



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

PREPAREE A L'Institut Agro Dijon

UMR Procédés Alimentaires et Microbiologie - UMR A 02.102

Ecole doctorale n°554

Ecole doctorale Environnements Santé

Doctorat Sciences des Aliments

Spécialité Biotechnologies agro-alimentaires

Par

Maxime Pacheco

Développement de techniques spectroscopiques multidimensionnelles et microscopiques afin de faciliter le suivi de la fluorescence native de biomolécules

Thèse présentée et soutenue à Dijon, le 07 Octobre 2022.

Composition du Jury :

Mme. Claire Le Henaff – Le Marrec	Professeur, Université de Bordeaux	Rapporteure
M. Thierry Douki	Chercheur CEA, Université Grenoble-Alpes	Rapporteur
Mme. Dominique Champion	Professeur, L'institut Agro Dijon	Présidente du Jury
M. Jean-Marie PERRIER-CORNET	Professeur, L'institut Agro Dijon	Directeur de thèse
M. Christian COELHO	Maitre de Conférences, Université de Clermont Auvergne	Invité
Mme. Pascale WINCKLER	Ingénieur de Recherche, L'institut Agro Dijon	Invitée

Remerciements

Je tiens tout d'abord à adresser mes remerciements à l'Université de Bourgogne Franche-Comté ainsi que la Région Bourgogne Franche-Comté pour le financement de cette thèse à travers le dispositif « Itinéraire Chercheur Entrepreneur ».

J'adresse également mes remerciements au Professeur Claire Le Henaff et au Docteur Thierry Douki d'avoir accepté d'être mes rapporteurs de thèse. Je remercie également le Professeur Dominique Champion d'avoir accepté de participer à mon jury de thèse.

Je tiens à remercier les membres de mon comité de thèse, le Professeur Mario Berberan-Santos ainsi que le Docteur Aymeric Leray, merci à vous d'avoir apporté un regard critique et bienveillant sur mes travaux de thèse.

J'ai beaucoup de personnes à remercier, qui ont participé de loin ou non à ce travail, donc je me permets de prendre le temps de remercier les principaux intéressés comme il se doit !

Ce travail de thèse a débuté lors de mon premier stage effectué en première année de master où j'ai eu la chance de rencontrer en premier Christian, et cette rencontre s'est effectuée grâce à l'un de mes enseignants, le Docteur Bruno Cardey. Si aujourd'hui, j'écris ce message, c'est que la concrétisation de cette thèse a été initiée par vous et pour ça, je vous suis extrêmement reconnaissant. Au cours de ce stage, très rapidement j'ai été pris sous l'aile de Christian. A ce moment-là, sans le savoir, tu avais initié une longue collaboration. En deuxième année de master, Jean-Marie et Pascale ont été assez fous pour nous rejoindre dans cette aventure. Et c'est avec cette équipe qu'un pari fou a démarré, en me demandant : « Tu comptes faire quoi après le stage ? ». Alors on lance un projet de thèse, et quelques mois après me voilà Doctorant. **Christian**, merci pour ton enthousiasme à chaque fois qu'on discute ensemble. Tu as toujours des centaines d'idées d'expériences, de projets tous aussi intéressants les uns que les autres et une énergie contagieuse qui donne envie de se dépasser dans le domaine de la recherche. J'ai adoré travailler avec toi, et tu as su me transmettre aussi bien la passion pour le monde de la recherche que pour le monde du vin (point très important !).

Jean-Marie, merci à toi de m'avoir fait entrer (un peu) dans le monde de la microbiologie. Tu es toujours partant quand une idée d'expérience est proposée (même quand elles sont excentriques !), et autant emballé par les résultats que ceux qui te les montrent. Merci pour ton optimisme à toute épreuve, on ne baisse pas les bras et on trouve toujours des solutions ! Tu es passionné par le monde de la recherche et tu as su retransmettre cette passion.

Pascale, merci de m'avoir initié au merveilleux monde de la microscopie ! Tu es toujours prête à aider quiconque le demande, et on ne lâche pas avant d'avoir trouvé une solution. Tu as toujours su modérer les nombreuses idées pour se recentrer sur l'essentiel (et ce n'était pas gagné certaines fois !). Je ne compte pas le nombre de fois où j'ai débarqué dans ton bureau quand une expérience ne marchait pas, et le temps à se creuser la tête, merci pour tout ce temps que tu as pu me consacrer (et au final on a réussi !). Mais surtout, désolé d'avoir fait saigner tes yeux trop de fois avec mes fautes d'orthographe, je fais des efforts !

Christian, Jean-Marie, Pascale, merci à vous trois pour tout. Je vous suis reconnaissant pour toutes ces années à collaborer ensemble et fier de ce qu'elles ont pu m'apporter !

Si ces années de thèse se sont si bien passées pour moi, c'est en grande partie parce que j'étais bien accompagné. Je tiens à remercier tous les doctorants, post-doctorants et personnels techniques avec qui j'ai partagé ces trois années. Grand merci à Marylou, Emilie, Maxime, Edouard, Fanny, Manon, Thierry, Alexis, David, Remy (et j'oublie sûrement des noms malheureusement !). Mais je vais tâcher d'être plus spécifique pour certaines personnes !

Popo, Jéré et Fafa, merci à vous les anciens du labo ! On a été plus que bien accueillis au sein de l'équipe. Avec vous, j'ai pu discuter de tout, mais surtout bien rigoler ! Toujours de bons conseils et prêts à aider. Je garderais de très bons souvenirs de toutes ces années. Que ce soient les moments au labo ou ailleurs, les repas ensemble (une pensée spéciale pour les quelques fois où Fafa le Dragon s'est éveillé !), etc. Contrairement à ce qu'on pourrait penser, on se fait plus que des collègues en thèse ;).

Laetitia, toujours souriante et prête à donner un coup de main (même si des fois ta main y reste !). Les moments hors labo, les repas, etc. (même les déménagements) sont des moments agréables qu'on a pu partager ensemble, et je te souhaite le meilleur pour la suite !

Les éminents membres du deuxième étage : **Alicia** (🌸), **Audrey** (☺), **Aurore** (👑), **Axelle** (👑) et **Manu'** (🎯) ! Merci à vous pour les moments passés ensemble, les pauses café à raconter

n'importe quoi (surtout Manu'), toutes les soirées, etc. J'ai adoré partager ma thèse avec vous et je ne peux pas énumérer (malheureusement) tous les moments marquants de cette thèse, mais c'est avec vous que j'en partage la majorité ! J'ai hâte de pouvoir partager d'autres moments avec vous tous !

Estelle, représentante du premier étage et la joueuse Jdr la plus assidue ! Je suis heureux d'avoir pu partager cette thèse en ta compagnie. Au labo comme en dehors, c'est toujours un plaisir de te voir. Les petites pauses café de l'après-midi, les soirées, etc. sont tous des moments dont je me souviendrais.

Tibs, merci pour tous les moments qu'on a pu passer ensemble, je ne suis pas sûre qu'il se soit passé une journée dans le bureau sans qu'on se marre ! Avec la musique pleins pots dans les labos, les imitations à la Michel Leeb, les photomontages en fond d'écran, etc. Il y a toujours un moment pour souffler de la thèse et ça m'a permis de pas exploser à certains moments ! La recherche a de beaux jours devant elle avec des chercheurs comme toi (même si tes expés sont bizarres des fois !).

Jojo, j'ai énormément de points sur lesquels je dois te remercier (évidemment tu as ton paragraphe rien que pour toi !). Plus de la moitié de mes travaux est co-écrit avec toi, et ce n'est pas uniquement parce que nos projets sont complémentaires. J'ai eu la chance de pouvoir travailler avec un ami durant la quasi-totalité de la thèse et c'est sûrement ce qui a rendu cette thèse un peu spéciale. Tu as toujours des milliers d'idées d'expériences qui surgissent chaque fois qu'on fait quelque chose (certaines sont assez spéciales d'ailleurs), et je n'ai jamais rencontré quelqu'un avec autant de passion pour le monde des sciences (coucou l'espace) et de curiosité dans tous les domaines (coucou les fourmis). Je suis convaincu que tu arriveras à devenir un excellent chercheur dans le futur (que je suivrais avec intérêt !), tu arrives à intéresser ceux qui t'entourent sur ce qui te passionne et tu contamineras sûrement plein d'étudiants dans ta carrière. En dehors du labo je me suis fait un ami sur qui compter, avec qui j'ai pu partager tout. Que ce soient les soirées Jdr, les après-midi jeux de société pendant les confinements, les repas, les sortis en bar, etc. Je ne pouvais pas faire plus court au vu de l'impact que tu as eu sur cette thèse ! Merci à toi pour tout ça, et j'ai hâte de passer mes vacances à venir te voir en Baie de Somme !

Je tiens également à remercier mes amis proches qui m'ont soutenu tout le long de la thèse, et même bien avant ! En commençant avec **Godefroy** et **Aymerick**. Merci à vous de m'avoir été présent pendant les années de licence et de master. Je suis fier d'avoir fait votre connaissance à ce moment-là, mes meilleurs moments de ces années sont à vos côtés et j'ai hâte de pouvoir trinquer avec vous !

Bien évidemment je dois de remercier ma famille de cœur, **le Tandem**, et chaque membre fondateur : **Flo'**, **Gus'**, **Maud**, **Mumu'**, **Nath'**, **Romain** et **Théo** ! Vous faites tous partie des personnes qui compte le plus pour moi, vous êtes les amis qui m'accompagneront partout, la famille que j'ai choisie. Que ce soit de l'école maternelle jusqu'à aujourd'hui, j'ai tellement de souvenirs avec vous qu'il est difficile de décrire à quel point vous avez été importants pendant toutes ces années ! J'ai hâte de voir jusqu'où le tandem ira, évoluera (surtout avec l'arrivée de nouveaux membres prochainement !), mais je suis convaincu que l'on restera la même famille peu importe ce qui suivra ! Je vous aime tous, et vivement que l'on fête tout ça ensemble !

Merci à toute ma famille proche, oncles et tantes, cousins et cousines, parrain et marraine, ma belle-famille et les amis de la famille de m'avoir soutenu pendant toutes ces années et de s'être intéressé à mon parcours ! **Papa** et **Maman**, ça va devenir compliqué d'exprimer par des mots à quel point je vous suis reconnaissant pour tout. Vous avez toujours été présent pour moi, toujours aider, soutenu, pousser à me dépasser. Si j'ai pu réaliser cette thèse et arrive où j'en suis, ou même tout simplement devenir qui je suis, c'est grâce à vous. Vous dites très souvent que vous êtes fier de vos enfants mais je peux en dire tout autant, je suis fier d'être votre fils et je vous aime ! **Elie** et **Mathieu**, merci à vous d'avoir toujours été là pour moi, d'avoir joué les rôles de grands frères à la perfection et de continuer à me soutenir (même si je ne fais pas de physique !). Je suis fier de ce que vous m'avez apporté et je vous aime. J'embrasse bien sûr tendrement mes belles-sœurs, **Jen'** et **Elisa**. Je suis extrêmement content de vous avoir à mes côtés et de vous compter parmi ma famille.

