2.7. Cinétiques de croissance (___) et de sporulation (___) de *B. subtilis* BSB1 cultivé en fermenteur en milieu BHI à 37°C, pH 5,0, aw 0.996 (a et b), à 49°C, pH 7,0, aw 0.996 (c et d) et à 37°C, pH 7,0, aw 0.985 (e et f). Les concentrations en cellules totales (**O**) et en spores thermorésistantes (**O**) (a,c et e) ont été ajustées avec le modèle de croissance sporulation (équations 1 et 2) en utilisant la fonction de densité de la loi normale (b, d et f).

4.4. Discussion et conclusion

Quatre lois de probabilité (normale, log-Normale, Gamma et la loi de Weibull) ont été testées pour décrire l'évolution de la probabilité de sporuler au cours du temps et ont été comparées sur plusieurs critères (Tableau 2.3).

Critère	Importance	Loi	Loi log-	Loi de	Loi de	Loi
	du critère	Gamma	Normale	Weibull	Weibull <i>k</i> =5	normale
Signification	+++	0(*)	0(*)	++	++(+)	+++
biologique des						
paramètres (*)						
Ajustement de	++	++	++	++	++	++
la fluorescence						
cumulée						
Ajustement des	++	++	++	++	+	++
cinétiques de		••		•••	•	• •
sporulation						
Nombre de	+	+	+	0	+	+
paramètres	•	-	-	Ŭ	•	-
Score	8	5	5	5	6-7	8

Tableau 2.3. Critères de choix de la loi de probabilité pour décrire la probabilité d'engagement en sporulation au cours du temps.

Les critères ont été classés par ordre d'importance avec 1, 2 ou 3 points attribués par critère au maximum. Pour chaque critère, un nombre de points a été accordé selon que la loi deprobabilité remplit plus ou moins le critère. Le critère de signification biologique des paramètres était un paramètre décisif (*) qui écarte automatiquement les lois de probabilité qui ne remplissent pas ce critère (loi Gamma et loi log-Normale).

Le premier critère de choix est leur capacité à décrire les cinétiques de fluorescence de *B. subtilis* SpoIIA-gfp qui représentent la probabilité d'engagement en sporulation. Cependant, ce premier critère n'a pas permis de choisir parmi les quatre lois puisque chacune d'elles s'ajustaient correctement aux cinétiques expérimentales de fluorescence.

Le deuxième critère important est la signification biologique des paramètres des lois de probabilité. Ceci a conduit à écarter les lois log-Normale et Gamma qui contiennent des paramètres de forme ou des paramètres difficilement interprétables biologiquement.

La troisième étape a consisté à comparer la loi de Weibull et la loi normale. La loi de Weibull contient un paramètre supplémentaire par rapport à la loi normale. Ce paramètre est le paramètre de forme k qui permet de décrire une asymétrie à droite de la courbe de probabilité. Nous avons alors proposé de nous affranchir du paramètre k pour obtenir une loi de Weibull modifiée contenant 3 paramètres à significations biologiques, comme pour la loi normale. Ce paramètre k a été fixé à 5 et correspond à la moyenne des valeurs de k estimées sur l'ensemble

des cinétiques de croissance-sporulation réalisées. Le dernier critère pour choisir entre la loi de Weibull à 3 paramètres et la loi gaussienne est le bon ajustement des cinétiques de croissancesporulation. Ce critère a conduit à déterminer que la loi gaussienne était plus adaptée pour la majeure partie des cinétiques de croissance-sporulation.

Pour conforter le choix de la loi normale, il est important de remarquer qu'une valeur de k=5 permet de générer des courbes de probabilité dont l'asymétrie est peu prononcée (Fig. 2.6 b, d et e). En d'autres termes, la loi de Weibull à 3 paramètres avec k=5 s'apparente à une loi normale, symétrique. De plus, une valeur de k=5 n'est pas justifiable biologiquement pour une future utilisation du modèle, dans d'autres conditions ou pour d'autres espèces ou genres bactériens.

En conclusion, la loi normale centrée (ou loi gaussienne) a été choisie pour décrire l'évolution de la probabilité d'engagement en sporulation au cours du temps. Ses paramètres reflètent l'hétérogénéité de comportement de sporulation de la population bactérienne au cours du temps. Le premier paramètre est la probabilité maximale de sporuler P_{max} qui correspond à la proportion maximale de cellules qui peuvent sporuler en même temps. Il représente donc l'efficacité de la sporulation dans la population. Le second paramètre est le temps t_{max} auquel la probabilité maximale est obtenue, c'est-à-dire le temps auquel les cellules ont le plus de chances de sporuler. Le troisième paramètre est la dispersion σ de la probabilité qui permet d'évaluer le caractère synchrone ou hétérogène de la population bactérienne à sporuler.

5. Focus 3: Comparaison du modèle de croissance-sporulation avec les modèles logistiques de sporulation de la littérature

La précision du modèle de croissance-sporulation pour décrire la cinétique de sporulation a été comparée aux modèles logistiques de sporulation de Baril *et al.* (2012) (20) et de Das et Sen (2011) (21). Ces modèles ont été choisis pour leur simplicité d'application et pour leur capacité à décrire différentes courbes de sporulation. De plus, par rapport à d'autres modèles de sporulation (32, 46), ces modèles déjà été utilisés pour ajuster des cinétiques expérimentales de sporulation publiées.

5.1. Méthode

Trois cinétiques de croissance-sporulation de *B*. subtilis BSB1 ont été obtenues dans des conditions environnementales différentes (Fig. 2.8). La souche a été cultivée en fermenteur, dans un volume de 2,5 l de bouillon cœur-cervelle, sous une agitation de 250 rpm, une aération de 2 l/min, à 25°C, pH 7,0 et à 37°C, pH 5,0. Une troisième culture a été réalisée en erlens de 250 ml, dans 100 ml de milieu Luria Bertani, sous une agitation de 100 rpm, à 37°C. Ces trois conditions environnementales ont été choisies car les cinétiques de sporulation présentaient des courbes d'allures différentes.

Les trois cinétiques de sporulation ont été ajustées avec les trois modèles : le modèle de croissance-sporulation (rappelé en équations 1 et 4), le modèle de Baril *et al.* (2012) (équation 18) et le modèle de Das et Sen (2011) (équation 19).

L'ajustement des cinétiques avec les 3 modèles a été fait par minimisation de la SCE (fmincon, Optimization Toolbox; MATLAB 7.9.0; The Math-works, Natick, USA) qui a également servi de critère de comparaison de la qualité d'ajustements des modèles.

A partir des ajustements des cinétiques avec le modèle de croissance-sporulation (équations 1 et 4), les valeurs de temps d'apparition des premières spores (t_{1s}) et de la concentration maximale en spores (S_{max}) obtenues ont été calculées pour être comparées aux valeurs estimées par les modèles de Baril *et al.* (2012) et de Das et Sen (2011).

$$\ln N(t_i) = \begin{cases} \ln(N_0), \ t_i < \lambda \\ \ln\left(\frac{N_{max}}{\left(1 + \frac{N_{max}}{N_0}\right) \times e^{-\mu_{max} \times (t_i - \lambda)}}\right), t_i \ge \lambda \end{cases}$$
(1)

avec $N(t_i)$ la concentration en cellules totales au temps t_i (UFC/ml), N_0 et N_{max} sont respectivement les concentrations initiale et maximale en cellules totales obtenues (UFC/ml), μ_{max} est le taux de croissance (h⁻¹), λ est la latence avant croissance (h).

$$S(t_i) = \begin{cases} 0, \ t_i < t_f \\ S(t_{i-1}) + \left[N(t_i - t_f) - S(t_{i-1}) \right] \times P_{max} \times \left[\frac{1}{\sigma \times \sqrt{2\pi}} \times \exp\left(-0.5 \times \left(\frac{t_i - t_{max}}{\sigma \times \sqrt{2}} \right)^2 \right) \right], \ t_i \ge t_f \end{cases}$$
(4)

avec $S(t_i)$ la concentration en spores au temps t_i , P_{max} est la proportion maximale de cellules s'engageant en sporulation, obenue au temps t_{max} (h), et σ est la dispersion de la probabilité (h).

$$log_{10}((S(t_i)) = \begin{cases} 0, t_i < t_{1s} \\ log_{10}(S_{max}) \times \frac{1 - \exp(-\mu_s \times (t_i - t_{1s}))}{1 + \exp(-\mu_s \times (t_i - t_{1s}))}, t_i \ge t_{1s} \end{cases}$$
(18)

avec $S(t_i)$ la concentration en spores (UFC/ml) au temps t_i , S_{max} est la concentration maximale en spores (UFC/ml), μ_s est le taux maximal de sporulation (h⁻¹), t_{1s} est le temps d'apparition de la première spore (h).

$$S(t_i) = S_{max} \times \left(1 - \exp\left(-\frac{t_i - t_{1s}}{\left(\frac{1}{\mu_s}\right) + t_{1s}}\right) \right)$$
(19)

avec les mêmes paramètres que décrits précédemment (équation 18).

5.2. Résultats et discussion

Les courbes des cinétiques de sporulation expérimentales obtenues dans les trois conditions testées étaient de formes variables. La cinétique de sporulation en fermenteur à 25°C, pH 7,0 présentait une apparition abrupte des spores entre 36 h et 46 h de culture alors que la cinétique à 37°C, pH 5,0 présentait une apparition plus progressive des spores de 18 h à 70 h de culture environ. La cinétique en erlen à 37°C comportait deux phases d'apparition des spores : une première correspondant à une apparition abrupte d'une première population de spores (environ 3 log₁₀ (UFC/ml)) à 12 h de culture puis une apparition plus progressive des spores des spores de 20 h à 100 h de culture (Fig. 2.8).

Le modèle de Das et Sen a permis de décrire des cinétiques abruptes comme celle observée à 25°C, pH 7.0 en fermenteur. En revanche, il ne permet pas de décrire des apparitions progressives des spores au cours du temps comme à 37°C, pH 5,0. Dans ces cas, la cinétique de sporulation n'a pas été décrite correctement, avec un temps d'apparition des premières spores t_{1s} et une concentration maximale en spores S_{max} largement surestimés par rapport à la réalité biologique. Par exemple, l'estimation de S_{max} était de l'ordre de 10^{11} UFC/ml à 25°C, pH 7,0 et à 37°C, pH 5,0 et a été estimé à 5,0 × 10^{15} UFC/ml à 37°C pH 7,0. De plus les SCE étaient toujours les plus élevées avec ce modèle par rapport aux deux autres modèles (Tableau 2.4). Ces mauvais ajustements des cinétiques progressives d'apparition des spores sont principalement dus au fait que ce sont les concentrations en spores sous leurs formes non

principalement dus au fait que ce sont les concentrations en spores sous leurs formes non transformées (UFC/ml) qui sont décrites et pas leurs formes logarithmiques (\log_{10} (UFC/ml)). Ceci conduit à des taux de sporulation μ_s très élevés (de l'ordre de 10^7 à 10^9) et donc à des valeurs $1/\mu_s$ très faibles qui n'ont alors plus d'impact sur la qualité d'ajustement de la cinétique.



Fig. 2.8. Cinétiques de sporulation de *B. subtilis* BSB1 cultibée en fermenteur en BHI, 25°C, pH 7,0, a_w 0,996 en fermenteur (a), en BHI, 37°C, pH 5,0, a_w 0,996, en fermenteur (b) et en LB, 37°C, pH 7,0, a_w 0,996, en erlen (c).

Les cinétiques expérimentales (•) ont été ajustées avec le modèle croissance sporulation (____), le modèle de Das et Sen (2011) (....) et avec le modèle de Baril et al. (2012) (____).

Tableau 2.4. Estimations des paramètres de sporulation des modèles de Baril *et al.* (2012), de Das et Sen (2011) et du modèle de croissance-sporulation pour trois cinétiques de sporulation.

	Paramètres	BHI, 25°C,	BHI, 37°C,	LB, 37°C, pH 7,0
		pH 5,0 en	pH 5,0 en	en erlen
		fermenteur	fermenteur	
Modèle de Baril et	$t_{1s}(\mathbf{h})$	33,3	11,3	-17,2
al. (2012)		[32,4-34,2]	[4,8-17,7]	[(-24,0)1(0,4)]
	μ_s (h ⁻¹)	0,267	0,053	0,022
		[0,213-0,322]	[0,0,35-0,072]	[0,017-0,027]
	Smax	18,15	16,15	21,89
	(ln (UFC/ml))	[17,62-18,67]	[15,04-17,26]	[20,16-23,62]
	SCE	4,77	27,36	56,56
Modèle de Das et	$t_{ls}(\mathbf{h})$	39,1	60,6	82,4
Sen (2011)		[14,1-64,1]	[23,7-97,4]	[65,1-99,7]
	$1/\mu_s$ (h)	/	/	/
	S _{max}	18,57	16,78	21,81
	(ln UFC/ml)	[17,76-19,38]	[16,11-17,45]	[21,46-22,17]
	SCE	193,61	850,46	3888,41
Modèle de	N_0	9,35	8,33	7,02
croissance-	(ln (UFC/ml))	[8,43-10,27]	[7,25-9,40]	[6,32-7,72]
sporulation	λ (h)	9,9	1,6	0,6
-		[9,1-10,6]	[0,3-3,0]	[0,1-1,0]
	$\mu_{max}(h^{-1})$	220	1,291	2,389
		[1,74-2,66]	[0,998-1,584]	[2,159-2,620]
	N _{max}	20,55	19,73	21,10
	(ln (UFC/ml))	[20,14-20,97]	[19,43-20,02]	[20,73-21,47]
	P _{max}	0,087	0,0226	1
		[0,028-0,146]	[0,0049-0,040]	[0,331-1]
	t_{max} (h)	40,3	68,1	139,6
		[38,3-42,2]	[57,8-78,4]	[123,7-155,4]
	σ (h)	2,54	12,65	29,123
		[2,05-3,02]	[10,16-15,14]	[25,78-32,46]
	S _{max}	18,86	15,93	20,62
	(ln (UFC/ml))			
	(non estimé)			
	t_{1s} (h) (non	34	18	12
	estimé)			
	SCE	7,17	29,38	23,91

 t_{1s} est le temps d'apparition des premières spores ; μ_s est le taux de sporulation ; S_{max} est la concentration maximale en spores ; N_0 est la concentration initiale en cellules végétatives ; λ est le temps de latence avant la croissance ; N_{max} est la concentration maximale en cellules totales ; P_{max} est la proportion maximale de cellules qui s'engagent en sporulation en même temps, t_{max} est le temps auquel P_{max} est obtenu et σ est la dispersion de la probabilité d'engagement en sporulation.

C'est pourquoi il a été impossible d'estimer les valeurs de μ_s qui ont alors été considérées comme des valeurs nulles dans nos cas d'étude (Tableau 2.4). Ce paramètre perd alors son utilité et donc son sens biologique. Dans les travaux de ces auteurs, seule la phase de ralentissement d'apparition des spores à partir de 10⁷ UFC/ml a pu être décrite avec leur modèle, mais pas la cinétique totale (voir *Bioresource technology* (102) p. 9663, Fig.2).

Le modèle de Baril est efficace pour décrire des cinétiques abruptes (25°C, pH 7,0) et progressives (37°C, pH 5,0) de sporulation. Cependant, ce modèle ne convient pas lorsque la cinétique présente deux phases: une phase abrupte puis une phase progressive observée à 37°C, pH 7,0. Dans cette condition, le modèle de Baril estime l'apparition de la première spore par millilitre à un temps antérieur au temps t₀ d'inoculation de la bactérie dans le milieu de culture. De plus, ce modèle estime que la concentration maximale en spores est supérieure à la concentration maximale en cellules totales. Ces estimations sont incohérentes avec la réalité expérimentale et la réalité biologique, ce qui soulève la question de la signification biologique de ces deux paramètres du modèle de Baril.

Le modèle de croissance-sporulation a permis de décrire correctement les trois cinétiques de sporulation. Pour les deux cinétiques en milieu BHI, les qualités d'ajustement étaient comparables entre ce modèle et le modèle de Baril (Tableau 2.4). En revanche, le modèle de croissance-sporulation a permis de calculer précisément le temps d'apparition des premières spores t_{1s} à 37°C, pH 7,0, (à 12 h de culture) et de détemriner une valeur de concentration maximale en spores cohérente avec la réalité expérimentale et biologique. L'avantage du modèle de croissance-sporulation est qu'il contient des paramètres qui qualifient le processus de sporulation dans sa définition, à savoir un processus de différenciation des cellules végétatives en spores. Ainsi, la concentration maximale en spores ne peut pas être estimée à une valeur supérieure à la concentration maximale en cellules végétatives. De plus, le modèle n'autorise pas une estimation du temps d'apparition des premières spores t_{1s} à un temps inférieur au temps nécessaire pour compléter ce processus de sporulation t_f .

6. Conclusions du chapitre 2

Le modèle cinétique développé dans cette étude, répond aux objectifs et contraintes fixées. Il permet de décrire la dynamique de sporulation à l'échelle populationnelle avec des paramètres explicatifs du processus de sporulation. Plus précisément, c'est un modèle de différenciation des cellules végétatives en spores (Focus 1) qui décrit une cinétique de sporulation à partir d'une cinétique de croissance grâce à deux paramètres qui qualifient la sporulation : la probabilité des cellules végétatives à se différencier en spores au cours du temps et le temps de formation de la spore une fois les cellules engagées en sporulation.

La signification biologique de ces deux paramètres de sporulation a été évaluée expérimentalement en utilisant un variant de *B. subtilis* BSB1: la souche SpoIIAA-gfp (*amyE:: P_{spoIIAA}-gfp*) qui produit une molécule fluorescente, la Green Fluorescent Protein (GFP) lorsque le promoteur du gène précoce de sporulation *spoIIAA* est activé, autrement dit, lorsque la cellule initie la sporulation (Article). Le temps de formation de la spore a pu être estimé à des valeurs comprises entre 4,0 h (à 49°C) et 7.4 h (à 27°C) dans nos conditions expérimentales. La probabilité d'engagement en sporulation dans la population bactérienne suit une loi de probabilité normale (Focus 2) qui permet d'évaluer l'hétérogénéité d'entrée en sporulation de la population bactérienne au cours du temps.

Le modèle de croissance-sporulation a été testé pour ajuster des cinétiques obtenues dans d'autres conditions expérimentales et a prouvé son efficacité pour décrire les cinétiques de sporulation par rapport aux modèles de la littérature comme celui de Das et Sen (2011) et celui de Baril *et al.* (2012) (Focus 3).

7. References

- 1. Postollec F, Mathot A-G, Bernard M, Divanac'h M-L, Pavan S, Sohier D. 2012. Tracking spore-forming bacteria in food: from natural biodiversity to selection by processes. Int J Food Microbiol 158:1–8.
- 2. Heyndrickx M. 2011. The Importance of endospore-forming bacteria originating from soil for contamination of industrial food processing. Appl Environ Soil Sci 1–11.
- 3. Miller RA, Kent DJ, Watterson MJ, Boor KJ, Martin NH, Wiedmann M. 2015. Spore populations among bulk tank raw milk and dairy powders are significantly different. J Dairy Sci 98:8492–8504.
- 4. Pinon A, Zwietering M, Perrier L, Membre J-M, Leporq B, Mettler E, Thuault D, Coroller L, Stahl V, Vialette M. 2004. Development and validation of experimental protocols for use of cardinal models for prediction of microorganism growth in food products. Appl Environ Microbiol 70:1081–1087.
- 5. Hoboken, NJ. 2017. Quantitative microbiology in food processing: modeling the microbial ecology. John Wiley & Sons, Chichester, UK ;
- 6. Doyle MP, Buchanan RL. 2012. Food microbiology: Fundamentals and frontiers. Science.
- 7. Nguyen Thi Minh H, Durand A, Loison P, Perrier-Cornet J-M, Gervais P. 2011. Effect of sporulation conditions on the resistance of *Bacillus subtilis* spores to heat and high pressure. Appl Microbiol Biotechnol 90:1409–1417.
- 8. Mah J-H, Kang D-H, Tang J. 2008. Effects of minerals on sporulation and heat resistance of *Clostridium sporogenes*. Int J Food Microbiol 128:385–389.
- Baril E, Coroller L, Couvert O, Leguérinel I, Postollec F, Boulais C, Carlin F, Mafart P. 2012. Modeling heat resistance of *Bacillus weihenstephanensis* and *Bacillus licheniformis* spores as function of sporulation temperature and pH. Food Microbiol 30:29–36.
- Mtimet N, Trunet C, Mathot A-G, Venaille L, Leguérinel I, Coroller L, Couvert O. 2015. Modeling the behavior of *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 12980 throughout its life cycle as vegetative cells or spores using growth boundaries. Food Microbiol 48:153– 162.
- 11. Peña WEL, Massaguer PR de, Teixeira LQ. 2009. Microbial modeling of thermal resistance of *Alicyclobacillus acidoterrestris* CRA7152 spores in concentrated orange juice with nisin addition. Braz J Microbiol 40:601–611.
- 12. Leguérinel I, Couvert O, Mafart P. 2007. Modelling the influence of the sporulation temperature upon the bacterial spore heat resistance, application to heating process calculation. Int J Food Microbiol 114:100–104.
- 13. Dubnau D, Mirouze N. 2013. Chance and necessity in *Bacillus subtilis* development. Microbiol Spectr 1:1–21.
- 14. Faille C, Bénézech T, Midelet-Bourdin G, Lequette Y, Clarisse M, Ronse G, Ronse A, Slomianny C. 2014. Sporulation of *Bacillus spp.* within biofilms: a potential source of contamination in food processing environments. Food Microbiol 40:64–74.

- Gauvry E, Mathot A-G, Leguérinel I, Couvert O, Postollec F, Broussolle V, Coroller L. 2016. Knowledge of the physiology of spore-forming bacteria can explain the origin of spores in the food environment. Res Microbiol 168:369-378.
- 16. Baril E, Coroller L, Postollec F, Leguerinel I, Boulais C, Carlin F, Mafart P. 2011. The wet-heat resistance of *Bacillus weihenstephanensis* KBAB4 spores produced in a two-step sporulation process depends on sporulation temperature but not on previous cell history. Int J Food Microbiol 146:57–62.
- 17. Dejong H, Geiselmann J, Batt G, Hernandez C, Page M. 2004. Qualitative simulation of the initiation of sporulation in. Bull Math Biol 66:261–299.
- 18. Jabbari S, Heap JT, King JR. 2011. Mathematical modelling of the sporulation-initiation network in *Bacillus Subtilis* revealing the dual role of the putative quorum-sensing signal molecule PhrA. Bull Math Biol 73:181–211.
- 19. Schultz D, Wolynes PG, Ben Jacob E, Onuchic JN. 2009. Deciding fate in adverse times: sporulation and competence in *Bacillus subtilis*. Proc Natl Acad Sci U S A 106:21027–21034.
- 20. Baril E, Coroller L, Couvert O, El Jabri M, Leguerinel I, Postollec F, Boulais C, Carlin F, Mafart P. 2012. Sporulation boundaries and spore formation kinetics of *Bacillus* spp. as a function of temperature, pH and a_w. Food Microbiol 32:79–86.
- 21. Das S, Sen R. 2011. Kinetic modeling of sporulation and product formation in stationary phase by *Bacillus coagulans* RK–02 vis-à-vis other Bacilli. Bioresour Technol 102:9659–9667.
- 22. Narula J, Kuchina A, Lee DD, Fujita M, Süel GM, Igoshin OA. 2015. Chromosomal arrangement of phosphorelay genes couples sporulation and DNA replication. Cell 162:328–337.
- 23. Buescher JM, Liebermeister W, Jules M, Uhr M, Muntel J, Botella E, Hessling B, Kleijn RJ, Le Chat L, Lecointe F, Mader U, Nicolas P, Piersma S, Rugheimer F, Becher D, Bessieres P, Bidnenko E, Denham EL, Dervyn E, Devine KM, Doherty G, Drulhe S, Felicori L, Fogg MJ, Goelzer A, Hansen A, Harwood CR, Hecker M, Hubner S, Hultschig C, Jarmer H, Klipp E, Leduc A, Lewis P, Molina F, Noirot P, Peres S, Pigeonneau N, Pohl S, Rasmussen S, Rinn B, Schaffer M, Schnidder J, Schwikowski B, Van Dijl JM, Veiga P, Walsh S, Wilkinson AJ, Stelling J, Aymerich S, Sauer U. 2012. Global network reorganization during dynamic adaptations of *Bacillus subtilis* metabolism. Science 335:1099–1103.
- 24. Nicolas P, Mäder U, Dervyn E, Rochat T, Leduc A, Pigeonneau N, Bidnenko E, Marchadier E, Hoebeke M, Aymerich S, Becher D, Bisicchia P, Botella E, Delumeau O, Doherty G, Denham EL, Fogg MJ, Fromion V, Goelzer A, Hansen A, Härtig E, Harwood CR, Homuth G, Jarmer H, Jules M, Klipp E, Le Chat L, Lecointe F, Lewis P, Liebermeister W, March A, Mars RAT, Nannapaneni P, Noone D, Pohl S, Rinn B, Rügheimer F, Sappa PK, Samson F, Schaffer M, Schwikowski B, Steil L, Stülke J, Wiegert T, Devine KM, Wilkinson AJ, van Dijl JM, Hecker M, Völker U, Bessières P, Noirot P. 2012. Condition-dependent transcriptome reveals high-level regulatory architecture in *Bacillus subtilis*. Science 335:1103–1106.
- 25. Chastanet A, Losick R. 2007. Engulfment during sporulation in *Bacillus subtilis* is governed by a multi-protein complex containing tandemly acting autolysins: Multi-protein complex containing autolysins. Mol Microbiol 64:139–152.

- 26. Cormack BP, Valdivia RH, Falkow S. 1996. FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). Gene 173:33–38.
- 27. Blokpoel MCJ, O'Toole R, Smeulders MJ, Williams HD. 2003. Development and application of unstable GFP variants to kinetic studies of mycobacterial gene expression. J Microbiol Methods 54:203–211.
- 28. Campbell TN, Choy FYM. 2001. The effect of pH on Green Fluorescent Protein: a brief review. Mol Biol Today 2:1–4.
- 29. Guiziou S, Sauveplane V, Chang H-J, Clerté C, Declerck N, Jules M, Bonnet J. 2016. A part toolbox to tune genetic expression in *Bacillus subtilis*. Nucleic Acids Res 44:7495–7508.
- Hageman JH, Shankweiler GW, Wall PR, Franich K, McCowan GW, Cauble SM, Grajeda J, Quinones C. 1984. Single, chemically defined sporulation medium for *Bacillus subtilis*: growth, sporulation, and extracellular protease production. J Bacteriol 160:438–441.
- 31. Rosso L, Lobry JR, Bajard S, Flandrois JP. 1995. Convenient model to describe the combined effects of temperature and pH on microbial growth. Appl Environ Microbiol 61:610–616.
- 32. Huang H, Ridgway D, Gu T, Moo-Young M. 2003. A segregated model for heterologous amylase production by *Bacillus subtilis*. Enzyme Microb Technol 32:407–413.
- 33. Huet S, Bouvier A, Poursat M., Jolivet E. 2003. Statistical tools for nonlinear regression. Springer-Verlag, New York, USA.
- 34. Komin N, Skupin A. 2017. How to address cellular heterogeneity by distribution biology. Curr Opin Syst Biol.
- 35. Ryall B, Eydallin G, Ferenci T. 2012. Culture history and population heterogeneity as determinants of bacterial adaptation: the adaptomics of a single environmental transition. Microbiol Mol Biol Rev 76:597–625.
- 36. Süel GM, Garcia-Ojalvo J, Liberman LM, Elowitz MB. 2006. An excitable gene regulatory circuit induces transient cellular differentiation. Nature 440:545–550.
- 37. Suel GM, Kulkarni RP, Dworkin J, Garcia-Ojalvo J, Elowitz MB. 2007. Tunability and noise dependence in differentiation dynamics. Science 315:1716–1719.
- 38. Chung JD, Stephanopoulos G. 1995. Studies of transcriptional state heterogeneity in sporulating cultures of *Bacillus subtilis*. Biotechnol Bioeng 47:234–242.
- 39. Parker GF, Daniel RA, Errington J. 1996. Timing and genetic regulation of commitment to sporulation in *Bacillus subtilis*. Microbiol Read Engl 142:3445–3452.
- 40. Veening J-W, Smits WK, Hamoen LW, Kuipers OP. 2006. Single cell analysis of gene expression patterns of competence development and initiation of sporulation in *Bacillus subtilis* grown on chemically defined media. J Appl Microbiol 101:531–541.
- 41. Strauch MA, de Mendoza D, Hoch JA. 1992. cis-unsaturated fatty acids specifically inhibit a signal-transducing protein kinase required for initiation of sporulation in *Bacillus subtilis*. Mol Microbiol 6:2909–2917.
- 42. Nandy SK, Prasad V, Venkatesh KV. 2008. Effect of temperature on the cannibalistic behavior of *Bacillus subtilis*. Appl Environ Microbiol 74:7427–7430.

- 43. Narula J, Kuchina A, Zhang F, Fujita M, Süel GM, Igoshin OA. 2016. Slowdown of growth controls cellular differentiation. Mol Syst Biol 12:871-884.
- 44. Tan IS, Weiss CA, Popham DL, Ramamurthi KS. 2015. A quality-control mechanism removes unfit cells from a population of sporulating bacteria. Dev Cell 34:682–693.
- 45. Scherrer B. 2009. Biostatistique. Gzaëtan Morin Edition, Montreal.
- 46. Morimoto M, Arkin A, Poolla K. 2011. Modeling sporulation decisions in *Bacillus subtilis* as optimal evolutionary decision-making 3508–3513.
CHAPITRE 3 :

CARACTERISATION DE LA CROISSANCE DE

Bacillus subtilis BSB1

1. Introduction

En microbiologie prévisionnelle, la modélisation des effets des facteurs environnementaux sur un processus bactérien se réalise généralement en deux étapes. La première étape décrit la cinétique du processus et la deuxième décrit les effets des facteurs environnementaux sur les paramètres cinétiques. Dans le chapitre précédent, un modèle cinétique de croissance-sporulation a été développé. La deuxième étape consiste alors à décrire et modéliser les effets de facteurs environnementaux sur la croissance et la sporulation de *Bacillus subtilis* BSB1. Les facteurs environnementaux d'intérêt sont ceux qui constituent un levier pour limiter la croissance et la sporulation bactérienne en industrie.

La croissance bactérienne est le processus bactérien dont dépend d'autres processus de différentiation cellulaire tels que la formation de biofilm, l'entrée dans un état de compétence, le cannibalisme ou encore la formation de spores. C'est pourquoi, dans certaines études, les caractéristiques de croissance ont été proposées pour prévoir la résistance des spores aux traitements thermiques ou leur capacité à émerger et rependre une croissance (Mtimet *et al.*, 2015; Trunet *et al.*, 2015). Généralement, ces caractéristiques de croissance sont les valeurs cardinales de croissance, c'est-à-dire les valeurs minimales, optimales et maximales des facteurs environnementaux pour lesquelles la bactérie est capable de se développer. Il est donc nécessaire de disposer d'estimations précises et fiables des valeurs cardinales pour prévoir les comportements bactériens de manière générale. Curieusement alors que de nombreuses connaissances sont disponibles sur *B. subtilis* à différents niveaux (physiologiques, métaboliques) et pour caractériser ses différents comportements cellulaires (croissance, formation de spores, résistance des spores), ses valeurs cardinales ne sont pas connues.

L'objectif de ce chapitre consiste à décrire les effets des facteurs environnementaux sur la croissance et de déterminer les valeurs cardinales de croissance de *B. subtilis* BSB1 pour la température, le pH et l'activité de l'eau.

2. Determination of the cardinal values of growth of *Bacillus subtilis* BSB1 with a classical factorial design and a sequential D-optimal design.

A partir de l'article proposé pour soumission dans le journal International Journal of Food Microbiology

Emilie Gauvry¹, Jean-Pierre Gauchi², Louis Coroller¹

 ¹ Université de Brest, EA 3882, Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Ecologie Microbienne, IBSAM, UMT Spore-Risk, 6 rue de l'université, 29334 Quimper.
 ² Institut National de la Recherche Agronomique, Unité MaIAGE, Domaine de vilvert F-78352 Jouy-en-Josas.

emilie.gauvry@univ-brest.fr, jean-pierre.gauchi@inra.fr, anne-gabrielle. mathot@univbrest.fr, ivan.legérinel@univ-brest.fr, louis.coroller@univ-brest.fr *Correspondance and reprints

Highlights

D-optimal design leads to accurate estimations of the cardinal values of growth of *B. subtilis*. D-optimal design offers the possibility to choose between various factors realistic level. Knowledge on the bacterial physiology are needed to build D-optimal designs.

Keywords Optimal design, cardinal model, growth limits

Conflicts of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

This work was supported by Quimper Communauté and Région Bretagne.

2.1. Abstract

In the field of predictive microbiology, the cardinal values (minimal, optimal and maximal values) of growth are commonly used to predict the ability of microorganisms to grow according to environmental conditions. In this study, a factorial design with 51 experiments and a D-optimal design with 30 experiments were performed independently to estimate the cardinal values of growth of *Bacillus subtilis* BSB1 for temperature, pH and water activity. The D-optimal design provided more accurate estimations of the cardinal values of growth than the factorial design. However, the estimates which were the most reliable biologically were those obtained with the factorial design. From these results, we encourage the scientific community to use D-optimal designs as it allows reducing the workload and it increases the accuracy of the estimations. Somehow, D-optimal designs should be used carefully as they are efficient if good guesses on the cardinal values of growth of the microorganism studied are made.

2.2. Introduction

Predictive microbiology aims to predict bacterial growth or inactivation according to the processes applied in the food industry (Mejlholm *et al.*, 2010; Pinon *et al.*, 2004; Teleken *et al.*, 2011). It offers a good support for the preservation of food safety and food quality that could be affected by the presence or the activity of microorganisms. A way to predict bacterial growth is based on the use of the cardinal of growth values as modeling parameters. The cardinal values of growth are the minimal, optimal and maximal values of environmental factors characterizing the growth of the microorganisms. They are classically determined with a twosteps procedure. The first step consists in fitting the growth kinetics with a primary model in order to determine the growth parameters such as the maximal growth rate (μ_{max}). The values of maximal growth rates are obtained for different levels of the environmental factors studied, following a given experimental design. The second step consists in fitting a secondary model as the cardinal model of (Rosso *et al.*, 1995), on the estimated growth rate. The main environmental factors studied are the temperature, the pH, and the water activity (a_w).

In the field of predictive microbiology experimental designs used are often full factorial designs which allow evaluating the effects of environmental factors independently (Box and Cox, 1964). Optimal designs based on the confidence ellipsoid parameters (the D-, A-, E-optimal designs) have been mathematically justified for models linear in their parameters, as polynomial models (Atkinson and Donev, 1992; Atkinson and Hunter, 1968). Despite the cardinal model of growth is nonlinear in its parameters, the optimal designs are useful to set up experiments in static or for dynamic environmental conditions (Bernaerts *et al.*, 2002; Van Derlinden *et al.*, 2008). Rigorous and mathematically based approaches exist for nonlinear models (see for instance (Pronzato and Pázman, 2013) but the designs are too heavy to compute when more than 4 parameters have to be estimated.

The major objective of this study is (i) to obtain accurate estimates of the cardinal values of growth, and their confidence intervals and (ii) to reduce workload at the laboratory scale. For this, we propose a strategy based on a sequential procedure of two D-optimal designs. The first design is computed and used to obtain first estimations of the cardinal values, what is useful when no knowledge is available on the cardinal values of the studied microorganism. These first estimations are then used as a priori values to compute the second D-optimal design which is performed to refine the estimations of the cardinal values. The sequential D-optimal design were compared to a classical full factorial design on different criteria: the workload, the

accuracy of the predictions, and the reliability of the estimates of the cardinal values of growth, in a biological point of view.

Many studies used the growth rate (μ_{max}) values under their "square-root form" to estimate the parameters of the secondary model. Whereas this practice is used to have a Gaussian distribution of the residues, this transformation is not always rigorously justifiable from a statistical point of view (Rosso and Robinson, 2001; Zwietering *et al.*, 1994). The approach we propose takes into account the heterogeneity of the variance of the maximal growth rate (μ_{max}), contributing to more accurate estimations of the cardinal values and their confidence intervals.

2.3. Material and methods

2.3.1. Bacterial strain and conservation

The strain used in this study was *Bacillus subtilis* BSB1 which is a *trp*+ derivative of *B. subtilis* 168 (Buescher *et al.*, 2012; Nicolas *et al.*, 2012) kindly provided by the Micalis institute, at the National Institute for Agricultural Research (INRA) of Jouy-en-Josas in France. The strain was isolated on Luria Bertani (LB) plates (DifcoTM, Becton, Dickinson and Company) and incubated overnight at 37 °C. A colony was re-suspended in LB broth, under a 100 rpm agitation at 37 °C until it reached an absorbance at 600 nm (A₆₀₀) of 1.0. From this pre-culture, a 100-fold dilution was performed in a 100 mL of LB broth in flasks, in the same culturing conditions during 3 h. A second dilution was then performed in the same conditions. When the A₆₀₀ of the suspension reached 1.0, glycerol was added to the culture at a final concentration of 25% w/w and the mix was dispended in cryovials. Conservation was then performed at -80 °C. These stocks were renewed every month to guarantee the level of cell recovery with a concentration closed to 1.0×10^9 UFC/mL.

2.3.2. Medium preparation, bacterial cultures and monitoring of growth

Each experiment was performed in modified Luria Bertani broth sterilized by filtration $(0.22 \ \mu m)$. The water activity of the medium was adjusted with sodium chloride. The pH was adjusted with sodium hydroxide 1 M or hydrochloric acid 1 M.

From bacterial stocks at -80 °C, an adequate dilution was performed in Tryptone Salt broth (Biokar Diagnostics, Allonne, France) and 1 mL of this dilution was inoculated in 250

mL flask containing 100 mL LB broth, in order to obtain an initial concentration of 10³ UFC/mL. Bacterial cultures were performed under 100 rpm agitation in thermostatically controlled ovens. Note that the culture medium was previously set to the studied temperature before the inoculation. The growth kinetics were performed by enumeration of total cells after adequate dilutions in TS broth, including three different dilutions in nutrient agar medium (Biokar Diagnostics, Allonne, France) and incubation at 37 °C during 24 h. Only plates containing between 15 and 300 colonies were used for enumeration.

The growth limits of the strain were assessed experimentally with Growth/No Growth (G/NG) experiments. Bacterial cultures were performed as previously described and the bacterial suspensions were incubated during 21 days and an enumeration of total cells was performed after 3, 7 and 14 days to assess the bacterial growth. We considered that bacterial growth occured when the concentration was 10-fold the initial concentration of the inoculum. The environmental conditions tested were between pH 4.8 and 5.00, between pH 8.90 and 9.30 in intervals of 0.05, between 5 °C and 13 °C and between 53 °C and 59 °C in intervals of 2 °C and between $a_w 0.920$ and 0.940 in intervals of 0.05.

2.3.3. Models of growths

2.3.3.1. Primary model of growth

The logistic growth model with delay of Kono (1968) modified by Rosso *et al.* (1996) was used to fit the experimental growth kinetics (equation 1).

$$\ln(N(t_i)) = \begin{cases} \ln(N_0), \ t_i < \lambda \\ \ln\left(\frac{N_{max}}{\left(1 + \frac{N_{max}}{N_0}\right) \times \exp(-\mu_{max}(t_i - \lambda))}\right), t_i \ge \lambda \end{cases}$$
(1)

with N_0 the concentration of the inoculum (CFU/mL), N_{max} the maximal total cell concentration (CFU/mL), λ the lag before growth (h) and μ_{max} the maximal vegetative growth rate (h⁻¹).

2.3.3.2. Secondary model of growth

The maximal growth rate μ_{max} was modelled as a function of temperature (T), pH and a_w (equation 2).

$$\mu_{max}(T, pH, a_w) = \mu_{opt} \times CM_2(T) \times CM_{0.1}(pH) \times CM_1(a_w) \times \zeta(T, pH, a_w)$$
(2)

with μ_{max} , the maximal growth rate obtained in the given conditions of temperature, pH and a_w , and μ_{opt} is the growth rate obtained in optimal conditions of environmental factors. The effects of each environmental factors CM_n and the effects of the interactions between factors $\zeta(T, pH, a_w)$ on the optimal growth rate are multiplicative and are calculated with equation 3 for temperature, equation 4 for pH, equation 5 for a_w and equations 5 to 7 for the interactions between the three factors (Augustin *et al.*, 2000; Augustin and Carlier, 2000; Le Marc *et al.*, 2002).

$$CM_{2}(T) = \begin{cases} 0, \ T \leq T_{min} \\ \frac{(T - T_{max})(T - T_{min})^{2}}{(T_{opt} - T_{min})[(T_{opt} - T_{min})(T - T_{opt}) - (T_{opt} - T_{max})(T_{opt} + T_{min} - 2T)]}, \ T_{min} < T < T_{max} \end{cases}$$
(3)

$$CM_{0.1}(pH) =$$

$$\begin{cases} 0, \ pH \le pH_{min} \\ \frac{(pH - pH_{max})(pH - pH_{min})^{0.1}}{(pH_{opt} - pH_{min})(pH - pH_{opt}) - (pH_{opt} - pH_{max}) \times (-0.9 \ pH_{opt} + pH_{min} - 0.1 \ pH)}, \ pH_{min} < pH < pH_{max} \end{cases}$$
(4)

$$CM_{2}(a_{w}) = \begin{cases} 0, \ a_{w} \leq a_{w_{min}} \\ \frac{(a_{w} - a_{w_{min}})}{1 - a_{w_{min}}}, \ a_{w_{min}} < a_{w} < a_{w_{max}} \end{cases}$$
(5)
$$\zeta \left(T, pH, a_{w} = \begin{cases} 1 \ if \ \psi \leq 0.5 \\ 2(1 - \psi)if \ 0.5 < \psi < 1 \\ 0 \ if \ \psi \geq 1 \end{cases} \right)$$
(6)

where:

$$\psi = \frac{\left(\frac{T_{opt}-T}{T_{opt}-T_{min}}\right)^{3}}{2\left(1-\left(\frac{pH_{opt}-pH}{pH_{opt}-pH_{min}}\right)^{3}\right)\left(1-\left(\frac{a_{wopt}-a_{w}}{a_{wopt}-a_{wmin}}\right)^{3}\right)} + \frac{\left(\frac{pH_{opt}-pH}{pH_{opt}-pH_{min}}\right)^{3}}{2\left(1-\left(\frac{T_{opt}-T}{T_{opt}-T_{min}}\right)^{3}\right)\left(1-\left(\frac{a_{wopt}-a_{w}}{a_{wopt}-a_{wmin}}\right)^{3}\right)} + \frac{\left(\frac{a_{wopt}-a_{w}}{a_{wopt}-a_{wmin}}\right)^{3}\right)}{2\left(1-\left(\frac{T_{opt}-T}{T_{opt}-T_{min}}\right)^{3}\right)\left(1-\left(\frac{a_{wopt}-a_{w}}{a_{wopt}-a_{wmin}}\right)^{3}\right)} \right)}$$
(7)

with "min", "max" and "opt" the minimal, maximal and optimal values of the environmental factors T, pH and a_w for which the bacteria are able to grow.

Therefore, the eight parameters which have to be estimated are:

$$\Theta = \{\mu_{opt}, T_{min}, T_{max}, T_{opt}, pH_{min}, pH_{max}, pH_{opt}, a_{w_{min}}\}$$
(8)

2.3.4. The factorial design

The first experimental design was composed of three independent factorial designs to evaluate the effect of temperature (17 experiments), the effect of pH (21 experiments) and the effect of water activity (13 experiments) (Table 3.2). This factorial design was initially built with equi-distributed coordinates from 5°C to 60 °C, from pH 4.0 to 10.0 and from $a_w 0.910$ to 0.996 . Depending on the results obtained through the performing of experiments, new coordinates were chosen more or less arbitrarily and integrated into the final factorial design. In this way, the factorial design was built in the course of experiments in order to get closer to the growth limits.

2.3.5. Computation of the optimal design

2.3.5.1. The statistical model

We considered simultaneously the classical statistical nonlinear regression model (equation 9)

$$Y = \eta(\xi, \theta) + \varepsilon \tag{9}$$

where Υ was the vector of the total number of observations N, η (ξ , θ) was the maximal growth rate μ_{max} evaluated with the secondary model of growth, for each experiment of the experimental design ξ (equation 10), θ was the p-dimensional vector of the *p* parameters to be estimated (equation 8). ε was the *N*-vector of the errors and in this paper we assumed that each ε_u (u=1,...,N), was independently normally distributed as N (0, σ^2_u), u=1,...,N, with mean equals to zero and a variance equals to σ^2_u .

$$\xi = \xi_{N,N_{S},\{r\}} = \begin{cases} x_{1} \dots x_{i} \dots x_{N_{S}} \\ r_{1} \dots r_{i} \dots r_{N_{S}} \end{cases}$$
(10)

with N_s was the support points, x_i was a 3-dimensional support point for the three environmental factors (T, pH, a_w), {r}= $r_1,...,r_{N_s}$, was the repetition scheme with r_i the repetition number of the microbiological experiment at the support point x_i . Let us note that $r_i \ge 1$ and $\sum_{i=1}^{N_s} r_i = N$.

For the estimation of the parameters θ , we used the nonlinear weighted least squares estimator $\hat{\theta}$ (equation 11).

$$\widehat{\Theta} = Arg \left\{ \min_{\theta \in \Theta} \sum_{u=1}^{N} w_u [y_u - \eta(\xi_u, \theta)]^2 \right\}$$
(11)

where ξ_u was a given row of the ξ matrix (u= 1 to N), y_u where the experimental values of μ_{max} , and the weights w_u were assumed to be equal to the inverse of the variance $1/\sigma_u^2$.

Generally, the σ_u^2 are unknown. Then, it is necessary to have some estimates $\hat{\sigma}_u^2$, of the σ_u^2 that will lead to the weight estimates, $\hat{\omega}_u = 1/\hat{\sigma}_u$. Therefore, the estimates $\hat{\sigma}_u^2$ have to be computed from anterior available data (see results section).

Numerous criteria exist to build optimal designs and several books are devoted on this matter (Atkinson and Donev, 1992; Walter and Pronzato, 1997). Hereafter, we will only provide some basic elements.

2.3.5.2. Optimal design for parameter estimation

The aim of the D-optimality criterion is to obtain accurate estimations of the parameters, when the η model (the growth model) is linear relatively to its θ parameters. Indeed this criterion leads to minimize the volume of the usual parametric confidence ellipsoid. In the case where the η model (in this study, the secondary model of growth) is nonlinear relatively to its θ parameters, an experimental strategy based on the D-optimality criterion is only an approximate and local optimal strategy (Walter and Pronzato, 1997). But the computation of the corresponding optimal designs for an exact criteria takes a too long computing-time for models with many parameters as in our case (p=8).

The D-optimal design, for a beforehand chosen N, is defined as:

$$\xi_{N,N_{\mathcal{S}}^*\{r^*\}}^D = Arg\left\{\max_{\{\xi,N_{\mathcal{S}},\{r\}\in\Xi}\det\left(M(\xi_{N_{\mathcal{S}},\{r\}},\theta)\right)\right\}$$
(12)

where $(\xi_{N_S,\{r\}}, \theta)$ is the Fisher Information $(p \times p)$ -Matrix, N_S^* and r^* are the optimal values of N_S and $\{r\}$ of the D-optimal design to obtain the most accurate estimations of the cardinal values of growth.

The Fisher Information Matrix where the errors are assumed independent and the Gaussian is given in equation 13:

$$M(\xi_{,N_S,\{r\}},\theta) = J(\xi_{,N_S,\{r\}},\theta)^T W J(\xi_{,N_S,\{r\}},\theta)^T$$
(13)

where $J(\xi_{N_S,\{r\}},\theta)$ is the $(N \times p)$ jacobian matrix (whom the general term is $\left\{\frac{\partial \eta(W_{ik},\theta}{\partial \theta_j}\right\}$, i=1,..., N_S , k=1,...,r_i, j=1,...,p) and W= Diag $\{w_u, i=1,...,N\}$.

Note that the Fisher Information Matrix depends on the unknown parameters θ . Then, a guess θ_0 of these parameters will be needed for the computations.

2.3.5.3. Sequential approach and experimental constraints

As the choice of the guess θ_0 can be problematic, a better way is to use a sequential approach based on at least two D-optimal designs (Ford and Silvey, 1980; Wu, 1985). The first D-optimal design D1 is based on guess on the parameters θ_0 and their bounds, coming from the literature (Table 3.1). This first design is performed experimentally and allows obtaining the first estimates of the parameters $\hat{\theta}$. Then, the next D-optimal design D2 is based on new θ_0 which are equal to the $\hat{\theta}$ obtained with the preceding D-optimal design D1. For the building of each discrete D-optimal design, we used the double-exchange algorithm proposed by (Fedorov, 1972), implemented in the OPTEX procedure of the SAS/QC software.

Moreover, the calculation of the two designs D1 and D2 took into account experimental constraints on the values of the environmental factors. The limits of the temperature, pH and water activity tested were chosen so that every combination of the three environmental factors allows a bacterial growth according to the cardinal model. As constraints on materials exist

also, steps were imposed for each environmental factors (2 $^{\circ}$ C for temperature, 0.2 for pH and 0.005 for a_w) (Table 3.1).

2.3.6. Data processing

The growth kinetics were fitted with the kinetic model of growth by minimizing the sum of squared error of the kinetic model (tool nlinfit, MATLAB and Statistics Toolbox Release 2013a, The MathWorks, Inc., Natick, Massachusetts, United States) with Eq. (14) and standard deviations (SD) of the estimations were calculated from the confidence intervals 95% calculated with the tool nlparci (MATLAB). A stochastic (global) minimization algorithm based on a random search with learning (Pronzato *et al.*, 1984) coded in Matlab software, was used to estimate the parameter values $\hat{\theta}$.

$$ESS = \sum (y_i - \hat{y}_i)^2 \tag{14}$$

with y_i the experimental data for the concentration of total cells or spores (ln (CFU/mL))) and \hat{y}_i the value calculated with the model.

The error of the model was evaluated with the *RMSE* (Root Mean Square Error):

$$RMSE = \sqrt{\frac{(y-\widehat{y})^2}{m}}$$
(15)

with y and \hat{y} the observed and predicted values of the concentration of total cells (ln(CFU/mL)) or the growth rate (h⁻¹) and *m* is the number of experimental data.

For the estimations of the cardinal values of growth with the secondary models, an approximate parameter confidence interval for every $\hat{\theta}_j$, j=1,...,p, elements of $\hat{\theta}$, was computed. It is a classical one based on an asymptotic (1- α) % confidence interval defined in equation 16:

$$\left[\hat{\theta}_{j} \pm t_{N-p;1-\alpha/2} \left(J\left(\xi_{,N_{S},\{r\}},\hat{\theta}\right)^{T} W_{\xi\xi_{,N_{S},\{r\}}} J\left(\xi_{,N_{S},\{r\}},\hat{\theta}\right) \right)_{j}^{-1} \right]$$
(16)

where $t_{N-p;1-\alpha/2}$ is the (1- $\alpha/2$)-percentile for the Student distribution with (N-p) degrees of

freedom, for a given risk α (α =0.05). The *j* subscript means that the diagonal element of the inverse of Eq. (14) is involved, $\widehat{W}_{\xi,N_{S},\{r\}}J = diag(\widehat{w}_{1},...,\widehat{w}_{n})$ with $\widehat{w}_{u} = 1/\sqrt{var(\widehat{y}_{u})}$, u=1,...,N.

Let us note that the estimations of the cardinal values were bounded to the a priori values of the inferior and superior bounds of the guesses (Table 3.1).

Table 3.1. The *a priori* values of the cardinal values and of the optimal growth rate of *B*. subtilis and experimental constraints for the computation of the D-optimal design. The guesses $\theta_0 of$ the cardinal values of growth come from the literature. (Holtmann and Bremer, 2004; Nichols et al., 1995; Pandey et al., 2013; Pant et al., 2015; Tapia et al., 2007).

Parameter	A priori values θ_0 of the cardinal	Experimental constraints for the
θ	values	computation of the optimal designs
	[inferior bound, superior bound]	D1 and D2
T_{min} (°C)	11 [6, 16]	23 - 47
T_{max} (°C)	52 [47, 57]	(step: 2°C)
T_{opt} (°C)	37 [32, 42]	
pH_{min}	5.0 [4.0, 6.0]	[5.6 - 8.4]
pH_{max}	9.0 [8.0, 10.0]	(step: 0.2)
pH_{opt}	7.0 [6.0, 8.0]	
$a_{w min}$	0.910 [0.860, 960]	[0.970 - 0.997]
		(step: 0.05)
μ_{opt}	3.000 [2.000, 4.000]	

2.4. Results and discussion

The objective of this work was to estimate the cardinal values of growth of *B. subtilis* BSB, the most precisely and the most exactly as possible. From guesses on the cardinal values of growth (Table 3.1), a classical factorial design (Table 3.2) and a D-optimal design composed of two sequential optimal designs D1+D2 (Table 3.3) were performed. The estimations of the cardinal values obtained with these two designs were compared for two criteria: the precision of the estimations and their biological reality. In order to assess the precision of the estimations, their standard deviations were compared and in order to verify the biological reality of the Growth/No Growth experiments.

T (°C)	pН	aw	μ_{max} (h ⁻¹) +/- SD	T (°C)	pН	aw	μ_{max} (h ⁻¹) +/- SD
37	4.9	0.997	2.18 +/- 0.20	25	7.0	0.997	0.99 +/- 0.09
37	5.0	0.997	2.76 +/- 0.22	25	7.0	0.997	0.74 +/- 0.04
37	5.2	0.997	2.13 +/- 0.20	30	7.0	0.997	1.37 +/- 0.11
37	5.4	0.997	2.54 +/- 0.10	37	7.0	0.997	2.80 +/- 0.13
37	5.8	0.997	3.13 +/- 0.27	35	7.0	0.997	2.22 +/- 0.10
37	6.0	0.997	3.06 +/- 0.15	41	7.0	0.997	2.09 +/- 0.12
37	6.0	0.997	2.89 +/- 0.26	45	7.0	0.997	3.63 +/- 0.06
37	6.5	0.997	2.96 +/- 0.14	45	7.0	0.997	3.67 +/- 0.06
37	6.6	0.997	3.42 +/- 0.32	50	7.0	0.997	3.00 +/- 0.14
37	7.00	0.997	3.02 +/- 0.13	50	7.0	0.997	3.87 +/- 0.18
37	7.00	0.997	2.60 +/- 0.08	50	7.0	0.997	4.14 +/- 0.22
37	7.5	0.997	3.40 +/- 0.13	54	7.0	0.997	1.70 +/- 0.09
37	7.6	0.997	3.19 +/- 0.50	37	7.0	0.997	2.63 +/- 0.21
37	7.9	0.997	2.84 +/- 0.10	37	7.0	0.985	2.44 +/- 0.23
37	7.9	0.997	2.72 +/- 0.13	37	7.0	0.985	2.29 +/- 0.42
37	7.9	0.997	3.07 +/- 0.09	37	7.0	0.980	3.45 +/- 0.23
37	8.3	0.997	3.09 +/- 0.27	37	7.0	0.976	5.60 +/- 0.73
37	8.4	0.997	2.67 +/- 0.12	37	7.0	0.976	2.66 +/- 0.61
37	8.7	0.997	2.24 +/- 0.30	37	7.0	0.968	1.09 +/- 0.10
37	8.8	0.997	0.94 +/- 0.09	37	7.0	0.968	1.29 +/- 0.11
37	9.0	0.997	1.39 +/-0.18	37	7.0	0.959	1.37 +/- 0.08
15	7.0	0.997	0.27 +/- 0.01	37	7.0	0.959	1.35 +/- 0.08
15	7.0	0.997	0.90 +/- 0.13	37	7.0	0.954	2.02 +/- 4.53
15	7.0	0.997	0.54 +/- 0.02	37	7.0	0.954	0.94 +/- 0.09
18	7.0	0.997	0.57 +/- 0.04	37	7.0	0.953	0.43 +/- 0.21
18	7.0	0.997	0.50 +/- 0.06				

Table 3.2. Estimations of the growth rates of *B. subtilis* BSB1 in LB for the factorialdesign (51 experiments).

Table 3.3. Estimations of the growth rates of B. subtilis BSB1 in LB for the optima	al
design composed of the optimal designs D1 (14 experiments) and D2 (16 experime	nts).

0				`		
D-optimal design D1						
T (°C)	pН	a_w	$\mu_{max}(h^{-1}) + - SD$			
23	5.6	0.970	0.474 +/- 0.021			
23	5.6	0.970	0.318 +/- 0.065			
23	8.4	0.997	0.742 +/- 0.082			
23	8.0	0.997	0.692 +/- 0.047			
23	6.4	0.970	0.585 +/- 0.052			
29	5.6	0.997	1.702 +/- 0.094			
29	8.4	0.970	0.588 +/- 0.189			
29	8.0	0.970	1.097 +/- 0.053			
47	5.6	0.997	0.383 +/- 0.037			
47	8.4	0.970	0.282 +/- 0.100			
47	8.0	0.970	0.616 +/- 0.144			
41	8.4	0.997	3.357 +/- 0.303			
41	6.0	0.970	0.852 +/- 0.306			
41	8.0	0.997	3.415 +/- 0.543			

D-optimal design D2							
T (°C)	pН	a_w	$\mu_{max}(h^{-1}) + /- SD$				
23	5.6	0.970	0.471 +/- 0. 086				
23	8.4	0.970	0.348 +/- 0. 012				
23	8.0	0.997	0.849 +/- 0. 034				
23	6.4	0.997	0.824 +/- 0. 049				
47	5.6	0.970	1.078 +/- 0. 122				
47	8.4	0.997	2.379 +/- 0. 229				
47	6.4	0.997	2.355 +/- 0. 143				
47	7.6	0.970	1.292 +/- 0. 122				
33	5.6	0.997	1.670 +/- 0. 199				
33	8.4	0.997	1.601 +/- 0. 253				
33	6.4	0.970	1.220 +/- 0. 146				
33	7.6	0.970	1.187 +/- 0.087				
45	5.6	0.997	2.685 +/- 0. 344				
45	8.4	0.970	1.209 +/- 0. 133				
45	6.4	0.970	1.166 +/- 0.071				
45	7.6	0.997	3.186 +/- 0. 472				

Table 3.4. Comparison of the estimations of the cardinal values obtained from the first D-optimal design D1, the D-optimal design (D1+D2) and the factorial design, with the growth limits assessed with the Growth/No Growth experiments.

Parameter	Esti	imations (+/-	SD)	Estimations (Estimations (+/- SD) from the data obtained			Estimations (+/- SD) from the data		
	from the o	lata obtained	for the D-	for the D-optimal design (D1+D2)		obtained for the factorial design				
	op	timal design I	D1							
T_{min} (°C)	9 ng	13.0	13 ^g	Q ^{ng}	11.2	13 ^g	Q ^{ng}	8.3	13 ^g	
1 min (C)		+/- 5.0	10		+/- 4.8	10	,	+/- 1.9	10	
T_{max} (°C)	55 ^{ng}	47.7	57 ^g	55 ^{ng}	48.4	57 ^g	55 ^{ng}	57.0	57 ^g	
		+/- 1.0			+/- 1.4			+/- 2.6		
T_{opt} (°C)		39.4			40.5			42.0		
_		+/- 4.2			+/- 2.5			+/- 1.9		
pH_{min}	4.8 ^g	4.5	4.9^{ng}	4.8 ^g	4.2	4.9^{ng}	4.8 ^g	4.1	4.9^{ng}	
_		+/- 2.9			+/- 5.0			+/- 3.7		
pH_{max}	9.0 ^g	9.5	9.1 ^{ng}	9.0 ^g	8.4	9.1 ^{ng}	9.0 ^g	8.8	9.1 ^{ng}	
		+/- 2.9			+/- 1.1			+/- 0.4		
pH_{opt}		7.2			7.8			7.8		
		+/- 1.5			+/- 5.0			+/- 2.6		
$a_{w\ min}$	0.930 ^{ng}	0.931	0.935 ^g	0.930 ^{ng}	0.946	0.935 ^g	0.930 ^{ng}	0.931	0.935 ^g	
		+/- 0.025			+/- 0.008			+/- 0.149		
$\mu_{opt}(h^{-1})$		3.143			3.337			3.170		
		+/- 1.588			+/- 0.760			+/- 260		
RMSE		1.61			2.97			5.61		

^g: Value of the environmental factor close to the growth limit, where growth was observed experimentally,

^{ng}: Value of the environmental factor close to the growth limit where no growth was observed experimentally.

The estimations of the cardinal values for temperature T_{min} , T_{max} , T_{opt} , and the minimal water activity $a_{w min}$ were different between the optimal design and the factorial design.

The use of the factorial design allowed estimating the minimal and maximal growth temperatures at 8.3 °C and 57.0 °C with an optimal temperature at 42.0 °C and the minimal water activity for growth was estimated at 0.931 (Table 3.2). T_{opt} and T_{max} were badly estimated as they corresponded to the bounds of the guesses on the a priori values of the maximal and optimal temperature for growth (Table 3.1). The use of the D-optimal design allowed estimating the cardinal values of growth for temperature to 11.2 °C, 40.5 °C and the minimal water activity to 0.946. These 4 values were correctly estimated as no estimations corresponded to the bounds of the guesses on the cardinal values. Moreover, the cardinal model described more accurately the effects of temperature, pH and a_w with the estimations obtained with the D-optimal design than with the factorial design when regarding the RMSE (Table 3.2).

To resume, the cardinal values were estimated more precisely with the D-optimal design than with the factorial design. This could be explained because the building of the D-optimal design was specifically built to take into account the heteroscedasticity of the experimental variance on the untransformed maximal growth rate μ_{max} . This meant that the contribution of each experimental value of μ_{max} was weighted with its corresponding variance on μ_{max} for the calculation of the parameter estimates. In other words, a higher weight was attributed to the support points where environmental conditions allowed a good repeatability of the response μ_{max} . On the contrary, the heterogeneity of the variance on the μ_{max} was not taken into account for the building of the factorial design.

In a biological point of view, the cardinal values of growth estimated with the factorial design were more reliable than those estimated with the D-optimal design. The estimations of the cardinal values of growth with the factorial design were more consistent with the growth limits evaluated with the G/NG experiments. More notably, the maximal temperature for growth was largely underestimated with the D-optimal design (48.4 °C) whereas growth is possible between 55 °C and 57 °C (Table 3.2). The minimal water activity was overestimated to 0.945 whereas growth is possible between 0.930 and 0.935. Moreover, the estimation of the maximal pH for growth was closer to the biological reality with the factorial design (pH_{max} =8.8) than with the D-optimal design (pH_{max} =8.4) as a bacterial growth was observed between 9.0 and 9.1 with G/NG experiments. One explanation for these results is that, contrary to the experiments performed for the factorial design, some experiments of the D-optimal design were performed for combinations of temperature, pH and a_w where interactions between these three factors could be observed (for example at 23°C, pH 5.6 and a_w 0.997). The effects of the interactions were calculated and represent an eventual source of error for the estimation of the

parameters if the the module ζ for the calculation of these interactions (Eq. 6) is not correct. Then, as previously explained, higher weights were attributed to the support points which were the most repeatable, for the calculation of the parameter estimates. As an example, if higher weights are attributed to values obtained at favorable values of environmental factors, the values in unfavorable conditions will contribute in a less extent to the estimations of the cardinal values whereas they are points of interest in a biological point of view.

2.6. Conclusions

In the field of predictive microbiology, the cardinal values of growth of pathogen or spoilage microorganisms are commonly used to predict their ability to grow according to environmental conditions. In this study we proposed to use a sequential D-optimal design for the estimation of the cardinal values of growth of *B. subtilis* BSB1. The use of the D-optimal design displayed the advantages of taking into account experimental requirements and constraints such as the number of experiments to perform and the limits of the materials. Moreover, in a statistical point of view, the parameters are accurately estimated with the Doptimal design. However, one limit for the use od D-optimal designs is the requirement of a high background in statistics and a high knowledge on the experimental designs. Otherwise, the use of a D-optimal design relies on *a priori* on the mathematical model (the cardinal model), on the guesses on the cardinal values of growth (the parameters of the secondary mode of growth) and their bounds. False guesses on these input values lead to estimate parameter values which are not consistent with the biological reality. This innovative study aims at encouraging the use of D-optimal designs for the determination of cardinal values of growth, provided that safe choices are made for the inputs needed to compute the design, i.e. the cardinal model, the cardinal values of growth and their bounds.

3. Résultats complémentaires

3.1. Introduction

Précédemment, les valeurs cardinales de croissance et le taux optimal de croissance de *Bacillus subtilis* BSB1 (8 paramètres) ont été déterminées avec un plan d'expériences factoriel composé de 3 plans indépendants pour le pH, la température et l'a_w, et un plan d'expériences D-optimal. Les valeurs cardinales les plus fiables étaient celles obtenues avec le plan factoriel car elles étaient plus proches de la réalité biologique. Toutefois, il est important de rappeler que pour une comparaison rigoureuse des estimations des valeurs cardinales obtenues avec les deux plans, les paramètres ont été estimés par la même méthode avec les deux plans, en imposant une contrainte sur les bornes des paramètres (Tableau 3.1). En d'autres termes, ceci a conduit à la majeure contrainte que les valeurs des paramètres ne pouvaient pas être estimées en dehors des bornes (Tableau 3.1). Cette méthode a conduit à de mauvaises estimations des températures maximales T_{max} (57°C) et optimales T_{opt} (42°C) avec le plan factoriel qui correspondaient aux bornes des paramètres à priori. De plus, ces mauvaises (et même fausses) estimations de T_{opt} et T_{max} ont eu un impact sur l'estimation de tous les autres paramètres puisque les 8 paramètres du modèle cardinal de croissance sont estimés de manière globale, à partir de l'ensemble des données des trois plans factoriels. Ainsi, les valeurs cardinales de croissance estimées avec le plan factoriel ne sont pas fiables dans l'étude présentée précédemment.

Classiquement, la méthode pour estimer les valeurs cardinales consiste à utiliser la forme « racine carrée » du taux de croissance maximal ($\sqrt{\mu max}$) pour stabiliser la variance sur tous les points expérimentaux (Rosso and Robinson, 2001; Zwietering *et al.*, 1994) et aucune borne sur les valeurs estimées n'est imposée. Afin d'évaluer les impacts de la pondération de la variance et des contraintes sur les bornes des paramètres sur les estimations, les valeurs cardinales de *B. subtilis* BSB1estimées dans l'étude précédente ont été comparées aux valeurs cardinales estimées par la méthode classique.

3.2. Matériels et méthodes

Les données expérimentales des taux maximaux de croissance μ_{max} en fonction de la température, pH et l'aw sont ceux du Tableau 3.2 pour le plan factoriel et ceux du Tableau 3.3 pour le plan D-optimal (D1+D2). Le taux de croissance maximal est calculé en fonction du taux de croissance optimal et des effets des facteurs environnementaux selon l'équation 19.

$$\sqrt{\mu_{max}} = \sqrt{\mu_{opt} \times \gamma_{0.1}(pH) \times \gamma_2(T) \times \gamma_{0.1}(a_w) \times \varepsilon(pH, T, a_w)}$$
(19)

avec $\gamma_2(T)$ (équation 3) l'effet de la température, $\gamma_{0.1}(pH)$ est l'effet du pH (équation 4), $\gamma_{0.1}(a_w)$ est l'effet de l'a_w (equation 5) et $\varepsilon(pH, T, a_w)$ est le module d'interactions (equations 6 et 7).

Les paramètres du modèle secondaire (valeurs cardinales de croissance et μ_{opt}) ont été estimés par minimisation de la somme des carrés des écarts (SCE, équation 14) entre les valeurs

observées et les valeurs calculées de $\sqrt{\mu_{max}}$ (fmincon, Matlab 2013a) et les intervalles de confiance à 95% ont été calculés (nlparci, Matlab 2013a).

3.3. Résultats et discussion

3.3.1. Le plan factoriel

Dans la section précédente (2. Determination of the cardinal values of growth of *Bacillus subtilis* with a classical factorial design and a sequential D-optimal design), malgré des valeurs cardinales plus cohérentes avec la réalité biologique que celles obtenues avec le plan D-optimal, les estimations restaient mauvaises avec le plan factoriel. Par exemple, le pH minimum était estimé à 4,1 alors qu'aucune croissance n'a été observée expérimentalement endessous de pH 4,8. Les températures optimale et maximale ont été estimées aux bornes des valeurs à priori (42°C et 57°C).