J'ai bien sûr une pensée pour mes grands-parents, que j'aurais souhaité avoir à mes côtés. Je suis persuadé qu'ils seraient fiers et auraient partagé avec joie cette étape de ma vie.

Laure (♥), je devais bien entendu terminer ces remerciements par la personne la plus importante à mes yeux. Tu étais là dès le début de cette thèse (plus heureuse pour moi que

moi-même), tu as fait des concessions pour que tout se passe pour le mieux pour moi, tu as pris soin de moi et tu me pousses chaque jour à me dépasser. J'ai tellement hâte de voir ce que le futur nous réserve, de voir ce qu'on pourra bâtir ensemble, mais avec toi à mes côtés ça ne peut être que bien (c'est une certitude) ! Ça se complique pour pouvoir trouver les bons termes et être capable te dire à quel point je te remercie pour tout ce que tu m'apportes au quotidien et à quel point je t'aime... plus que tout, ça c'est sûr !

Symboles et abréviations

Abs : Absorbance

ADN : Acide désoxyribonucléique

a_w : Activité de l'eau

C.I. : Conversion interne

C.I.S. : Couplage intersystème

CaDPA : Dipicolinate de calcium (calcium dipicolinate)

CaDPAP : Photoproduits du dipicolinate de calcium

DPA : Acide dipicolinique (dipicolinic acid)

DPAP : Photoproduits de l'acide dipicolinique

EFI : Effet de filtre interne

FA : Fermentation alcoolique

FLIM : Fluorescence-Lifetime Imaging Microscopy

FML : Fermentation malolactique

HOMO : Highest Occupied Molecular Orbitals

k_{nr} : Constante de désexcitation non radiative

k_r : Constante de désexcitation radiative

LUMO : Lowest Unoccupied Molecular Orbitals

MEEF : Matrice d'excitation-émission de fluorescence

PARAFAC : PARAllel FACtor analysis

pH : Potentiel hydrogène

pKa : constante d'acidité

QSU : Quinine sulfate unit

SASP : Small, Acide-Soluble Spore Proteins

SP : Spore photoproducts

TCSPC : Time-Correlated Single Photon Counting

UV : Ultraviolet

UVc : Ultraviolet-C (100-280 nm)

η : Viscosité

τ : Temps de vie

ϕ_F : Rendement quantique de fluorescence

Liste des figures

Figure 2.1 : Niveaux d'énergies des orbitales moléculaires pour le formaldéhyde et ses transitions électroniques possibles, selon Valeur, 2001.....	9
Figure 2.2 : Description des états singulets et triplets pour le formaldéhyde selon Valeur, 2001.	10
Figure 2.3* : Processus de désexcitation possibles, selon Valeur, 2001.....	11
Figure 2.4 : Diagramme de Perrin-Jablonski représentant les différents processus de désexcitation. Processus radiatif : flèche orange, processus non radiatif : flèche violette.....	13
Figure 2.5 : Schéma réactionnel des mécanismes d'excitation et d'émission. Où k_a est la constante d'absorption ; k_r est la constante de désexcitation radiative ; k_{nr} est la constante de désexcitation non radiative.	14
Figure 2.6* : Illustration de la structure d'une baie de raisin et la distribution de ses constituants selon Fontes et al., 2011 (Conde et al., 2007; Coombe, 1987; Jackson, 2008). Les valeurs indiquent le pourcentage de chaque type de composés dans les compartiments associés.	22
Figure 2.7* : Catégories principales de sucres présents dans les baies de raisin.....	22
Figure 2.8* : Formule chimique et concentration des principaux acides organiques présents dans les baies de raisin.....	24
Figure 2.9 : Schéma de la structure du noyau flavonoïde issu de Teixeira et al., 2013.....	25
Figure 2.10 : Structure des composés flavonoïdes présents dans le vin. Illustration inspiré de Gutiérrez-Escobar et al., 2021.....	27
Figure 2.11 : Structure des composés flavonoïdes présents dans le vin. Illustration inspirée de Gutiérrez-Escobar et al., 2021.....	29
Figure 2.12 : Principes généraux de la fabrication du vin rouge et du vin blanc de Bourgogne (Illustration BIVB).....	31
Figure 2.13* : Schéma simplifié des étapes principales de la fermentation alcoolique.....	32
Figure 2.14* : Equation simplifiée de réaction pour la fermentation malolactique.....	36
Figure 2.15 : Transport de l'acide L-malique dans la une cellule de <i>O. oeni</i> et le rôle de la FML dans le maintien du pH interne. Schéma réalisé à partir de Bartowsky, 2005; Bastard, 2015; Bouix & Ghorbal, 2015; Breniaux, 2018; Loubiere et al., 1992; Salema et al., 1994; Tourdot-Maréchal et al., 1993	37
Figure 2.16* : Schéma simplifié des étapes du cycle de sporulation et de germination chez l'espèce <i>B. subtilis</i> d'après McKenney et al., 2013.	42
Figure 2.17 : Schéma général de la structure de la spore bactérienne. Les échelles des différentes structures ne sont pas respectées). Le diamètre d'une spore bactérienne est d'environ 1 μm .47	47
Figure 2.18* : Structure des différents photoproduits.	51
Figure 2.19* : Structure chimique de l'acide dipicolinique en fonction de ses différents pKa. 53	53

* Réalisé à l'aide de BioRender.com

Figure 4.1 : Schéma de principe du spectrofluorimètre. Les traits en pointillés représentent le chemin optique et les monochromateurs sont des systèmes à un réseau dans cette représentation.....	63
Figure 4.2 : Schéma du fonctionnement de l'Aqualog®.....	64
Figure 4.3 : MEEF corrigé de l'acide dipicolinique (10 mM) après une irradiation de 10 minutes à 0.120J/cm ² , pour un pH de 8. L'axe X représente les longueurs d'ondes d'excitation (nm), l'axe Z représente les longueurs d'ondes d'émission (nm) et l'axe Z représente l'intensité de fluorescence (U.A.).....	65
Figure 4.4 : Exemple de diffusion Raman et Rayleigh du premier ordre et du second ordre pour l'acide dipicolinique (10 mM).....	67
Figure 4.5 : Jeu de données de MEEF décomposé en 4 composantes PARAFAC.....	68
Figure 4.6 : Principe du TCSPC.....	70
Figure 4.7 : Exemple d'histogramme des temps d'arrivée des photons après un pulse d'excitation. Sur le graphique de gauche : la courbe bleue représente la réponse instrumentale (IRF), en rouge l'histogramme expérimentale pour l'acide dipicolinique à 10 mM après une irradiation de 10 minutes à 0,120 J/cm ² et en vert la modélisation du déclin par fonction exponentielle convoluée à l'IRF. Sur le graphique de droite : la courbe des résidus (traduisant l'écart entre la courbe expérimentale et son ajustement numérique).....	71
Figure 4.8 : Schéma de gauche : Digramme de Perrin-Jablonski pour une excitation à un, deux et trois photons. Où, $h\nu_2 = h\nu_1/2$ et $h\nu_3 = h\nu_1/3$. Schéma de droite : Comparaison de l'absorption au cours du trajet du faisceau entre une excitation à un et deux photons.....	72
Figure 4.9 : Schéma du fonctionnement du microscope multiphoton. 3 modes d'observation sont disponibles : en lumière visible (pointillés vert), en excitation multiphoton (pointillés rouge) et en FLIM (pointillés violet).....	73
Figure 4.10 : Exemple d'image FLIM pour une souche sauvage de spore bactérienne avant traitement. L'échelle « Fast Lifetimes [ns] » indique la répartition des temps de vie au sein des spores, plus la couleur tend vers l'orange plus le temps de vie est long (~2 ns) et plus la couleur tend vers le bleu plus le temps de vie est court (~1,1 ns).....	74
Figure 4.11 : Schéma récapitulatif de la représentation graphique du phasor. Point bleu : déclin de fluorescence mono exponentiel ; point orange : déclin multi exponentiel avec τ_1 et τ_2 les temps de vie associés, et f1 et f2 les facteurs de contributions.....	75
Figure 4.12 : Exemple de représentation phasor plot obtenue à partir d'une image FLIM d'une souche sauvage de spore bactérienne, traité dans le logiciel MAPI ainsi qu'une représentation de son contour via un code Matlab.....	76
Figure 1: Biplot representation of the first two components of a PCA model describing Fmax values of PARAFAC components for Chardonnay fresh wines from wineries A (green) and B (blue) and from Chardonnay wine contest C (red) (A). PARAFAC components EEMFs that were used as loadings for the PCA model (B). Analysis of variance of the four PARAFAC components Fmax values depending on the malolactic fermentation achievement (MLF+) or not (MLF-) (C). Different letters above box plot (a,b) represent significant differences (p=0.05) between the fermentative conditions.....	88

Figure 2: Decay of fluorescence measured at pH=5 of MLF+ (blue) and MLF- wines (red) sampled during Chardonnay wine contest C with an excitation wavelength set as 280 nm and emission set as 440 nm. The baseline of the blue curve is shifted to better observe changes in fluorescence decay (A). Mean values of decay lifetimes τ_1 and τ_2 , expressed in ns and their associated fractional intensities F1 and F2 expressed in percentage, as indicated in equation 2, at a fixed pH=5. Values in parenthesis indicate the mean standard deviations for the five MLF+ wines (N=5) and MLF- wines (N=5) (B).....	90
Figure 3: Phasor plot of fresh Chardonnay wines in winery A (squares), winery B (triangles) and Chardonnay contest wines C (circles) analyzed before and after malolactic fermentation, with an emission wavelength set at 440 nm for a fixed excitation at 280 nm (A). Chardonnay wines g values for all analyzed wines A+B+C (partly) (N=22) (B), fresh wines from winery A (N=6) (C), fresh wines from winery B (N=6) (D) and a selection of Chardonnay contest wines (N=10) (E). Different letters above box plot (a,b) represent significant differences (p=0.05) between the fermentative conditions.....	91
Figure 4: Decay of fluorescence measured at pH=5 of MLF+ (blue) and MLF- wines (red) sampled during Chardonnay wine contest C with an excitation wavelength set as 280 nm and emission set as 440 nm. The baseline of the blue curve is shifted to better observe changes in fluorescence decay (A). Mean values of decay lifetimes τ_1 and τ_2 , expressed in ns and their associated fractional intensities F1 and F2 expressed in percentage, as indicated in equation 2, at a fixed pH=5. Values in parenthesis indicate the mean standard deviations for the five MLF+ wines (N=5) and MLF- wines (N=5) (B).....	93
Figure 5: Biplot representation of the multispectral fluorescence Chardonnay wines from fresh wines from winery A (squares), winery B (triangles) and Chardonnay contest wines C (circles) obtained by a Principal component analysis (A) and by a Partial Least Square – Discriminant Analysis oriented on MLF achievement (B).....	94
Figure S.I.1: EEMS for each MLF-/+ group for the three typologies of Chardonnay wines.	106
Figure S.I.2: Fmax values of PARAFAC C3 against C4 for all the Chardonnay wines before and after MLF.....	107
Figure S.I.3: Phasor plot g and s values for the 22 Chardonnay wines in function of their associated total acidity (expressed in equivalent g/L H ₂ SO ₄).....	108
Figure S.I.4: Phasor plot g and s values for the 22 Chardonnay fresh wines in function of their associated pH.....	108
Figure 5.1 : Valeurs de Fmax (u.a.) pour les 4 composantes PARAFAC du second lot de vins en fonction de la FML. (A) : Fmax C1 ; (B) : Fmax C2 ; (C) : Fmax C3 ; (D) : Fmax C4. « FML - » (N = 29) : la FML n'a pas été réalisée ; « FML + » (N = 25) : la FML a été réalisée. La différence de lettre au dessus des boîtes à moustaches indiquent une différence significative (p < 0.05).	110
Figure 5.2 : (A) : représentation phasor plot des temps de vie de fluorescence du second lot de vins. Les acquisitions sont réalisées au couple EX/EM (nm) de C4 : 315/440. « FML - » : la FML n'a pas été réalisée ; « FML + » : la FML a été réalisée. Valeurs de g (B) et de s (C) en fonction de la FML. La différence de lettre au dessus des boîtes à moustaches indiquent une différence significative (p < 0.05).....	111