Tableau 3.5. Estimations des valeurs cardinales de croissance de *B. subtilis* BSB1 avec le plan D-optimal avec et sans contraintes sur les bornes des paramètres.

Danamaàtna	Estimations consistentiates and los Estimations avec contraintes a						
Parametre	Estimation	is sans contrain	ites sur les	Estimations avec contraintes sur les			
	borr	nes des paramè	tres	borr	ies des paramè	tres	
	et interv	alles de confia	nce 95%	et interv	alles de confia	nce 95%	
T_{min} (°C)	9^{ng}	5,5	13 ^g	9 ^{ng}	8.3	13 ^g	
		+/- 29,0			+/- 1.9		
T_{max} (°C)	55 ^{ng}	55,7	57 ^g	55 ^{ng}	57.0	57 ^g	
		+/- 21,9			+/- 2.6		
T_{opt} (°C)		46,9			42.0		
_		+/- 26			+/- 1.9		
pH_{min}	4,8 ^g	4,8	4.9^{ng}	4.8 ^g	4.1	4.9^{ng}	
		+/- 5,6			+/- 3.7		
pH_{max}	9,0 ^g	9,2	9.1 ^{ng}	9.0 ^g	8.8	9.1 ^{ng}	
		+/- 3,0			+/- 0.4		
pHopt		6,8			7.8		
		+/- 10,0			+/- 2.6		
$a_{w min}$	0,930 ^{ng}	0,929	0.935 ^g	0.930 ^{ng}	0.931	0.935 ^g	
		+/- 0,186			+/- 0.149		
$\mu_{opt}(h^{-1})$		4,041			3.170		
_		+/- 27,61			+/- 260		
RMSE		0,45			5,61		

L'estimation des valeurs cardinales par la méthode classique, sans imposer de contraintes aux bornes des paramètres, a permis d'obtenir des estimations des valeurs cardinales plus proches de la réalité biologique (Tableau 3.5). En effet, les pHs minimum et optimum ont été estimés à 4,8 et 9,2 respectivement, sachant qu'expérimentalement, les limites de croissance étaient comprises entre pH 4,8 et 4,9 et entre pH 9,1 et 9,2. Les températures optimale et maximale ont été estimées à 46,9°C et 55,4°C et effectivement, l'optimum de croissance a été observé autour de 45°C (Tableau 3.2) et la limite supérieure de température a été évaluée entre 54°C et 56°C. Finalement, la valeur d'a_w minimale de 0,929 était également cohérente puisque la limite a été évaluée entre a_w 0,930 et a_w 0,935. Ces meilleures résultats révèlent l'inconvénient d'imposer des bornes aux valeurs a priori des paramètres du modèle (les valeurs cardinales de croissanceà dans la méthoe d'estimation.

3.3.2. Le plan D-optimal

Précédemment, nous avons supposé que les erreurs d'estimation avec le plan D-optimal étaient le résultat de mauvais à priori sur les valeurs des paramètres et plus particulièrement sur les bornes des paramètres.

Tableau 3.6 Estimations des valeurs cardinales de croissance de *B. subtilis* BSB1 avec le plan D-optimal avec et sans contraintes sur les bornes des paramètres.

Paramètre	Estimation	ns sans contrain	tes sur les	Estimations avec contraintes sur les			
	bori	nes des paramèt	tres	borr	bornes des paramètres		
	et interv	alles de confia	nce 95%	et interv	alles de confia	nce 95%	
T_{min} (°C)	9^{ng}	6,0	13 ^g	9^{ng}	11,2	13 ^g	
		+/- 110,4			+/- 4,8		
T_{max} (°C)	55 ^{ng}	47,9	57 ^g	55 ^{ng}	48,4	57 ^g	
		+/- 15,1			+/- 1,4		
T_{opt} (°C)		42,6			40,5		
		+/- 3,4			+/- 2,5		
pH_{min}	4,8 ^g	4,6	4.9^{ng}	4.8 ^g	4,2	4.9^{ng}	
		+/- 2,0			+/- 5,0		
pH_{max}	9,0 ^g	8,5	9.1 ^{ng}	9.0 ^{<i>g</i>}	8,4	9.1 ^{ng}	
		+/- 2,6			+/- 1,1		
pHopt		7,8			7,8		
_		+/- 11,9			+/- 5,0		
$a_{w min}$	0,930 ^{ng}	0,946	0.935 ^g	0.930 ^{ng}	0,946	0.935 ^g	
		+/- 0,111			+/- 0,008		
$\mu_{opt}(h^{-1})$		3,337			3,337		
_		+/- 5,868			+/- 0,760		
RMSE		0,39			2,97		

Cependant, les valeurs cardinales estimées par la méthode utilisant la contrainte des bornes des paramètres sont comparables à celles obtenues avec la méthode classique (Tableau 3.6). Les valeurs estimées ne sont toujours pas cohérentes avec la réalité biologique avec la méthode d'estimation classique. Ceci signifie que les estimations des paramètres n'ont pas été impactées

par la contrainte des bornes sur les paramètres mais plutôt par la structure générale du plan Doptimal. Ces résultats confirment nos précédentes conclusions, à savoir que les à priori sur les paramètres conditionnent fortement la structure du plan et donc les estimations des paramètres.

4. Conclusions du chapitre 3

La caractérisation de la croissance d'une souche bactérienne repose sur la connaissance de ses valeurs cardinales (minimale, optimale et maximale) de croissance pour les facteurs environnementaux étudiés. Afin de les déterminer de manière précise, une approche utilisant un plan d'expériences D-optimal a été proposée et a été comparée à une approche classique utilisant des plans factoriels. Les qualités d'estimations des valeurs cardinales de croissance avec ces deux approches ont été comparées sur différents critères tels que les contraintes expérimentales, la précision des estimations et leur cohérence avec la réalité biologique (Fig. 3.1).

FORCES	FAIBLESSES
- Résultats cohérentes de la réalité biologique	- Charge de travail
 Prise en considération de contraintes expérimentales Précision des estimations Gestion de la charge de travail 	- Connaissances en statistiques requises - <i>A priori</i> sur les modèles de croissance nécessaire et sur les valeurs cardinales de croissance
OPPORTUNITES	MENACES
- Plan réalisable par la majeure partie de la communauté de biologistes	- Estimations moins précises
- Détermination rapide des valeurs cardinales pour des microorganismes dont on dispose d'un minimum de connaissances sur les caractéristiques de croissance	- Risque d'estimer des valeurs cardinales non cohérentes avec les limites de croissance

Fig. 3.1. Analyse SWOT des plans factoriels et des plans D-optimaux pour l'estimation des valeurs cardinales de croissance.

Les forces, faiblesses, opportunités et menaces des plans factoriels (bleu) et des plans Doptimaux (bleu) ont été comparées.

D'une part, les plans factoriels sont simples à construire, nécessitent peu de pré-requis sur les modèles de croissance et les valeurs cardinales de croissance, mais requièrent beaucoup de données expérimentales. Les estimations des valeurs cardinales estimées sont cohérentes avec la réalité biologique mais les estimations sont peu précises par rapport à la charge de travail réalisée. D'autre part, les plans d'expériences optimisés ont pour avantage de prendre en compte des contraintes expérimentales et de réduire la charge de travail mais leur construction nécessite des connaissances accrues en statistiques et en biologie et nécessitent des pré-requis sur les valeurs a priori des valeurs cardinales et des modèles de croissance. En effet, s'ils permettent d'obtenir des estimations précises des valeurs cardinales, ils peuvent conduire à des estimations qui ne sont pas cohérentes avec la réalité biologique si les a priori sur les modèles de croissance et sur les limites de croissances sont fausses.

La qualité des estimations des paramètres repose sur deux critères que sont la précision des estimations et la réalité biologique de ces estimations. Un compromis est nécessaire entre ces deux critères de qualité mais pour une future application en agroalimentaire, il est préférable d'utiliser les valeurs cardinales les plus proches de la réalité biologique. Dans le cadre de cette étude, nous avons donc choisi d'utiliser les valeurs cardinales estimées par la méthode classique avec les plans factoriels.

5. Références

- Atkinson, A.C., Donev, A.N., 1992. Optimum experimental designs, Oxford statistical science series. Clarendon Press; Oxford University Press, Oxford [England] : New York.
- Atkinson, A.C., Hunter, W.G., 1968. The design of experiments for parameter estimation. Technometrics 10, 271. doi:10.2307/1267043
- Augustin, J.C., Carlier, V., 2000. Mathematical modelling of the growth rate and lag time for *Listeria monocytogenes*. Int. J. Food Microbiol. 56, 29–51.
- Augustin, J.C., Rosso, L., Carlier, V., 2000. A model describing the effect of temperature history on lag time for *Listeria monocytogenes*. Int. J. Food Microbiol. 57, 169–181.
- Bernaerts, K., Servaes, R.D., Kooyman, S., Versyck, K.J., Van Impe, J.F., 2002. Optimal temperature input design for estimation of the square root model parameters: parameter accuracy and model validity restrictions. Int. J. Food Microbiol. 73, 145–157.
- Box, G.E., Cox, D.R., 1964. An analysis of transformations. J. R. Stat. Soc. Ser. B Methodol. 211–252.
- Buescher, J.M., Liebermeister, W., Jules, M., Uhr, M., Muntel, J., Botella, E., Hessling, B., Kleijn, R.J., Le Chat, L., Lecointe, F., Mader, U., Nicolas, P., Piersma, S., Rugheimer, F., Becher, D., Bessieres, P., Bidnenko, E., Denham, E.L., Dervyn, E., Devine, K.M., Doherty, G., Drulhe, S., Felicori, L., Fogg, M.J., Goelzer, A., Hansen, A., Harwood, C.R., Hecker, M., Hubner, S., Hultschig, C., Jarmer, H., Klipp, E., Leduc, A., Lewis, P., Molina, F., Noirot, P., Peres, S., Pigeonneau, N., Pohl, S., Rasmussen, S., Rinn, B., Schaffer, M., Schnidder, J., Schwikowski, B., Van Dijl, J.M., Veiga, P., Walsh, S., Wilkinson, A.J., Stelling, J., Aymerich, S., Sauer, U., 2012. Global Network Reorganization During Dynamic Adaptations of *Bacillus subtilis* metabolism. Science 335, 1099–1103. doi:10.1126/science.1206871
- Fedorov, V.V., 1972. Theory Of Optimal Experiments. Elsevier Science, Burlington.
- Gallant, A.R. (Ed.), 1987. Nonlinear statistical models, Wiley Series in Probability and Statistics. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA. doi:10.1002/9780470316719
- Holtmann, G., Bremer, E., 2004. Thermoprotection of *Bacillus subtilis* by exogenously provided glycine betaine and structurally related compatible solutes: involvement of Opu transporters. J. Bacteriol. 186, 1683–1693. doi:10.1128/JB.186.6.1683-1693.2004
- Le Marc, Y., Huchet, V., Bourgeois, C.M., Guyonnet, J.P., Mafart, P., Thuault, D., 2002. Modelling the growth kinetics of *Listeria* as a function of temperature, pH and organic acid concentration. Int. J. Food Microbiol. 73, 219–237. doi:10.1016/S0168-1605(01)00640-7

- Mejlholm, O., Gunvig, A., Borggaard, C., Blom-Hanssen, J., Mellefont, L., Ross, T., Leroi, F., Else, T., Visser, D., Dalgaard, P., 2010. Predicting growth rates and growth boundary of *Listeria monocytogenes* An international validation study with focus on processed and ready-to-eat meat and seafood. Int. J. Food Microbiol. 141, 137–150. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2010.04.026
- Mtimet, N., Trunet, C., Mathot, A.-G., Venaille, L., Leguérinel, I., Coroller, L., Couvert, O., 2015. Modeling the behavior of *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 12980 throughout its life cycle as vegetative cells or spores using growth boundaries. Food Microbiol. 48, 153–162. doi:10.1016/j.fm.2014.10.013
- Nichols, D., Nichols, P., McMeekin, T., 1995. Ecology and physiology of psychrophilic bacteria from Antarctic saline lakes and sea ice. Sci. Prog. 78, 331–347.
- Nicolas, P., Mäder, U., Dervyn, E., Rochat, T., Leduc, A., Pigeonneau, N., Bidnenko, E., Marchadier, E., Hoebeke, M., Aymerich, S., Becher, D., Bisicchia, P., Botella, E., Delumeau, O., Doherty, G., Denham, E.L., Fogg, M.J., Fromion, V., Goelzer, A., Hansen, A., Härtig, E., Harwood, C.R., Homuth, G., Jarmer, H., Jules, M., Klipp, E., Le Chat, L., Lecointe, F., Lewis, P., Liebermeister, W., March, A., Mars, R.A.T., Nannapaneni, P., Noone, D., Pohl, S., Rinn, B., Rügheimer, F., Sappa, P.K., Samson, F., Schaffer, M., Schwikowski, B., Steil, L., Stülke, J., Wiegert, T., Devine, K.M., Wilkinson, A.J., van Dijl, J.M., Hecker, M., Völker, U., Bessières, P., Noirot, P., 2012. Condition-dependent transcriptome reveals high-level regulatory architecture in *Bacillus subtilis*. Science 335, 1103–1106. doi:10.1126/science.1206848
- Pandey, R., Ter Beek, A., Vischer, N.O.E., Smelt, J.P.P.M., Brul, S., Manders, E.M.M., 2013. Live Cell imaging of germination and outgrowth of Individual *Bacillus subtilis* Spores; the effect of heat stress quantitatively analyzed with SporeTracker. PLoS ONE 8, e58972. doi:10.1371/journal.pone.0058972
- Pant, G., Prakash, A., Pavani, J.V.P., Bera, S., Deviram, G.V.N.S., Kumar, A., Panchpuri, M., Prasuna, R.G., 2015. Production, optimization and partial purification of protease from *Bacillus subtilis*. J. Taibah Univ. Sci. 9, 50–55. doi:10.1016/j.jtusci.2014.04.010
- Pinon, A., Zwietering, M., Perrier, L., Membre, J.-M., Leporq, B., Mettler, E., Thuault, D., Coroller, L., Stahl, V., Vialette, M., 2004. Development and validation of experimental protocols for use of cardinal models for prediction of microorganism growth in food products. Appl. Environ. Microbiol. 70, 1081–1087. doi:10.1128/AEM.70.2.1081-1087.2004
- Pronzato, L., Pázman, A., 2013. Design of experiments in nonlinear models: asymptotic normality, optimality criteria and small-sample properties, Lecture notes in statistics. Springer, New York.
- Pronzato, L., Walter, E., Venot, A., Lebruchec, J.-F., 1984. A general-purpose global optimizer: Implimentation and applications. Math. Comput. Simul. 26, 412–422. doi:10.1016/0378-4754(84)90105-8

- Rosso, L., Lobry, J.R., Bajard, S., Flandrois, J.P., 1995. convenient model to describe the combined effects of temperature and pH on microbial growth. Appl. Environ. Microbiol. 61, 610–616.
- Rosso, L., Robinson, T.P., 2001. A cardinal model to describe the effect of water activity on the growth of moulds. Int. J. Food Microbiol. 63, 265–273. doi:10.1016/S0168-1605(00)00469-4
- Tapia, M.S., Alzamora, S.M., Chirife, J., 2007. Effects of water activity (aw) on microbial stability: As a hurdle in food preservation, in: Barbosa-Cnovas, G.V., Fontana, A.J., Schmidt, S.J., Labuza, T.P. (Eds.), Water Activity in Foods. Blackwell Publishing Ltd, Oxford, UK, pp. 239–271. doi:10.1002/9780470376454.ch10
- Teleken, J.T., Robazza, W. da S., Gomes, G. de A., 2011. Mathematical modeling of microbial growth in milk. Food Sci. Technol. Camp. 31, 891–896. doi:10.1590/S0101-20612011000400010
- Trunet, C., Mtimet, N., Mathot, A.-G., Postollec, F., Leguerinel, I., Sohier, D., Couvert, O., Carlin, F., Coroller, L., 2015. Modeling the recovery of heat-treated *Bacillus licheniformis* Ad978 and *Bacillus weihenstephanensis* KBAB4 spores at suboptimal temperature and pH using growth limits. Appl. Environ. Microbiol. 81, 562–568. doi:10.1128/AEM.02520-14
- Van Derlinden, E., Bernaerts, K., Van Impe, J.F., 2008. Accurate estimation of cardinal growth temperatures of *Escherichia coli* from optimal dynamic experiments. Int. J. Food Microbiol. 128, 89–100. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2008.07.007
- Walter, E., Pronzato, L., 1997. Identification of parametric models from experimental data, Communications and control engineering. Springer; Masson, Berlin; New York : Paris.
- Zwietering, M.H., Cuppers, H.G., de Wit, J.C., van 't Riet, K., 1994. Evaluation of data transformations and validation of a model for the effect of temperature on bacterial growth. Appl. Environ. Microbiol. 60, 195–203.

CHAPITRE 4:

EFFETS DES FACTEURS ENVIRONNEMENTAUX SUR LA CROISSANCE ET LA SPORULATION DE

Bacillus subtilis BSB1

1. Introduction

Dans le chapitre précédent (chapitre 3), les effets de la température, du pH et de l'activité de l'eau ont été évalués sur la croissance de *B. subtilis* BSB1. Les valeurs cardinales de croissance de cette souche ont été déterminées avec un modèle secondaire de croissance classique : le modèle cardinal de Rosso *et al.* (1995). Les modèles de microbiologie prévisionnelle sont couramment utilisés pour prévoir la croissance bactérienne en fonction de facteurs environnementaux, dans les aliments (Mejlholm *et al.*, 2010; Membre *et al.*, 2005; Pinon *et al.*, 2004; Teleken *et al.*, 2011). En revanche, aucun modèle prévisionnel de sporulation n'a été développé à ce jour, et il existe peu de données quantitatives de l'impact de facteurs environnementaux sur la formation des spores (Baril *et al.*, 2012; Dawes and Mandelstam, 1970; Monteiro *et al.*, 2005; Yazdany and Lashkari, 1975).

L'objectif de ce chapitre est d'évaluer l'impact de la température, du pH et de l'activité de l'eau sur les paramètres cinétiques de sporulation de *B. subtilis* BSB1 et de modéliser ces effets. Pour cela, le modèle de croissance-sporulation développé dans le chapitre 2 a été utilisé. Ce modèle présente plusieurs avantages ; il ajuste bien les cinétiques de croissance-sporulation et contient des paramètres ayant une signification biologique.

2. Modeling of the effects of temperature, pH and water activity, on the growth and sporulation abilities of *Bacillus subtilis* BSB1

A partir de l'article proposé pour soumission dans le journal International Journal of Food Microbiology

Emilie Gauvry^a, Anne-Gabrielle Mathot^a, Olivier Couvert^a, Ivan Leguérinel^a, Louis Coroller^a

^a Université de Brest, EA 3882, Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Ecologie Microbienne, IBSAM, UMT Spore-Risk, 6 rue de l'université, 29334 Quimper.

emilie.gauvry@univ-brest.fr, Anne-Gabrielle.Mathot@univ-brest.fr, Olivier.Couvert@univ-brest.fr, ivan.leguerinel@univ-brest.fr, louis.coroller@univ-brest.fr *Correspondance and reprints

Highlights

Suboptimal conditions for growth lead to a delay of the first spore formation. Suboptimal conditions for growth lead to more abupt spore formation. Suboptimal conditions of water activity for growth affect the maximal concentration of spores.

Environmental factors affect growth and sporulation behavior in the same manner.

Keywords

Growth kinetics, sporulation kinetics, cardinal model, growth boundaries.

Conflicts of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

This work was supported by Quimper Communauté and Région Bretagne.

2.1. Abstract

Spore-forming bacteria are incriminated in cases of food spoilage or food poisoning. In their sporulated form, they are resistant to physical and chemical treatments applied in the food industry and can persist throughout the food chain. Some cases of bacterial sporulation have been reported in the processing of dairy products or vegetables, which leads to an increase in the concentration of resistant forms in final products or on food lines. In order to identify sporulation environments in the food industry, it is necessary to be able to predict bacterial sporulation according to environmental factors. As sporulation occurs after bacterial growth, a kinetic model of growth-sporulation was used to describe the effects of temperature, pH and water activity on the growth and the sporulation abilities of *Bacillus subtilis* BSB1. The effects of environmental factors on both growth and sporulation could be described with a single cardinal model and only the cardinal values of growth were used as inputs to predict these effects. These findings suggest that both growth and sporulation can be predicted with a single simple model: the cardinal model of Rosso *et al.* (1995).

2.2. Introduction

Spore-forming bacteria have been responsible for 30 to 40% of foodborne illness cases in France over years (InVS, 2015, 2014, 2013). They can produce spoilage enzymes (Rosenkvist and Hansen, 1995; Sorokulova et al., 2003; Pavic et al., 2005) or toxins that make food unfit for human consumption. They are natural contaminants of raw materials in their sporulated form. Throughout the food chain, from farm to fork, contaminating spores can encounter environmental conditions that enable their germination, producing vegetative cells which are able to complete a full cell cycle. Indeed, they can grow until they reach high concentrations when they can form biofilms or they can differentiate into resistant spores. The sporulation conditions have a strong impact on the production of spores and their resistance properties. These newly-formed spores will be sources of re-contamination of food products, end products and food lines, and can be resistant to subsequent treatments. Many studies aim at gaining a better understanding of (i) ecological niches of spore-formers (Heyndrickx, 2011; Miller et al., 2015; Postollec et al., 2012), (ii) the abilities of vegetative cells to grow in foods according to environmental factors (Doyle and Buchanan, 2012; Pinon et al., 2004; Sant'Ana, 2017) and (iii) the abilities of spores to resist chemical and physical treatments (Baril et al., 2012b; Mah et al., 2008; Mtimet et al., 2015; Nguyen Thi Minh et al., 2011; Peña et al., 2009). However, few studies have identified the sporulation niches and the steps of food processes that would be favorable to bacterial sporulation in foods and on food lines.

Predictive microbiology provides useful tools for predicting bacterial behavior according to environmental factors, such as bacterial growth according to the environmental factors (Augustin *et al.*, 2000; Pinon *et al.*, 2004; Rosso *et al.*, 1995), or the resistance of spores according to physical and chemical treatments (Baril *et al.*, 2011; Gaillard *et al.*, 1998; Mafart *et al.*, 2010). As far as sporulation is concerned, primary models are sparsely developed (Baril *et al.*, 2012a; Das and Sen, 2011). Some studies have investigated the effects of temperature, pH or water activity on sporulation (Baril *et al.*, 2012a; Lundgren, 1967; Monteiro *et al.*, 2005; Mtimet *et al.*, 2015) but, to our knowledge, no secondary model has been suggested to quantify and predict these effects. Sporulation and growth are two closely linked bacterial processes as sporulation starts with DNA replication as for bacterial division, so the two processes share molecular machineries (Narula *et al.*, 2016b).

The objective of this work was to (i) assess the effects of environmental factors on the growth and the sporulation of *Bacillus subtilis* BSB1 and (ii) to suggest a secondary model to describe these effects. The environmental factors studied were those which could have a

significant impact on the sporulation behavior and which could be easily adjusted in the food industry to limit sporulation (Gauvry *et al.*, 2017): temperature, pH and water activity.

2.3. Materials and methods

2.3.1. Biological material

The strain used in this study was the bacterial model *Bacillus subtilis* BSB1 which is a *trp*+ derivative of *B. subtilis* 168 (Buescher *et al.*, 2012; Nicolas *et al.*, 2012) kindly provided by the Micalis institute, at the National Institute for Agricultural Research (INRA) center in Jouy-en-Josas, France.

The strain was isolated on Luria Bertani (LB) plates (DifcoTM, Becton, Dickinson and Company) and incubated overnight at 37 °C. A colony was re-suspended in LB broth, under 100 rpm agitation at 37 °C until it reached an absorbance A_{600nm} of 1.0. From this pre-culture, a 100-fold dilution was performed in 100 mL of LB broth in a flask, in the same culturing conditions for 3 h. A second dilution was then performed in the same conditions. When the A_{600nm} reached 1.0, glycerol was added to the bacterial suspensions at a final concentration of 25% w/w in cryovials. Conservation was performed at -80 °C and the stocks were renewed every month to avoid cellular death overtime in the cryovials.

2.3.2. Assessment of the impact of temperature, pH and water activity on growth

2.3.2.1. Assessment of growth limits

Growth/No Growth (G/NG) experiments were performed to evaluate the growth limits for temperature, pH and a_w. Different pH values were tested between pH 4.5 to 5.0 (5 values) and between pH 8.9 and 9.3 (4 values). The temperatures tested were 5 °C, 10 °C, 13 °C and 15 °C for the lower limits and between 54 °C and 60 °C with a step of 2 °C for the upper limits. The values of a_w tested were comprised between 0.910 and 0.940 with a step of 0.05.

From a cryovial, a convenient dilution was performed in Tryptone Salt broth (Biokar Diagnostics, Allonne, France) and 1 mL of this dilution was inoculated in a 250 mL flask

containing 100 mL LB broth, in order to obtain an initial concentration of $3 \log_{10}$ (CFU/mL). Cultures were performed under an agitation of 100 rpm and the standard conditions of temperature, pH and a_w were 37 °C, pH 7.00 and a_w 0.996. Total cell counts were performed for each culture after 3 days, 7 days and 14 days, by pouring 1 mL of adequate dilutions into TS broth in Nutrient Agar (Biokar Diagnostics, Allonne, France), with incubation of the plates for 24 h at 37 °C and counting of the colonies.

2.3.2.2.. Effects of temperature, pH and a_w on growth

The effects of pH, temperature and water activity on the bacterial growth were evaluated with three independent experimental designs (Table 4.1), from pH 4.9 to 9.0, from 15 °C to 54 °C and from a_w 0.996 to 0.940 respectively. For each environmental factor tested, the other factors were set to the standard values of 37 °C, pH 7.0 and maximal a_w (a_w 0.996). Bacterial cultures were performed in 100 mL of LB in 250 mL shaking flasks under an agitation of 100 rpm. The inoculation was performed as previously described. The growth kinetics were monitored by total cell counts over time.

2.3.3. Assessment of the impact of pH, water activity and temperature on growth and sporulation abilities

2.3.3.1. Evaluation of sporulation limits

Sporulation abilities were assessed with Sporulation/No Sporulation (S/NS) at 5 °C, 9 °C, 13 °C and 15 °C for the lower limits and between 48 °C to 60 °C with a step of 2 °C for the upper limits. The values of a_w tested were comprised between 0.910 and 0.945 with a step of 0.05. The effects of pH could not be evaluated in these conditions because the pH could not be maintained at a constant value throughout the culture in the shaking flasks. Indeed, the pH of the medium decreases during bacterial growth and increases at the onset of and during sporulation. The conditions of culture were the same as for the evaluation of the growth limits. The spore count was performed after 3, 7 and 14 days of culture. To do so, the total bacterial suspension was treated for 10 minutes at 80 °C by the capillary method (Baril, 2011) in order to eliminate vegetative forms. With this method, the detection limit of the concentration of spores was 10 CFU/mL.

2.3.3.2. Effects of temperature, pH and a_w on growth and sporulation

The effects of pH (5.0; 5.2; 7.0; 8.0; 8.8), temperature (20 °C; 25 °C; 30 °C; 37 °C; 45 °C; 49 °C) and a_w (0.945; 0.960; 0.975; 0.985; 0.997) were evaluated on the growth and the sporulation of *B. subtilis* BSB1 in batch cultures. Only one environmental factor changed between experiments, the two other environmental factors were set to the standard values which were 37 °C, pH 7.0 and a_w 0.996. For each condition tested, the bacterial cultures were performed in triplicate.

B. subtilis BSB1 was cultivated in batches, in an Applikon bioreactor (Applikon Biotechnology, Netherlands) in 2 L Brain Heart Infusion (BIOKAR Diagnostics, Beauvais, France) supplemented with sporulation salts (Hageman *et al.*, 1984), under 250 rpm agitation and an aeration of 1.5 L/min. The initial inoculum of 10^3 CFU/mL was made from an adequate dilution of a cryovial in TS broth. The water activity of the medium was adjusted with sodium chloride. The pH was maintained at a constant value across the culture, by adding sodium hydroxide 2 M or hydrochloric acid 2 M sterilized on 0.22 µm filters. At each measurement point, 5 mL were sampled, and the total cell count and spore count were performed as previously described.

2.3.4. Primary and secondary modellings

2.3.4.1. Kinetic model of growth and sporulation

The growth parameters were evaluated for the different conditions tested (Table 4.1). The data of the natural logarithm for the total cell concentration were plotted against time and the logistic model of growth (Rosso *et al.*, 1995) was used to fit experimental data with Eq. (1).

$$\ln(N(t_i)) = \begin{cases} \ln(N_0), \ t_i < \lambda\\ \ln\left(\frac{N_{max}}{\left(1 + \frac{N_{max}}{N_0}\right) \times \exp(-\mu_{max} \times (t_i - \lambda))}\right), t_i \ge \lambda \end{cases}$$
(1)

with $N(t_i)$, the concentration of total cells at time t_i , N_0 the initial concentration of vegetative cells and N_{max} the maximal total cell concentration (CFU/mL), λ the lag before growth (h) and μ_{max} the maximal vegetative growth rate (h⁻¹).

The sporulation kinetics in batch cultures were fitted with the primary model of Gauvry *et al.* (2017) (results for submission in the journal *Applied and Environmental Microbiology*) given by equations Eq. (2):

$$S(t_{i}) = \begin{cases} 0, \ t_{i} < t_{f} \\ S(t_{i-1}) + \left[N(t_{i} - t_{f}) - S(t_{i-1}) \right] \times P_{max} \times \left[\frac{1}{\sigma \sqrt{2\pi}} \times \exp\left(-0.5 \times \left(\frac{t_{i} - t_{max}}{\sigma \times \sqrt{2}} \right)^{2} \right) \right], \ t_{i} \ge t_{f} \end{cases}$$
(2)

with $N(t_i - t_f)$ the concentration of total cells at time $t_i - t_f$ (CFU/mL) given in Eq. (1), $S_{t_{i-1}}$, the concentration of spores at time t_{i-1} (CFU/mL). The sporulation parameters were P_{max} (unitless), t_{max} (h) and σ (h). P_{max} is used to weight the maximal proportion of cells which are able to sporulate at the time t_{max} (h). Consequently the probability of sporulating at time t_{max} can be easily calculated as follows:

$$P(t_{max}) = P_{max} \times \frac{1}{\sigma \times \sqrt{2\pi}}$$
(3)

 P_{max} is obtained at the time t_{max} which mainly has an impact on the time at which the first cells initiate sporulation and subsequently, on the time until the first spores appear. Lastly, the parameter σ is the scattering of the probability curve which accounts for the heterogeneity of the bacterial population's sporulation behavior over time, which majorly influences the shape of the sporulation curve *i.e.* the appearance rate of spores over time.

2.3.4.2. Modeling the impact of temperature, pH and a_w on growth and sporulation

The effects of temperature, pH and water activity on bacterial growth were described with the cardinal model of Rosso *et al.* (1995) with equations Eq. (4) and Eq. (5)

$$Y_{max}(T^{\circ}C, pH, a_w) = Y_{opt} \times CM_2(T^{\circ}C) \times CM_{0.1}(pH) \times CM_1(a_w)$$

$$\tag{4}$$

139

$$CM_{n}(X) = \begin{cases} \frac{(X - X_{max}) \times (X - X_{min})^{n}}{(X_{opt} - X_{min})^{n-1} \times [(X_{opt} - X_{min}) \times (X - X_{opt}) - (X_{opt} - X_{max}) \times (X_{opt} + X_{min} - nX)]}, Xmin < X < Xmax \\ 0, X \le Xmin \text{ ou } X \ge Xmax \end{cases}$$

$$(5)$$

with *Y*, the growth and sporulation parameters (and more exactly μ_{max} , $1/\lambda$, - (log₁₀ (*P*_{max})), *t*_{max} and σ) and *X*, the environmental factor (pH, temperature or water activity). *X*_{max}, *X*_{min} and *X*_{opt} were the maximal, minimal and optimal values of the environmental factors at which the strain was able to grow, and *n*, a shape parameter. The values of the shape parameter used to describe the effects of temperature, pH and water activity on the growth and sporulation parameters were 2, 0.1 and 1 respectively and we made the approximation that $a_{w max} = a_{w opt} = 0.996$.

The cardinal values of growth were estimated based on the combined data of μ_{max} of the three factorial designs, obtained in LB in Erlenmeyer flasks. The effects of temperature, pH and water activity on the lag before growth λ were described with the cardinal values as inputs and the optimal value of $1/\lambda$ was estimated.

The optimal values of the sporulation parameters were estimated in a two-step procedure. The growth and sporulation kinetics obtained in favorable conditions for growth and sporulation (45 °C, pH 7.0, a_w 0.996) were fitted with the primary model given by Eq. (1) and Eq. (2) in order to estimate the growth and sporulation parameters in this particular condition. The values of these parameters ($Y_{max}(45^\circ C, pH 7.0, a_w 0.996)$) were used to calculate the optimum values Y_{opt} . with Eq. (4). The effects *CM* ($45^\circ C, pH 7.0, a_w 0.996$) were calculated with Eq. (5) and the use of the cardinal values of growth as inputs.

2.3.5. Fitting of the growth and sporulation curves and estimation of the cardinal values of growth and sporulation

The growth and the sporulation parameters were estimated by minimizing the Sum of Square Error (SSE) in Eq. (6) between the experimental values and the values calculated by the kinetic models (functions nlinfit or fmincon, MATLAB and Statistics Toolbox Release 2013a, The MathWorks, Inc., Natick, Massachusetts, United States). The standard deviations of the estimates were calculated from the confidence intervals at 95% (function nlparci). Triplicates were performed for each condition tested for the growth and sporulation kinetics in batch

cultures. As there was little biological and experimental variability, estimations of the growth and sporulation parameters were made on the global data of the triplicates.

$$SSE = \sum (y_i - \hat{y}_i)^2 \tag{6}$$

with y_i the experimental data of the concentration of total cells or spores ln (CFU/mL) and \hat{y}_i the corresponding concentrations estimated with the model.

From the fitted or simulated kinetics of growth and sporulation with Eq. (1) and Eq. (2), criteria of interest to characterize the efficiency of sporulation in reference to previous works (Baril *et al.*, 2012a; Carvalho *et al.*, 2010; Monteiro *et al.*, 2014) could be calculated. These criteria are the maximal concentration of spores S_{max} (CFU/mL) and the time to see the first spore t_{1s} (h) i.e. the time at which the first spore (1 CFU/mL) appears.

The goodness of fit of the model was assessed with the Root Mean Square Error (RMSE) in Eq. (7). The relative error (RE) in Eq. (8) was used to assess the mean error between (i) observed and predicted values of $1/\lambda$ and (ii) between estimated and predicted values of the time to see the first spores (t_{1s}) and the maximal concentration of spores S_{max} (ln (CFU/mL)) (Ross, 1996).

$$RMSE = \sqrt{\frac{SSE}{n-p}}$$
(7)

with SSE calculated in Eq. (6), *n* the number of experimental data of $1/\lambda$ (h⁻¹), t_{1s} (h) or S_{max} (ln (CFU/mL)), and *p* the number of parameters of the model.

$$RE(\%) = 100 \times \frac{|y_i - \hat{y}_i|}{y_i}$$
(8)

with y_i the experimental data of $1/\lambda$ or the estimated values of the sporulation parameters $(-\log_{10} (P_{max}))$, t_{max} , σ , and \hat{y}_i the corresponding predicted values calculated with the cardinal model.

2.4. Results

2.4.1. Characterization of the growth of *B. subtilis* BSB1 according to temperature, pH and water activity

The Growth/No growth experiments allowed determining that *B. subtilis* BSB1 could grow between 13 °C and 54 °C, between pH 4.9 and pH 9.1 and at water activities superior to 0.935 (filled black rounds on Fig. 4.1).

Table 4.1. Growth limits and estimations of the cardinal values of *B. subtilis* BSB1 determined based on the maximal growth rate.

Parameter	Lower boundaries	Estimates (±SD)	Upper boundaries
T_{min} (°C)	10 ^{ng}	5.5 (±3.9)	13 ^g
T_{opt} (°C)		46.9 (±3.6)	
T_{max} (°C)	54.0 ^g	55.7 (±2.9)	56 ^g
pH_{min}	4.8 ^{ng}	4.8 (±0.8)	4.9 ^g
<i>pH</i> _{opt}		6.8 (±1.4)	
<i>pH_{max}</i>	9.1 ^g	9.2 (±0.5)	9.2 ^{ng}
a w min	0.925 ^{ng}	0.929 (±0.026)	0.930 ^g
μ_{opt} (h ⁻¹)		4.040 (±1.000)	
$1/\lambda$ (h ⁻¹)		0.82 (±0.25)	

^g: growth was observed at the corresponding temperature, pH or a_w with the G/NG experiments.

^{ng}: no growth was observed at the corresponding temperature, pH or a_w with the G/NG experiments.

The cardinal values of growth were estimated for temperature, pH and a_w based on the maximal growth rates μ_{max} (Fig. 4.1 and Table 4.1). *B. subtilis* BSB1 had an optimal growth rate μ_{opt} of 4.040 h⁻¹ in optimal conditions i.e. at 46.9 °C, pH 6.79 and maximal a_w 0.996. It had a minimal latency of 1.2 h. According to the cardinal model, the ranges of temperature, pH and water activity for which the strain was able to grow were from 5.5 °C to 55.7 °C, from pH 4.8 to 9.2 and beyond a_w 0.929.

The impacts of the three parameters on the lag before growth could be correctly predicted with a mean relative error of 27% for the 47 experiments. The maximal concentration of total cells N_{max} could be considered as a constant with a mean value of ln (N_{max}) of 20.76 (+/- 4.36%) i.e. 1.04×10^9 CFU/mL.



Fig. 4.1. Effect of temperature, pH and a_w on the growth rate and the lag before growth of *B. subtilis* BSB1.

The experimental data (\circ) of μ_{max} (a, c and e) and $1/\lambda$ (b, d and f) were plotted against temperature (a and b), pH (c and d) or a_w (e and f). The conditions in which no growth was observed are indicated by bold empty circles on the horizontal axis (\circ) and the conditions in which growth was observed in the Growth/No Growth experiments are indicated by black filled circles (\bullet). The cardinal values of growth were estimated based on μ_{max} with the cardinal model (solid lines). These estimated cardinal values were used as inputs to estimate $1/\lambda_{opt}$ and then describe the effects of environmental factors on $1/\lambda$.
<u>2.4.2. Characterization of the sporulation of *B. subtilis* BSB1 according to temperature, pH and water activity</u>

2.4.2.1. Typical impacts of environmental factors on sporulation kinetics

In order to show to what extent sporulation could be affected by the environmental factors, three characteristic curves of growth and sporulation obtained in batch culture in Brain Heart Infusion (BHI) are depicted in Fig. 4.2. As previously indicated, the effects of pH were also evaluated but suboptimal pH affected growth and sporulation in the same manner as for suboptimal temperature.

The first one was obtained at 49 °C, pH 7.0 and a_w 0.996 (Fig. 4.2a) which was a favorable condition for growth with a maximal growth rate of 3.80 h⁻¹ and a lag before growth of 3.5 h. The production of spores was high (2.0×10^7 CFU/mL) and the appearance of spores was gradual over time as the spores appeared after 14 h and until more than 100 h of culture. In the second case, at 25 °C, pH 7.0 and a_w 0.996 (Fig. 4.2c), the growth started 6 h later and the maximal growth rate was lower (2.2 h^{-1}). The production of spores was also high (1.06×10^8 CFU/mL) but they appeared more synchronously from 29 h to 60 h of culture. Lastly, at 37 °C, pH 7.0 and a_w 0.945 (Fig. 4.2e), bacterial multiplication started after 8.2 h of latency and the maximal growth rate was strongly affected (μ_{max} =0.42 h⁻¹). The spores appeared synchronously and sooner, at 9 h of culture, compared to 14 h and 29 h at 49 °C and 25 °C respectively. Moreover, the production of spores at a_w 0.945 was affected 5000-fold compared to what was obtained at 25 °C, with a maximal concentration of spores of 3.00×10^4 CFU/mL.

The sporulation rates can be explained by the shape of the probability curves (Fig. 4.2b, d and f). The spores appeared rapidly at 25 °C (Fig. 4.2c) and $a_w 0.945$ (Fig. 4.2e) because the probability scatterings were low with respective values of σ of 4.8 h (Fig. 4.2d) and 3.1 h (Fig. 4.2f) and because the maximal probability of sporulating was obtained soon at 25 °C (t_{max} =48.2 h) and $a_w 0.996$ (t_{max} =13.4 h). Inversely, at 49 °C, the maximal probability of sporulating was reached later (t_{max} =87.0 h) and the cells sporulated less synchronously as the sporulation probability over time was much more scattered (σ = 25.6 h). At $a_w 0.945$, what was characteristic was that the maximal probability of forming a spore was 10-fold higher than at 25 °C (Fig. 4.4) whereas the spore yield was 400 times lower at $a_w 0.945$. This could be explained by the maximal sporulation probability which was reached much sooner at t_{max} = 13.4 h of culture when the concentration of total cells was only 1.20 $10^4 \times CFU/mL$.



Fig. 4.2. Growth and sporulation kinetics of *B. subtilis* BSB1 obtained in BHI, in batch cultures at 49 °C, pH 7.0 and a_w 0.996 (a and b), at 25 °C, pH 7.0 and a_w 0.996 (c and d) and at 37 °C, pH 7.0 and a_w 0.945 (e and f).

The experimental data of total cells (o) and heat resistant spores (•) ($log_{10}(CFU/mL)$) were fitted with the growth-sporulation model in Eq. (1) and Eq. (2) (solid lines). The probability of vegetative cells sporulating over time (h^{-1}) is represented below the corresponding growth and sporulation kinetics (b, d and f).

On the contrary, the maximal sporulation probability was obtained at 48.2 h of culture at 25 °C when the bacterial concentration was 8.0×10^9 CFU/mL. Consequently, despite the fact that the maximal proportion of cells was lower at 25 °C, this proportion concerned a higher amount of vegetative cells, which explains the more efficient production of spores at this temperature.

2.4.2.2. Effects of environmental factors on sporulation kinetics

In the Sporulation/No Sporulation experiments, the limits of sporulation were comprised between 10 °C and 15 °C for the lower limits, between 50 °C and 52 °C and the minimal a_w for sporulation was between 0.935 and 0.940. However, estimations of the sporulation limits directly depend on the spore detection limit (10 CFU/mL), inherent to the experimental procedure. Consequently, the sporulation limits were underestimated with this method.

We defined the optimal conditions for sporulation as the conditions in which the spores appeared the soonest and in which the highest amount of spores was obtained. The spores appeared sooner in the most optimal conditions for sporulation and this time increased when we approached the sporulation limits (Fig. 4.3a, c and e).



Fig. 4.3. Effects of temperature (a and b), pH (c and d), and water activity (e and f) on the inverse of the calculated time to see the first spore $1/t_{1s}$ (a, c and e) and the calculated maximal concentration of spores reached S_{max} (log₁₀ (CFU/mL)) (b, d and f).

For example, while the first spores appeared at 14 h of culture at the three temperatures 37 °C, 45 °C and 49 °C, they appeared at 29 h at 20 °C and at 51 h at 25 °C. An exception was observed

at $a_w 0.945$ (Fig. 4.3e) for which the first spores appeared at 10 hours of culture. The spores appeared more synchronously in suboptimal conditions while they appeared more gradually over time in more optimal sporulation conditions (Fig. 4.2). The maximal concentration (S_{max}) of spores was not strongly affected by the temperatures and the pH values tested (Fig. 4.3b and d) with a mean value of S_{max} of 2.5×10^7 UFC/mL. However, the maximal concentration of spores was more strongly affected as the water activity decreased (Fig 4.3f) with 3.0×10^4 CFU/mL obtained at $a_w 0.945$ while the maximal concentration of spores obtained was 6.54×10^8 CFU/mL at 37 °C, pH 7.0 and $a_w 0.996$.

In optimal conditions for growth (at 45 °C, pH 7.0, a_w 0.996), the probability of forming a spore was 7.32×10^{-5} h⁻¹, the time t_{max} at which cells had the highest probability of sporulating was 109.8 h and the optimal probability scattering σ was 21.7 h. Interestingly, as the environmental conditions came closer to the growth limits, the maximal sporulation probability increased from 7.32×10^{-5} h⁻¹ in optimal conditions to 1.10×10^{-2} h⁻¹ at 25 °C or 3.38×10^{-2} h⁻¹ at a_w 0.945. The time t_{max} at which the cells had the maximal sporulation probability decreased as we neared the growth boundaries until values of 35.1 h at pH 8.80 or 13.2 h at a_w 0.945 for example. Lastly, the probability scattering dropped as the temperature, pH or water activity became more and more drastic for growth and sporulation. For example, the values decreased from 22.1 h in optimal conditions to 3.7 h at a_w 0.945, 5.7 h at pH 8.8 or 7.4 h at 20 °C. Our observations indicated that when we neared the growth boundaries, the cells sporulated more synchronously and in higher proportions. However vegetative cells sporulated sooner, when the concentration of vegetative cells was low, ultimately leading to fewer amounts of sporulating cells.

2.4.3. Prediction of the effects of environmental factors on the growth and sporulation of *Bacillus subtilis* BSB1.

The optimal conditions for growth (45 °C, pH 7.0, a_w 0.996) were used as a background to calculate the optimal values of the probability parameters that would be obtained in optimal conditions for growth i.e. at 46.9 °C, pH 6.79, a_w 0.996. The values of P_{max} , t_{max} and σ in these optimal conditions for growth were 3.98×10^{-3} , 111.7 h and 22.1 h respectively. The growth limits and the optimal values of the sporulation parameters were used as inputs of the cardinal model to describe the effects of the temperature, pH and water activity on P_{max} (Fig. 4.4a, d and g), t_{max} (Fig. 4.4b, e and g), and σ (Fig. 4.4c, d and e).



Fig. 4.4. Effects of temperature, pH, and water activity on the maximal proportion of vegetative cells sporulating $(-\log_{10} (P_{max}))$ (a, d and g), the time to reach the maximal sporulation probability t_{max} (b, e and h) and the probability scattering σ (c, f and i). The cardinal values of growth (Tab. 1) were used as inputs for the cardinal model (solid lines).

The predicted kinetics of growth and sporulation gave a good prediction of the time to see the first spores with a mean relative error of 23.9 % and the predictions were generally safe (underestimated). The maximal concentration of spores (\log_{10} (CFU/mL)) could be predicted with a mean relative error of 17.8%.

2.4. Discussion

B. subtilis is able to grow between 5.5 °C and 55.6 °C, between pH 4.8 and pH 9.2 and beyond a_w 0.996. These values were consistent with the growth boundaries evaluated with the Growth/No Growth experiments and are consistent with previous observations (Holtmann and Bremer, 2004; Pandey *et al.*, 2013; Pant *et al.*, 2015; Tapia *et al.*, 2007). As the environmental conditions were increasingly drastic for growth, the latency before growth increased and the

growth rate decreased. The experiments were performed with bacterial cells which were in the same physiological states and the size of the inoculum was high enough (3.0 log₁₀ (CFU/mL)) to neglect the heterogeneity of behavior between cells. Consequently, a linear relationship could be observed between the growth and the inverse of the latency before growth as previously observed elsewhere (Munoz-Cuevas *et al.*, 2010; Robinson, 1998).

Predictive microbiology has proven its efficiency to predict the bacterial growth rate according to environmental factors by using a cardinal model. This model uses the cardinal values of growth i.e. the minimal, optimal and maximal values of environmental factors for which bacterial growth is possible. As a relationship could be established between the growth rate and the latency before growth, the cardinal model could be used to predict both these growth parameters. On the contrary, the environmental condition tested did not have a significant impact on the maximal concentration of total cells. Consequently, the maximal bacterial concentration could be considered as a constant of 1.04×10^9 UFC/mL in the culture conditions tested. This also means that provided that vegetative cells are able to grow, they will theoretically meet the conditions of starvation and quorum sensing that trigger sporulation (Grossman and Losick, 1988).

Close to the optimal conditions for growth, the first spores appeared the soonest and the highest concentrations of spores were obtained (Fig. 4.3). These criteria are commonly used to define the efficiency of sporulation (Baril *et al.*, 2012a; Carvalho *et al.*, 2010; Monteiro *et al.*, 2005) and are of interest for food applications. Consequently, we defined the optimal conditions for sporulation being identical to the optimal conditions for growth.

The maximal concentration of spores was not strongly affected by suboptimal temperature and pH conditions. These results are consistent with previous results on *B. subtilis* (Monteiro 2005) and were also observed for other species such as *B. weihenstephanensis* KBAB4 (Baril *et al.*, 2012a). On the contrary, water activity had a strong effect on the maximal concentration of spores as also observed for *B. weihenstephanensis* KBAB4. In our study, this could be related to the rapid mortality observed after the stationary phase at low water activity (results not shown). Indeed, sporulation is a last resort differentiation option for survival but, before committing to sporulation, a checkpoint is activated to assess whether the cell will succeed or fail to complete the sporulation process (Lemon *et al.*, 2000; Stephens, 1998; Veening *et al.*, 2009). In suboptimal conditions, the spores of *B. subtilis* BSB1 appeared later as observed for *B. weihenstephanensis* KBAB4 and *B. licheniformis* AD978 (Baril *et al.*, 2012a) but they appeared more synchronously contrarily to what is commonly observed in the literature.

The effects of environmental factors on the sporulation kinetics can be explained by their effects on the sporulation probability over time. Surprisingly, when the conditions are not optimal for sporulation, the maximal probability of sporulating increases and both the time t_{max} at which P_{max} is reached and the probability scattering decrease. These results mean that vegetative cells sporulate more synchronously and in higher proportions in suboptimal conditions for sporulation. However, each of the three sporulation parameters has an impact on the sporulation kinetics. More specifically, the vegetative cells can sporulate very early, before the maximal concentration of total cells is reached. Consequently, although a high proportion of cells sporulate in the same range of time (P_{max}), this corresponds to a small amount (or concentration) of cells as depicted at $a_w 0.945$ (Fig 4.2e). This also means that in suboptimal conditions, vegetative cells overcome the factors needed for sporulation i.e. nutrient starvation and communication between cells. These findings suggest that too drastic environmental conditions do not only modulate sporulation but can also be triggers of sporulation.

Sporulation and growth are strongly linked as a linear relationship exists between the maximal growth rate and the sporulation rate (Baril, 2011; Dawes and Mandelstam, 1970), because these two bacterial processes share common molecular machineries (Mendez et al., 2004; Narula et al., 2016a; Reder et al., 2012). In our study, a linear relationship was also observed between the maximal growth rate μ_{max} and the probability scattering σ which mostly impacts sporulation. Moreover, the sporulation boundaries were consistent with the growth boundaries and the optimal conditions for sporulation (in which the spores appear rapidly and in high concentrations) matched with the optimal condition for growth. Lastly, the temperature, pH and water activity affected both the growth (Fig. 4.1) and sporulation (Fig. 4.4) parameters in the same way. These observations led us to suggest that the sporulation parameters could be described with the same model as growth, i.e. the cardinal model with the cardinal values of growth as inputs. The only information needed to predict sporulation in any environmental conditions was the "optimal values" of the sporulation parameters which would be obtained in optimal conditions i.e. at 46.9°C, pH 6.8, aw 0.996. Only one set of experimental values for the growth and sporulation kinetics in favorable conditions for sporulation is required as a set of calibration kinetics to calculate these optimal values with Eq. (4) and Eq. (5). Thanks to these optimal parameter values and the cardinal values of growth, the cardinal model efficiently described the growth and sporulation kinetics obtained in the 13 other conditions tested for the batch. With this model, the data of interest for food applications such as the time until the first spores appear and the maximal concentration of spores could be satisfactorily and safely predicted (by calculation) with mean relative errors of 23.9% and 17.8% respectively.

3. Conclusions du chapitre 4

The objective of this work was to assess the effects of environmental factors on the growth and sporulation of *B. subtilis* BSB1 and to predict these effects. The optimal conditions for growth and for sporulation were the same and the boundaries' values of growth and sporulation were also the same. In suboptimal conditions for growth and sporulation, growth starts later and the growth rate decreases, the spores appear later, more rapidly and in lower proportions. The environmental factors (temperature, pH, a_w) affected the sporulation and growth parameters in the same way. This led us to propose a single, common model to describe and predict both growth and sporulation. As the cardinal model is efficient in predicting bacterial growth, this model was used with the cardinal values of growth as the sole inputs. The model correctly described all the growth kinetics as well as the sporulation kinetics. The sole exception was the maximal concentration of total cells which reached an average concentration of 1.04×10^9 CFU/mL in every condition tested.

To conclude, despite the fact that we did not propose an innovative model to describe and predict the effects of environmental factors on sporulation, we proved that a single cardinal model of growth-sporulation can be used to predict both the growth and sporulation of *B*. *subtilis*. For further applications in the food industry, such a model is simple to use and only requires the growth boundaries as inputs and a single set of experimental growth-sporulation kinetics to calibrate the optimal values of the parameters.

4. References

- Augustin, J.C., Rosso, L., Carlier, V., 2000. A model describing the effect of temperature history on lag time for *Listeria monocytogenes*. Int. J. Food Microbiol. 57, 169–181. doi: 10.1016/S0168-1605(00)00260-9
- Baril, E., 2011. Quantification de l'influence de l'environnement sur la formation et la thermorésistance des spores bactériennes. Thèse de doctorat en microbiologie alimentaire sous la direction de Pierre Mafart, Quimper, Université de Bretagne Occidentale.
- Baril, E., Coroller, L., Couvert, O., El Jabri, M., Leguerinel, I., Postollec, F., Boulais, C., Carlin, F., Mafart, P., 2012a. Sporulation boundaries and spore formation kinetics of *Bacillus spp.* as a function of temperature, pH and a(w). Food Microbiol. 32, 79–86. doi:10.1016/j.fm.2012.04.011
- Baril, E., Coroller, L., Couvert, O., Leguérinel, I., Postollec, F., Boulais, C., Carlin, F., Mafart, P., 2012b. Modeling heat resistance of *Bacillus weihenstephanensis* and *Bacillus licheniformis* spores as function of sporulation temperature and pH. Food Microbiol. 30, 29–36. doi:10.1016/j.fm.2011.09.017
- Baril, E., Coroller, L., Postollec, F., Leguerinel, I., Boulais, C., Carlin, F., Mafart, P., 2011. The wet-heat resistance of *Bacillus weihenstephanensis* KBAB4 spores produced in a twostep sporulation process depends on sporulation temperature but not on previous cell history. Int. J. Food Microbiol. 146, 57–62. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2011.01.042
- Buescher, J.M., Liebermeister, W., Jules, M., Uhr, M., Muntel, J., Botella, E., Hessling, B., Kleijn, R.J., Le Chat, L., Lecointe, F., Mader, U., Nicolas, P., Piersma, S., Rugheimer, F., Becher, D., Bessieres, P., Bidnenko, E., Denham, E.L., Dervyn, E., Devine, K.M., Doherty, G., Drulhe, S., Felicori, L., Fogg, M.J., Goelzer, A., Hansen, A., Harwood, C.R., Hecker, M., Hubner, S., Hultschig, C., Jarmer, H., Klipp, E., Leduc, A., Lewis, P., Molina, F., Noirot, P., Peres, S., Pigeonneau, N., Pohl, S., Rasmussen, S., Rinn, B., Schaffer, M., Schnidder, J., Schwikowski, B., Van Dijl, J.M., Veiga, P., Walsh, S., Wilkinson, A.J., Stelling, J., Aymerich, S., Sauer, U., 2012. Global network reorganization during dynamic adaptations of *Bacillus subtilis* metabolism. Science 335, 1099–1103. doi:10.1126/science.1206871
- Carvalho, A.L.U. de, Oliveira, F.H.P.C. de, Mariano, R. de L.R., Gouveia, E.R., Souto-Maior, A.M., 2010. Growth, sporulation and production of bioactive compounds by *Bacillus subtilis* R14. Braz. Arch. Biol. Technol. 53, 643–652. doi:10.1590/S1516-89132010000300020
- Das, S., Sen, R., 2011. Kinetic modeling of sporulation and product formation in stationary phase by *Bacillus coagulans* RK–02 vis-à-vis other Bacilli. Bioresour. Technol. 102, 9659–9667. doi:10.1016/j.biortech.2011.07.067
- Dawes, I.W., Mandelstam, J., 1970. Sporulation of *Bacillus subtilis* in continuous culture. J. Bacteriol. 103, 529–535.

Doyle, M.P., Buchanan, R.L., 2012. Food microbiology: Fundamentals and frontiers. Science.

- Gaillard, S., Leguerinel, I., Mafart, P., 1998. Modelling combined effects of temperature and pH on the heat resistance of spores of *Bacillus cereus*. Food Microbiol. 15, 625–630. doi:10.1006/fmic.1998.0201
- Gauvry, E., Mathot, A.-G., Leguérinel, I., Couvert, O., Postollec, F., Broussolle, V., Coroller, L., 2017. Knowledge of the physiology of spore-forming bacteria can explain the origin of spores in the food environment. Res. Microbiol. 168, 369–378. doi:10.1016/j.resmic.2016.10.006
- Grossman, A.D., Losick, R., 1988. Extracellular control of spore formation in *Bacillus subtilis*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 85, 4369–4373.
- 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. J. Bacteriol. 160, 438–441.
- Heyndrickx, M., 2011. The Importance of Endospore-Forming Bacteria Originating from Soil for Contamination of Industrial Food Processing. Appl. Environ. Soil Sci. 1–11. doi:10.1155/2011/561975
- Holtmann, G., Bremer, E., 2004. hermoprotection of *Bacillus subtilis* by exogenously provided glycine betaine and structurally related compatible solutes: involvement of Opu transporters. J. Bacteriol. 186, 1683–1693. doi:10.1128/JB.186.6.1683-1693.2004
- InVS, 2015. Surveillance des toxi-infections alimentaires collectives. Données de la déclaration obligatoire, 2015.
- InVS, 2014. Surveillance des toxi-infections alimentaires collectives. Données de la déclaration obligatoire, 2014.
- InVS, 2013. Surveillance des toxi-infections alimentaires collectives. Données de la déclaration obligatoire, 2013.
- Lemon, K.P., Kurtser, I., Wu, J., Grossman, A.D., 2000. Control of initiation of sporulation by replication initiation genes in *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. 182, 2989–2991. doi:10.1128/JB.182.10.2989-2991.2000
- Lundgren, L., 1967. Effect of variation of sporulation time and temperature on thermostability of *Bacillus cereus* epores. Physiol. Plant. 20, 392–399. doi:10.1111/j.1399-3054.1967.tb07179.x
- Mafart, P., Leguérinel, I., Couvert, O., Coroller, L., 2010. Quantification of spore resistance for assessment and optimization of heating processes: a never-ending story. Food Microbiol. 27, 568–572. doi:10.1016/j.fm.2010.03.002
- Mah, J.-H., Kang, D.-H., Tang, J., 2008. Effects of minerals on sporulation and heat resistance

of *Clostridium sporogenes*. Int. J. Food Microbiol. 128, 385–389. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2008.10.002.

- Mejlholm, O., Gunvig, A., Borggaard, C., Blom-Hanssen, J., Mellefont, L., Ross, T., Leroi, F., Else, T., Visser, D., Dalgaard, P., 2010. Predicting growth rates and growth boundary of *Listeria monocytogenes* — An international validation study with focus on processed and ready-to-eat meat and seafood. Int. J. Food Microbiol. 141, 137–150. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2010.04.026
- Membre, J., Leporq, B., Vialette, M., Mettler, E., Perrier, L., Thuault, D., Zwietering, M., 2005. Temperature effect on bacterial growth rate: quantitative microbiology approach including cardinal values and variability estimates to perform growth simulations on/in food. Int. J. Food Microbiol. 100, 179–186. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2004.10.015
- Mendez, M.B., Orsaria, L.M., Philippe, V., Pedrido, M.E., Grau, R.R., 2004. Novel roles of the master transcription factors Spo0A and B for furvival and fporulation of *Bacillus subtilis* at low growth temperature. J. Bacteriol. 989–1000. doi: 10.1128/JB.186.4.989-1000.2004
- Miller, R.A., Kent, D.J., Watterson, M.J., Boor, K.J., Martin, N.H., Wiedmann, M., 2015. Spore populations among bulk tank raw milk and dairy powders are significantly different. J. Dairy Sci. 98, 8492–8504. doi:10.3168/jds.2015-9943
- Monteiro, S.M., Clemente, J.J., Henriques, A.O., Gomes, R.J., Carrondo, M.J., Cunha, A.E., 2005. A procedure for high-yield spore production by *Bacillus subtilis*. Biotechnol. Prog. 21, 1026–1031. doi:10.1021/bp050062z
- Monteiro, S.M.S., Clemente, J.J., Carrondo, M.J.T., Cunha, A.E., 2014. Enhanced spore production of *Bacillus subtilis* grown in a chemically defined medium. Adv. Microbiol. 04, 444–454. doi:10.4236/aim.2014.48049
- Mtimet, N., Trunet, C., Mathot, A.-G., Venaille, L., Leguérinel, I., Coroller, L., Couvert, O., 2015. Modeling the behavior of *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 12980 throughout its life cycle as vegetative cells or spores using growth boundaries. Food Microbiol. 48, 153–162. doi:10.1016/j.fm.2014.10.013
- Munoz-Cuevas, M., Fernandez, P.S., George, S., Pin, C., 2010. Modeling the lag period and exponential growth of *Listeria monocytogenes* under conditions of fluctuating temperature and water activity values. Appl. Environ. Microbiol. 76, 2908–2915. doi:10.1128/AEM.02572-09
- Narula, J., Fujita, M., Igoshin, O.A., 2016a. Functional requirements of cellular differentiation: lessons from *Bacillus subtilis*. Curr. Opin. Microbiol. 34, 38–46. doi:10.1016/j.mib.2016.07.011
- Narula, J., Kuchina, A., Zhang, F., Fujita, M., Süel, G.M., Igoshin, O.A., 2016b. Slowdown of growth controls cellular differentiation. Mol. Syst. Biol. 12, 871. doi:10.15252/msb.20156691

- Nguyen Thi Minh, H., Durand, A., Loison, P., Perrier-Cornet, J.-M., Gervais, P., 2011. Effect of sporulation conditions on the resistance of *Bacillus subtilis* spores to heat and high pressure. Appl. Microbiol. Biotechnol. 90, 1409–1417. doi:10.1007/s00253-011-3183-9
- Nicolas, P., Mäder, U., Dervyn, E., Rochat, T., Leduc, A., Pigeonneau, N., Bidnenko, E., Marchadier, E., Hoebeke, M., Aymerich, S., Becher, D., Bisicchia, P., Botella, E., Delumeau, O., Doherty, G., Denham, E.L., Fogg, M.J., Fromion, V., Goelzer, A., Hansen, A., Härtig, E., Harwood, C.R., Homuth, G., Jarmer, H., Jules, M., Klipp, E., Le Chat, L., Lecointe, F., Lewis, P., Liebermeister, W., March, A., Mars, R.A.T., Nannapaneni, P., Noone, D., Pohl, S., Rinn, B., Rügheimer, F., Sappa, P.K., Samson, F., Schaffer, M., Schwikowski, B., Steil, L., Stülke, J., Wiegert, T., Devine, K.M., Wilkinson, A.J., van Dijl, J.M., Hecker, M., Völker, U., Bessières, P., Noirot, P., 2012. Condition-dependent transcriptome reveals high-level regulatory architecture in *Bacillus subtilis*. Science 335, 1103–1106. doi:10.1126/science.1206848
- Pandey, R., Ter Beek, A., Vischer, N.O.E., Smelt, J.P.P.M., Brul, S., Manders, E.M.M., 2013. Live cell imaging of germination and outgrowth of individual *Bacillus subtilis* spores; the effect of heat stress quantitatively analyzed with SporeTracker. PLoS ONE 8, e58972. doi:10.1371/journal.pone.0058972
- Pant, G., Prakash, A., Pavani, J.V.P., Bera, S., Deviram, G.V.N.S., Kumar, A., Panchpuri, M., Prasuna, R.G., 2015. Production, optimization and partial purification of protease from *Bacillus subtilis*. J. Taibah Univ. Sci. 9, 50–55. doi:10.1016/j.jtusci.2014.04.010
- Peña, W.E.L., Massaguer, P.R. de, Teixeira, L.Q., 2009. Microbial modeling of thermal resistance of *Alicyclobacillus acidoterrestris* CRA7152 spores in concentrated orange juice with nisin addition. Braz. J. Microbiol. 40, 601–611. doi:10.1590/S1517-83822009000300024
- Pinon, A., Zwietering, M., Perrier, L., Membre, J.-M., Leporq, B., Mettler, E., Thuault, D., Coroller, L., Stahl, V., Vialette, M., 2004. Development and validation of experimental protocols for use of cardinal models for prediction of microorganism growth in food products. Appl. Environ. Microbiol. 70, 1081–1087. doi:10.1128/AEM.70.2.1081-1087.2004
- Postollec, F., Mathot, A.-G., Bernard, M., Divanac'h, M.-L., Pavan, S., Sohier, D., 2012. Tracking spore-forming bacteria in food: from natural biodiversity to selection by processes. Int. J. Food Microbiol. 1–8. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2012.03.004
- Reder, A., Albrecht, D., Gerth, U., Hecker, M., 2012. Cross-talk between the general stress response and sporulation initiation in *Bacillus subtilis* - the σ(B) promoter of spo0E represents an AND-gate. Environ. Microbiol. 2741–2756. doi: 0.1111/j.1462-2920.2012.02755.x
- Robinson, T., 1998. The effect of the growth environment on the lag phase of *Listeria monocytogenes*. Int. J. Food Microbiol. 44, 83–92. doi:10.1016/S0168-1605(98)00120-2

- Ross, T., 1996. Indices for performance evaluation of predictive models in food microbiology. J. Appl. Bacteriol. 81, 501–508. doi:10.1111/j.1365-2672.1996.tb03539.x
- Rosso, L., Lobry, J.R., Bajard, S., Flandrois, J.P., 1995. Convenient model to describe the combined effects of temperature and pH on microbial growth. Appl. Environ. Microbiol. 61, 610–616.
- Sant'Ana, A. de S. (Ed.), 2017. Quantitative microbiology in food processing: modeling the microbial ecology. John Wiley & Sons, Chichester, UK ; Hoboken, NJ.
- Stephens, C., 1998. Bacterial sporulation: A question of commitment? Curr. Biol. 8, R45–R48. doi:10.1016/S0960-9822(98)70031-4
- Tapia, M.S., Alzamora, S.M., Chirife, J., 2007. Effects of Water Activity (aw) on Microbial Stability: As a Hurdle in Food Preservation, in: Barbosa-Cnovas, G.V., Fontana, A.J., Schmidt, S.J., Labuza, T.P. (Eds.). Water activity in foods. Blackwell Publishing Ltd, Oxford, UK, pp. 239–271. doi:10.1002/9780470376454.ch10
- Teleken, J.T., Robazza, W. da S., Gomes, G. de A., 2011. Mathematical modeling of microbial growth in milk. Food Sci. Technol. Camp. 31, 891–896. doi:10.1590/S0101-20612011000400010
- Veening, J.-W., Murray, H., Errington, J., 2009. A mechanism for cell cycle regulation of sporulation initiation in *Bacillus subtilis*. Genes Dev. 1959–1970. doi: 10.1101/gad.528209
- Yazdany, S., Lashkari, K.B., 1975. Effect of pH on sporulation of *Bacillus stearothermophilus*. Appl. Microbiol. 30, 1–3.

CHAPITRE 5: EVALUATION DE LA ROBUSTESSE DES MODELES DE SPORULATION : DOMAINES ET LIMITES D'APPLICATION

1. Introduction

Un modèle cinétique de croissance-sporulation a été développé dans le chapitre 1. Il permet de décrire à la fois la croissance des cellules végétatives et leurs différenciations en spores. La croissance est décrite avec quatre paramètres : la concentration initiale N_0 et la concentration maximale en cellules végétatives N_{max} , la durée de la latence avant la croissance λ et le taux de croissance μ_{max} . La sporulation a été décrite avec quatre paramètres : le temps de formation de la spore t_f , la probabilité maximale de sporuler P_{max} , le temps t_{max} auquel cette probabilité maximale est obtenue et la dispersion de la probabilité σ . Ces trois derniers paramètres décrivant la probabilité d'une cellule végétative à s'engager en sporulation au cours du temps. Ce modèle a prouvé son efficacité pour décrire différentes cinétiques de croissance et de sporulation de Bacillus subtilis BSB1 obtenues dans des conditions statiques de température, pH et d'aw. Dans le chapitre précédent (chapitre 4), les effets des facteurs environnementaux sur les paramètres cinétiques de croissance et de sporulation de B. subtilis BSB1 ont été quantifiés et ont pu être décrits par un modèle secondaire. Ce modèle secondaire est un modèle cardinal qui intègre les valeurs dites cardinales de croissance (valeurs minimales, optimales et maximales de température, pH et aw pour lesquels la souche est capable de se multiplier) ainsi que les valeurs optimales des paramètres de croissance et de sporulation. Ces valeurs optimales (μ_{opt} , λ_{min} , $P_{max opt}$, $t_{max opt}$, σ_{opt}) sont spécifiques du couple souche-aliment et de l'environnement. Les valeurs cardinales de croissance et les valeurs optimales de sporulation pour le pH et la température et l'aw ont été déterminées précédemment (chapitre 3 et chapitre 4, respectivement).