Figure 5.3 : Représentation phasor plot des temps de vie de fluorescence des moûts du 3 ^{ème} lot en fonction de la souche utilisée, pour un couple EX/EM correspondant à celui de C4 (315 nm/440 nm). Les « contrôles -/+ » représentent les moûts ayant été traités ou non avant FML. Points jaunes : souche A ; points cyans : souche B ; points noirs : souche C ; points roses : souche D.....	112
Figure 5.4 : Représentation phasor plot des temps de vie de fluorescence des moûts du 3 ^{ème} lot en fonction des conditions BF ou PL, pour un couple EX/EM correspondant à celui de C4 (315 nm/440 nm). Graphique du haut : pour les moûts issus du « contrôle - ». Graphique du bas : pour les moûts issus du « contrôle + ».....	114
Figure 5.5 : Représentation phasor plot des temps de vie de fluorescence des moûts du 3 ^{ème} lot en fonction des moûts ayant subis ou non un traitement, pour un couple EX/EM correspondant à celui de C4 (315 nm/440 nm). Les moûts n’ayant pas été traités apparaissent en points rouges (BF -) et en points cyans (PL -) ; les moûts ayant été traités apparaissent en points bleus (BF +) et en points jaunes (PL +).....	115
Figure 1: UVc irradiation (λ_{ex} : 254 nm, 10 min at 0.120 J/cm ²) on DPA (10mM) and CaDPA (50mM). EEMF of resulting photoproducts: DPAp and CaDPAp. DPA and CaDPA EEMF were not shown because the compounds did not emit enough fluorescence to be detected. The same intensity (a.u.) scale was used for all spectra.	125
Figure 2: Fluorescence emission spectra of DPA (10 mM) and CaDPA (50 mM) for two excitation wavelengths: λ_{ex} = 300 nm (A) and λ_{ex} = 340 nm (B). The red (DPA) and the dark green (CaDPA) lines were obtained before UVc treatment (irradiation of 10 min. at 0.120 J/cm ²). The orange and light green solid line correspond to DPAp and CaDPAp emission spectra after irradiation. The corresponding dotted lines come from the same samples after 24h.	126
Figure 3: Analysis of variance of DPA concentration (nM) depending if DPA was dosed immediately after or 24 hours after the UVc irradiation. Two irradiation times were used: 10 min at 0.120 J/cm ² (A) and 20 min at 0.120 J/cm ² (B) with an initial DPA concentration of 100nM. Each irradiated group (N(A)=6; N(B)=4) was dosed directly after irradiation and 24 hours after irradiation. Different letters above box plot (a,b) represent significant differences (p=0.05) between the time conditions.....	127
Figure 4: MS spectra obtained for DPA before and after UVc treatment (0.120 J/cm ²) at different times (10 min and 1 h). Only m/z values from 100 to 400 were representing on the X-axis, as all changes occur in this range.....	128
Figure 5: Two photon microscopy images for each strain before and after UVc treatment (2 minutes at 0.120 J/cm ²) with the same contrast. PS533 (wild-type) before irradiation (A) and after irradiation (B). PS4150 (without coat) before irradiation (C) and after irradiation (D). FB122 (lack of DPA) before irradiation (E) and after irradiation (F).....	136
Figure 6: Fluorescence intensity of bacterial spores (N=10) before and after irradiation for strains PS533 (wild-type) (A), PS4150 (without coat) (B), FB122 (lack of DPA) (C). Increase in fluorescence intensity values after irradiation for each strain (D). Different letters above box plot (a,b) represent significant differences (p=0.05) between the time conditions.	137

Figure 7: (A) Phasor plot image outlines before (line) and after irradiation (dotted line) for each strain: PS533 (red), PS4150 (blue) and FB122 (green). (B) Table: Mean fluorescence lifetime (τ_{mean}) obtained by phasor plot representation for all strains used before and after irradiation (0.120 J/cm ² for 2 min). Where g and s represent the values at the two coordinates [g;s] of the phasor plot.	139
Figure S1: Fluorescence intensity has been measured using a fluorescence spectrometer (FluoroMax-4). For DPA assay, the fluorescence intensity was measured using a DPA-Tb ³⁺ solution with concentration from 0 to 100 nM. Emission spectra were measured for λ_{ex} : 280 ± 10 nm. CPS: Counts per second, is the measurement unit of the fluorescence intensity.	144
Figure S2: Standard curve for DPA dosage was obtained using the fluorescence intensities of the DPA-Tb ³⁺ complex at the excitation wavelength of 280 ± 10 nm, and emission wavelength of 545 nm ± 5 nm. The fitting function was used to calculate the DPA concentration as a function of the measured complex fluorescence intensity.....	144
Figure S3: Absorbance spectra for untreated DPA (black line), DPA photoproducts DPAP (blue line), untreated CaDPA (red line) and its photoproducts CaDPAP (green line). The concentration of each sample was 0.1 mM.	145
Figure S4: Figure S3 associated EEMF. EEMF of untreated DPA (A), untreated CaDPA (C), DPAP (B) and CaDPAP (D). The concentration of each samples was 0.1 mM. X axis represents the excitation wavelength (nm), Y axis represents the emission wavelength (nm) and Z axis represented the fluorescence intensity (a.u.). Different letters above box plot (a,b) represents significant differences (p=0.05) between the time conditions.	146
Figure S5: Analysis of variance of DPA concentration (nM) depending on when DPA assay was realized. The DPA was assayed for the first time directly after irradiation then 24 hours later (n°1). The same samples were irradiated again and were assayed directly after this second irradiation and 24 hours later (n°2).	146
Figure 1: (A) Formula of the major forms of DPA according to its pKa, and (B) the associated dissociation diagram for the different forms of DPA as function of pH.	158
Figure 2: EEMF of CaDPAP (50 mM with irradiation condition set at λ_{ex} : 254 nm, 10 min at 0.120 J/cm ²), as function of pH. The same intensity (a.u.) scale was used for all spectra. ...	159
Figure 3: Phasor plot image of DPAP and CaDPAP solutions (N=4) as function of pH (from 0 to 11). Emission wavelength was set at 400 nm for CaDPAP and 430 nm for DPAP, for a fixed excitation at 300 nm for CaDPAP and 340 nm for DPAP.....	162
Figure 4: Phasor plot image of DPAP and CaDPAP solutions (N=4) as function of solvent a_w (from 1.000 to about 0.650, at pH 1.3 for DPAP and 7 for CaDPAP). Emission wavelength was set at 400 nm for CaDPAP and 430 nm for DPAP, for a fixed excitation at 300 nm for CaDPAP and 340 nm for DPAP.	163
Figure 5.6 : Représentation phasor plot des contours des "tâches" obtenus via le logiciel MAPI pour différentes souches de spores bactériennes en fonction du pH du milieu de culture, avant et après irradiation de 2 minutes à 0.120 J/cm ² . Longueur d'onde du laser pour le FLIM en microscopie multiphotonique : 710 nm. PS533 : souche sauvage ; PS4150 : souche dépourvue de manteau ; FB122 : souche dépourvue de DPA (environ 5 % de DPA).	169

Figure 5.7 : Représentation phasor plot des contours des "tâches" obtenus via le logiciel MAPI pour différentes souches de spores bactériennes en fonction de l' a_w du milieu de culture, avant et après irradiation de 2 minutes à 0.120 J/cm ² . Longueur d'onde du laser : 710 nm. PS533 : souche sauvage ; FB122 : souche dépourvue de DPA (environ 5 % de DPA).....	172
Figure 5.8 : Valeurs des intensités moyennes de fluorescences de spores bactériennes (N = 15) en fonction de l' a_w , avant traitement. PS533 : souche sauvage ; FB122 : souche dépourvue de DPA (environ 5 % de DPA). Les boxplot ne partageant pas la même lettre sont significativement différentes (p < 0.05).....	172
Figure 1: Box plots representing fluorescence intensity measurement of FB122 spores supplemented with DPA. A: Fluorescence intensity measurement of FB122 and FB122 spores supplemented with DPA after exposition to UVc. B: Fluorescence intensity measurement of FB122 spores supplemented with DPAP. Different letters above the box plots represent significant differences (Tukey p < 0.05).....	184
Figure 2: A: Outlines of phasor plot representation for FB122 spores supplemented with DPA before and after UVc treatment. FB122 without DPA is the control condition. B: Outlines of phasor plot representation for FB122 spores supplemented with DPAP. FB122 without DPA and FB122 supplemented with DPA are the control conditions. C: Graphical representation of the means lifetimes for each condition (N = 5)......	186
Figure 3: Schematic representation of possible ways to introduce DPAP inside the FB122 forespore during sporulation. DPA: Blue; DPAP: Green shapes with various forms representing various DPAP, DPA instable forms: Red. A Introduction of DPA inside FB122, followed by UVc exposure to create DPAP inside the spore. B Introduction of DPAP inside FB122 spores depending on uptake selectivity. Two possible ways are considered: 1) selection of certain DPAP or 2) uptake of DPA and instable DPA, which would become DPAP once in the core. These two ways may explain the differences observed in fluorescence intensity and lifetime observed on these spores.....	187
Figure 4: Fluorescence intensity (A) and lifetime (B) measurements of FB122 spores supplemented with 24 hours stabilized UVC irradiated DPA. . Different letters represent significant differences (Tukey p < 0.05). (C) Phasor plot representation of mean fluorescence lifetimes for each condition (N = 5)......	188
Figure 5: Histograms representing germination rate relative to the FB122 strain in a media supplemented with DPA. Different letters represent significant differences (Tukey p < 0.05).	191
Figure 6: FB122 supplemented with DPA: germination and growth parameters. A: Mean growth curves from FB122 supplemented with DPA (■); FB122 supplemented with DPAP, coming from DPA previously exposed to UVc 2 min (●); 5 min (▲); 10 min (▼) and 30 min (◇). B: Zoom on the first hour of the growth curve showing the germination delay.....	193
Figure 7: Box plot representing FB122 spores (complemented or not with DPAP) inactivation rate after 30J/m ² UVc treatment (X min). Different letter means significant difference (Tukey test p < 0.05).	194