Dans ce chapitre, l'objectif est d'étudier la robustesse et la généricité des modèles de sporulation. Ces modèles ont été développés à partir de données de croissance et de sporulation obtenues dans des conditions particulières de culture (en fermenteur, dans 2 l de milieu BHI, avec une agitation de 250 rpm, une aération de 2 l/min et la température, le pH et l'activité de l'eau étaient maintenus constants au cours des cultures). Afin de valider une utilisation plus générale de ces modèles, la question suivante s'est posée : les modèles développés sont-ils utilisables dans d'autres conditions de culture et pour d'autres espèces ? Pour y répondre, la validité des modèles a été testée pour différents milieux de culture (BHI, LB et lactosérum), pour des conditions dynamiques de température ou de pH, et pour une autre espèce bactérienne, *Bacillus licheniformis*.

2. Matériel et méthodes

2.1. Matériel biologique et conservation des souches

Les deux souches bactériennes étudiées sont *B. subtilis* BSB1, dérivée *trp*+ de la souche modèle BSB168, fournie par l'institut MICALIS, de l'INRA de Jouy-en-Josas, et *Bacillus licheniformis* AD978, une souche d'origine industrielle isolée à partir d'un produit laitier par le laboratoire ADRIA Développement.

B. subtilis BSB1 a été fourni sous forme de colonies étalées sur une gélose Luria Bertani (LBA, Biokar Diagnostics, Beauvais, France). Une colonie a été re-suspendue dans 100 ml de milieu LB dans un erlen de 250 ml. L'incubation s'est faite sous une agitation de 100 rpm à 37° C pendant 4 h. Une dilution au $1/100^{\text{ème}}$ a ensuite été réalisée dans un milieu LB frais, dans les mêmes conditions pendant 3 h. Cette suspension bactérienne a ensuite été diluée au $1/100^{\text{ème}}$ dans les mêmes conditions pendant 5 h jusqu'à atteindre la phase stationnaire (A_{600nm} = 1). La suspension bactérienne a ensuite été supplémentée par 25% vol/vol final de glycérol et la suspension a été répartie en cryotubes de 1,5 ml qui ont ensuite été conservés à -80°C.

B. licheniformis Ad978 a été fourni en cryotubes qui contenaient uniquement des cellules végétatives conservées à -20°C en bouillon coeur-cervelle (BHI, BIOKAR Diagnostics, Beauvais, France) (70%) et de glycérol (30%) et conservées à -20°C à des concentrations de l'ordre de $1,0 \times 10^8$ UFC/ml.

2.2. Conditions testées

Les milieux de culture testés ont été le BHI, le LB ou lactosérum. Les milieux LB et BHI ont été stérilisés par autoclavage et le lactosérum a été préparé à partir de poudre de lactosérum de cheddar déshydratée à une concentration de 6,5 g pour 100 ml d'eau distillée. La solution a été stérilisée par filtration sur des filtres ayant des pores de 0,22 µm de diamètre (EMD MilliporeTM SteritopTM, Fisher Scientific, Brant, France). Les conditions de culture testées ont été en erlen de 250 ml avec 100 ml de milieu, avec une agitation de 100 rpm, et en fermenteur dans 21 de milieu, avec une agitation de 250 rpm, une aération de 2 l/min et le pH pouvait être contrôlé au cours du temps. A partir des cryotubes, des dilutions adéquates ont été réalisées en bouillon tryptone-sel (TS, Biokar Diagnostics, Beauvais, France) pour une inoculation à une concentration initiale d'environ 10³ UFC/ml.

Afin d'évaluer la robustesse du modèle, différentes combinaisons de milieux de culture et de conditions de culture ont été testées.

Pour tester l'effet du milieu de culture, *B. subtilis* BSB1 a été cultivé en erlen dans les milieux BHI, LB et lactosérum.

Pour tester l'effet des conditions de culture, des cinétiques de croissance et de sporulation de *B. subtilis* BSB1 ont été obtenues en milieu BHI en fermenteurs (en conditions statiques de température, pH et a_w) et en erlens.Pour tester la validité des modèles en conditions dynamiques de facteurs environnementaux, différentes conditions de culture ont été testées :

- En milieu BHI en erlen et une incubation :
 - i) à 37°C tout le long de la culture ;
 - ii) à 37°C pendant 16 h puis la suspension bactérienne a été placée à 10°C ;
 - à 37°C pendant 16 h, puis la suspension bactérienne a été placée à 10°C pendant
 24 h et replacée à 37°C.
- En milieu BHI en fermenteur:
 - i) à pH 7,0 tout le long de la culture ;
 - ii) à pH 7,0 pendant 23 h, puis le pH a été abaissé à 5,0 pendant 40 h, puis à pH 4,5 pour la fin de l'incubation.

Pour vérifier si les modèles de croissance et de sporulation sont applicables pour d'autres microorganismes, *B. licheniformis* a été choisi car c'est une espèce génétiquement proche de *B. subtilis* (Rey *et al.*, 2004). Sur les 139 gènes de sporulation de *B. subtilis*, tous ont un orthologue chez *B. licheniformis* sauf 6 gènes impliqués dans la synthèse d'un polysaccharide du manteau (Kunst *et al.*, 1997). *B. licheniformis* Ad978 a été cultivé dans 2 l de milieu Hageman (Hageman *et al.*, 1984) supplémenté de 1% (vol/vol) de milieu BHI en fermenteur (Applikon Biotechnology, Hollande) avec une agitation de 300 rpm et une aération de 3 l/min, à 45°C et pH 7,2, à 45°C et pH 5,8 et à 20°C et pH 7,2.

2.3. Suivi de la croissance et de la sporulation

Les dénombrements des cellules totales ont été effectués par inclusion dans la gélose nutritive (GN, Biokar Diagnostics, Beauvais, France) pour *B. subtilis* BSB1 et dans la gélose cœur-cervelle pour *B. licheniformis* AD978, après des dilutions adéquates dans du bouillon tryptone-sel (TS). Les spores ont été dénombrées après un traitement thermique à 80°C pendant 10 min de la suspension bactérienne totale par la méthode des capillaires (Baril, 2011). Les boîtes gélosées ont ensuite été incubées 24 h à 37°C pour *B. subtilis* BSB1 ou une nuit à 30°C avant lecture pour *B. licheniformis* Ad978.

2.4. Modèles de croissance et de sporulation

2.4.1. Modèles cinétiques de croissance, mort et sporulation bactériennes

La croissance bactérienne a été décrite avec le modèle logistique de croissance avec délai (Rosso *et al.*, 1995):

$$\ln(N(t_i)) = \begin{cases} \ln(N_0), \ t_i < \lambda\\ \ln\left(\frac{N_{max}}{\left(1 + \frac{N_{max}}{N_0}\right) \times \exp(-\mu_{max} \times (t_i - \lambda))}\right), t_i \ge \lambda \end{cases}$$
(1)

avec $N(t_i)$ la concentration en cellules à un instant donné t_i , N_0 est la concentration initiale en cellules (UFC/ml), N_{max} est la concentration maximale en cellules totales (UFC/ml), λ est le temps de latence (h) avant d'observer la croissance et μ_{max} est le taux de croissance maximum (h⁻¹).

La sporulation bactérienne (équation 2) a été décrite à partir de la croissance bactérienne (équation 1). Pour certaines cinétiques, un déclin cellulaire a été observé et a été décrit avec l'équation 3 inspirée des modèles log-linéaires d'inactivation (Geeraerd *et al.*, 2005).

$$S(t_i) = \begin{cases} 0, \ t_i < t_f \\ S(t_{i-1}) + \left[N(t_i - t_f) - S(t_{i-1}) \right] \times P_{max} \times \left[\frac{1}{\sigma \times \sqrt{2\pi}} \times \exp\left(-0.5 \times \left(\frac{t_i - t_{max}}{\sigma \times \sqrt{2}} \right)^2 \right) \right] \ , t_i \ge t_f \end{cases}$$
(2)

avec $S(t_i)$, la concentration en spores (UFC/ml) au temps donné t_i (h), $N(t_i - t_f)$ est la concentration en cellules totales (UFC/ml) calculée avec le modèle de croissance (équation 1), t_f est le temps de formation de la spore (h), P_{max} (sans unités) est la proportion maximale de cellules s'engageant en sporulation qui est atteinte au temps t_{max} (h) et σ est la dispersion de la probabilité autour de t_{max} (h).

$$ln(N(t_i)) = \begin{cases} ln(N_{max}), \ t_i < t_m \\ ln(N_{res}) + ln((N_{max} - N_{res}) \times \exp(-k \times (t_i - t_m))), \ t_i \ge t_m \end{cases}$$
(3)

avec N_{res} la concentration en cellules totales résiduelles (ou survivantes) (UFC/ml), k est le taux de mort cellulaire (h⁻¹) et t_m (h) est le temps à partir duquel le déclin cellulaire est observé.

A partir des cinétiques simulées ou ajustées, des critères d'intérêt qui caractérisent la sporulation ont pu être calculés comme le temps d'apparition des premières spores (t_{1s}) ou la concentration maximale en spores obtenue (S_{max}) .

2.4.2. Modèle cardinal de croissance-sporulation

Les effets de la température, pH et a_w sur les paramètres de croissance (λ et μ_{max}) et de sporulation (P_{max} , t_{max} et σ) ont été décrits avec le modèle cardinal suivant (équations 4 et 5) :

$$Y_{X_i} = Y_{opt} \times \prod_{i=1}^k CM_{n_i}(X_i) \tag{4}$$

$$CM_{n}(X) = \begin{cases} 0, X > X_{max} \text{ or } X < X_{min} \\ \frac{(X - X_{max}) \times (X - X_{min})^{n}}{(X_{opt} - X_{min})^{n-1} \times [(X_{opt} - X_{min}) \times (X - X_{opt}) - (X_{opt} - X_{max}) \times (X_{opt} + X_{min} - nX)]}, X_{min} \le X \le X_{max} \end{cases}$$
(5)

avec Y_{x_i} les valeurs des paramètres de croissance et de sporulation obtenues dans les conditions de facteurs environnementaux X_i et Y_{opt} sont les valeurs obtenues dans les conditions optimales de croissance. Les paramètres de croissance décrits par ce modèle sont μ_{max} (h⁻¹) et $1/\lambda$ (h⁻¹) et les paramètres de sporulation sont $-\log_{10} (P_{max})$, t_{max} (h) et σ (h). X est le niveau d'un facteur environnemental (pH, température ou a_w), X_{max} , X_{min} et X_{opt} les valeurs maximales, minimales et optimales des facteurs environnementaux caractérisant le comportement de la souche bactérienne, et *n* est un paramètre de forme. Pour le pH, ce paramètre de forme vaut 0,1 pour *B. subtilis* BSB1 et il vaut 1 pour l'a_w, et l'approximation suivante a été faite : $a_{w max} = a_{w opt} =$ 0,996.

2.5. Prévision des cinétiques de croissance-sporulation

2.5.1. Prévision des cinétiques de croissance-sporulation de *B. subtilis* BSB1 dans des conditions et des milieux de culture différents

Pour prévoir les cinétiques de croissance-sporulation dans un milieu (ou matrice) et des conditions de culture différentes de celles utilisées pour le développement du modèle secondaire, deux étapes sont nécessaires.

La première étape consiste à estimer les paramètres cinétiques caractéristiques de la condition de culture, de la matrice et de la souche bactérienne. Pour cela, les paramètres cinétiques ont été déterminés à partir des cinétiques de référence obtenues dans des conditions favorables à la croissance et à la sporulation bactérienne. Ces paramètres d'intérêt sont les paramètres de croissance λ , μ_{max} et N_{max} et les paramètres de sporulation P_{max} , t_{max} , σ . Pour *B. subtilis* BSB1, ces conditions de références étaient à 37°C, pH 7,0, a_w 0,996 et pour *B. licheniformis* Ad978, elles étaient à 45°C, pH 7,2, a_w 0,996. En utilisant les équations 4 et 5 et les valeurs cardinales de croissance (Tableau 5.1), les valeurs optimales (Y_{opt}) de ces paramètres ont été calculées dans les conditions optimales pour la croissance de la façon suivante : $Y_{opt} = \frac{Y_{X_i}}{\prod_{i=1}^k CM_{n_i}(X_i)}$. Les conditions optimales de croissance et de sporulation sont données par les valeurs cardinales de croissance (Tableau 5.1) c'est-à-dire à 46,9°C, pH 6,8 et a_w 0,996 pour *B. subtilis* BSB1 et à 50,9°C, pH 6,9 et a_w 0.996 pour *B. licheniformis* Ad978.

La seconde étape a pour objectif de simuler la cinétique de croissance-sporulation dans une condition environnementale de température, pH et a_w particulière. Pour cela, les paramètres cinétiques (μ_{max} , P_{max} , t_{max} , et σ) ont été calculés pour chaque condition environnementale testée à partir des équations 4 et 5 utilisant les valeurs cardinales de croissance et des valeurs optimales des paramètres Y_{opt} . La concentration initiale en cellules végétatives N_0 utilisées était la valeur observée (déterminée expérimentalement) et la concentration maximale en cellules totales N_{max} a été considérée constante, quelle que soit la condition environnementale. Sa valeur a été estimée avec la cinétique de référence. Une fois, l'ensemble des paramètres cinétiques disponibles, les équations 1, 2 et 3 ont été utilisées pour simuler l'évolution des cellules totales et des spores.

Dans les conditions variables de température ou de pH, des variations brutales (shifts) ont été réalisées en modifiant ces facteurs environnementaux par paliers de pH de 7,0 à 5,0 puis à 4,5 ou par paliers de température de 37°C à 10°C et de 10°C à 37°C. Pour simuler la croissance et la sporulation dans ces conditions, nous avons supposé que les modèles développés en

conditions constantes étaient valides en conditions dynamiques. Pour deux conditions environnementales successives A et B, la probabilité d'initier la sporulation évolue d'abord selon les paramètres $P_{max A}$, $t_{max A}$ et σ_A . A l'instant du shift environnemental (t_{shift}), l'hypothèse émise a été que la probabilité d'initier la sporulation redevient instantanément nulle et les paramètres cinétiques varient en fonction de la nouvelle condition environnementale B. Ainsi, au moment du shift, la probabilité démarre de zéro et évolue avec les paramètres de la condition B avec un décalage de t_{shift} dans le temps : $P_{max B}$, ($t_{max B}$ + t_{shift}) et σ_B .

 Tableau 5.1 : Caractéristiques de croissance de B. subtilis BSB1 et de B. licheniformis

 Ad978.

Les	caractéristiques	de	croissance	sont	les	valeurs	cardinales	(minimales,	optimales	et		
max	maximales) de croissance pour la température, le pH et l'a _w .											

Paramètres cardinaux	<i>B. subtilis</i> BSB1 ¹	<i>B. licheniformis</i> Ad978 ²
T_{min} (°C)	5.5	8.6
$T_{opt}(^{\circ}\mathrm{C})$	46.9	50.9
$T_{max}(^{\circ}\mathrm{C})$	55.7	56.1
pH_{min}	4.8	5.3
pH_{opt}	6.8	6.9
pH_{max}	9.2	8.5
$a_{w min}$	0.929	0.915

¹Valeurs cardinales de B. subtilis BSB1 déterminées dans le chapitre 3 ² Baril et al., 2012

La simulation des cinétiques de croissance-sporulation permet d'avoir accès au temps d'apparition des premières spores t_{1s} et à la concentration maximale en spores obtenues S_{max} . Ces valeurs ont été déterminées pour les cinétiques ajustées aux données expérimentales et seront appelées par la suite « valeurs observées » $t_{1s \text{ observé}}$ et $S_{\text{max observé}}$, et ces valeurs ont été déterminées pour les cinétiques prévues par le modèle secondaire $t_{1s \text{ prévu}}$ et $S_{\text{max prévu}}$.

2.5.2. Analyses statistiques : ajustements et erreurs de prévision

2.5.2.1. Ajustement des cinétiques de croissance et de sporulation

Pour ajuster les cinétiques de croissance et de sporulation, les valeurs des paramètres ont été estimées par minimisation de la somme des carrés des écarts (équation 6) (fmincon, Matlab, Statistics Toolbox Release 2013a, The MathWorks, Inc., Natick, Massachusetts, United States). Les intervalles de confiance à 95% ont été calculés à partir de la régression linéaire obtenue avec les estimations des paramètres (nlparci, Matlab, Statistics Toolbox Release 2013a, The MathWorks, Inc., Natick, Massachusetts, United States).

où y_i est la valeur expérimentale (observée) de la concentration en spores ou en cellules totales (ln (UFC/ml)) et \hat{y}_i est la valeur calculée par le modèle.

Par la suite, les cinétiques ajustées aux données expérimentales seront appelées « cinétiques observées ».

2.5.2.2. Erreurs de prévision des cinétiques prévues par rapport aux cinétiques observées

Pour chaque cinétique expérimentale de croissance-sporulation (données de concentrations en cellules totales et en spores), les cinétiques observées et les cinétiques prévues par les modèles ont été tracées. Les qualités d'ajustement des cinétiques observées et des cinétiques prévues, aux données expérimentales, ont été estimées avec l'erreur type (Root Mean Square Error, RMSE) selon l'équation 7:

$$RMSE = \sqrt{\frac{\Sigma(y_i - \hat{y}_i)^2}{n - p}}$$
(7)

où y_i est la valeur expérimentale de la concentration en cellules totales ou en spores (ln (UFC/ml)), \hat{y}_i est la valeur observée (estimée) ou prévue par le modèle, *n* est le nombre de points expérimentaux et *p* est le nombre de paramètres du modèle.

Afin de vérifier si les cinétiques observées et les cinétiques prévues décrivent les cinétiques expérimentales de manière significativement différente, le critère du maximum de vraisemblance a été utilisé (équation 8).

$$S_L = n \times ln(\frac{SCE_{prévue}}{SCE_{observée}})$$
(8)

où *n* est le nombre de points expérimentaux, *SCE* est la somme des carrés des écarts entre les valeurs calculées par le modèle de croissance-sporulation et les valeurs expérimentales (ou observées) dans le cas des cinétiques prévues ($SCE_{prévue}$) et dans le cas des cinétiques observées ($SCE_{observée}$) avec le modèle de croissance-sporulation (équations 1 et 3).

Le degré de liberté a été défini par le nombre de paramètres estimés par le modèle cinétique, à savoir tous les paramètres sauf la concentration initiale N_0 qui n'est pas prédite par le modèle cardinal, soit 6 paramètres (λ , μ_{max} , N_{max} , P_{max} , t_{max} et σ). Les cinétiques observées et prévues décrivent de manière significativement différente les cinétiques observées si la valeur S_L est supérieure à 12,59 d'après la table du Khi-deux, pour un degré de liberté de 6 avec un seuil de tolérance α =5%.

Dans les cas où les cinétiques observées étaient significativement différentes des cinétiques prévues ($S_L>12.59$), l'erreur de prévision de la cinétique prévue a été définie par le rapport $\frac{\text{RMSE de la cinétique prévue}}{\text{RMSE de la cinétique observée}}$ avec la RMSE calculée selon l'équation 7.

Par ailleurs, les qualités d'ajustement aux données expérimentales des concentrations en cellules totales ou en spores ont été dissociées : RMSE_N et RMSE_S.

2.5.2.3. Erreurs de prévision de la concentration maximale en spores et du temps d'apparition des premières spores.

Les erreurs de prévision du temps d'apparition des premières spores t_{1s} et de la concentration maximale en spores S_{max} ont été évaluées en calculant les erreurs relatives (Oscar, 2005) entre les valeurs prévues ($t_{1s prévu}$ et $S_{max prévu}$) et les valeurs observées ($t_{1s observé}$ et $S_{max observé}$) (équation 9).

$$ER (\%) = 100 \times \left(\frac{y_{pr\acute{v}u} - y_{observ\acute{e}}}{y_{observ\acute{e}}}\right)$$
(9)

avec $y_{prévue}$, les valeurs prévues de t_{1s} ou log_{10} (S_{max}) et $y_{observé}$ sont les valeurs observées (par ajustement des cinétiques avec le modèle de croissance-sporulation).

Le risque associé à une apparition rapide des premières spores est surestimé si ER<0 pour t_{1s} et le risque associé à un grand nombre de spores est surestimé sir ER>0 pour S_{max}.

3. Résultats et discussion

3.1. Evaluation de la robustesse des modèles de croissance et de sporulation pour prévoir les cinétiques de *B. subtilis* BSB1 dans des conditions et milieux de culture différents

3.1.1. Effet de la condition de culture : fermenteur et erlen en milieu BHI

Le modèle cinétique de croissance-sporulation développé et le modèle cardinal de croissance et de sporulation ont été proposés pour décrire les cinétiques de *B. subtilis* BSB1 obtenues en milieu BHI en fermenteur. Lorsque *B. subtilis* BSB1 est cultivé en erlen dans les mêmes conditions de pH, température et d'a_w, les comportements de croissance et sporulation sont affectées (Fig. 5.1). En erlen, la concentration maximale en cellules totales N_{max} est 6 fois inférieure à celle obtenue en fermenteur et la concentration maximale en spores S_{max} est affectée d'un facteur environ 200. Ce résultat s'explique en partie par une probabilité maximale de sporuler (P_{max}) plus faible d'un facteur environ 40, en erlen (Tableau 5.2)

Dans les deux conditions de culture, les cinétiques d'apparition des spores présentent deux phases. Dans une première phase, les spores (environ 10^4 UFC/ml) apparaissent de manière abrupte puis, durant la seconde phase, elles apparaissent de manière progressive. Néanmoins, l'apparition des spores est beaucoup plus lente au cours de la seconde phase en erlen qu'en fermenteur. Cette évolution plus lente de la concentration en spores en erlen est directement liée à une dispersion de la probabilité de sporuler σ (σ =61,7 h) plus élevée qu'en fermenteur (σ =19,8 h). Ces différents effets des conditions de culture sur la sporulation peuvent s'expliquer car en fermenteur, le pH est contrôlé tout le long de la culture, l'agitation est plus élevée qu'en erlen et le milieu est aéré à 2 l/min. Ces conditions de culture sont plus favorables à une production plus importante de spores (Monteiro et *al.*, 2005; Posada-Uribe *et al.*, 2015).

3.1.2. Effet de la matrice : BHI, LB et lactosérum en erlen

En erlens, les cinétiques de sporulation présentent des concentrations maximales en spores similaires (Fig. 5.1) avec une moyenne de $1,05 \times 10^6$ UFC/ml. Les cinétiques de sporulation présentent des courbes d'allures similaires en milieu LB et en lactosérum alors que la courbe d'apparition des spores est plus lente, plus progressive en milieu BHI.





Les données expérimentales de concentrations en cellules totales (\circ) et en cellules thermorésistantes (\circ) ont été ajustées avec le modèle de croissance ($____$) et de sporulation ($____$) et constituent alors les cinétiques observées (a, c, e et g). Les courbes de probabilité de sporuler au cours du temps correspondantes (b, d, f et h) sont présentées sous les cinétiques obtenues en BHI en fermenteur (a et b), et en erlen dans les milieux BHI (c et d), LB (e et f) et lactosérum (g et h).

Tableau 5.2. Estimations des paramètres de croissance et de sporulation de *B. subtilis* BSB1 cultivé dans différents milieux, en conditions optimales de température, pH et a_w.

B. subtilis BSB1 a été cultivé en fermenteur dans le milieu BHI et en erlens dans les milieux BHI, LB et lactosérum à 37°C, pH 7,0 et a_w 0,996. Les intervalles de confiance 95% des paramètres estimés sont indiqués entre crochets.

Paramètres	Signification	BHI, 37°C, pH 7.0, a _w 0.996	BHI, 37°C, pH 7.0, a _w 0.996.	LB, 40°C, pH 7.0, a _w 0.996.	Lactosérum, 37°C, pH 7.0, a _w 0.996.		
		en fermenteur	erlen	erlen	erlen		
N ₀ (ln (UFC/ml))	Concentration initiale en cellules végétatives	6,69 [5,97-7,41]	6,59 [6,10-7,07]	13,41 [12,76-14,05]	9,58 [8,84-10,32]		
λ (h)	Latence avant la croissance	1,1 [0,6-1,6]	6,6 [6,2-7,0]	2,1 [1,4-2,8]	2,2 [1,4-3,0]		
$\boldsymbol{\mu}_{max}\left(\mathbf{h}^{-1}\right)$	Taux maximal de croissance	2,672 [2,287-3,063]	3,695 [2,831-4,566]	1,970 [1,232-2,711]	3,285 [1,840-4,730]		
N _{max} (ln (UFC/ml))	Concentration maximale en cellules totales	21,53 [20,87-22,19]	19,74 [19,37-20,14]	19,75 [19,35-20,15]	19,01 [18,73-19,29]		
P _{max}	Proportion maximale de cellules s'engageant en sporulation	5.64 × 10 ⁻² [-0,0240-0.137]	1,40 × 10 ⁻³ [-1,44 × 10 ⁻⁴ -3,00 × 10 ⁻³]	$2,90 \times 10^{-3}$ [7,0 × 10 ⁻⁴ -5,1 × 10 ⁻³]	8,70 × 10 ⁻³ [2,50 × 10 ⁻³ -1,48 × 10 ⁻²]		
t_{max} (h)	Temps auquel les cellules ont la probabilité maximale de sporuler	62,1 [58,5-137,9]	146,0 [61,4-230,7]	64,5 [41,1-87,9]	103,2 [78,3-128,1]		
σ (h)	Dispersion de la probabilité	14,1 [10,5-17,7]	61,7 [24,1-99,4]	23,8 [14,2-33,37]	43,8 [30,4-57,2]		
t _{1s} (h)	Temps d'apparition des premières spores (calculé)	13	17	9	11		
S _{max} (UFC/ml)	Concentration maximale en spores (calculée)	$1,23 \times 10^{8}$	$5,26 \times 10^5$	$1,08 \times 10^{6}$	$1,54 \times 10^{6}$		
RMSE _N	RMSE associée aux cellules totales	1,34	1,49	0,49	0,72		
RMSEs	RMSE associée aux spores	0,59	0,45	0,93	1,11		

Ceci s'explique notamment par des valeurs de dispersion de la probabilité de sporuler (σ) et un temps pour obtenir la probabilité maximale de sporuler (t_{max}) plus élevée qu'en milieu LB et en lactosérum (Tableau 5.2). Les temps d'apparition des premières spores étaient de 9 h en milieu LB, 11 h en lactosérum et 17 h en milieu BHI. L'apparition des spores plus tardives en milieu BHI en erlen peut s'expliquer par un taux d'inoculation plus faible ainsi qu'un temps de latence plus élevé de 4 h environ, par rapport aux croissances dans les deux autres milieux. La concentration maximale en cellules totales est alors obtenue plus tardivement, ainsi que la concentration en cellules suffisante (5.6×10^6 UFC/ml) et nécessaire pour que les premières cellules puissent initier la sporulation.

<u>3.1.3. Prévision des effets de la température sur la croissance et la sporulation</u> dans les trois matrices.

Les valeurs estimées des paramètres de croissance et de sporulation estimées en conditions favorables de croissance et de sporulation à 37°C, pH 7,0, a_w 0,996 (Tableau 5.2), ont été utilisées pour le calcul des paramètres à deux autres températures (Tableau 5.3). Pour chaque température testée, les cinétiques observées et les cinétiques prévues par les modèles prévisionnels ont été tracées (Fig. 5.2). Etant donné que les modèles de croissance et de sporulation ont été développés pour des cultures en fermenteur, les erreurs de prévision (RMSE de la cinétique prévue) à 25°C et 49°C en fermenteur sont donc considérées comme les erreurs de prévision du modèle. Pour les cultures en milieu BHI en fermenteur (Fig. 5.2a et 5.2b), les erreurs de prévision du modèle associées aux spores sont de 6,2 et 3,7 à 25°C et à 49°C respectivement. A 25°C, la différence entre la cinétique observée et la cinétique prévue est notamment due à un décalage du temps d'apparition des premières spores t₁s d'environ 22 h (Tableau 5.2). Malgré ce décalage, l'allure de la courbe décrivant l'évolution du nombre de spores au cours du temps est correctement décrite par la cinétique simulée par le modèle.

Les cinétiques de croissance-sporulation prévues décrivent correctement l'évolution des concentrations en cellules totales et en spores avec des erreurs de prévisions inférieures ou égales à l'erreur du modèle. Les modèles de croissance et de sporulation permettent de prévoir correctement les temps d'apparition des premières spores dans 5 conditions sur 8. Néanmoins, en lactosérum à 25°C et en milieu BHI à 25°C en fermenteur, les temps d'apparition des premières spores sont sous-estimés de 8 h et 22 h respectivement (avec des erreurs relatives ER=50% et ER=65% respectivement). En milieu LB à 45°C, la valeur est surestimée mais avec une erreur de prévision de 2 h seulement (ER=17%).



Fig. 5.2. Comparaison des cinétiques de croissance-sporulation observées et prévues de *B. subtilis* BSB1 cultivé dans différents milieux, à deux températures.

Les données expérimentales des concentrations en cellules totales (\circ) et en cellules thermorésistantes (\circ) ont été ajustées avec le modèle de croissance (_____) et de sporulation (_____) et constituent les cinétiques observées. Ces cinétiques observées sont comparées aux cinétiques de croissance (-----) et de sporulation (-----), prévues par le modèle cardinal pour des cultures de B. subtilis BSB1 en fermenteur en BHI à 25 °C (a) et 49°C (b), et en erlens dans les milieux BHI à 25°C (c) et 48°C (d), LB à 27°C (e) et 45°C (f), et lactosérum à 25°C (g) et 48°C (h).

Paramètres	res BHI 25°C		BHI 49°C fermenteur		BHI 25°C		BHI 48°C		LB 27°C		LB 45°C		Lactosérum 25°C		Lactosérum 48°C	
	ajusté	calculé	ajusté	calculé	ajusté	Calculé	ajusté	calculé	ajusté	calculé	ajusté	calculé	ajusté	calculé	ajusté	calculé
No	9,35	/	5,46	/	5,12	/	7,50	/	9,86	/	5,86	/	10.17	/	9.57	
(ln	[8,43-		[4,69-		[4,58-		[3,65-		[8,40-		[4,48-		[9.27-		[8.89-	
(UFC/ml))	10,27]		6,23]		5,66]		11,40]		11,32]		7,24]		11.06]		10.25]	
λ (h)	9,9	2,6	3,49		11,8	15,6	0	4,9	2,8	4,7	0,6	1,8	2.2	5.3	2.3	1.7
	[9,1-		[3,0-	0,8	[10,7-		[-5,51-		[1,1-		[-0,1-		[0.7-		[1.7-	
	10,6]		3,9]		12,9]		5,51]		4,6]		1,3]		3.4]		2.9]	
μ_{max} (h-1)	2,204		3,804	3,544	1,137		1,248		0,978		2,643	2,290	0.814	1.00	2.627	4.39
	[1,744-	1,130	[3,045-		[1,004-	1,56	[0,231-	4,952	[0,763-	0,873	[2,293-		[0.669-	1.39	[1.828-	
	2,665]	21.52	4,558]	01.50	1,270]		2,265]		1,194]	10.75	2,993]	10.75	0.959]	10.01	3.426]	10.01
N _{max}	20,56	21,53	18,53	21,53	20,17	10.74	19,38	10.74	19,78	19,75	21,62	19,75	19.99 [10.50	19.01	19.24	19.01
(III (IJFC/ml))	20,14-		[20,2- 18 8]		20 501	19,74	24 441	19,74	20 301		20,93-		20 391		19.00-	
(UFC/III))	0.087	0.207	7 15	2 21	20,50]	6.22	1 21 v	1.52	1 40	7.50	4 76	1 1 2	1.57	1.4	5.06	1.8
1 max	10,087	0,297	$\times 10^{-2}$	$\times 10^{-2}$	× 10 ⁻²	× 10 ⁻²	1,31 × 10 ⁻⁵	$\times 10^{-4}$	$\times 10^{-3}$	× 10 ⁻²	+,70 × 10 ⁻⁴	$\times 10^{-3}$	$\times 10^{-2}$	× 10 ⁻¹	× 10 ⁻²	× 10 ⁻³
	0,146]		[1.63		[8.4		[-1.2	~ 10	[1.54	~ 10	[-6.47	~ 10	[1.5	~ 10	[-0.13-	
	· 1		×10 ⁻²		×10 ⁻³		×10 ⁻⁴		×10 ⁻⁴		× 10 ⁻⁴		× 10 ⁻²		0.23]	
			-		-		-		-		-		-		_	
			1,27		4,1		1,5		2,60		0,0016]		1.6			
			$\times 10^{-1}$]		× 10 ⁻²]		×10 ⁻⁴]		× 10 ⁻³]				× 10 ⁻²]			
$t_{\rm max}({\bf h})$	40,25	26,3	87,0	82,3	225,3	61,7	222,3		73,2	28,6	31,6	75,0	137.5	43.6	548.7	138.0
	[38,3-		[64,5-		[194,5-		[-4397,3-	195,3	[44,4-		[-179,7-		[107.7-		[253.2-	
	42,2]		109,6]		256,1]		4841,9]		102,0]		242,9]		167.3]		844.1]	
σ (h)	2,5	6,0	25,1	18,7	51,1	26,1	149,8		26,4	10,5	81,5	27,7	37,0	18.5	132.7	58.5
	[2,0-		[18,1-		[43,1-		[-1048,1-	82,5	[12,96-		[-154,6-		[26.8-		[86.8-	
	3,0]		32,1]		59,0]		[]]]]]]]]]]]]]]]]]]]]]]]]]]]]]]]]]]]]]]		39,86]	-	317,6]		47,2]	~	178.7]	
t _{1s} (h)	34	12	14	12	30	26	17	15	15	8	12	14	16	8	14	11
S _{max}	7,1	5,7	7,7	4,9	1,42	2,1	4,61	5,61	5,39	2,42	1,76	4,20	7.52	2.26	1.06	3.21
(UFC/ml)	× 10′	× 10°	$\times 10^{\circ}$	× 10 ⁷	× 10′	× 10′	× 10 ³	× 10 ⁺	× 10 ³	× 10 ⁷	× 10 ³	× 10 ⁵	$\times 10^{\circ}$	× 10′	× 10′	× 10 ³
RMSE _N	0,81	2,75	0,72	20,4	1,22	1,95	1,23	2.51	0,77	1,26	1,06	3,26	0.81	1.12	0.55	1.58
RMSEs	1,03	6,36	0,34	1,26	1,42	5,48	0,95	2.35	0,65	5,1	3,72	5,81	1.81	6.23	0.71	2.94
(*)				2/3		3/3		0/3		2/3		2/3		2/3		

Tableau 5.3. Comparaison des valeurs des paramètres de croissance et de sporulation estimés et prévus par le modèle cardinal pour *B. subtilis* BSB1 cultivé dans différents milieux de culture à des température sous-optimales pour la croissance et la sporulation. *Les intervalles de confiance 95% des estimations des paramètres sont indiqués entre crochets.*

(*) Dans les conditions de culture utilisées pour le développement des modèles (en BHI en fermenteur), les températures défavorables conduisent à une augmentation de P_{max} et une diminution de t_{max} et σ . Pour chaque matrice (BHI, LB ou lactosérum) et température testées pour des cultures en erlen, le score indique le nombre de paramètres qui sont impactés de la même manière (augmentation ou diminution) par la température.