Liste des tableaux

Tableau 2.1 : Les différents types de luminescence.	6
Tableau 2.2 : Durée caractéristique des différents phénomènes.	13
Table 1: Physicochemical parameters of wines for the 103 analyzed Chardonnay wines samples (A+B+C).....	87
Table S.I.1: Oenological parameters and multispectral fluorescence parameters (PARAFAC components and phasor plot g and s values) of fresh Chardonnay wines from wineries A and B.	100
Table S.I.2: Phasor plot g and s for a part of Chardonnay contest wines (C).....	100
Table S.I.3: Oenological parameters and PARAFAC components Fmax values of Chardonnay contest wines (C). Abbreviations for wine country origin FR : France; US : United States ; GER : Germany; CH : China ; AUS : Australia ; SW : Swiss ; UK : Ukraine ; IT : Italy ; CA : Canada ; JP : Japan ; EN : England ; RO : Romania ; MA : Macedonia ; NZ : New Zealand ; BE : Belgium ; AZ : Azerbaijan ; CZ : Czech Republic ; CHI : Chile.	101
Table S.I.4: Polyphenolic concentrations, expressed in mg/L for Chardonnay fresh wines from wineries A and B.	105
Tableau 5.1 : Tableau récapitulatif du plan expérimental. Contrôle - (N = 24) et Contrôle + (N = 24). Quatre souches : A, B, C et D. Deux conditions BF (biofilm) et PL (planctonique), et des triplicatas pour chaque condition.....	111
Table 1: List of the major compounds found by mass spectrometry by direct injection of DPA solution, before and after UVC treatment at different irradiation times (10 min. and 1h.). ND: Not Determined. NP: Not Proposed, a.u.: arbitrary unit.	131
Tableau 5.2 : Listes des composés majoritaires détectés par spectrométrie de masse, par une injection directe d'une solution de DPA avant et après une exposition aux UVC. Nous avons réalisé des irradiations de 1 heure sur du DPA (3 g/L), pour deux conditions d'irradiations : liquide et sec. m/z représente la masse molaire détectée. Err [ppm] et mSigma sont des indicateurs représentant la fiabilité des formules brutes proposées. L'intensité des différents pics détectés est indiquée en u.a.. ND : Non Détecté ; NP : Non Proposé ; n/a : aucune réponse possible.....	147
Table 1: Fluorescence lifetimes obtained for DPA and CaDPA after irradiation (0.120 J/cm ² for 10 min) as function of pH (from 0 to 11). τ_1 and τ_2 were the fluorescence lifetimes (ns), B ₁ and B ₂ were the pre-exponential factor (%) and CHISQ the factor that allowed to validate the fitting.	160
Table 2: Fluorescence lifetime obtained for DPA and CaDPA after irradiation (0.120 J/cm ² for 10 min) as a function of solvent a _w (from 1.000 to about 0.650, at pH 1.3 for DPAP and 7 for CaDPAP). τ_1 and τ_2 were the fluorescence lifetimes (ns), B ₁ and B ₂ were the pre-exponential factor (%) and CHISQ the factor that allowed to validate the fitting.	162
Tableau 5.3 : Temps de vie moyens (ns) après irradiation de 2 minutes à 0.120 J/cm ² obtenus par la représentation phasor plot dans la Figure 1. PS533 : souche sauvage ; PS4150 : souche dépourvue de manteau ; FB122 : souche dépourvue de DPA (environ 5 % de DPA).	170

Tableau 5.4 : Temps de vie moyen (ns) après irradiation de 2 minutes à 0.120 J/cm² obtenus par la représentation phasor plot dans la Figure 2. PS533 : souche sauvage ; FB122 : souche dépourvue de DPA (environ 5% de DPA). 173

Table 1: Fitting Parameters: Germination delay; μ coefficient representing the growth speed at the inflexion point of the exponential phase, time to reach the inflexion point. Different letters represent significant differences (Tukey $p < 0.05$). 193

I. Introduction générale	1
II. Etude bibliographique	5
1. Approche fondamentale du principe de fluorescence	6
1.1. Interaction lumière-matière – aperçu historique	6
1.2. Les phénomènes de diffusion	7
1.3. Les phénomènes d'absorption.....	8
1.3.1. Les processus de désexcitation	10
1.3.2. Intensité de fluorescence	14
1.4. Temps de vie et rendement quantique de fluorescence	15
1.4.1. Temps de vie des états excités	15
1.4.2. Rendement quantique	17
1.5. Paramètres importants influençant la fluorescence	19
2. Généralités sur le vin.....	21
2.1. Composants majeurs du raisin et du vin	21
2.1.1. Les sucres	22
2.1.2. Les acides organiques.....	23
2.1.3. Les composés phénoliques	24
2.1.3.a. La famille des flavonoïdes.....	25
2.1.3.b. La famille des non-flavonoïdes.....	27
2.2. Elaboration d'un vin.....	29
2.2.1. La fermentation alcoolique (FA)	31
2.2.1.a. Les mécanismes de la FA	31
2.2.1.b. Les méthodes de contrôle	33
2.2.1.c. Les apports organoleptiques.....	33
2.2.2. La fermentation malolactique (FML)	35
2.2.2.a. Les mécanismes de la FML.....	35
2.2.2.b. Les méthodes de contrôle	37
2.2.2.c. Les apports organoleptiques.....	38
2.3. Utilisation des techniques de fluorescence dans le domaine viticole	39
3. Généralités sur les spores bactériennes	41
3.1. Qu'est-ce qu'une spore bactérienne ?	41
3.1.1. La sporulation.....	41

3.1.1.a. L'origine de la sporulation.....	41
3.1.1.b. Les étapes de la sporulation	42
3.1.1.c. Effets des paramètres environnementaux sur la sporulation et les conséquences engendrées	44
3.1.2. Structure et composition de la spore.....	46
3.2. Les propriétés et composés impliqués dans la résistance des spores.....	50
3.2.1. Faible hydratation et mobilité réduite des composés du protoplaste	50
3.2.3. Les protéines SASP.....	52
3.2.4. L'acide dipicolinique	52
3.3. Utilisation des techniques de fluorescence pour la caractérisation des spores bactériennes.....	54
III. Objectifs	57
IV. Matériel et méthodes	61
1. Fluorescence stationnaire	62
1.1. Spectres d'émission et d'excitation.....	62
1.2. Matrices excitation-émission	63
1.2.a. Corrections des spectres.....	65
1.2.b. PARAFAC.....	67
2. Fluorescence résolue dans le temps.....	69
2.1. TCSPC	69
3. Microscopie multi-photon.....	71
3.1. FLIM.....	73
4. Phasor plot	74
V. Résultats et discussions	77
Chapitre 1 : Développement de techniques spectroscopiques multidimensionnelles pour le suivi des changements en acides et polyphénols induits par la fermentation malolactique .	78
Multispectral fluorescence sensitivity to acidic and polyphenolic changes in Chardonnay wines – The case study of malolactic fermentation	79
Supplementary information.....	99
Résultats complémentaires.....	109
1. Effet de la fermentation malolactique.....	109
2. Effet de la souche bactérienne impliqué dans la FML.....	111

Chapitre 2 : Caractérisation des photoproduits de l'acide dipicolinique et du dipicolinate de calcium <i>via</i> des techniques de spectroscopie et microscopie de fluorescence	115
Spectroscopic and microscopic characterization of dipicolinic acid and its salt photoproducts - A UVc effect study on DPA in solution and in bacterial spores.	117
Supplementary information	143
Résultats complémentaires.....	147
1. Effet de l'UVc en fonction de l'état d'hydratation	147
Chapitre 3 : Etude spectroscopique de l'effet des changements de pH et d'activité de l'eau sur les photoproduits de l'acide dipicolinique et du dipicolinate de calcium.....	150
Spectroscopic study of the effects of pH and water activity on the photoproducts of dipicolinic acid and calcium dipicolinate	151
Résultats supplémentaires.....	167
1. Etudes des changements de pH dans les spores bactériennes	167
2. Etude des changements d' a_w dans les spores bactériennes	170
Chapitre 4 : Effet des photoproduits du DPA induits par UVc sur la germination et la résistance aux UVc des spores de <i>Bacillus subtilis</i>	174
Uptake of UVc induced photoproducts of Dipicolinic Acid by <i>Bacillus subtilis</i> spores – effects on the germination and UVc resistance of the spores.	175
VI. Conclusions et perspectives	202
VII. Références	208

I. Introduction générale

Les techniques de chimie analytique et plus précisément les techniques de caractérisation sont capitales peu importe le domaine d'application. Cet argument est encore plus vrai dans le domaine agroalimentaire où la qualité des aliments est une priorité pour éviter perte de temps, d'argent et de laisser certains micro-organismes devenir des vecteurs de maladies. Outre l'évaluation de critère de qualité, ces techniques permettent d'investiguer les milieux biologiques pour permettre l'évaluation des changements de ces milieux lors de traitements ou de divers procédés. Le développement de nouvelles techniques est primordial pour répondre à des nombreuses problématiques et pallier les défauts des techniques déjà en place.

Cette thèse a eu pour objectif de développer une nouvelle méthode de caractérisation des milieux biologiques à l'aide du couplage de deux techniques de fluorescence, la fluorescence stationnaire et la fluorescence résolue dans le temps. L'implémentation de ces techniques est dédiée à l'étude de composés fluorescents. Elles ont un fort potentiel du fait de leur rapidité, du faible volume d'échantillon nécessaire à l'analyse, d'une analyse non-destructrice de l'échantillon, et un faible coût d'analyse, que ce soit pour l'appareillage nécessaire ou pour les consommables utiles au fonctionnement. A ce jour, aucune étude n'a utilisé ce genre de couplage de techniques pour le développement d'une technique de caractérisation. Pour mener à bien ce projet, nous avons besoin de modèle d'études biologiques. Nous nous sommes dirigés vers deux milieux biologiques très différents, ayant un fort intérêt dans le domaine de l'agroalimentaire : le vin et les spores bactériennes. Le vin est une boisson alcoolisée représentant un marché mondial de grande envergure, tandis que les spores bactériennes sont des contaminants alimentaires responsables de diverses maladies.