Les concentrations maximales en spores S_{max} sont prévues avec des erreurs relatives (log_{10} (UFC/ml)) qui n'excédent pas 30% pour les 6 cinétiques en erlens. Ces concentrations sont légèrement surestimées pour 5 cinétiques sur 6, l'exception étant à 48°C en lactosérum où ER=-21,8%. Dans cette condition, la valeur observée de la concentration maximale en spores $S_{max observée}$ (par ajustement de la cinétique) est probablement surévaluée à cause d'un manque de données expérimentales en fin de culture. En effet, les points expérimentaux s'arrêtent à 200 h de culture alors que la cinétique prévoit une concentration maximale en spores atteinte à plus de 500 h de culture. Les prévisions de t_{1s} et S_{max} vont dans le sens d'une surestimation des risques associés à une apparition rapide des spores et une forte production de spores. De plus, ces prévisions restent dans le domaine d'acceptabilité défini par (Oscar, 2005) c'est-à-dire que les erreurs de prévisions n'excèdent pas 30% lorsque le risque lié à la présence des spores est surestimé et n'excéde pas 15% lorsque le risque est sous-estimé.

3.2 Evaluation de la robustesse des modèles de croissance et de sporulation pour prévoir les cinétiques de *B. subtilis* BSB1 dans des conditions dynamiques de pH et de température.

3.2.1. Méthodologie : comment évolue la probabilité de sporuler en fonction des changements des facteurs environnementaux ?

Lorsqu'un changement des conditions environnementales est appliqué, d'une condition A à une condition B, deux hypothèses ont été proposées : soit la probabilité de sporuler repart de zéro et évolue selon l'effet de la condition B (hypothèse n°1), soit la probabilité continue d'évoluer selon l'effet de la condition B, mais à partir de la probabilité de sporuler obtenue à l'issue de la phase A, sans repartir de zéro (hypothèse n° 2). En conditions dynamiques de facteurs environnementaux, les qualités de prévision des cinétiques de sporulation sont meilleures lorsque la probabilité repart de zéro (hypothèse 1, résultats non montrés). En conditions dynamiques de température, les RMSE associées aux spores (RMSE_s) sont de 0.23 avec l'hypothèse n°1 et 1.20 avec l'hypothèse n°2, et en conditions dynamiques de pH, les RMSEs sont de 0.45 avec l'hypothèse n°1 et 0.60 avec l'hypothèse n°2. D'un point de vue physiologique, des changements brutaux de facteurs environnementaux imposent un temps d'adaptation aux cellules à différents niveaux physiologiques, métaboliques et/ou moléculaires (Beales, 2004). Par exemple, le passage d'une condition favorable à une condition défavorable pour la croissance bactérienne se traduit par un temps de latence plus élevé en lien avec l'adaptation des cellules à leur nouvel environnement (Guillier et al., 2005; Wilks et al., 2009). En ce qui concerne la sporulation, nous avons supposé qu'un temps d'adaptation est également nécessaire, ce qui expliquerait les meilleurs ajustements obtenus lorsque la probabilité repart de zéro que lorsqu'elle se poursuit, à chaque shift environnemental. De ce fait, ce sont les prévisions utilisant une probabilité qui repart de zéro et qui évolue selon l'effet des conditions environnementales imposées (hypothèse n°1), qui seront présentées et discutées dans les figures suivantes (Fig. 5.3 et Fig. 5.4).

3.2.2. Description et prévision des cinétiques de croissance-sporulation en conditions dynamiques de température.

Les cinétiques de croissance et de sporulation de *B. subtilis* BSB1 cultivé en milieu BHI, en erlens, ont été acquises dans une condition statique de température (à 37°C) et dans deux conditions dynamiques de température (Fig. 5.3). Dans ces trois scénarios testés, les cinétiques de croissance ne sont pas statistiquement différentes (p<5%). La concentration maximale en cellules totales atteint 2,9 × 10⁸ UFC/ml. Néanmoins, les cinétiques de sporulation sont fortement impactées par les différents profils de température.

En condition statique de température, à 37°C, les spores apparaissent à partir de 13 h de culture et en deux phases. Une première phase correspond à une apparition abrupte d'une première population de spores (environ 10^3 UFC/ml) puis les spores apparaissent plus progressivement dans une deuxième phase jusqu'à atteindre la concentration maximale en spores S_{max} de 2,8 10^8 UFC/mL à environ 150 h de culture.

Dans le second scénario, *B. subtilis* BSB1 est cultivé 16 h à 37°C puis est incubé à 10°C pour le reste du temps de culture, ce qui provoque une stagnation de la concentration en spores au cours du temps. A partir de la cinétique de sporulation ajustée en condition statique de température (37°C), la cinétique a été décrite à 37°C jusqu'à 16 h de culture où la concentration en spores atteint $1,3 \times 10^2$ UFC/ml. A partir de 16 h de culture, la température de 10°C n'est plus favorable à la sporulation. La probabilité de sporuler prévue est donc nulle et la concentration en spores est considérée constante au cours du temps, avec une valeur de $1,3 \times 10^2$ UFC/ml. Cette prévision est logique car les basses températures conduisent à une répression des gènes de sporulation (Budde *et al.*, 2006) et ralentissent fortement les réactions enzymatiques (Movahedi et Waites, 2002) qui seraient même bloquées à 10°C. Ainsi, même les cellules qui se seraient déjà engagées en sporulation au moment du passage à 10°C, ne peuvent pas terminer le processus de sporulation jusqu'à la formation d'une spore thermorésistante. Ces hypothèses sont confortées par nos résultats puisque la concentration en spores n'évolue pas à partir du moment où les suspensions bacteriennes sont incubées à 10°C.



Fig. 5.3. Cinétiques de croissance-sporulation *B. subtilis* BSB1 dans différentes conditions dynamiques de température.

Les concentrations en cellules totales (•) et en cellules thermorésistantes (•) en conditions statiques de température (37°C) ont été ajustées avec le modèle de croissance (-------) et de sporulation (-------). A partir de ces cinétiques ajustées, les cinétiques de sporulation ont été prévues dans les deux conditions suivantes : B. subtilis BSB1 a été cultivé 16 h à 37°C puis placée à 10°C (◊) et sa cinétique de sporulation a été simulée (---------) et B. subtilis BSB1 a été cultivé 16 h à 37°C, puis placée à 10°C pendant 24 h puis de nouveau placée à 37°C (□) et la cinétique de sporulation correspondante a été simulée (-------). Les changements de température sont indiqués par les lignes verticales en tirets.

Dans le $3^{\text{ème}}$ scénario, *B. subtilis* BSB1 est cultivé 16 h à 37° C puis incubé à 10° C pendant 24 h (comme dans le $2^{\text{ème}}$ scénario) et finalement, la suspension bactérienne est de nouveau replacée à 37° C. Lorsque la suspension bactérienne est de nouveau replacée à 37° C, la cinétique d'apparition des spores se poursuit et correspondait à la cinétique en condition statique (à 37° C) avec un décalage de 24 h dans le temps jusqu'à atteindre la concentration maximale en spores de 2,8 × 10^{8} UFC/ml. L'évolution du nombre de spores au cours du temps dans cette condition dynamique de température est correctement décrite avec la méthodologie utilisant les modèles prévisionnels de sporulation et une probabilité repartant de zéro à chaque changement environnemental (RMSE_S=0,23).

<u>3.2.3. Description et prévision des cinétiques de croissance-sporulation en</u> <u>conditions dynamiques de pH</u>

Les cinétiques de croissance et de sporulation de *B. subtilis* BSB1 cultivé en milieu BHI, en fermenteur, sont comparées dans une condition statique de pH (pH 7,0) et dans une condition dynamique de pH (Fig. 5.4). Dans ces deux conditions, les cinétiques de croissance ne sont pas statistiquement différentes (p<5%). La concentration maximale en cellules totales atteint $2,2 \times 10^9$ UFC/ml.





Les données de cellules totales (•) et de cellules thermorésistantes en condition statique de pH 7,0 (•) ont été ajustées avec le modèle primaire de croissance (_____) et de sporulation (_____). L'évolution du nombre de spores en condition dynamique de pH (•) a été décrite avec la cinétique prévue par les modèles prévisionnels de croissance-sporulation (_____-). Les changements de pH sont indiqués par les lignes verticales en tirets.

En condition statique de pH (pH 7,0), les spores apparaissent en deux phases : une première phase correspond à une apparition abrupte d'une première population de spores jusqu'à environ 10^4 UFC/ml puis, au cours de la seconde phase, une apparition plus progressive des spores est observée jusqu'à atteindre la concentration maximale en spores S_{max} de 7,8 × 10^8 UFC/ml. Les cinétiques de croissance et de sporulation sont ajustées dans cette condition statique, à pH 7,0 (lignes continues en Fig. 5.3) et les valeurs des paramètres de sporulation (P_{max} , t_{max} et σ) à pH 7,0 sont utilisées pour le calcul des paramètres à pH 5,0 et pH 4,5 et pour la simulation des cinétiques de sporulation en condition dynamique de pH.

En condition dynamique de pH, B. subtilis BSB1 est cultivé pendant 23 h à pH 7,0 jusqu'à atteindre une concentration d'environ 10⁵ UFC/ml. A t=23 h, le pH est abaissé et maintenu constant à pH 5.0 pendant 40 h (jusqu'à 63 h de culture) jusqu'à atteindre une concentration en spores de $2,3 \times 10^6$ UFC/ml. Au temps t=63 h, la concentration en spores est 40 fois supérieure à pH 7,0 avec une concentration en spores de 6.3×10^7 UFC/ml. A partir de 63 h de culture, le pH est de nouveau abaissé et maintenu constant à une valeur de 4,5, non favorable à la sporulation, ce qui explique que la concentration en spores reste constante à partir de 63 h de culture. La cinétique de sporulation est prévue avec les paramètres ajustés à pH 7,0 jusqu'à 23 h de culture où la concentration en spores est de 7,4 \times 10⁴ UFC/ml. De 23 h à 63 h de culture, la cinétique de sporulation est simulée avec les paramètres de probabilité calculés à pH 5,0 (et en partant d'une valeur nulle de probabilité de sporuler). A 63 h de culture, la concentration en spores simulée est de 6.9×10^6 UFC/ml et est ensuite considérée constante à partir de 63 h de culture quand le pH est abaissé à pH 4,5, défavorable à la sporulation. La cinétique prévue décrit correctement l'évolution de la concentration en spores au cours du temps, en condition dynamique de pH avec une RMSE associée aux spores de 0,23. Notamment, elle permet de décrire le ralentissement de l'apparition des spores au cours du temps lorsque le pH est abaissé à pH 5,0 par rapport à une cinétique à pH constant de 7,0. La concentration maximale en spores est légèrement sous-estimée à une valeur de 1.3 × 10⁶ UFC/ml par rapport à la concentration maximale en spores déterminée expérimentalement qui est de 3.3×10^6 UFC/ml (RE= 6.2%). Le ralentissement de l'apparition des spores peut être expliqué au niveau physiologique par une baisse de la production de SigmaH à bas pH, sous-unité transcriptionnelle nécessaire à l'activation de Spo0A en Spo0A~P (Cosby et Zuber, 1997). Par ailleurs, de faibles valeurs de pH conduisent à la production d'espèces réactives de l'oxygène qui inhiberaient également la sporulation (Wilk et al., 2009).

3.3. Extrapolation des modèles de croissance et de sporulation pour la souche *Bacillus licheniformis* Ad978.

3.3.1. Evaluation de la robustesse du modèle cinétique de croissance-sporulation pour décrire les cinétiques de *B. licheniformis* Ad978.

Des cinétiques de croissance et de sporulation de *B. licheniformis* AD978 ont été obtenues, en milieu Hageman, additionné de 1% de milieu BHI, à 45°C, pH 7,2, à 45°C, pH 5,8 et à 20°C, pH 7,2 (Fig. 5.5 et Tableau 5.5).

Le modèle cinétique de croissance-sporulation s'ajuste correctement aux trois cinétiques expérimentales de B. licheniformis AD978 (Fig. 5.5) et permet d'estimer correctement la concentration maximale en spores et le temps d'apparition des premières spores (Tableau 5.4). Un cas particulier a été remarqué à 45°C pH 5,8 où un déclin cellulaire concommitant à la sporulation est observé. Dans ce cas, la description de ce déclin cellulaire impacte fortement les estimations des paramètres de croissance et de sporulation (résultats non montrés). Si la mort cellulaire n'est pas modélisée (équations 1 et 3), l'évolution du nombre de cellules totales n'est pas convenablement décrite avec une SCE associée aux cellules totales SCE_N de 150,7 contre une SCE_N de 13,5 lorsque le déclin cellulaire est pris en compte. Lorsque la mort cellulaire n'est pas décrite, la concentration maximale en cellules totales N_{max} est sous-estimée d'un facteur 10, la probabilité maximale de sporuler est sous-estimée d'un facteur 1000 et est obtenue 50 h plus tard par rapport aux estimations obtenues lorsque la mort cellulaire est modélisée. Il est donc nécessaire de décrire le déclin cellulaire pour une estimation correcte des paramètres de croissance et de sporulation. Pour B. subtilis BSB1, des cas de déclins cellulaires existent mais n'ont été observés qu'une fois la concentration maximale en spores atteinte. Par conséquent, le déclin cellulaire n'impactait pas les estimations des paramètres de croissance et de sporulation.

3.3.2. Evaluation de l'impact des facteurs environnementaux sur les paramètres de croissance et de sporulation de *B. licheniformis* Ad978.

Parmi les trois conditions testées, la condition la plus favorable à la croissance et la sporulation est à 45°C, pH 7,2 (Fig. 5.5a et b).


Fig. 5.5. Ajustement des cinétiques de croissance (_____) et de sporulation (_____) de *B. licheniformis* Ad978 avec le modèle de croissance (déclin)-sporulation (équations 1 à 3), avec un temps de formation de la spore t_f de 7,0 h, en milieu BHI, à 45°C pH 7,2 et a_w 0,996 (a et b), à 45°C pH 5,8 et a_w 0,996 (c et d) et à 20°C, pH 7,2, a_w 0,996 (e et f).

Tableau 5.4. Estimations des paramètres de croissance, (de mort) et de sporulation pour les cultures de *B. licheniformis* Ad978 en fermenteur, en milieu BHI, à 45°C, pH 7,2, 45°C, pH 5,8 et 20°C pH 7,2.

Paramètres	Signification	BHI		
		45°C,	45°C, pH	20°C,
		рН 7,2	5,8	рН 7,2
N_{θ}	Concentration initiale en cellules	6,59	5,62	7,02
(III (UFC/IIII))	vegetatives	[3,00-7,18]	[3,03- 6,21]	[0,42-7,01]
λ (h)	Latence avant la croissance	5,0	5,0	0,0
		[4,1-6,0]	[4,32-5,59]	[-4,3-4,3]
μ_{max} (h ⁻¹)	Taux maximal de croissance	1,25	2,81	0,14
		[1,11-1,40]	[2,25- 3,36]	[0,13-0,15]
N _{max}	Concentration maximale en cellules	21,21	20,80	21,57
(ln (UFC/ml))	totales	[20,86- 21,57]	[20,35-21,25]	[21,23- 21,90]
	Temps auquel le déclin cellulaire	/	19,03	/
$t_m(\mathbf{h})$	démarre		[17,35-20,72]	
	Taux de mortalité	/	$7,48 \times 10^{-2}$	/
L (L-1)			$[5,27 \times 10^{-2} -$	
<i>K</i> (n ⁻)			9,68 × 10 ⁻²]	
Nres	Concentration en cellules totales	/	14,54	/
(ln (UFC/ml))	restantes ou survivantes		[13,80-15,29]	
P _{max}	Proportion maximale de cellules	1,00	0,48	1,00
	s'engageant en sporulation	[0,40-1,60]	[-0,45-1,40]	[0,29-1,71]
t_{max} (h)	Temps auquel les cellules ont la	20,7	156,0	297,7
	probabilité maximale de sporuler	[17,9-23,5]	[111,7-200,3]	[263,8-
A \	N	1.0	20.0	331,5]
σ (h)	Dispersion de la probabilité	4,0	30,9	65,2
4 (1)		[2,9-3,2]	[25,2-36,3]	[33,3-73,0]
t 1s (n)	spores (calculé)	15	17	41
S _{max}	Concentration maximale en spores	9,42	9,41	1,41
(CFU/ml)	(calculée)	× 10 ⁸	× 10 ⁵	× 10 ⁹
RMSE _N	RMSE associée aux cellules totales	0,90	0,69	1,25
RMSEs	RMSE associée aux spores	1,99	0,62	1,78

Dans cette condition, les premières spores apparaissent plus tôt qu'à 20°C pH 7,2 et en plus grand nombre qu'à 45°C, pH 5,8. Ces conditions sont également favorables à la croissance avec un taux de croissance μ_{max} plus élevé qu'à 20°C, pH 7,2, un temps de latence faible qu'à 45°C, pH 5,8 et une concentration maximale en cellules totales de 1,63 × 10⁹ UFC/ml (Tableau 5.4).

A 20°C, pH 7,2 (Fig. 5.5e et f), aucune latence n'est observée mais le taux maximal de croissance est 9 fois inférieur à celui obtenu en conditions plus favorables. Les premières spores apparaissent 26 h plus tard qu'en conditions plus favorables, et de manière plus progressive de

42 h à 200 h de culture jusqu'à atteindre une concentration maximale en spores de $1,41 \times 10^9$ UFC/mL. Ces observations s'expliquent par la probabilité maximale de sporuler qui est affectée d'un facteur 16 et obtenue 270 h plus tard, et la probabilité est plus dispersée (σ =65.2 h).

A 45°C pH 5,8 (Fig. 5.5c et d), la croissance est plus favorable qu'à pH 7,2 avec une latence de 5,0 h et un taux de croissance environ 2 fois supérieur (μ_{max} =2,81 h⁻¹). En revanche, un important déclin cellulaire est observé de 20 h à 100 h de culture pour atteindre une concentration en cellules résiduelles N_{res} de 2,06 × 10⁶ UFC/ml. Le rendement de sporulation (0.09%) est environ 700 fois inférieur à celui obtenu en conditions favorables. La probabilité maximale de sporuler est obtenue 136 h plus tard qu'à 45°C, pH 7,2 et la probabilité est plus dispersée (σ =65,2 h).

A partir de ces observations, et en considérant que la condition 45°C, pH 7,2 est la condition la plus favorable à la croissance et la sporulation, les effets de température et pH défavorables (20°C ou pH 5.8) sur les paramètres de croissance et de sporulation sont rassemblés dans le tableau 5.5 et sont comparés à ceux observés sur B. subtilis BSB1. Les conditions défavorables conduisent à une augmentation du temps d'apparition des premières spores t_{1s} et à une concentration finale en spores S_{max} plus faible chez les deux espèces. Ces premières observations laissent supposer que les conditions défavorables ont des effets similaires sur la sporulation des deux espèces. Mais l'utilisation du modèle cinétique de croissance-sporulation permet de mettre en évidence des comportements physiologiques de sporulation différents entre ces deux espèces. Les conditions défavorables de sporulation amènent à des évolutions opposées des trois paramètres de sporulation B. subtilis BSB1 et de B. licheniformis Ad978 (Tableau 5.5). Les cellules de B. subtilis initient la sporulation plus tôt (évalué avec t_{max}) et de manière plus synchrone (évalué avec σ) en conditions défavorables de croissance et de sporulation alors que les cellules de *B. licheniformis* initient la sporulation plus tard et de manière plus hétérogène, conduisant à une apparition plus progressive des spores au cours du temps, en conditions défavorables de pH et de température. Ces résultats sont cohérents avec de précédentes données indiquant que l'apparition des spores est plus lente (taux d'apparition des spores plus faible) en conditions sous-optimales de pH et de température (Baril et al., 2012). Au regard de ces différences de comportement entre les deux espèces, le modèle cardinal qui a été validé chez *B. subtilis* ne peut pas être extrapolé à l'évolution des paramètres de sporulation de *B. licheniformis* Ad978.

		Effets des conditions sous-optimales de pH		Effets des conditions sous-optimales de température	
Paramètres	Signification	Bacillus subtilis BSB1	Bacillus licheniformis AD978	Bacillus subtilis BSB1	Bacillus licheniformis AD978
λ (h)	Latence avant la	×	1	1	1
	croissance				
$\boldsymbol{\mu}_{max}$ (h ⁻¹)	Taux maximal de croissance				
N _{max} (UFC/ml)	Concentration maximale en cellules totales	Π	=	=	=
Mort cellula	Mort cellulaire pendant la		Oui	Non	Non ou ?
sporu	sporulation				
P_{max} (h ⁻¹)	Probabilité maximale de sporuler				
t _{max} (h)	Temps auquel les cellules ont la probabilité maximale de sporuler		/		/
σ (h)	Dispersion de la probabilité		1		1
t1s (h)	Temps d'apparition des premières spores (calculé)	1	1	1	1
S _{max} (UFC/ml)	Concentration maximale en spores (calculée)	=	=		=

Tableau 5.5. Comparaison des effets du pH et de la température sur les paramètres de croissance et de sporulation de *B. subtilis* BSB1 et *B. licheniformis* Ad978

Les conditions défavorables de facteurs environnementaux conduisent à une diminution (), à une augmentation / ou ne modifient pas (=) les valeurs des paramètres.

3.3.3. Quel est le comportement général de sporulation des bactéries sporulées ?

Les deux espèces *B. subtilis* et *B. licheniformis* sont deux espèces mésophiles proches génétiquement et présentent néanmoins des comportements de sporulation différents. Ces observations soulèvent alors la question suivante: le comportement de sporulation de *B. subtilis* BSB1 est-il représentatif du comportement des bactéries sporulées, en général ou ce modèle bactérien a-t-il un comportement atypique?

Le comportement plus généralement observé dans la littérature est celui décrit chez *B. licheniformis* Ad978. Par exemple, chez *Bacillus weihenstephanensis* KBAB4, les conditions défavorables à la sporulation conduisent à une apparition plus lente, plus progressive, des spores au cours du temps comme pour *B. licheniformis* Ad978 (Baril et al., 2012). Des comportement similaires ont aussi été observés pour trois souches de *Bacillus cereus* (ATCC 4342, 7004 et 981) qui sporulent plus lentement en conditions défavorables de température (González *et al.*, 1999) et de pH (Mazas *et al.*, 1997). Il est également intéressant de noter qu'une sporulation plus lente en conditions défavorables d'activité de l'eau a été observée pour une autre souche de *B. subtilis* (ATCC 31324). Néanmoins, des comportements similaires à *B. subtilis* BSB1 ont aussi été observés pour d'autres microorganismes. Chez *Bacillus cereus* NCIB 5893, l'apparition des spores est plus rapide en condition défavorable de température (40°C) par rapport à une condition plus favorable (entre 30°C et 35°C) (Lundgren, 1967). En conditions alcalines (condition contrôle (Baweja *et al.*, 2008). Ces données montrent que le comportement de sporulation est espèce-dépendant mais aussi souche-dépendant.

6. Conclusion

Le modèle cinétique de croissance-sporulation développé dans le chapitre 2 est un outil efficace pour décrire les cinétiques de *B. subtilis* obtenues dans divers milieux et conditions de culture. Pour chaque milieu testé (LB, BHI et lactosérum), la température a les mêmes effets sur les paramètres de croissance et de sporulation. Ceci justifie l'utilisation du modèle cardinal pour prévoir les effets de la température sur ces deux processus biologiques. Les modèles permettent de prévoir correctement les cinétiques de croissance et de sporulation maximale en spores) en fonction de la température. Pour aller plus loin, une méthodologie efficace a été proposée pour prévoir les cinétiques de croissance et de sporulation et des données d'intérêt. Elle repose sur la probabilité de sporuler des cellules végétatives, qui évolue au cours du temps, selon l'effet du facteur environnemental appliqué.

L'utilisation du modèle cinétique de croissance permet de mettre en lumière des comportements physiologiques différents entre deux espèces génétiquement proches : *B. subtilis* et *B. licheniformis*. Un déclin cellulaire pendant la sporulation de *B. licheniformis* a été observé et a été décrit avec un module de décroissance cellulaire qui a été implémenté dans le modèle cinétique. Malgré des effets des facteurs environnementaux visiblement identiques sur la sporulation des deux espèces, au regard du temps d'apparition des premières spores et de la concentration maximale en spores, les paramètres de sporulation qui reflètent le comportement physiologique de sporulation, sont impactés de manière différente entre les deux espèces. Ces observations révèlent les limites d'utilisation du modèle cardinal de sporulation pour prévoir l'évolution des paramètres de sporulation de *B. licheniformis* Ad978 en fonction de la température, du pH et de l'aw. Une connaissance minimale du comportement du microorganisme étudié est nécessaire pour être capable de prévoir ces effets mais il est difficile de présager du comportement de sporulation d'un microorganisme donné puisque ce comportement de sporulation est dépendant de l'espèce et même de la souche bactérienne.

5. Références

- Baril, E., 2011. Quantification de l'influence de l'environnement sur la formation et la thermorésistance des spores bactériennes.
- Baril, E., Coroller, L., Couvert, O., El Jabri, M., Leguerinel, I., Postollec, F., Boulais, C., Carlin, F., Mafart, P., 2012. Sporulation boundaries and spore formation kinetics of *Bacillus spp.* as a function of temperature, pH and a_w. Food Microbiol. 32, 79–86. doi:10.1016/j.fm.2012.04.011
- Baweja, R.B., Zaman, M.S., Mattoo, A.R., Sharma, K., Tripathi, V., Aggarwal, A., Dubey, G.P., Kurupati, R.K., Ganguli, M., Chaudhury, N.K., Sen, S., Das, T.K., Gade, W.N., Singh, Y., 2008. Properties of *Bacillus anthracis* spores prepared under various environmental conditions. Arch. Microbiol. 189, 71–79. doi:10.1007/s00203-007-0295-9
- Beales, N., 2004. Adaptation of microorganisms to cold temperatures, weak acid preservatives, low pH, and osmotic Stress: A Review. Compr. Rev. Food Sci. Food Saf. 3, 1–20. doi:10.1111/j.1541-4337.2004.tb00057.x
- Budde, I., Steil, L., Scharf, C., Völker, U., Bremer, E., 2006. Adaptation of *Bacillus subtilis* to growth at low temperature: a combined transcriptomic and proteomic appraisal. Microbiol. Read. Engl. 152, 831–853. doi:10.1099/mic.0.28530-0
- Cosby, W.M., Zuber, P., 1997. Regulation of *Bacillus subtilis* sigmaH (spo0H) and AbrB in response to changes in external pH. Journal of Bacteriology 179, 6778–6787. doi:10.1128/jb.179.21.6778-6787.1997
- Geeraerd, A.H., Valdramidis, V.P., Van Impe, J.F., 2005. GInaFiT, a freeware tool to assess non-log-linear microbial survivor curves. Int. J. Food Microbiol. 102, 95–105. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2004.11.038
- González, I., López, M., Martínez, S., Bernardo, A., González, J., 1999. Thermal inactivation of *Bacillus cereus* spores formed at different temperatures. Int. J. Food Microbiol. 51, 81–84. doi:10.1016/S0168-1605(99)00109-9
- Guillier, L., Pardon, P., Augustin, J.-C., 2005. Influence of Stress on Individual Lag Time Distributions of Listeria monocytogenes. Appl. Environ. Microbiol. 71, 2940–2948. doi:10.1128/AEM.71.6.2940-2948.2005
- 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. J. Bacteriol. 160, 438–441.

- 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., Capuano, V., Carter, N.M., Choi, S.K., Cordani, J.J., Connerton, I.F., Cummings, N.J., Daniel, R.A., Denziot, F., Devine, K.M., Düsterhöft, A., Ehrlich, S.D., Emmerson, P.T., Entian, K.D., Errington, J., Fabret, C., Ferrari, E., Foulger, D., Fritz, C., Fujita, M., Fujita, Y., Fuma, S., Galizzi, A., Galleron, N., Ghim, S.Y., Glaser, P., Goffeau, A., Golightly, E.J., Grandi, G., Guiseppi, G., Guy, B.J., Haga, K., Haiech, J., Harwood, C.R., Hènaut, A., Hilbert, H., Holsappel, S., Hosono, S., Hullo, M.F., Itaya, M., Jones, L., Joris, B., Karamata, D., Kasahara, Y., Klaerr-Blanchard, M., Klein, C., Kobayashi, Y., Koetter, P., Koningstein, G., Krogh, S., Kumano, M., Kurita, K., Lapidus, A., Lardinois, S., Lauber, J., Lazarevic, V., Lee, S.M., Levine, A., Liu, H., Masuda, S., Mauël, C., Médigue, C., Medina, N., Mellado, R.P., Mizuno, M., Moestl, D., Nakai, S., Noback, M., Noone, D., O'Reilly, M., Ogawa, K., Ogiwara, A., Oudega, B., Park, S.H., Parro, V., Pohl, T.M., Portelle, D., Porwollik, S., Prescott, A.M., Presecan, E., Pujic, P., Purnelle, B., Rapoport, G., Rey, M., Reynolds, S., Rieger, M., Rivolta, C., Rocha, E., Roche, B., Rose, M., Sadaie, Y., Sato, T., Scanlan, E., Schleich, S., Schroeter, R., Scoffone, F., Sekiguchi, J., Sekowska, A., Seror, S.J., Serror, P., Shin, B.S., Soldo, B., Sorokin, A., Tacconi, E., Takagi, T., Takahashi, H., Takemaru, K., Takeuchi, M., Tamakoshi, A., Tanaka, T., Terpstra, P., Togoni, A., Tosato, V., Uchiyama, S., Vandebol, M., Vannier, F., Vassarotti, A., Viari, A., Wambutt, R., Wedler, H., Weitzenegger, T., Winters, P., Wipat, A., Yamamoto, H., Yamane, K., Yasumoto, K., Yata, K., Yoshida, K., Yoshikawa, H.F., Zumstein, E., Yoshikawa, H., Danchin, A., 1997. The complete genome sequence of the gram-positive bacterium Bacillus subtilis. Nature 390, 249-256. doi:10.1038/36786
- Lundgren, L., 1967. effect of variation of sporulation time and temperature on thermostability of *Bacillus cereus* spores. Physiol. Plant. 20, 392–399. doi:10.1111/j.1399-3054.1967.tb07179.x
- Mazas, M., López, M., González, I., Bernardo, A., Martín, R., 1997. Effects of sporulation pH on the heat resistance and the sporulation of Bacillus cereus. Lett. Appl. Microbiol. 25, 331–334. https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.1997.00240.x
- Monteiro, S.M., Clemente, J.J., Henriques, A.O., Gomes, R.J., Carrondo, M.J., Cunha, A.E., 2005. A procedure for high-yield spore production by *Bacillus subtilis*. Biotechnol. Prog. 21, 1026–1031. doi:10.1021/bp050062z
- Movahedi, S., Waites, W., 2002. Cold shock response in sporulating *Bacillus subtilis* and its effect on spore heat resistance. J. Bacteriol. 184, 5275–5281. doi:10.1128/JB.184.19.5275-5281.2002
- Oscar, T.E., 2005. Validation of lag time and growth rate models for *Salmonella typhimurium*: ecceptable prediction zone Method. J. Food Sci. 70, M129–M137. doi:10.1111/j.1365-2621.2005.tb07103.x

- Posada-Uribe, L.F., Romero-Tabarez, M., Villegas-Escobar, V., 2015. Effect of medium components and culture conditions in *Bacillus subtilis* EA-CB0575 spore production. Bioprocess Biosyst. Eng. 38, 1879–1888. doi:10.1007/s00449-015-1428-1
- Rey, M., Ramaiya, P., Nelson, B., *et al.*, 2004. Complete genome sequence of the industrial bacterium *Bacillus licheniformis* and comparisons with closely related Bacillus species. 5. doi:10.1186/gb-2004-5-10-r77
- Rosso, L., Lobry, J.R., Bajard, S., Flandrois, J.P., 1995. Convenient model to describe the combined Effects of temperature and pH on microbial growth. Appl. Environ. Microbiol. 61, 610–616.
- Wilks, J.C., Kitko, R.D., Cleeton, S.H., Lee, G.E., Ugwu, C.S., Jones, B.D., BonDurant, S.S., Slonczewski, J.L., 2009. Acid and base stress and transcriptomic responses in *Bacillus subtilis*. Appl. Environ. Microbiol. 75, 981–990. doi:10.1128/AEM.01652-08

CONCLUSION GENERALE :

SYNTHESE DES RESULTATS ET PERSPECTIVES

Synthèse des résultats

Les bactéries sporulées sont à l'origine de risques sanitaires et d'altération des produits alimentaires. Peu d'informations sont disponibles sur la formation de nouvelles spores au cours des procédés alimentaires. Pourtant, la sporulation au cours d'un procédé alimentaire contribue à l'augmentation de la charge en spores. Celles-ci peuvent être plus ou moins résistantes à des traitements subséquents selon les conditions dans lesquelles elles sont produites. Afin d'identifier les niches de sporulation des matières premières jusqu'au produit fini, il est nécessaire de déterminer les conditions environnementales qui favorisent ou qui limitent la sporulation bactérienne. Pour cela, la microbiologie prévisionnelle est un outil utile pour prévoir, les effets de facteurs environnementaux sur les processus bactériens, à l'aide de modèles mathématiques. Néanmoins, aucun modèle prévisionnel n'a été développé pour prévoir la sporulation, à ce jour. L'objectif de cette thèse a été de développer des modèles mathématiques afin de prévoir la sporulation bactérienne en fonction des conditions environnementales. Pour atteindre cet objectif, plusieurs étapes ont été nécessaires (Fig. C).