Ces deux milieux d'étude distincts feront l'objet d'un même objectif, la caractérisation des changements physico-chimiques des sondes natives aux milieux biologiques, sous l'effet de différents stress. Le vin possède initialement un grand nombre de molécules fluorescentes capables de jouer le rôle de sondes natives, alors que les spores bactériennes ne comportent pas de molécules pour jouer ce rôle. Pour pallier ce problème, on irradie un composé unique aux spores bactériennes, l'acide dipicolinique, qui émet ensuite une fluorescence caractéristique. Dans ce travail, nous caractérisons ses différents composés en fonction de modifications volontairement initiées, tel que la fermentation malolactique pour le vin et les changements de pH et d'activité de l'eau pour les spores bactériennes.

Ce manuscrit de thèse comprend six parties. Il débute par une description de **l'état de l'art** des divers phénomènes de l'interaction lumière-matière, avec une attention particulière sur les phénomènes d'absorption. La fluorescence étant le processus fondamental des différentes techniques analytiques utilisées lors de nos expérimentations, ce dernier est défini avec soin ainsi que les valeurs caractéristiques des milieux observés, tels que les temps de vie de fluorescence. Cet état de l'art est complété avec des généralités sur les deux milieux biologiques d'études, le vin et les spores bactériennes. La description de notre première matrice d'intérêt, le vin, définit les différents composés du vin présents avant et lors des procédés fermentaires. L'élaboration des vins et les procédés de vinification associés, en particulier les fermentations alcoolique et malolactique, sont décrits du fait de l'importance qu'ils jouent dans notre étude. La dernière partie de cet état de l'art se concentre sur les spores bactériennes. Une description de la structure de la spore ainsi que les différents composés impliqués dans sa résistance sont présentés. Après avoir exposé **les objectifs** de nos travaux de recherches, ainsi que les techniques utilisées pour répondre aux problématiques dans la **partie Matériels & méthodes**, les résultats sont présentés sous forme d'articles scientifiques et de résultats supplémentaires.

Le premier chapitre est dédié au couplage des techniques de fluorescence stationnaire et résolue dans le temps pour le développement d'une nouvelle technique de caractérisation dans le domaine viticole, avec comme application le suivi des effets de la fermentation malolactique sur un échantillonnage de vins issus du monde entier. Les résultats supplémentaires associés à ce travail viendront renforcer les conclusions énoncées dans l'article publié.

Le deuxième chapitre est consacré à la caractérisation spectroscopique et microscopique des photoproduits de l'acide dipicolinique et de son sel, le dipicolinate de calcium. Cette publication apporte de nouvelles théories sur la stabilité des photoproduits, encore non envisagées jusqu'à ce jour. Cette étude permet d'apporter de nouvelles pistes des effets d'une irradiation UVc sur la structure de l'acide dipicolinique et envisage une nouvelle méthode pour la visualisation des photoproduits. Cette méthode pourrait amener à la caractérisation de paramètres physico-chimiques intracellulaires de la spore bactérienne.

Le troisième chapitre présente les changements des caractéristiques des photoproduits du DPA en fonction du pH et de l'activité de l'eau, deux paramètres physico-chimiques impliqués dans les propriétés de résistance de la spore bactérienne. Cette étude *in vitro* des changements des

photoproduits sera complétée par des résultats supplémentaires apportant les prémisses d'une étude *in vivo*.

Le quatrième chapitre démontre l'effet des photoproduits sur la croissance et la résistance des spores bactériennes, grâce à l'implémentation d'une nouvelle méthode de production de photoproduits, non-létale pour la spore.

Ce manuscrit se clôturera par une **conclusion** sur l'ensemble des résultats présentés ainsi que les **perspectives** envisagées à la suite de ces travaux.

II. Etude bibliographique

1. Approche fondamentale du principe de fluorescence

1.1. Interaction lumière-matière – aperçu historique

Il existe deux types d'interactions lumière-matière : la diffusion et l'absorption, et l'interaction sur laquelle ce projet se portera est l'absorption et plus particulièrement la luminescence. Ce phénomène est caractérisé par l'émission de photons (ultraviolet, visible ou infrarouge) résultant de l'excitation électronique de la matière. Il est opposé à l'incandescence qui découle d'une augmentation de la température. La luminescence est une lumière froide tandis que l'incandescence est une lumière chaude. La luminescence est classifiée selon le mode d'excitation, comme résumé dans le tableau 1.1 :

Tableau 2.1 : Les différents types de luminescence.

Phénomène	Mode d'excitation
Photoluminescence	Absorption de photons
Radioluminescence	Rayonnement ionisant
Cathodoluminescence	Rayon cathodique
Electroluminescence	Champ électrique
Thermoluminescence	Chauffage
Chimiluminescence	Processus chimique
Bioluminescence	Processus biochimique
Triboluminescence	Forces de frottement et électrostatiques
Sonoluminescence	Ultrasons

Dans le cas de ce projet, le type de luminescence étudiée est la photoluminescence, phénomène qui regroupe la fluorescence, la fluorescence retardée et la phosphorescence. Ces phénomènes sont connus depuis de nombreux siècles. Le terme phosphorescence vient du grec et se traduit par « qui transporte la lumière ». Au Moyen-âge ce terme était assigné aux matériaux qui brillent dans le noir après une exposition à la lumière. Dans le cas de la fluorescence, le phénomène est connu depuis 1565 où il est décrit pour la première fois par un physicien Espagnol, Nicolàs Monardes. Cependant, le phénomène n'était alors pas compris. Le phénomène fut réinvestigué par George Gabriel Stokes dans une publication célèbre intitulée « On the refrangibility of light » en 1852 (Stokes, 1852). Dans cette publication, il démontre expérimentalement que le phénomène est une émission de lumière suite à l'absorption de lumière. Cette expérience montre aussi que la longueur d'onde d'émission est toujours plus

longue que celle de l'excitation. Ce phénomène est aujourd'hui appelé loi de Stokes, bien que le phénomène ait été décrit 10 ans plus tôt par Edmond Becquerel (Valeur, 2001). Le terme fluorescence apparaît pour la première fois dans son deuxième article en 1853 (Stokes, 1853). Contrairement à la phosphorescence, ce terme ne provient pas d'une traduction ou comme on pourrait le penser, de l'élément fluor, mais tire son inspiration de l'opalescence qui est dérivé du nom d'un minéral. Comme un minéral, la fluorine, montrait les propriétés décrites plus tôt, Stokes se résout alors à utiliser le terme de fluorescence.

1.2. Les phénomènes de diffusion

L'un des phénomènes d'interaction de la lumière avec la matière est la diffusion. Ce phénomène est dû aux collisions entre le flux de photons et les molécules du milieu. Il produit un signal significatif en solution, qui se superpose à un éventuel signal de fluorescence. Deux types de diffusion peuvent être distingués : la diffusion Rayleigh ou la diffusion Raman, selon la nature du choc (élastique ou inélastique).

Diffusion Rayleigh : Collision élastique entre le photon et la molécule. Le photon diffusé ne change pas d'énergie après la collision et les radiations sont observées à la même longueur d'onde que le faisceau d'excitation.

Diffusion Raman : Collision inélastiques entre le photon et les électrons de la molécule qui induit la perte (ou gain) d'une certaine quantité d'énergie par la molécule. Il est possible de visualiser la diffusion Raman sur un spectre de diffusion, il s'agit des raies de moindre amplitude situées de part et d'autre de la diffusion Rayleigh. On obtient ainsi la diffusion « Raman Stokes » et la diffusion « Raman Anti-Stokes ».

La diffusion « Raman Stokes » se produit lorsque l'électron excité retourne dans un niveau d'énergie vibrationnel supérieur à l'état fondamental, ce qui aura pour effet d'émettre un photon à une plus grande longueur d'onde que la longueur d'onde incidente. Tandis que la diffusion « Raman Stokes » se produit lorsque l'électron initial est à un niveau vibrationnel supérieur à celui de l'état fondamental et en se désexcitant retourne à l'état fondamental, ce qui aura pour effet d'émettre un photon à une longueur d'onde plus courte que la longueur d'onde incidente.

1.3. Les phénomènes d'absorption

De nombreuses molécules absorbent dans l'ultraviolet ou le visible. La loi de Beer-Lambert permet de déterminer la fraction de lumière absorbée ou diffusée (Lakowicz, 1983), pour une longueur d'onde donnée. On peut l'exprimer grâce à l'équation suivante :

$$A = \log (I_0/I_T) = \epsilon l c \quad (2.1)$$

Où I_0 est l'intensité incidente ; I_T est l'intensité transmise ; l est la longueur que traverse l'échantillon correspondant à la longueur de la cuve contenant l'échantillon à analyser (cm) ; c est la concentration (mol.L^{-1}) ; ϵ est le coefficient d'absorption de la molécule ($\text{L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$).

Cette méthode est une technique majeure dans la mesure de l'absorption de la lumière.

Lorsqu'une molécule absorbe de la lumière, l'énergie apportée par cette radiation va principalement affecter les états électroniques, ce qui provoque une transition d'un électron d'une orbitale moléculaire à l'état fondamental vers une orbitale inoccupée ayant un niveau d'énergie supérieur. Pour être absorbé, l'apport d'énergie doit être égal à l'écart entre les niveaux énergétiques des deux états électroniques de la molécule. On dit alors que la molécule passe dans un état excité.

Les orbitales moléculaires : Il existe différents types d'orbitales moléculaires impliquée dans les liaisons, telles que les orbitales σ , π (orbitales liantes) et n (orbitale non liante). Une orbitale est dite liante lorsque les orbitales atomiques dont elle résulte sont en phase. A l'inverse, une orbitale est dite antiliante lorsque les orbitales atomiques dont elle résulte sont en opposition de phase. Enfin, une orbitale est dite non liante lorsqu'aucune symétrie n'est possible.

Les orbitales σ résultent de la combinaison de deux orbitales atomiques s , ou d'une orbitale s et d'une orbitale atomique p . La liaison σ , s'étend le long de l'axe passant par les deux noyaux atomiques, avec une symétrie axiale autour de cet axe. Les orbitales π résultent de la combinaison d'orbitales atomiques p se chevauchant latéralement, induisant une liaison π .

Les états excités correspondent à des orbitales moléculaires antiliantes σ^* et π^* . Généralement, l'énergie nécessaire aux transitions vers les états excités est dans cet ordre :

$$\sigma \rightarrow \sigma^* > \sigma \rightarrow \pi^* > n \rightarrow \sigma^* > \pi \rightarrow \pi^* > n \rightarrow \pi^*$$

Pour illustrer ces niveaux d'énergie, la figure 2.1 montre l'exemple du formaldéhyde et des transitions possibles. Pour décrire les phénomènes d'absorption et de fluorescence, il y a deux orbitales importantes à considérer : l'orbitale moléculaire occupée la plus élevée (« Highest Occupied Molecular Orbitals » ou HOMO) et l'orbitale moléculaire inoccupée la plus basse

(« Lowest Unoccupied Molecular Orbitals » ou LUMO). Les transitions permises entre ces niveaux d'énergie électronique sont caractéristiques du spectre d'absorption UV/visible de la molécule. Plus la différence d'énergie est petite, plus la molécule peut être facilement excitée.

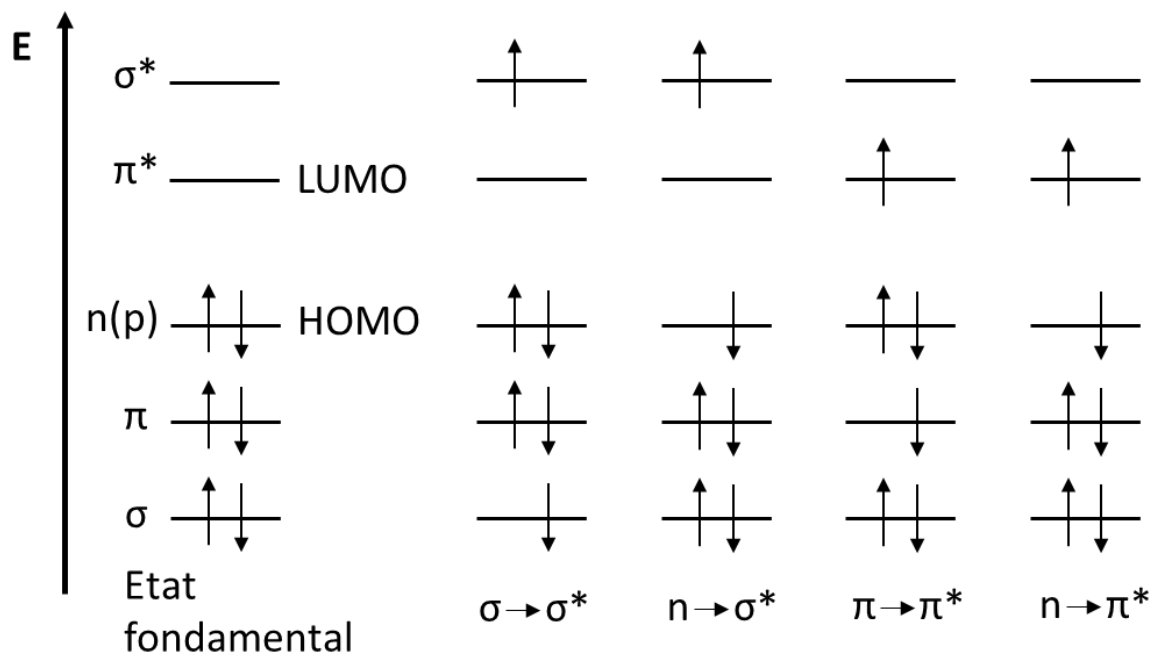


Figure 2.1 : Niveaux d'énergie des orbitales moléculaires pour le formaldéhyde et ses transitions électroniques possibles, selon Valeur, 2001.

Lorsqu'un des deux électrons de spin opposés est porté à un niveau d'énergie supérieur, son état de spin est normalement inchangé et le nombre total de spins de la molécule reste égal à 0. Dans ce cas de figure, la multiplicité des deux états (fondamental et excité) sera de 1, $M = 2S+1 = 2 \cdot (\frac{1}{2} - \frac{1}{2}) + 1 = 1$. Cet état sera appelé état singulet. Cependant, il est possible qu'un changement de spin de l'électron se produise sur la molécule à l'état singulet excité. Ce qui donne lieu à 2 électrons avec des spins parallèles, soit une multiplicité de 3, $M = 2 \cdot (\frac{1}{2} + \frac{1}{2}) + 1 = 3$. Cet état sera appelé état triplet, et son énergie sera inférieure à l'état singulet équivalent. Cette différence d'état est montrée dans la figure 2.2 avec le formaldéhyde comme exemple.

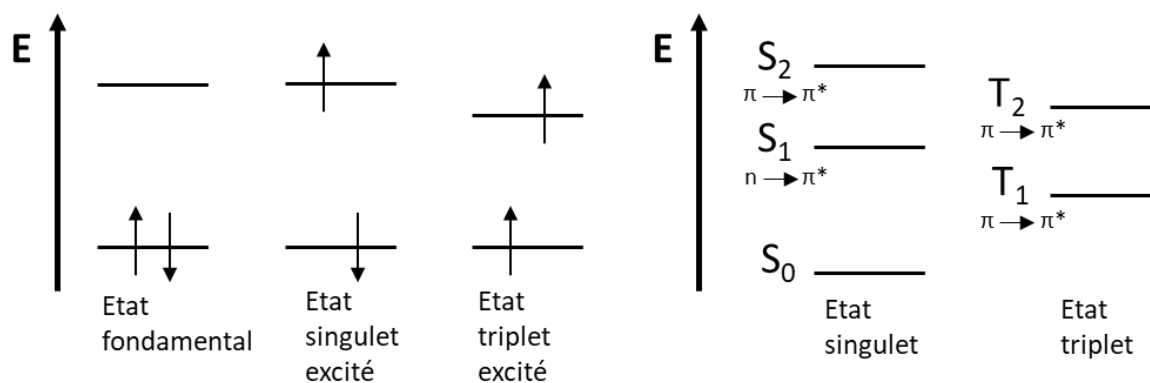


Figure 2.2 : Description des états singulets et triplets pour le formaldéhyde selon Valeur, 2001.

1.3.1. Les processus de désexcitation

Une fois qu'une molécule est excitée par l'absorption d'un photon, elle peut retourner à son état fondamental grâce à divers processus de désexcitation. Les processus possibles de désexcitation sont présentés dans la figure 2.3 ci-dessous. La dispersion du surplus d'énergie peut impliquer la réémission d'un photon, la désexcitation sera alors dite radiative. Si la dispersion du surplus d'énergie implique un autre moyen, la désexcitation sera dite non radiative.

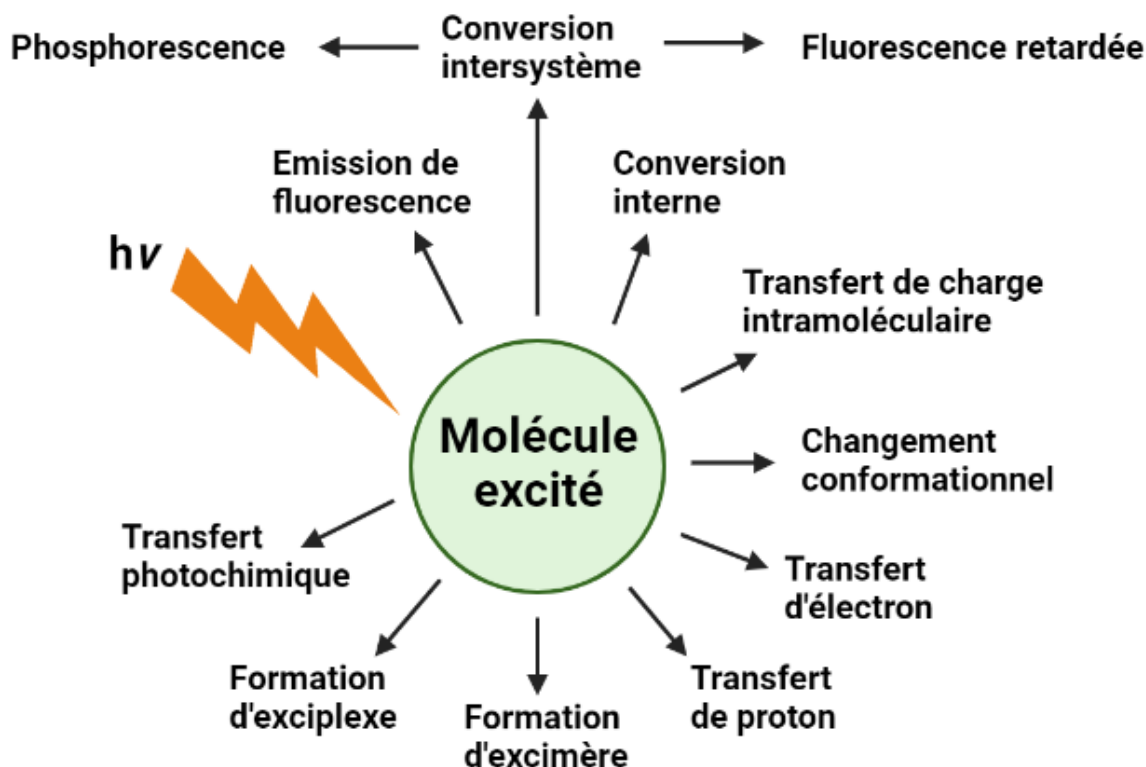


Figure 2.3 : Processus de désexcitation possibles, selon Valeur, 2001.

Conversion interne (C.I) : Transition non radiative (émission de chaleur) entre 2 états électroniques de même multiplicité de spin. En solution, ce processus est accompagné par la relaxation vibrationnelle jusqu'au plus bas niveau d'énergie vibrationnel de l'état électronique final. Depuis un état S_1 , une conversion interne jusqu'à l'état S_0 est possible, mais sera moins favorisée qu'une conversion $S_2 \rightarrow S_1$ qui possède un gap d'énergie moins important que $S_1 \rightarrow S_0$. Plus le gap d'énergie entre l'état électronique initial et final est petit, plus grande sera l'efficacité de la conversion interne.

Fluorescence : L'émission de photons visibles accompagnant la transition $S_1 \rightarrow S_0$ est appelée fluorescence. Mis à part quelques exceptions, l'émission de fluorescence s'effectue principalement à partir de l'état S_1 et ses caractéristiques (sauf la polarisation) ne dépendent pas de la longueur d'onde d'excitation (à condition qu'il y ait une seule espèce présente à l'état fondamental).

En général, les différences entre les niveaux vibrationnels sont similaires dans les états fondamentaux et excités, de sorte que le spectre d'émission est souvent l'image miroir du spectre d'excitation (« règle du miroir »).

L'écart entre le maximum de la première bande d'absorption et le maximum de la fluorescence est appelé le décalage de Stokes.

Selon la règle de Stokes, la longueur d'onde d'une émission de fluorescence devrait toujours être supérieure à celle de l'absorption. Cependant, dans certains cas, le spectre d'absorption recouvre une partie du spectre de fluorescence. Cette observation semble en contradiction avec le principe de conservation de l'énergie. Mais ce phénomène s'explique par le fait qu'à température ambiante, une fraction des molécules se trouve dans un niveau vibrationnel supérieur au niveau 0 dans l'état fondamental ainsi que dans l'état excité.