La première étape (2) Fig. C), a été de développer un modèle cinétique de sporulation qui décrit l'évolution du nombre de spores produites au cours du temps. Etant donné que les nombreuses informations sur la physiologie de la sporulation indiquent que la croissance et la sporulation sont deux processus bactériens étroitement liés, un modèle associant la sporulation à la croissance bactérienne a été développé. Plus précisément, c'est un modèle de différenciation des cellules végétatives en spores qui permet de décrire une cinétique de sporulation à partir d'une cinétique de croissance. La croissance a été décrite avec un modèle de croissance classique : le modèle logistique de Kono (1968) modifié par Rosso et al. (1995). Ce modèle intègre quatre paramètres de croissance : la concentration initiale en cellules N_0 (CFU/mL), la latence avant la croissance λ (h), le taux maximal de croissance μ_{max} (h⁻¹) et la concentration maximale en spores N_{max} (UFC/mL). Le lien entre les spores et les cellules végétatives a été fait avec quatre paramètres qui qualifient la sporulation. La probabilité de sporuler des cellules végétatives au cours du temps a été décrite avec une loi gaussienne (ou loi normale) qui permet d'évaluer l'hétérogénéité d'entrée en sporulation de la population bactérienne au cours du temps avec trois paramètres. Le premier paramètre de cette gaussienne est la probabilité maximale de sporuler $P_{max}(h^{-1})$ qui a été définie par la proportion maximale de cellules végétatives capables de s'engager en sporulation en même temps. Ce paramètre a plus particulièrement un impact sur la concentration maximale en spores obtenue. Le deuxième paramètre de probabilité est le temps t_{max} (h) auquel la probabilité maximale de sporuler est obtenue et impacte plus particulièrement le temps d'apparition des premières spores. Le troisième paramètre de cette loi normale est la dispersion de la probabilité σ (h) autour de t_{max} qui rend compte du caractère synchrone ou hétérogène de la population bactérienne pour l'engagement en sporulation. Ce dernier paramètre a plus particulièrement un impact sur la vitesse d'apparition des spores. D'autre part, la différenciation des cellules végétatives en spores a été qualifiée avec le temps de formation de la spore t_{f_i} une fois les cellules engagées en sporulation. La signification biologique des paramètres de sporulation a été évaluée expérimentalement en utilisant une souche dérivée de *B. subtilis* BSB1, la souche SpoIIAA-gfp (*amyE* ::*P*_{spoIIAA}-gfp) qui produit une molécule fluorescente, la Green Fluorescent Protein (GFP) lorsque la sporulation est initiée par la cellule. Ainsi, le suivi de la fluorescence produite par cette souche a permis d'évaluer d'une part, l'évolution du nombre de cellules s'engageant en sporulation au cours du temps, et d'autre part, le temps de formation de la spore qui correspond au temps écoulé entre la détection de la GFP et l'apparition des premières spores.

Ce modèle décrit parfaitement l'ensemble des cinétiques de croissance-sporulation de *B. subtilis* BSB1 obtenues dans différentes conditions environnementales. Ce modèle est même plus efficace que de précédents modèles de sporulation (Das et Sen, 2011 et Baril et al, 2012) pour décrire les cinétiques et déterminer des données d'intérêt en agroalimentaire telles que le temps d'apparition des premières spores ou la concentration maximale en spores obtenue à la fin de la culture. De plus, il permet d'étudier et de qualifer de façon indépendante la croissance et la sporulation.

La seconde étape (O Fig. C) a consisté à décrire puis modéliser les effets des facteurs environnementaux (température, pH et a_w) sur les paramètres de croissance et e sporulation de *B. subtilis* BSB1. Les conditions optimales pour la croissance correspondent aux conditions où les cellules végétatives se développent rapidement, lorsque le taux de croissance μ_{max} est le plus élevé et avec un faible temps de latence. Pour la sporulation, les conditions optimales ont été définies lorsque les premières spores apparaissent tôt au cours de la culture et lorsque le rendement de sporulation est fort. Les limites de croissance et de sporulation de *B. subtilis* sont très proches pour les trois facteurs environnementaux et les conditions optimales pour la croissance et la sporulation correspondent également. Lorsque les conditions environnementales sont sous-optimales, la latence λ avant la croissance augmente et le taux de croissance maximal μ_{max} diminue mais la concentration maximale N_{max} en cellules totales reste stable. En conditions non favorables pour la croissance et la sporulation, les cellules végétatives commencent à sporuler plus tôt (évalué avec t_{max}), sporulent de manière plus synchrone (évalué avec σ) et en plus grande proportion (évaluée P_{max}). La combinaison des effets de conditions sous-optimales sur ces paramètres de croissance et de sporulation conduit à une apparition plus tardive des premières spores et une concentration finale en spores (S_{max}) plus faible.



Fig. C. Représentation schématique des objectifs de la thèse et état d'avancement de chaque objectif (atteint (
), ou travaux à poursuivre (
)). Les numéros entourés correspondent aux 5 chapitres de la thèse.

Les outils de la microbiologie prévisionnelle sont couramment utilisés pour prévoir la croissance bactérienne en fonction des conditions environnementales. La prévision de la croissance (et plus particulièrement le taux de croissance bactérien) repose sur l'utilisation d'un

modèle secondaire, le modèle cardinal de Rosso et al. (1995) et des valeurs cardinales de croissance, c'est-à-dire les valeurs minimales, optimales et maximales des facteurs environnementaux pour lesquelles la bactérie est capable de se développer. Une stratégie innovante a été proposée pour estimer le plus précisément possible les valeurs cardinales de croissance de B. subtilis BSB1. Pour cela, un plan dit D-optimal a été construit. L'originalité de ce plan est qu'il a été réalisé de manière séquentielle (le plan global est constitué de deux plans successifs D-optimaux réalisés successivement) et a tenu compte de contraintes expérimentales telles qu'un nombre d'expériences inférieur à trente. En parallèle de ce plan, des plans factoriels (plus classiques), où les effets de chaque facteur environnemental ont été évalués de manière indépendante, ont été réalisés. Statistiquement, les estimations obtenues avec le plan D-optimal (D1+D2) sont plus précises que celles obtenues avec le plan factoriel. En revanche, les estimations des valeurs cardinales avec le plan D-optimal sont incohérentes avec la réalité biologique, c'est-à-dire qu'elles ne correspondent pas aux limites de croissance évaluées avec des expériences de croissance/non croissance. Ces mauvaises estimations étaient liées à de mauvais à priori sur les valeurs cardinales qui ont impacté la structure du plan Doptimal et la structure du plan a impacté, elle-même, les estimations. Pour de futures applications, il est alors préférable d'utiliser les valeurs cardinales les plus proches de la réalité biologique, autrement dit les valeurs cardinales estimées par la méthode classique, avec les plans factoriels.

La croissance et la sporulation sont deux processus bactériens étroitement liés au niveau physiologique (Mendez et al., 2004; Narula et al., 2016; Reder et al., 2012) et une corrélation existe entre la vitesse de croissance et la vitesse de sporulation (Baril et al., 2012; Dawes and Thornley, 1970). De plus, les paramètres de croissance et de sporulation sont impactés de manière similaire par les facteurs environnementaux. C'est pourquoi, nous avons suggéré d'utiliser un seul modèle secondaire pour décrire et prévoir la croissance et la sporulation, comme cela a déjà été proposé pour décrire d'autres processus bactériens tels que la germination et la reprise de croissance des spores (Mtimet et al., 2015). Ce modèle est donc le modèle cardinal de Rosso (1995) qui utilise les valeurs cardinales de croissance et les valeurs optimales des paramètres de croissance et de sporulation. Ces valeurs optimales des paramètres sont déterminées à partir de l'ajustement d'un seul jeu de données de croissance et de sporulation obtenu dans une condition environnementale favorable à ces deux comportements bactériens. L'utilisation du modèle cardinal permet de décrire correctement les cinétiques expérimentales dans différentes conditions de pH, température et aw et permet de prévoir correctement des informations d'intérêt en agroalimentaire tels que le temps d'apparition des premières spores et la concentration maximale en spores atteinte.

La validité des modèles primaire et secondaire de croissance et de sporulation a été testée pour vérifier s'ils sont utilisables en dehors du domaine expérimental dans lequel ces modèles ont été développés. Pour cela, ces modèles ont été utilisés et testés pour prévoir les cinétiques de croissance-sporulation (i) de *B. subtilis* BSB1 dans des matrices et conditions de culture différentes de celles utilisées pour le développement des modèles, (ii) de *B. subtilis* BSB1 en conditions dynamiques de température et de pH, et (iii) d'une autre espèce, *Bacillus licheniformis* Ad978.

Les modèles de croissance et de sporulation ont montré leur efficacité pour prévoir les cinétiques de la souche d'étude B. subtilis BSB1 dans différentes matrices (milieux riches LB, BHI et lactosérum) et dans des conditions de culture différentes (en termes de volume de milieu de culture, d'agitation, d'aération, etc ...). Les cinétiques ont été correctement décrites et les prévisions des temps d'apparition des premières spores et de la concentration maximale en spores atteinte étaient sécuritaires et satisfaisantes. Une méthodologie a également été proposée pour prévoir les cinétiques en conditions dynamiques de facteurs environnementaux. Cette méthodologie repose sur des postulats au niveau physiologique qui sont traduits mathématiquement. Les bactéries cultivées dans une condition environnementale A adoptent un comportement de sporulation (traduit par la probabilité de sporuler) qui est fonction de cette condition A (les paramètres de sporulation sont calculés avec le modèle cardinal). Lorsqu'un changement brutal (shift) de la condition A à une condition B est appliqué, l'hypothèse est qu'un temps d'adaptation des cellules est nécessaire (traduit par une probabilité de sporuler qui retombe à zéro) avant d'adopter un comportement qui est fonction de la condition B. Cette méthodologie utilisée avec les modèles (cinétique et cardinal) de croissance et de sporulation a prouvé son efficacité pour prévoir les cinétiques de sporulation obtenues dans deux scénarios simples où la température ou le pH variaient au cours de la culture. Ces premiers résultats encourageants offrent des perspectives pour prévoir la sporulation dans des scénarios plus complexes de facteurs environnementaux pour simuler les conditions rencontrées dans les procédés alimentaires.

Les modèles de croissance et de sporulation ont montré leurs limites pour prévoir la sporulation chez une autre espèce de *Bacillus*. Malgré le fait que *B. licheniformis* et *B. subtilis* soient des espèces proches génétiquement, leurs comportements de sporulation sont différents. Contrairement à *B. subtilis*, un déclin cellulaire a été observé de manière concomitante à la sporulation chez *B. licheniformis* et impacte fortement l'estimation des paramètres de croissance et de sporulation. Il est néanmoins facile de compléter le modèle de croissance-sporulation avec un module de mort cellulaire inspiré des modèles d'inactivation

(Geeraerd *et al.*, 2005) pour décrire les cinétiques de *B. licheniformis* Ad978. De plus, les effets des facteurs environnementaux sur les paramètres de sporulation du modèle cinétique apparaissent opposés. Dans des conditions environnementales non favorables à la sporulation, l'apparition des spores de *B. licheniformis* au cours du temps est plus lente qu'en conditions optimales alors que pour *B. subtilis*, le contraire a été observé. Dans la littérature des comportements de sporulation opposés ont également été observés entre espèces et même entre souches. L'utilisation du modèle cardinal pour prévoir les cinétiques de croissance-sporulation d'un microorganisme dont le comportement de sporulation n'est pas caractérisé est donc limitée. Ces conclusions mettent alors en lumière le manque de données quantitatives sur la sporulation bactérienne dans la littérature, pour être capable de caractériser et prévoir la sporulation en fonction des conditions environnementales.

Perspectives

Ces travaux de thèse ont permis d'apporter un certain nombre de connaissances sur la croissance et la sporulation de l'espèce modèle des bactéries sporulées : *Bacillus subtilis*. Plus particulièrement ces travaux ont contribué à mieux caractériser le comportement de sporulation d'une population bactérienne aux niveaux physiologique et quantitatif. Des modèles de croissance et de sporulation ont été proposés pour décrire et prévoir l'impact de la température, du pH et de l'aw sur la croissance et la sporulation bactériennes. Malgré des premiers résultats encourageants, l'étape de validation de ces modèles reste néanmoins à compléter chez *B. subtilis* BSB1. Dans une optique de prévoir la sporulation dans les industries agroalimentaires, dans les ingrédients, les aliments et sur les lignes de production, la robustesse de ces modèles devra être évaluée dans des conditions environnementales plus réelles, en imitant des scénarios représentatifs de procédés alimentaires.

Dans un premier temps, les modèles pourront être validés en milieux liquides et agités, pour des scénarios plus complexes de conditions dynamiques de facteurs environnementaux. Par exemple, une étape d'acidification pourrait être imitée par diminution du pH en continu (et pas par variations brutales de pH comme cela a été testé dans ces travaux) ou encore un refroidissement par diminution progressive de la température.

Ensuite, il est important de faire remarquer que les cas de sporulation en industrie agroalimentaire ont été observés principalement en biofilms sur les lignes de production (Burgess et al., 2009; Marchand et al., 2012; Sharma and Anand, 2002). Il serait alors intéressant d'étudier la sporulation de *B. subtilis* en biofilms pour répondre à ces principales questions : (i) comment sont réparties les cellules sporulantes dans le biofilm ? Cette question a déjà fait l'objet de divers travaux (Cairns et al., 2014 ; Vlamakis et al., 2008) (ii) quel est l'impact des conditions de sporulation sur la sporulation en biofilm ? (iii) quelles sont les propriétés des spores produites en biofilm en termes de thermo-résistance, d'adhésion aux surfaces, de capacités à germer ? Ces questions pourraient être abordées en utilisant un variant génétique de B. subtilis (producteur de biofilm) qui produit une molécule fluorescente (la GFP par exemple) lorsque les cellules s'engagent en sporulation (en ciblant le gène spoIID par exemple) et un marqueur qui cible spécifiquement le manteau des spores (comme par exemple les anticorps contre les spores de Bacillus couplés à la molécule fluorescente FITC). Par observations microscopiques (microscopie confocale), les marqueurs fluorescents permettraient de déterminer quand les cellules s'engagent en sporulation et quand les spores mâtures sont produites. Ces marqueurs fluorescents permettraient également de localiser ces cellules (sporulantes ou sporulées) dans le biofilm (Bridier *et al.*, 2011). Pour ce faire, la formation de biofilms pourrait être réalisée en capillaires ou en cellules d'écoulement (Franklin *et al.*, 2015). Les cellules d'écoulement sont intéressantes pour étudier l'effet d'un flux liquide sur les capacités de sporulation des cellules en biofilm et sur le détachement des spores formées dans le biofilm.

En dernier lieu, la validation complète des modèles proposés repose sur la possibilité d'extrapoler l'utilisation de ces modèles à d'autres souches espèces ou genres bactériens. Dans ces travaux, des limites de ces modèles ont été identifiés et ces limites sont directement liées aux propriétés physiologiques de sporulation du microorganisme d'étude. Prévoir un comportement cellulaire en fonction des gènes présents, des voies métaboliques présentes et actives, des réseaux de régulation, (etc ...) serait une perspective d'amélioration du modèle très ambitieuse et peu envisageable en termes de charge de travail. Une perspective plus simple et plus immédiate pour prévoir la sporulation d'un microorganisme peu connu, serait de déterminer l'effet positif ou négatif des facteurs environnementaux sur les paramètres de la croissance et la sporulation. Ceci nécessiterait deux cinétiques expérimentales de croissancesporulation, une obtenue dans une conditios favorable et une deuxième obetenue dans une condition défavorable à la sporulation. Ainsi, si les conditions défavorables conduisent à une diminution des valeurs des paramètres, alors le modèle cardinal peut être utilisé pour décrire ces effets. A l'inverse, si les conditions défavorables conduisent à une augmentation des valeurs des paramètres, alors le modèle cardinal peut être utilisé pour décrire cet effet postif sur les paramètres transformés (transformation inverse ou opposée par exemple). Cette transformation de paramètre est déjà utilisée pour prévoir la latence avant la croissance puisque c'est la forme inverse $1/\lambda$ qui est décrite et prévue avec le modèle cardinal.

Au cours de ces travaux de thèse, diverses questions sur le comportement de sporulation d'une population bactérienne se sont posées. A notre connaissance, aucune étude ne s'est intéressée à l'impact des conditions environnementales sur le temps de formation d'une spore mature. Dans le chapitre 1, une stratégie expérimentale a été mise en place pour évaluer le temps de formation de la spore t_f dans trois conditions environnementales. Dans les conditions de température testées (27°C, 40°C et 49°C) t_f variait peu (de 4.0 à 7.4 h) mais il serait intéressant d'évaluer ce temps de formation de la spore dans des conditions plus drastiques et en évaluant également les effets du pH et l'activité de l'eau. Ce temps de formation de la spore t_f pourrait ensuite être utilisé dans le modèle de croissance-sporulation comme un paramètre supplémentaire, et non une constante fixée à 7 h comme cela a été fait dans ces travaux.

Pour développer le modèle cinétique de sporulation, nous avons fait l'approximation que le temps de formation de la spore t_f est constant au cours du temps de culture. Autrement dit, quel que soit le temps auquel les cellules s'engagent en sporulation, les cellules nécessiteront le même temps t_f pour former une spore mâture. Néanmoins, pour aller plus loin, il serait intéressant d'évaluer si t_f est homogène dans toute la population bactérienne (les cellules végétatives requièrent-elles toutes le même temps pour sporuler ?) et s'il évolue au cours du temps de culture. En effet, étant donné que le milieu se dégrade au cours du temps de culture, les spores qui apparaissent en fin de culture ont été produites dans un milieu plus appauvri et plus « pollué » par des métabolites secondaires que les spores qui apparaissent en début de culture. Ces conditions plus drastiques ont possiblement un effet négatif sur le temps nécessaire pour compléter le processus de sporulation. Il serait alors intéressant de vérifier comment évolue le temps de formation de la spore au cours de la culture. Pour cela, des outils de cytométrie en flux peuvent être envisagés en marquant (avec des molécules fluorescentes comme la GFP ou m-cherry) un gène précoce de la sporulation tel que *spoIIAA* utilisé dans ces travaux, et un gène tardif de la sporulation comme *spoVG* ou *gerE*. Ces gènes sont suffisamment exprimés d'après les travaux de Nicolas et al. (2012), pour une détection des protéines fluorescentes. A titre indicatif, en conditions optimales de sporulation, le temps écoulé entre l'expression de spoIIAA et de spoVG ou gerE est de 200 minutes (3 h 40 min) (Errington, 2003).

Ces divers questionnements couvrent des thématiques traitant de la physiologie des cellules et leur comportement de sporulation en fonction de leur environnement. Les informations pourraient être utilisées pour compléter et/ou améliorer les modèles de sporulation pour une prévision plus fine des capacités de sporulation des cellules végétatives en fonction de leur environnement.

Références

- Baril, E., Coroller, L., Couvert, O., El Jabri, M., Leguerinel, I., Postollec, F., Boulais, C., Carlin, F., Mafart, P., 2012. Sporulation boundaries and spore formation kinetics of *Bacillus spp.* as a function of temperature, pH and a(w). Food Microbiol. 32, 79–86. doi:10.1016/j.fm.2012.04.011
- 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, e16177. doi:10.1371/journal.pone.0016177
- Burgess, S.A., Brooks, J.D., Rakonjac, J., Walker, K.M., Flint, S.H., 2009. The formation of spores in biofilms of *Anoxybacillus flavithermus*. J. Appl. Microbiol. 1012–1018. doi: 10.1111/j.1365-2672.2009.04282.x.
- Cairns, L.S., Hobley, L., Stanley-Wall, N.R., 2014. Biofilm formation by *Bacillus subtilis* : new insights into regulatory strategies and assembly mechanisms: Regulation and assembly of *Bacillus subtilis* biofilms. Molecular Microbiology 93, 587–598. doi:10.1111/mmi.12697
- Dawes, I.W., Thornley, J.H.M., 1970. Sporulation in *Bacillus subtilis*. Theoretical and experimental studies in continuous culture systems. J. Gen. Microbiol. 62, 49–66. doi:10.1099/00221287-62-1-49
- Das S, Sen R. Kinetic modeling of sporulation and product formation in stationary phase by Bacillus coagulans RK–02 vis-à-vis other Bacilli. Bioresour Technol 2011;102:9659– 67. doi: 10.1016/j.biortech.2011.07.067
- Errington, J., 2003. Regulation of endospore formation in *Bacillus subtilis*. Nat. Rev. Microbiol. 1, 117–126. doi:10.1038/nrmicro750
- Franklin, M.J., Bothner, B., Akiyama, T., Chang, C., 2015. New technologies for studying biofilms. Microbiol. Spectr. 3. doi:10.1128/microbiolspec.MB-0016-2014
- Geeraerd, A.H., Valdramidis, V.P., Van Impe, J.F., 2005. GInaFiT, a freeware tool to assess non-log-linear microbial survivor curves. Int. J. Food Microbiol. 102, 95–105. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2004.11.038
- Kono, T., 1968. Kinetics of microbial cell growth. Biotechnol. Bioeng. 10, 105–131. doi:10.1002/bit.260100202
- Marchand, S., De Block, J., De Jonghe, V., Coorevits, A., Heyndrickx, M., Herman, L., 2012. Biofilm formation in milk production and processing environments; influence on milk quality and safety. Compr. Rev. Food Sci. Food Saf. 133–147. doi: 10.1111/j.1541-4337.2011.00183.x

- Mendez, M.B., Orsaria, L.M., Philippe, V., Pedrido, M.E., Grau, R.R., 2004. Novel roles of the master transcription factors Spo0A and B for durvival and sporulation of *Bacillus subtilis* at low growth temperature. J. Bacteriol. 989–1000. doi: 10.1128/JB.186.4.989-1000.2004
- Mtimet, N., Trunet, C., Mathot, A.-G., Venaille, L., Leguérinel, I., Coroller, L., Couvert, O., 2015. Modeling the behavior of *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 12980 throughout its life cycle as vegetative cells or spores using growth boundaries. Food Microbiol. 48, 153–162. doi:10.1016/j.fm.2014.10.013
- Narula, J., Kuchina, A., Zhang, F., Fujita, M., Süel, G.M., Igoshin, O.A., 2016. Slowdown of growth controls cellular differentiation. Mol. Syst. Biol. 12, 871. doi:10.15252/msb.20156691
- Nicolas, P., Mäder, U., Dervyn, E., Rochat, T., Leduc, A., Pigeonneau, N., Bidnenko, E., Marchadier, E., Hoebeke, M., Aymerich, S., Becher, D., Bisicchia, P., Botella, E., Delumeau, O., Doherty, G., Denham, E.L., Fogg, M.J., Fromion, V., Goelzer, A., Hansen, A., Härtig, E., Harwood, C.R., Homuth, G., Jarmer, H., Jules, M., Klipp, E., Le Chat, L., Lecointe, F., Lewis, P., Liebermeister, W., March, A., Mars, R.A.T., Nannapaneni, P., Noone, D., Pohl, S., Rinn, B., Rügheimer, F., Sappa, P.K., Samson, F., Schaffer, M., Schwikowski, B., Steil, L., Stülke, J., Wiegert, T., Devine, K.M., Wilkinson, A.J., van Dijl, J.M., Hecker, M., Völker, U., Bessières, P., Noirot, P., 2012. Condition-dependent transcriptome reveals high-level regulatory architecture in *Bacillus subtilis*. Science 335, 1103–1106. doi:10.1126/science.1206848
- Reder, A., Albrecht, D., Gerth, U., Hecker, M., 2012. Cross-talk between the general stress response and sporulation initiation in *Bacillus subtilis* the $\sigma(B)$ promoter of spo0E represents an AND-gate. Environ. Microbiol. 2741–2756. doi: 0.1111/j.1462-2920.2012.02755.x
- Rosso, L., Lobry, J.R., Bajard, S., Flandrois, J.P., 1995. Convenient model to describe the combined effects of temperature and pH on microbial growth. Appl. Environ. Microbiol. 61, 610–616.
- Sharma, M., Anand, S., 2002. Biofilms evaluation as an essential component of HACCP for food/dairy processing industry – a case. Food Control 469–477. doi: 10.1016/S0956-7135(01)00068-8
- Vlamakis, H., Aguilar, C., Losick, R., Kolter, R., 2008. Control of cell fate by the formation of an architecturally complex bacterial community. Genes & Development 945–953. doi:10.1101/gad.1645008

LISTE DES FIGURES

Fig. A. Etapes du cycle de vie des bactéries sporulées

Fig. B. Diagramme récapitulatif du plan de thèse.

Les numéros entourés correspondent aux 5 chapitres de la thèse.

Fig. 1.1. Effects of environmental factors on the initiation sporulation pathways of *Bacillus* and *Clostridium*. Some sporulation pathways are specific to *Clostridium* (in blue) and *Bacillus* (in orange) and some elements are common to both, or found in both (in black). Activation pathways (→) and inhibition pathways (→) can concern either the action of the targeted

molecule or its production. Phosphorylation pathways are indicated by (\mathbf{P}) on arrows. Thin blue arrows indicate pathways that are hypothetical or not entirely understood in Clostridia.

An inventory of the spore-formers possessed by sensors provides an overview of the environmental stimuli that could affect sporulation in Bacilli and Clostridia. Five sensor kinases, called KinA to KinE, have been reported in B. subtilis. The main sensor kinase KinA possesses three PAS domains (A, B and C) that sense different stimuli, such as the oxygen concentration via the NAD⁺/NADH ratio and redox potential (via the sensing of reactive oxygen species) or light intensity (via protein Sda that responds to DNA damages caused by light) [60]. The KinB protein, which does not possess PAS domains, senses anaerobic conditions [61] and potassium levels [56], while the KinC protein responds to plant signals and polyketides [40] and KinD to osmotic conditions and plant-derived signals [34,40]. The role of KinE remains to be elucidated. When they are stimulated, the five B. subtilis Kin sensors are autophosphorylated, and then phosphorylate the general response regulator of sporulation Spo0A via the successive intermediates Spo0F and Spo0B (Fig. 1.1). KinC is also able to directly phosphorylate Spo0A [33]. Phosphorylation of Spo0A~P can be reversed by aspartate phosphatases such as Spo0E [28] and by the Rap phosphatases (RapA to RapK), which act by dephosphorylating the intermediary Spo0F~P. Sporulation pathways are less well understood in *Clostridia* (thin blue arrows indicate pathways that are hypothetical or not entirely understood). *Clostridium* does not possess a multicomponent phosphorelay (Spo0F and Spo0B) and SinR inhibits Spo0A phosphorylation, while SinR inhibits production of Spo0A in Bacillus. The EDF-A and Phr pheromones have not vet been reported in Clostridium species if they exist, while they are sensed by Bacilli as indicators of cell density. In C. difficile the cytosolic HK CD1579 responds to carbon sources via the regulator CcpA.

Fig. 1.2. Favorable steps for sporulation during a food process according to environmental

factors. Different processes may be encountered in the food industry. The main factors that may modulate (empty symbols) or trigger sporulation of *Clostridium* (full blue symbols) or both *Bacillus* and *Clostridium* (full black symbols) are indicated at each step. Sporulation can be triggered by pH for *Clostridium* and by nutrients (\bigcirc) and quorum-sensing signals (\ge) for both. Modulating factors may also include pH, nutrients and quorum-sensing signals as well as a_w (\diamond), temperature (\square), minerals (\bigcirc), a variation in gas concentration (\bigstar), shear stress (\bigcirc) and the presence of other microorganisms (\triangle).

Fig. 1.3. Stratégies ascendante (bottom up) et descendante (top down) en microbiologie prévisionnelle (inspiré de Bruggemean et Westerhoff, 2007)

Fig. 1.4. Forces et faiblesses des modèles développés à l'échelle de la population (souvent phénoménologiques) et à l'échelle cellulaire (souvent mécaniste), adapté de Ferrer *et al.*, (2009). Les forces d'un type de modèle sont souvent les faiblesses de l'autre (↔).

Fig. 1.5. Comparaison des modèles de sporulation de la littérature sur différents critères. Les modèles de Jabbari *et al.* (2011) (_____), Das et Sen (2011) et Baril *et al.* (2012) (_____), Atehortua *et al.* (2007) (______), Huang *et al.* (2003) (______) et Morimoto *et al.* (2011) (______) ont été comparés sur différents critères, en attribuant une valeur de 0, 1, 2 ou 3 selon si le critère est complètement remplit (3) ou non (0).

Fig. 2.1. Schematic representation of the growth and sporulation model. The new spores that appear at time t_i come from vegetative cells not committed to sporulation $N(t_i - t_f)-S(t_{i-1})$ which were present t_f hours earlier and had a sporulation probability $P(t_i - t_f)$. This probability was described with a Gaussian law as a function of time with three parameters: P_{max} which corresponds to the maximal proportion of cells able to sporulate in the same amount of time, t_{max} which is the time at which the cells have the highest probability of sporulating (h), and σ which is the probability scattering.

Fig. 2.2. Fluorescence, growth and sporulation kinetics of *B. subtilis* at 27°C (a, b and c), 40°C (d, e and f) and 49°C (g, h and i). The values of fluorescence (o) were fitted with the normal density function (solid lines in a, d and g) and the corresponding probability densities (b, e and h) with the three sporulation parameters of equation 6: P_{max} , t_{max} and σ . The concentration of total cells (o) and the concentration of spores (\Box) over time were fitted with the growth sporulation model in equations 1 and 4 (in c, f and i).

Fig. 2.3. Représentation schématique de l'évolution temporelle des sous-populations constituant une suspension bactérienne. Les cellules totales N (\square) comprennent les cellules végétatives V et les spores S (\square). Les cellules végétatives sont elles-mêmes distinguées en 3 sous-populations : les cellules non-engagées en sporulation V_{ne} (\square), les cellules déjà engagées en sporulation ou sporulantes V_s (\square) et les cellules qui s'engagent en sporulation V_e (\square) à un instant donné t_i . Parmi les spores, on distingue les spores déjà présentes S de celles qui apparaissent S_a à un instant donné t_i .

Fig. 2.4. Représentation schématique de la stratégie expérimentale pour évaluer la probabilité d'engagement en sporulation. La stratégie expérimentale repose sur le suivi de la fluorescence de la suspension de *B. subtilis* SpoIIAA-gfp au cours du temps de culture (a). Les cellules végétatives qui ne se sont pas engagées en sporulation (\bigcirc) ne produisent pas de fluorescence. Les cellules qui sont engagées dans la sporulation ou cellules sporulantes (\boxdot) produisent de la fluorescence. Lorsque la cellule mère se lyse (\bigstar), la fluorescence est libérée dans le milieu de culture avec la spore mâture (\ldots).

Fig. 2.5 : Répartition des valeurs de k du modèle de Weibull pour 14 cinétiques de croissance-sporulation. La moyenne des valeurs de k pour les 14 cinétiques de croissance sporulation (•) était de 4,67 (____).

Fig. 2.6. Cinétiques de croissance (___) et de sporulation (___) de *B. subtilis* BSB1 cultivé en fermenteur en milieu BHI à 25°C, pH 7,0, a_w 0,996 (a et b), à 49°C, pH 7,0, a_w 0,996 (c et d) et à 37°C, pH 7,0, a_w 0,985 (e et f). Les concentrations en cellules totales (\mathbf{O}) et en spores thermorésistantes (\mathbf{O}) (a,c et e) ont été ajustées avec le modèle de croissance sporulation (équations 1 et 2) en utilisant la fonction de densité de la loi de probabilité de Weibull modifiée avec k=5 (b, d et f).

Fig. 2.7. Cinétiques de croissance (___) et de sporulation (___) de *B. subtilis* BSB1 cultivé en fermenteur en milieu BHI à 37°C, pH 5,0, a_w 0.996 (a et b), à 49°C, pH 7,0, a_w 0.996 (c et d) et à 37°C, pH 7,0, a_w 0.985 (e et f).Les concentrations en cellules totales (**O**) et en spores thermorésistantes (**O**) (a,c et e) ont été ajustées avec le modèle de croissance sporulation (équations 1 et 2) en utilisant la fonction de densité de la loi normale (b, d et f).

Fig. 2.8. Cinétiques de sporulation de *B. subtilis* BSB1 cultibée en fermenteur en BHI à 25° C, pH 7,0, a_w 0,996 (a), en BHI, 37° C, pH 5,0, a_w 0,996, en fermenteur (b) et en LB, 37° C, pH 7,0, a_w 0,996, en erlen (c). Les cinétiques expérimentales () ont été ajustées avec le modèle croissance sporulation (____), le modèle de Das et Sen (2011) (.....) et avec le modèle de Baril *et al.* (2012) (____).

Fig. 3.1. Analyse SWOT des plans factoriels et des plans D-optimaux pour l'estimation des valeurs cardinales de croissance. Les forces, faiblesses, opportunités et menaces des plans factoriels (bleu) et des plans D-optimaux (bleu) ont été comparées.

Fig. 4.1. Effect of temperature, pH and a_w on the growth rate and the lag before growth of *B. subtilis* BSB1. The experimental data (\circ) of μ_{max} (a, c and e) and $1/\lambda$ (b, d and f) were plotted against temperature (a and b), pH (c and d) or a_w (e and f). The conditions in which no growth was observed are indicated by bold empty circles on the horizontal axis (**0**) and the conditions in which growth was observed in the Growth/No Growth experiments are indicated by black filled circles (**•**). The cardinal values of growth were estimated based on μ_{max} with the cardinal model (solid lines). These estimated cardinal values were used as inputs to estimate $1/\lambda_{opt}$ and then describe the effects of environmental factors on $1/\lambda$.

Fig. 4.2. Growth and sporulation kinetics of *B. subtilis* BSB1 obtained in BHI, in batch cultures at 49°C, pH 7.0 and a_w 0.996 (a and b), at 25°C, pH 7.0 and a_w 0.996 (c and d) and at 37°C, pH 7.0 and a_w 0.945 (e and f). The experimental data of total cells (o) and heat resistant spores (\bullet) (log10 (CFU/mL)) were fitted with the growth-sporulation model in Eq. (1) and Eq. (2) (solid lines). The probability of vegetative cells sporulating over time (h-1) is represented below the corresponding growth and sporulation kinetics (b, d and f).