L'émission d'un photon est aussi rapide que l'absorption d'un photon ($\approx 10^{-15}$ s). Cependant, les molécules excitées restent dans l'état S_1 pendant un certain temps avant d'émettre un photon de fluorescence, on appelle cette durée le temps de vie de fluorescence. Ainsi, après l'excitation d'une population de molécules par une impulsion lumineuse très courte, l'intensité de fluorescence décroît exponentiellement, le temps caractéristique de décroissance, reflétant le temps de vie de fluorescence des molécules dans l'état excité S_1 .

Conversion intersystème (C.I.S) : La conversion intersystème est une transition non radiative entre 2 niveaux d'énergie vibrationnelle de même énergie, mais de multiplicités différentes. Par exemple, une molécule excitée à l'état vibrationnel 0 de l'état S_1 peut se déplacer jusqu'à l'état vibrationnel n (où n est de même énergie que l'état vibrationnel de l'état $S_{1,0}$) de l'état triplet T_n . La conversion intersystème est favorisée dans le cas de transition $S_0 \rightarrow S_1$ de type $n \rightarrow \pi^*$ ainsi qu'en présence d'atomes lourds (par exemple : Br, Pb).

Phosphorescence : La phosphorescence est l'émission de photons accompagnant la transition entre les état T_1 et S_0 . A température ambiante, les désexcitations non radiatives depuis l'état triplet T_1 sont prédominantes, puisque les transitions entre l'état T_1 et S_0 sont interdites. La constante de désexcitation radiative est alors très faible et les nombreuses collisions avec les molécules du solvant favorisent une relaxation non radiative, par les conversions intersystème et relaxations vibrationnelles en S_0 . En revanche, à basse température et/ou en milieu rigide, on peut observer la phosphorescence car la durée de vie de l'état triplet devient suffisamment longue pour observer la phosphorescence.

Fluorescence retardée : Il est possible qu'une molécule ayant effectué une transition entre les états S_1 et T_1 puisse être réversible est retourner à l'état S_1 pour émettre un photon fluorescent. Le temps passé entre les différents états singulet et triplet allonge le temps avant la

désexcitation ce qui explique que la fluorescence est retardée. Plusieurs processus permettent la fluorescence retardée, soit de façon thermique, soit par annihilation triplet-triplet ou encore par transition triplet-triplet.

Un récapitulatif des phénomènes de désexcitation et de leurs durées caractéristiques sont représentés dans un diagramme de Perrin-Jablonski dans la figure 2.4 et le tableau 2.2 ci-dessous :

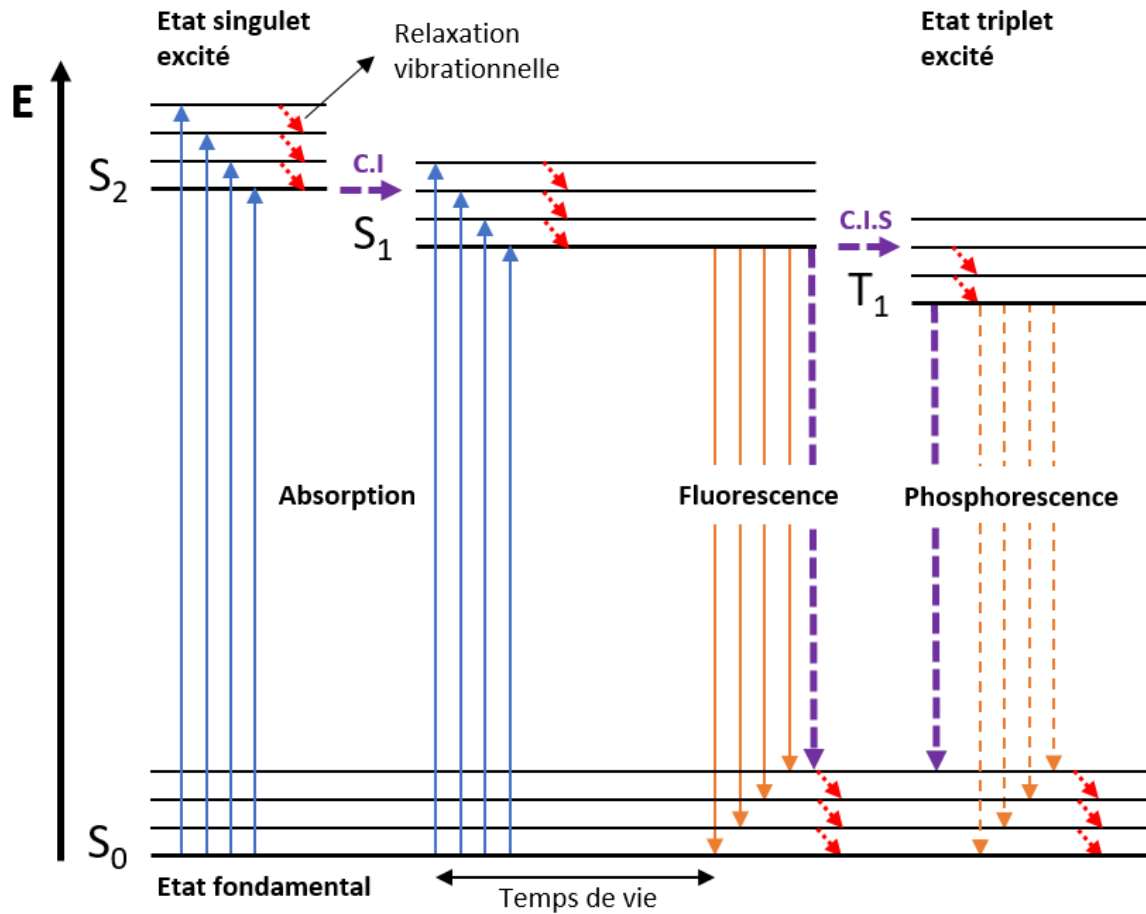


Figure 2.4 : Diagramme de Perrin-Jablonski représentant les différents processus de désexcitation. Processus radiatif : flèche orange, processus non radiatif : flèche violette.

Tableau 2.2 : Durée caractéristique des différents phénomènes.

Phénomènes	Durée (s)
Absorption	10^{-15}
Relaxation vibrationnelle	10^{-12} à 10^{-10}
Temps de vie de l'état excité S ₁	10^{-10} à 10^{-7}

Conversion interne	10^{-11} à 10^{-9}
Conversion intersystème	10^{-10} à 10^{-18}
Temps de vie de l'état excité T_1	10^{-6} à 1

1.3.2. Intensité de fluorescence

Les mécanismes d'excitation et d'émission d'une molécule A et de son état excité A* peuvent être décrit suivant le schéma réactionnel suivant, donné figure 2.5 :

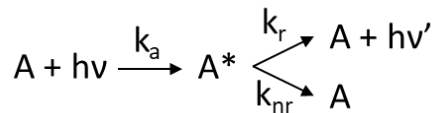


Figure 2.5 : Schéma réactionnel des mécanismes d'excitation et d'émission. Où k_a est la constante d'absorption ; k_r est la constante de désexcitation radiative ; k_{nr} est la constante de désexcitation non radiative.

En suivant le schéma réactionnel de la figure 2.5, et en considérant que la concentration de molécules à l'état excité reste constante au cours du temps sous l'effet d'une source lumineuse émettant un flux constant de photons N_0 , on peut écrire :

$$\begin{cases} \frac{d[A^*]}{dt} = 0 = k_a \alpha N_0 - (k_r + k_{nr})[A^*] ; \text{soit } [A^*] = \frac{k_a \alpha N_0}{k_r + k_{nr}} \\ I_F = k_r [A^*] ; \text{soit } I_F = k_r \frac{k_a \alpha N_0}{k_r + k_{nr}} = \phi k_a \alpha N_0 \end{cases} \quad (2.2)$$

Où, $k_a \alpha N_0$ est une quantité de photons absorbés/unité de volume/unité de temps ; soit I_a .

Et d'après la loi de Beer-Lambert on peut écrire :

$$I_a = I_0 - I_T = I_0 (1 - 10^{-\varepsilon[A]l}) \quad (2.3)$$

Ce qui nous permet de conclure :

$$I_F = \phi I_0 (1 - 10^{-\varepsilon[A]l}) = 2,3 \phi I_0 (1 - e^{-\varepsilon[A]l}) \quad (2.4)$$

Et si on considère que la molécule fluorescente en solution est très diluée on peut assimiler $e^{-\varepsilon[A]l}$ à $1 - \varepsilon [A] l$, ce qui donne :

$$I_F \approx 2,3 \phi I_0 \varepsilon [A] l \quad (2.5)$$

Où ϕ est le rendement quantique ; I_0 est l'intensité de fluorescence incidente ; I est l'intensité incidente ; l est la longueur que traverse la lumière correspondant à la longueur de la cuve contenant l'échantillon à analyser (cm) ; $[A]$ est la concentration de la molécule considérée (mol.L^{-1}) ; ϵ est le coefficient d'absorption de la molécule ($\text{L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$).

Quenching de la fluorescence

L'intensité de fluorescence peut être diminuée par de nombreux procédés. Ces diminutions sont appelées « quenching » et peuvent être produites par différents mécanismes. Le quenching collisionnel est produit lorsque qu'un fluorophore à l'état excité se désexcite suite au contact avec une autre molécule en solution, molécule appelée quencher. Le fluorophore retourne à son état fondamental lors de la rencontre avec le quencher. La diminution de l'intensité de fluorescence est décrite par équation de Stern-Volmer (Lakowicz & Masters, 2008) :

$$\frac{I_0}{I} = 1 + K [Q] = 1 + k_q \tau_0 [Q] \quad (2.6)$$

Où K est la constante de Stern-Volmer de quenching ; k_q est la constante biomoléculaire de quenching ; τ_0 est le temps de vie avant quenching ; $[Q]$ est la concentration en quencher.

Une grande variété de molécules peut agir comme quencher collisionnel. Par exemple l'oxygène, les halogènes, les amines ou les molécules déficientes en électrons. Les mécanismes de quenching varient en fonction du complexe fluorophore-quencher.

Il existe d'autres processus que le quenching collisionnel. Les fluorophores peuvent également former des complexes non fluorescents avec les quenchers. Ce processus est appelé quenching statique du fait qu'il se produit à l'état fondamental et n'est pas relié à la diffusion ou à la collision de molécules. Le quenching peut également se produire par l'atténuation de la lumière incidente par le fluorophore lui-même ou une autre espèce absorbantes.

1.4. Temps de vie et rendement quantique de fluorescence

1.4.1. Temps de vie des états excités

On suppose ici qu'un échantillon contenant un fluorophore est excité à l'aide d'une impulsion lumineuse très courte. En considérant une population initiale de fluorophore de n_0 à l'état excité. La population à l'état excité décroît avec un taux $k_r + k_{nr}$ selon :

$$\frac{dn(t)}{dt} = -(k_r + k_{nr}) n(t) \quad (2.7)$$

Où $n(t)$ est le nombre de molécules excitées au temps t après l'excitation ; k_r est la constante de désexcitation radiative ; k_{nr} est la constante de désexcitation non radiative.