Fig. 4.3. Effects of temperature (a and b), pH (c and d), and water activity (e and f) on the inverse of the calculated time to see the first spore $1/t_{1s}$ (a, c and e) and the calculated maximal concentration of spores reached S_{max} (log₁₀ (CFU/mL)) (b, d and f).

Fig. 4.4. Effects of temperature, pH, and water activity on the maximal proportion of vegetative cells sporulating $(-\log_{10} (P_{max}))$ (a, d and g), the time to reach the maximal sporulation probability t_{max} (b, e and h) and the probability scattering σ (c, f and i). The cardinal values of growth (Tab. 1) were used as inputs for the cardinal model (solid lines).

Fig. 5.1. Cinétiques de croissance-sporulation de *B. subtilis* BSB1 dans différents milieux de cultures, en conditions favorables à 37° C, pH 7,0, (aw 0,996). Les données expérimentales de concentrations en cellules totales (\bullet) et en cellules thermorésistantes (\bullet) ont été ajustées avec le modèle de croissance (_____) et de sporulation (______) et constituent alors les cinétiques observées (a, c, e et g). Les courbes de probabilité de sporuler au cours du temps correspondantes (b, d, f et h) sont présentées sous les cinétiques obtenues en BHI en fermenteur (a et b), et en erlen dans les milieux BHI (c et d), LB (e et f) et lactosérum (g et h).

Fig. 5.2. Comparaison des cinétiques de croissance-sporulation observées et prévues de *B. subtilis* BSB1 cultivé dans différents milieux, à deux températures.

Les données expérimentales des concentrations en cellules totales (\bullet) et en cellules thermorésistantes (\bullet) ont été ajustées avec le modèle de croissance (______) et de sporulation (______) et constituent les cinétiques observées. Ces cinétiques observées sont comparées aux cinétiques prévues de croissance (------) et de sporulation (------), par le modèle cardinal pour des cultures de *B. subtilis* BSB1 en fermenteur en BHI à 25 °C (a) et 49°C (b), et en erlens dans les milieux BHI à 25°C (c) et 48°C (d), LB à 27°C (e) et 45°C (f), et lactosérum à 25°C (g) et 48°C (h).

Fig. 5.3. Cinétiques de croissance-sporulation *B. subtilis* BSB1 dans différentes conditions dynamiques de température. Les concentrations en cellules totales (\bullet) et en cellules thermorésistantes (\bullet) en conditions statiques de température (37°C) ont été ajustées avec le modèle de croissance (_____) et de sporulation (______). A partir de ces cinétiques ajustées, les cinétiques de sporulation ont été prévues dans les deux conditions suivantes : *B. subtilis* BSB1 a été cultivé 16 h à 37°C puis placée à 10°C (\diamond) et sa cinétique de sporulation a été simulée (______) et *B. subtilis* BSB1 a été cultivé 16 h à 37°C (\Box) et la cinétique de sporulation correspondante a été simulée (______). Les changements de température sont indiqués par les lignes verticales en tirets.

Fig. 5.4. Prévision des cinétiques de croissance et de sporulation de *B. subtilis* BSB1 en condition dynamique de pH. Les données de cellules totales (\bullet) et de cellules thermorésistantes en condition statique de pH 7,0 (\bullet) ont été ajustées avec le modèle primaire de croissance (_____) et de sporulation (_____). L'évolution du nombre de spores en condition dynamique de pH (\bullet) a été décrite avec la cinétique prévue par les modèles prévisionnels de croissance-sporulation (_____-). Les changements de pH sont indiqués par les lignes verticales en tirets.

Fig. 5.5. Ajustement des cinétiques de croissance (_____) et de sporulation (_____) de *B. licheniformis* Ad978 avec le modèle de croissance-(déclin)-sporulation (équations 1 à 3), avec un temps de formation de la spore t_f de 7,0 h, en milieu BHI, à 45°C pH 7,2 et aw 0,996 (a et b), à 45°C pH 5,8 et aw 0,996 (c et d) et à 20°C, pH 7,2, aw 0,996 (e et f).

Fig. C. Représentation schématique des objectifs de la thèse et état d'avancement de chaque objectif (atteint (\checkmark), ou travaux à poursuivre (\bigtriangleup)). Les numéros entourés correspondent aux 5 chapitres de la thèse.

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 2.1. Estimations of the fluorescence, the growth and the sporulation parameters of *B. subtilis* at 27 °C, 40 °C and 49 °C.

Tableau 2.2. Sous-populations coexistant dans une suspension bactérienne sporulante et quantification de leurs concentrations. Les concentrations en cellules totales et en spores sont déterminées expérimentalement (^a) et les concentrations des autres sous-populations sont déduites par le calcul (^b).

Tableau 2.3. Critères de choix de la loi de probabilité pour décrire la probabilité d'engagement en sporulation au cours du temps. Les critères ont été classés par ordre d'importance avec 1, 2 ou 3 points attribués par critère au maximum. Pour chaque critère, un nombre de points a été accordé selon que la loi deprobabilité remplit plus ou moins le critère. Le critère de signification biologique des paramètres était un paramètre décisif (*) qui écarte automatiquement les lois de probabilité qui ne remplissent pas ce critère (loi Gamma et loi log-Normale).

Tableau 2.4. Estimations des paramètres de sporulation des modèles de Baril *et al.* (2012), de Das et Sen (2011) et du modèle de croissance-sporulation pour trois cinétiques de sporulation. t_{1s} est le temps d'apparition des premières spores ; μ_s est le taux de sporulation ; S_{max} est la concentration maximale en spores ; N_0 est la concentration initiale en cellules végétatives ; λ est le temps de latence avant la croissance ; N_{max} est la concentration maximale en cellules totales ; P^*_{max} est le facteur permettant d'accéder à la probabilité maximale de sporuler P_{max} , t_{max} est le temps auquel P_{max} est obtenu et σ est la dispersion de la probabilité d'engagement en sporulation.

Tableau 3.1. The a priori values of the cardinal values and of the optimal growth rate of *B. subtilis* and experimental constraints for the computation of the D-optimal design. The guesses θ_0 of the cardinal values of growth come from the literature. (Holtmann and Bremer, 2004; Nichols *et al.*, 1995; Pandey *et al.*, 2013; Pant *et al.*, 2015; Tapia *et al.*, 2007).

Tableau 3.2. Estimations of the growth rates of *B. subtilis* BSB1 in LB for the factorial design (51 experiments).

Tableau 3.3. Estimations of the growth rates of *B. subtilis* BSB1 in LB for the optimal design composed of the optimal designs D1 (14 experiments) and D2 (16 experiments).

Tableau 3.4. Table 3.4. Comparison of the estimations of the cardinal values obtained from the first D-optimal design D1, the D-optimal design (D1+D2) and the factorial design, with the growth limits assessed with the Growth/No Growth experiments. g: Value of the environmental factor close to the growth limit, where growth was observed experimentally, ng: Value of the environmental factor close to the growth limit where no growth was observed experimentally.

 Tableau 3.5. Tableau 3.5. Estimations des valeurs cardinales de croissance de *B. subtilis*

 BSB1 avec le plan D-optimal avec et sans contraintes sur les bornes des paramètres.

 Tableau 3.6. Tableau 3.6 Estimations des valeurs cardinales de croissance de *B. subtilis*

 BSB1 avec le plan D-optimal avec et sans contraintes sur les bornes des paramètres.

Table 4.1. Growth limits and estimations of the cardinal values of *B. subtilis* **BSB1 determined based on the maximal growth rate.** g: growth was observed at the corresponding temperature, pH or a_w with the growth-no growth experiments; ng: no growth was observed at the corresponding temperature, pH or a_w with the growth-no growth experiments.

Tableau 5.1 : Caractéristiques de croissance de *B. subtilis* **BSB1 et de** *B. licheniformis* **Ad978.** Les caractéristiques de croissance sont les valeurs cardinales (minimales, optimales et maximales) de croissance pour la température, le pH et l'a_w. ¹ Valeurs cardinales de *B. subtilis* BSB1 déterminées dans le chapitre 3 ; ² (Baril *et al.*, 2012)

Tableau 5.2. Estimations des paramètres de croissance et de sporulation de *B. subtilis* BSB1 cultivé dans différents milieux, en conditions optimales de température, pH et aw. *B. subtilis* BSB1 a été cultivé en fermenteur dans le milieu BHI et en erlens dans les milieux BHI, LB et lactosérum à 37°C, pH 7,0 et a_w 0,996. Les intervalles de confiance 95% des paramètres estimés sont indiqués entre crochets.

Tableau 5.3. Comparaison des valeurs des paramètres de croissance et de sporulation estimés et prévus par le modèle cardinal pour *B. subtilis* BSB1 cultivé dans différents milieux de culture à des température sous-optimales pour la croissance et la sporulation. Les intervalles de confiance 95% des estimations des paramètres sont indiqués entre crochets. (*) Dans les conditions de culture utilisées pour le développement des modèles (en BHI en fermenteur), les températures défavorables conduisent à une augmentation de *Pmax* et une diminution de tmax et σ . Pour chaque matrice (BHI, LB ou lactosérum) et température testées pour des cultures en erlen, le score indique le nombre de paramètres qui sont impactés de la même manière (augmentation ou diminution) par la température.

Tableau 5.4. Estimations des paramètres de croissance, (de mort) et de sporulation pour les cultures de *B. licheniformis* Ad978 en fermenteur, en milieu BHI, à 45°C, pH 7,2, 45°C, pH 5,8 et 20°C pH 7,2.

Tableau 5.5 : comparaison des effets du pH et de la température sur les paramètres de croissance et de sporulation de *B. subtilis* BSB1 et *B. licheniformis* Ad978.

VALORISATIONS DES TRAVAUX DE THESE

1. Publication avec comité de lecture

E. Gauvry, A-G. Mathot, I. Leguérinel, O. Couvert, F. Postollec, V. Broussolle, L. Coroller. 2016. Knowledge of the physiology of spore-forming bacteria ca explain the origin of spores in the food environment. *Research in Microbiology*. 168: 369-378

2. Publications en préparation

E. Gauvry, A-G. Mathot, I. Leguérinel, O. Couvert, M. Jules, L. Coroller. Differentiation of vegtetative cells into spores: kinetic model applied to *Bacillus subtilis*. *Applied and Environmental Microbiology. En préparation pour soumission*.

E. Gauvry, A-G. Mathot, I. Leguérinel, O. Couvert, L. Coroller. Effects of pH, temperature and water activity on the sporulation abilities of *Bacillus subtilis* BSB1. *International Journal of Food Microbiology. En préparation pour soumission*.

E. Gauvry, A-G. Mathot, I. Leguérinel, O. Couvert, L. Coroller. Estimation of the cardinal values of growth of *Bacillus subtilis* BSB1 for temperature, pH and water activity : comparison of a D-optimal design and a factorial design. *International Journal of Food Microbiology. En préparation pour soumission*.

3. Communications orales

E. Gauvry, A-G. Mathot, O. Couvert, I. Leguérinel, L. Coroller (2015). Modèle cinétique de croissance-sporulation de *Bacillus subtilis*. *BSPIT*, *Paris (France)*.

E. Gauvry, A-G. Mathot, O. Couvert, I. Leguérinel, L. Coroller (2015). A kinetical model to describe the growth and the sporulation of *Bacillus subtilis*. *ICPMF9*, *Rio de Janeiro (Brésil)*.

E. Gauvry, A-G. Mathot, O. Couvert, I. Leguérinel, L. Coroller (2016). A growth-sporulation kinetic model usable for food predictive modelling. *European Spores Conference, Londres (Royaume-Uni).*

E. Gauvry, A-G. Mathot, O. Couvert, I. Leguérinel, N. Desriac, F. Postollec, L. Coroller (2017). Growth limits and their uses to predict the life-cycle of spore-forming bacteria. *IAFP*, *Bruxelles (Belgique)*.

E. Gauvry, A-G. Mathot, O. Couvert, I. Leguérinel, M. Jules, L. Coroller (2017). Modelling the temporal heterogeneity of the sporulation in a planktonic culture of *Bacillus subtilis*. *Microbial Spoilers, Quimper (France)*.

E. Gauvry, A-G. Mathot, O. Couvert, **I. Leguérinel**, L. Coroller (2017). Growth and sporulation dynamics of *Bacillus subtilis* can be described by its growth limits. *ICPMF10*, *Cordoue* (*Espagne*).

4. Communication affichée

E. Gauvry, A-G. Mathot, O. Couvert, I. Leguérinel, F. Postollec, V. Huchet, N. Desriac, L. Coroller. Growth boundaries: a generic law to account the different steps of the life-cycle of spore-forming bacteria. Spoilers 2017, Quimper, France.



Modèle cinétique de croissance-sporulation de Bacillus subtilis E. Gauvry, A-G. Mathot, O. Couvert, I. Leguérinel, L. Coroller Université de Brest, EA3882, Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Ecologie Microbienne, UMT14.01 SPORE-RISK, ScInBioS, Quimper, France

Les spores bactériennes sont ubiquitaires et sont à l'origine de la contamination des aliments. Si les conditions environnementales au cours d'un procédé de transformation ou de fabrication sont favorables, les spores germent, les cellules se multiplient jusqu'à atteindre des concentrations néfastes pour la stabilité de l'aliment ou pour la santé humaine. Les cellules peuvent ensuite se différencier en spores qui sont généralement résistantes aux traitements physiques appliqués en industrie agroalimentaire. Il est donc d'un grand intérêt de prévoir la sporulation au cours d'un procédé. Les modèles de sporulation sont peu utilisés et sont généralement développés indépendamment de la croissance végétative. Or, la sporulation est physiologiquement liée à la croissance et, actuellement, aucun modèle ne permet de décrire la croissance des cellules végétatives et leur différenciation en spores en système non alimenté.

L'objet de cette étude est de proposer un modèle de sporulation basé sur un modèle de croissance végétative en intégrant des paramètres liant les spores aux cellules végétatives dont elles sont issues. La souche *Bacillus subtilis* BSB1 dérivée de la souche modèle 168 a été utilisée pour cette étude. Les cinétiques de croissance et sporulation ont été obtenues en bouillon coeur cervelle additionné de sels de sporulation (Hageman *et al.*, 1984), à pH 7.0, sous une

agitation de 100 rpm avec un inoculum initial de 10³ UFC/mL. Les concentrations en cellules totales ont été déterminées par inclusion en gélose et dénombrement des colonies. Les spores ont été énumérées après traitement de 10 minutes à 80°C pour éliminer les formes végétatives. Les cinétiques de croissance-sporulation ont été réalisées à 45°C, température optimale de croissance, 18°C et 37°C.

Plusieurs modèles ont été testés. Le choix du modèle s'est porté sur un compromis entre des critères statistiques qui rendent compte du bon ajustement du modèle aux données expérimentales et sur un critère de signification biologique des paramètres du modèle.

La cinétique de sporulation est décrite par deux phases: une première correspondant à l'apparition quasiment simultanée d'une première population d'environ 10³ spores à 18°C et

 37° C et 2.10⁴ spores à 45°C, suivie d'une augmentation plus progressive du nombre de spores comme décrit par le modèle de Baril *et al.* (2012). Les paramètres cinétiques de sporulation sont différemment affectés par la température. L'efficacité maximale de sporulation a été observée à 37 °C avec une probabilité de sporulation de 47% alors que les probabilités sont de 0.76% et 0.02% à 45°C et 18°C respectivement. La diminution de température permet de retarder l'apparition des premières spores avec des temps séparant la fin de la phase exponentielle de la croissance végétative de l'apparition des premières spores de 3.5h, 6h et 60h à 45°C, 37°C et 18°C respectivement. En revanche, les vitesses d'apparition des spores décrivant la seconde cinétique de sporulation sont peu affectées par la température avec des valeurs de 0.022, 0.025 et 0.029 h⁻¹ à 18°C, 37°C et 45°C.

L'originalité de ce travail porte sur la nature du modèle dont les paramètres liant la cinétique de sporulation à la cinétique de croissance permettent de mieux comprendre comment le

comportement de sporulation est modulé par les conditions environnementales.



A kinetical model to describe the growth and the sporulation of Bacillus subtilis

E. Gauvry, A-G. Mathot, O. Couvert, I. Leguérinel, L. Coroller Université de Brest, EA3882, Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Ecologie Microbienne, UMT14.01 SPORE-RISK, ScInBioS, Quimper, France

Spore-forming bacteria represent a great deal for food safety. They can differentiate into spores which are able to resist and survive to different kinds of treatments applied in the food industry. Predictive microbiology has proved its efficiency to prevent the vegetative cell growth, but sporulation models are sparsely used and generally are developed independently of the vegetative cell growth. However, the sporulation process is closely related to growth but no model allowing to deduce a sporulation kinetic from a vegetative growth kinetic has been developed yet.

The purpose of this study is to suggest a growth and sporulation kinetic model allowing to label the efficiency of the sporulation process based on already available models describing the vegetative cell growth (e.g. growth rate, lag time and cardinal values).

Bacillus subtilis BSB1 was used in this study as it is derived from the well-studied strain 168. Growth-sporulation kinetics were performed in brain heart infusion supplemented with sporulation salts, at pH 7.0, under 100 rpm agitation, with an initial inoculum of 3.0 log10 (CFU/mL). Total cells concentrations were enumerated by plating on agar medium and spores were enumerated by plating after a 10 minutes treatment at 80°C of the total culture. Kinetics were performed at 18°C, 37°C and 45°C. The goodness of fit of the model allowed to evaluate the effect of temperature on sporulation behavior of *B. subtilis*.

A mathematical model was proposed to describe both the vegetative cell growth kinetic and the spore formation. This model integrates sporulation parameters with a biological meaning: the probability of a vegetative cell to sporulate, the time for sporulation initiation and the sporulation rate.

This new kinetic model allows to predict correctly sporulation behavior of *B. subtilis* and thus constitutes a good tool to prevent spore formation according to environmental factors.

7th European Spores Conference – Londres – 2016



A growth-sporulation kinetic model usable for food predictive modelling

E. Gauvry, A-G. Mathot, O. Couvert, I. Leguérinel, L. Coroller Université de Brest, EA3882, Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Ecologie Microbienne, UMT14.01 SPORE-RISK, ScInBioS, Quimper, France

Spore-forming bacteria represent a great deal for food safety of processed foods. Bacterial spores are able to resist and survive to different kinds of treatments applied in the food industry. These resistance properties are acquired during the sporulation process. While predictive microbiology has proved its efficiency to describe the vegetative cell growth and the thermal inactivation, the sporulation is not taken into account in risk assessment or food predictive modelling. As the growth can be accurately described, it is interesting to model their ability to differentiate into spores as a function of time, but also as a function of the main environmental factors in order to identify the sporulation niches. Thus, a growth-sporulation model that uses only two parameters with biological meaning was developed. These parameters are the time to form a spore and the probability to sporulate that follows a Gaussian evolution. The model was applied to experimental growth-sporulation kinetics of Bacillus subtilis BSB1 performed in batch, in brain heart infusion supplemented with sporulation salts, with an initial inoculum of 3.0 log10 (CFU/mL), under 250 rpm agitation at pHs 5.0, 7.0 and 9.0 (37°C) and at 25°C, 37°C and 45°C (pH 7.0). Growth was monitored by enumerating total cells after plating on agar medium and sporulation was monitored by enumerating spores selected by a 10 minutes treatment of the total culture at 80°C. The model allowed to describe very accurately spores formation kinetic from growth kinetic: it provided information on the times at which the first cells and the last cells initiate sporulation and on the maximal probability to form a spore. From this model, classical kinetical parameters like the time at which the first spore appears, sporulation rate and the maximal spore concentration were deduced. All these parameters are modulated by the environmental factors. The maximal probability to form a spore was 600-fold inferior at 45°C compared to 37°C what notably led to a decrease in spore yield by 440-fold at 45°C compared to 37°C. At 25°C, the maximal probability increases almost 10-fold more rapidly at 25°C than at 37°C and 45°C leading to a 10 to 12-fold higher rate of spores appearance at 25°C compared to 37°C and 45°C. As a conclusion, with only two biological parameters describing the sporulation process, the model is more efficient than previous kinetic model to describe growth and sporulation kinetics and more interestingly, it provides quantitative information at a physiological level. This simple model thus constitutes an easy and interesting tool to evaluate the impact of environmental factors on several aspects of the sporulation process.

International Association for Food Protection – Bruxelles – 2017

Symposium



Growth Limits and Their Uses to Predict the Cycle of Life of Spore-forming Bacteria

E. Gauvry¹, A-G. Mathot¹, O. Couver¹t, I. Leguérinel¹, N. Desriac¹, F. Postollec², L. Coroller¹

¹Université de Brest, EA3882, Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Ecologie Microbienne, UMT14.01 SPORE-RISK, ScInBioS, Quimper, France ²ADRIA Développement- Creac'h Gwen, 29196 Quimper, France

Spore-forming bacteria are responsible of food poisoning (37% in France, 2014) and involved in the spoilage of various processed foods. Bacterial spores are commonly found in the environment, making bacterial spores the natural contaminant of raw materials. The spore properties (heat resistance, germination ability) are impacted by the environment of their formation. During food processing, spores can encounter favourable conditions and then germinate. The new vegetative cell can grow, producing spoilage or toxic enzymes making food unfit for human consumption. Predictive microbiology has proved its efficiency to predict bacterial growth in foods with the growth limits (or cardinal values) according to the environmental factors like pH, temperature or water activity. In this talk, we propose to go further by showing that the growth limits of spore-forming bacteria can also be used to predict the different steps of their cycle of life: growth, sporulation, resistance, germination, and outgrowth. For example, it was shown that the temperature boundaries of Bacillus licheniformis and Bacillus weihenstephanensis were similar for growth, recovery after a heat treatment and sporulation. The heat resistance of their spores was also tightly linked to the sporulation conditions for temperature and pH. Another striking example concerns the behaviour of the thermophilic bacteria Geobacillus stearothermophilus (ie its growth, sporulation and recovery after a heat treatment) that could be explained by the growth limits for pH and temperature only.

Microbial Spoilers – Quimper - 2017

Microbial Spoilers in Food symposium is back - Get ready !



Modelling the temporal heterogeneity of the sporulation in a planktonic culture of Bacillus subtilis

E. Gauvry¹, A-G. Mathot¹, O. Couvert¹, I. Leguérinel¹, M. Jules², L. Coroller¹

¹Université de Brest, EA3882, Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Ecologie Microbienne, UMT14.01 SPORE-RISK, ScInBioS, Quimper, France

Introduction

The sporulation of *B. subtilis* has been thoroughly studied at cellular level, what allowed understanding the stochasticity of this differentiation process. At the population level, many studies aim to define the elements that contribute to the heterogeneity in the initiation of sporulation, but few studies assess quantitatively the sporulation dynamics.

Material & methods

The bacterial variant EG4 (*amyE::PspoIIAA-gfp*) of *B. subtilis* BSB1 was obtained. This strain expresses the Green Fluorescent Protein when the early gene of sporulation spoIIAA is activated. Cultures were performed in Luria Bertani broth in flasks (100 rpm) at 27°C, 40°C and 49°C, in the dark. The growth and sporulation kinetics were obtained by enumeration of total cells and spores over time and the production of GFP was monitored by spectrophotometry (485/535nm). The accumulation of GFP accounted for the accumulation of sporulating cells over time. Thus, different distribution laws were tested to fit the fluorescence curves: the normal, log-normal, Weibull and gamma laws.

Results

The Weibull model was the most adapted to assess the evolution of sporulating cells over time. Meaningful parameters such as the time for maximal probability to initiate sporulation and the time at which the first cell initiates sporulation were estimated. More importantly, it allows deducing directly the sporulation kinetic from the fluorescence curve.

Significance

This work allowed assessing quantitatively the heterogeneity of the sporulation process by kinetics at the population level.

10th International Conference of Predictive Modelling in Food – Cordoou – 2017



Growth and sporulation dynamics of *Bacillus subtilis* can be described by its growth limits.

E. Gauvry¹, A-G. Mathot¹, O. Couvert¹, I. Leguérinel¹, L. Coroller¹

¹Université de Brest, EA3882, Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Ecologie Microbienne, UMT14.01 SPORE-RISK, ScInBioS, Quimper, France

Introduction and Objectives:

Spore-forming bacteria represent a great deal in the food industry as they are responsible of food poisoning and involved in the spoilage of various processed foods. Predictive microbiology has proved its efficiency to predict vegetative growth and the thermal inactivation but the sporulation is barely taken into account in risk assessment or food predictive modelling. However, the sporulation process occurs in many industrial environments. As the spore germination and resistance abilities are dependent of the sporulation environment, it is interesting to identify the conditions favorable for the spore formation. The aim of this study was to describe and to model the effects of pH, water activity and temperature on the sporulation abilities and the sporulation dynamics of *Bacillus subtilis*.

Materials and Methods:

Growth-sporulation kinetics of *Bacillus subtilis* BSB1 were performed in batch, in brain heart infusion supplemented with sporulation salts, with an initial inoculum of 3.0 log10 (CFU/mL), under 250 rpm agitation. The effects of environmental factors were tested independently, the two other factors being maintained to standard values (pH 7.0, 37°C, aw 0.996). Growth was monitored by enumerating total cells after plating on agar medium and sporulation was monitored by enumerating spores after a 10 minutes treatment of the total culture at 80°C. The kinetics of growth and sporulation were fitted by a growth-sporulation kinetical model. The values of the growth parameters (growth rate, lag time, and maximal cell concentration) and the sporulation parameters (the incubation time needed to observe the first spore and the maximal probability for the vegetative cells to initiate sporulation) were modeled as a function of pH, water activity and temperature.

Result:

The sporulation abilities were maximal intemperature, pH and water activity conditions which were optimal for growth. The sporulation abilities decreased as the environmental factors brought closer the growth boundaries. As examples, the maximal probability to initiate sporulation decreased from 12% at 37% to 0.33% at 20°C and the time needed to see the first

spores was 53 h at 20°C compared to 15 hours at 45°C. These evolutions of the sporulation abilities and dynamics according to the environmental factors could be described by a gamma-concept model, using the growth cardinal values of the strain. For example, it allowed us predicting the time to see the first spores with a mean error of prediction of 8.3% on six temperatures tested and 17% on five values of pH tested.

Conclusion:

The sporulation could be predicted according to environmental factors using the growth characteristics of the studied strain (i.e. the growth cardinal values). This growth-sporulation model gives the opportunities to target key steps in terms of temperature, pH, aw and time, during food process or agriculture process that could promote the sporulation.

Keyword:

Cardinal model, growth limits, sporulation, Bacillus subtilis


ADRIA DÉVELOPPEMENT BRETAGNE OCCIDENTALE UNIVERSITY (LUBEM) IN QUIMPER ACTIA



GROWTH BOUNDARIES:

A generic law to account the different steps of the life-cycle of spore-forming bacteria

Emilie Gauvry^a Anne-Gabrielle Mathot^e, Olivier Couvert^e, Ivan Leguérinet^e, Florence Postollec^o, Véronique Huchet^e, Noémie Desriac^a, Clément Trunet^e, Louis Coroller^a ¹Université de Brest, EA 3882, Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Ecologie Microbienne, IBSAM, UMT Spore-Risk, 6 rue de l'université, 29334 Quimper.

INTRODUCTION

The diversity and the characteristic of **spore-forming bacteria** make them a hazard for food safety and food quality at different steps of the food chain. The description of their cycle of life is a great tool in order to prevent the risk due to spore or their prevalence in food. The prediction of growth, inactivation, sporulation or germination could help industrials or competent authorities to prevent risks.

Predictive microbiology has proved its efficiency to predict the bacterial growth according to environmental factors and even in food matrices. This prediction is based on the **cardinal values of growth** that account for the **growth boundaries**. These growth limits are directly linked to the physiological responses of the studied strain to harsh environmental conditions. The general physiology of the strain is affected by environmental conditions. This led to the assumption that the growth boundaries could account also for the boundaries of the other physiological capacities and processes.

MATERIAL AND METHODS

The cardinal values of growth (\bigstar) of *Bacillus weihenstephanensis* KBAB4 for temperature were determined by fitting the cardinal model of Rosso (Rosso *et al.*, 1995) to the experimental values of the growth rates according to temperature. The effects of sporulation temperature were evaluated on the **sporulation** abilities (S_{max}) and the subsequent heat resistance of spores (δ) and the effects of recovery temperature on the germination (τ_{germ}) and the **outgrowth** (τ_{outG}) abilities of spores were evaluated.



The temperature limits for each bacterial process matched with the **growth boundaries** (0.9°C – 33.1°C - 38.6 °C). For further, **secondary models** (continuous lines) with the growth limits as inputs could be used to describe the effects of temperature but also pH and water activity (results not shown) on the different bacterial behaviors of the psychrophilic bacteria *B. weihenstephanensis* KBAB4 but also on a mesohpilic strain *Bacillus licheniformis* AD978 and a psychrophilic strain *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 12980.

CONCLUSION

The whole behavior of spore-forming bacteria can be predicted by using their growth limits as modelling parameters

REFERENCES

Trunet C, Mtimet N, Mathot A-G, Postollec F, Leguerinel I, Sohier D, et al. Modeling the recovery of heat-treated *Bacillus licheniformis* Ad978 and *Bacillus weihenstephanensis* KBAB4 spores at suboptimal temperature and pH using growth limits. Appl Environ Microbiol 2015;81:562–8. Baril E, Coroller L, Couvert O, Leguérinel I, Postollec F, Boulais C, et al. Modeling heat resistance of *Bacillus weihenstephanensis* and *Bacillus licheniformis* Ad978 and *Bacillus formis* Spores as function of sporulation temperature and pH. Food Microbiol 2012:29–36. Baril E, Coroller L, Couvert O, El Jabri M, Leguerinel I, Postollec F, et al. Sporulation boundaries and spore formation kinetics of *Bacillus spp.* as a

Bani E, Coroller L, Couvert O, El Jabri M, Leguerinel I, Postollec F, et al. Sporulation boundaries and spore formation kinetics of *Bacillus spp.* as a function of temperature, pH and a_w. Food Microbiol 2012:79-86.

Rosso L, Lobry JR, Bajard S, Flandrois JP. Convenient model to describe the combined effects of temperature and pH on microbial growth. Appl Environ Microbiol 1995;61:610-6.

ACTIVITES D'ENCADREMENT ET D'ENSEIGNEMENT

-

Activités d'enseignement

Monitorat en travaux pratiques de biochimie (96 heures), 1ères années IUT Quimper, options ABB (analyses biologiques et biochimiques) et IAB (industries agroalimentaires et biologiques).

Encadrement de stagiaires

Rania Allouche. 2014. Master 1 Sciences, Technologies et Santé, Mention Biologie-Santé (Universite de Bretagne Occidentale). Détermination des valeurs cardinales de croissance de *Bacillus subtilis* pour l'aw.

Yoann Nachez. 2015. IUT 2^{ème} année Génie biologique, option industries groalimentaires et biologiques (IUT Quimper). Effet de la température sur la cinétique de sporulation de *Bacillus subtilis* BSB1

Typhaine Horaugné. 2016. IUT 2^{ème} année Génie biologique, option industries groalimentaires et biologiques (IUT Quimper). Détermination des valeurs cardinales de croissance *Bacillus subtilis*.

Charlène Plénière. 2017. License Biologie et Environnement, spécialisation Biotechnologies (Université de Bretagne Sud). Validation d'un modèle de croissance-sporulation sur matrice alimentaire en condition dynamique de pH

Modélisation de la sporulation de *Bacillus subtilis* BSB1 et liens physiologiques avec les cinétiques de croissance

Résumé

Les bactéries sporulées sont à l'origine de risques sanitaires et d'altération des produits alimentaires. Elles peuvent sporuler pour former des cellules résistantes à diverses agressions physiques ou chimiques. Afin de limiter la formation des spores dans les aliments et sur les lignes de production en industrie agroalimentaire, une approche préventive consiste à prévoir ce processus bactérien en fonction des conditions environnementales rencontrées durant les procédés de fabrication. Pour cela, un modèle cinétique décrivant à la fois la croissance et la sporulation de la bactérie modèle Bacillus subtilis BSB1 a été développé. Ce modèle est un outil utile pour évaluer l'impact des facteurs environnementaux sur des aspects quantitatifs et physiologiques de la croissance et de la sporulation. Des conditions défavorables de température, de pH et d'activité de l'eau provoquent un ralentissement de la croissance bactérienne, une sporulation plus synchrone dans la population de *B. subtilis* conduisant à une apparition plus tardive des spores et une production plus faible de spores. Tous ces effets ont été décrits avec un modèle prévisionnel de croissance et de sporulation : le modèle cardinal. Ces modèles (cinétique et cardinal) sont efficaces pour prévoir la croissance et la sporulation de *B. subtilis* BSB1 dans différentes conditions de culture, différentes matrices et en conditions dynamiques de facteurs environnementaux. Ces travaux et ces modèles mathématiques permettront de mieux comprendre le comportement de sporulation des bactéries en fonction des facteurs environnementaux et ainsi, de mieux appréhender la sporulation en industrie agroalimentaire.

Mots-clés : Bacillus subtilis, sporulation, croissance, modèles, cinétique, physiologie

Modeling the sporulation of *Bacillus subtilis* BSB1 and physiological links with growth kinetics

Abstract

Spore-forming bacteria cause health risks and alteration of food products. They can sporulate to form cells resistant to various physical or chemical aggressions. In order to limit the formation of spores in food and on production lines in the agri-food industry, a preventive approach consists in predicting this bacterial process according to the environmental conditions encountered during the manufacturing processes. For this, a kinetic model describing both growth and sporulation of the bacterium model *Bacillus subtilis* BSB1 was developed. This model is a useful tool for assessing the impact of environmental factors on quantitative and physiological aspects of growth and sporulation of B. subtilis. Unfavorable conditions of temperature, pH and water activity cause a slowing of *B. subtilis*' growth, a more synchronous sporulation in the bacterial population leading to later spore emergence and lower spore production. All these effects have been described with a predictive model of growth and sporulation: the cardinal model. These (kinetic and cardinal) models are efficient to predict growth and sporulation of B. subtilis BSB1 in different culture conditions, different matrices and in dynamic conditions of environmental factors. This work and these mathematical models will allow a better understanding of the sporulation behavior of bacteria according to environmental factors and thus a better understanding of the sporulation in the agrofood industry.

Key words : Bacillus subtilis, sporulation, growth, models, kinetics, physiology