L'émission est un événement aléatoire, et chaque fluorophore excité a la même probabilité d'émettre dans un laps de temps défini. Cela résulte en une décroissance exponentielle de la population. En effet, en définissant $\tau = \frac{1}{k_r + k_{nr}}$ on peut écrire :

$$n(t) = n_0 \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) \quad (2.8)$$

Dans les expériences en fluorescence nous n'observons pas le nombre de molécules excitées mais l'intensité de fluorescence que celles-ci émettent en se désexcitant, qui est proportionnelle à $n(t)$. L'équation 2.8 peut ainsi être écrite sous forme de

$$I(t) = I_0 \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) \quad (2.9)$$

Où I_0 est l'intensité de fluorescence au temps initiale.

Temps de vie naturel

La constante de désexcitation radiative peut être obtenue à partir des paramètres intrinsèques à la molécule et des paramètres du solvant. Cette équation est aussi connue sous le nom d'équation de Strickler-Berg (Strickler & Berg, 1962).

$$k_r = 2.88 \times 10^{-9} n^2 \frac{\int F(\bar{\nu}) d\bar{\nu}}{\int F(\bar{\nu}) d\bar{\nu} / \bar{\nu}^{-3}} \int \frac{\epsilon(\bar{\nu})}{\bar{\nu}} d\bar{\nu} \quad (2.10)$$

Où $F(\bar{\nu})$ est le spectre d'émission tracé sur l'échelle du nombre d'onde (cm^{-1}) ; $\epsilon(\bar{\nu})$ est le spectre d'absorption ; n est l'indice de réfraction du milieu.

Dans le cas où le seul processus de désexcitation de $S_1 \rightarrow S_0$ implique l'émission de fluorescence, le temps de vie est égal à $1/k_r$, on l'appelle alors le temps de vie naturel, écrit τ_n .

$$\frac{1}{\tau_n} = 2.88 \times 10^{-9} n^2 \langle \bar{\nu}^{-3} \rangle^{-1} \int \frac{\epsilon(\bar{\nu})}{\bar{\nu}} d\bar{\nu} \quad (2.11)$$

L'intégrale est calculée pour une absorption et une émission d'une transition $S_0 \leftrightarrow S_1$. Il faut remarque que cette équation repose sur de fortes approximations. En effet, l'équation 2.10 suppose qu'il n'y a pas d'interaction entre le solvant, pas de changement d'indice de réfraction entre la longueur d'onde d'excitation et d'émission, ni de changement de géométrie de la forme excitée. Une forme plus complète de l'équation existe où un facteur $G = g_1/g_u$ est intégré à

l'équation, g_l et g_u étant les dégénérescences des états les plus bas et hauts. Dans le cas d'une transition avec émission de fluorescence $G = 1$, et dans le cas d'émission de phosphorescence $G = 1/3$ (Lakowicz, 2006).

Rotations de molécules

Les rotations de certaines parties de molécules dans des états excités participent fortement aux processus de désexcitation non radiatifs. Considérons une molécule possédant des doubles liaisons : une excitation des électrons présents dans les orbitales non liantes les promeut dans une orbitale d'un état excité. Cela a pour effet de changer l'indice de liaison en le diminuant, permettant de faire passer une double liaison pour une simple liaison en rendant possible une isomérisation cis/trans par rotation, induisant par la même occasion une diminution des temps de vie (Berezin & Achilefu, 2010). Si on suppose que la rotation à l'état excité est possible, alors on peut exprimer la constante de vitesse de rotation autour de la liaison de la manière suivante :

$$k_{\text{rot}} = \frac{k_B T}{4 \pi r^3 \eta} \quad (2.12)$$

Où η est la viscosité du solvant (N.s.m^{-2}) ; k_B est la constante de Boltzmann ; T est la température ; r est le rayon d'une particule sphérique (en mètre).

Dans le cas où le processus de désexcitation non radiatif est une rotation alors $k_{\text{rot}} = k_{\text{nr}}$ et

$$\tau = \frac{1}{k_r + \frac{k_B T}{4 \pi r^3 \eta}} \quad (2.13)$$

Il est aussi envisageable de définir le temps de vie en fonction de la viscosité à l'aide de l'équation suivante (Berezin & Achilefu, 2010) :

$$\tau = C_m \times \eta^\gamma \quad (2.14)$$

Où η est la viscosité ; C_m est une constante concentration-température ; γ est un paramètre moléculaire dépendant du colorant utilisé pour calibrer la viscosité du fluorophore.

1.4.2. Rendement quantique

Rendement quantique de fluorescence

Le rendement quantique de fluorescence « ϕ_F » rend compte de la compétition entre les phénomènes de désexcitation radiatifs et non radiatifs. ϕ_F représente est la probabilité pour qu'une molécule excitée émette un photon :

$$\phi_F = \frac{\text{Quantité de photons émis}}{\text{Quantité de photons absorbés}} = \frac{k_r}{k_r + k_{nr}} = k_r \tau \quad (2.15)$$

Utilisant le temps de vie radiatif, défini précédemment, le rendement quantique de fluorescence peut aussi s'écrire :

$$\phi_F = \frac{\tau}{\tau_r} \quad (2.16)$$

Il est également possible de relier le rendement quantique de fluorescence avec la viscosité, ce qui donnera :

$$\phi_F = z \eta^\alpha \quad (2.17)$$

Où z et α représentent des constantes ; η est la viscosité.

En combinant les équations (2.15) et (2.17) il est possible de décrire le temps de vie en fonction de la viscosité :

$$\tau = \frac{z \eta^\alpha}{k_r} \quad (2.18)$$

Rendements quantiques de CIS et de phosphorescence

Les rendements quantiques pour la conversion intersystème et la phosphorescence sont :

$$\phi_{CIS} = \frac{k_{CIS}}{k_r^S + k_{nr}^S} = k_{CIS} \tau_S \quad (2.19)$$

$$\phi_P = \frac{k_r^T}{k_r^T + k_{nr}^T} \phi_{CIS} \quad (2.20)$$

Où k_{CIS} est la constante de désexcitation dans le cas d'une conversion intersystème ; Les indices et exposants indiquant « S » ou « T » indiquent si le facteur est associé à une transition provenant de l'état singulet ou de l'état triplet.

Estimation de ϕ

Le moyen le plus simple pour estimer le rendement quantique d'un fluorophore est de le comparer à des étalons de rendement quantique connue. Le rendement quantique du fluorophore inconnu est ainsi calculé :

$$Q = Q_R \frac{I \text{ OD}_R n^2}{I_R \text{ OD} n_R^2} \quad (2.21)$$

Où Q est le rendement quantique ; I est l'intensité intégrée ; OD est la densité optique ; n est l'indice de réfraction. Les « R » ajoutés en indices correspondent aux facteurs du fluorophore de référence.

1.5. Paramètres importants influençant la fluorescence

De nombreux paramètres peuvent influencer le rendement quantique de fluorescence ou les temps de vie de fluorescence, tels que le pH, la température, les changements de conformation, etc. (Lakowicz & Masters, 2008). Ces paramètres sont importants à prendre en compte lors des expérimentations pour éviter une mauvaise interprétation du fait de l'effet de plusieurs facteurs qui pourraient agir simultanément.

pH/concentration en ions : Ces deux paramètres évoluent différemment en fonction des molécules étudiées. La fluorescence d'un composé aromatique avec des fonctions acides est généralement dépendante du pH. Les propriétés acides ou basiques d'une molécule qui absorbe la lumière ne sont pas les mêmes à l'état fondamental et à l'état excité. Les longueurs d'ondes et les intensités d'émissions sont susceptibles d'être différentes pour les formes ionisées et non ionisées de la molécule. Ces effets sont visibles sur des sondes sensibles au changement de pH tels que la pyranine, la fluorescéine, les SNARF ou la coumarine (Valeur, 2001). Pour ce qui est de l'impact de la présence de certains ions sur les spectres de fluorescence, l'Indo-1 est un bon exemple de sonde sensible aux cations (Bannwarth et al., 2009).

Température : Une augmentation de température tend à baisser le rendement de fluorescence ainsi que le temps de vie car les procédés non radiatifs liés à l'agitation thermique (collisions avec les molécules du solvant, etc.) sont favorisés pour des augmentations de température. Par exemple dans le cas d'une étude sur une molécule, le N-Acetyl-L-tryptophanamide ou NATA. La diminution de température peut amener à un décalage du spectre d'émission vers des longueurs d'ondes plus élevées ainsi qu'une baisse du rendement quantique (Lakowicz & Balter, 1982). Le même type de décalage est observé pour une autre molécule, le patman, où des

changements supplémentaires en temps de vie et en intensité de fluorescence sont remarqués (Lakowicz et al., 1983).

Structure moléculaire : La plupart des composés fluorescents sont issus de composés aromatiques, bien que quelques composés aliphatiques insaturés soient également fluorescents. Généralement, une augmentation de la délocalisation des électrons sur les orbitales π (i.e. du degré de conjugaison) induit un décalage des spectres d'absorption et d'excitation vers des longueurs d'ondes plus élevées, ainsi qu'une augmentation du rendement quantique de fluorescence. Pour illustrer ces propos, il suffit de regarder les composés tels que : le naphthalène, l'anthracène, le naphtacène et le pentacène qui émettent respectivement une fluorescence dans l'ultraviolet, le bleu, le vert et le rouge (Valeur, 2001).

La présence d'atomes lourds comme substituants de molécules aromatiques entraîne un quenching de la fluorescence, cet effet étant dû à une augmentation de la probabilité de conversion intersystème. Cet effet peut être plus faible pour certains hydrocarbures aromatiques, si le rendement quantique de fluorescence est suffisamment important pour que la désexcitation radiative domine les autres processus de désexcitation. Ou au contraire si le rendement quantique de fluorescence est très faible ce qui entraîne une faible favorisation de la conversion intersystème. Et pour finir, s'il n'y a pas d'état triplet énergétiquement proche de l'état de fluorescence (Dreeskamp et al., 1975; Valeur, 2001).

En général, la substitution avec des groupements donneur d'électrons induit une augmentation du coefficient d'absorption molaire et induit un décalage du spectre d'absorption et d'émission.

Viscosité : La viscosité a un effet important sur les spectres d'émission des fluorophores, mais aussi sur leurs temps de vie de fluorescence. Il faut prendre en particulier prendre garde au fait que la viscosité est impactée par les changements de température. Le trans-stilbène est un exemple connu, sa fluorescence est fortement dépendante de la viscosité et de la température (Sharafy & Muszkat, 1971; Sumitani et al., 1977), et cet effet a été interprété par la possibilité de rotation de la double liaison centrale à l'état excité. Une augmentation de la viscosité augmentera le rendement quantique de fluorescence, ainsi que les temps de vie de fluorescence, et peut provoquer des changements dans l'intensité de fluorescence de certains pics d'émissions (Valeur, 2001; Vyšniauskas, 2015).

2. Généralités sur le vin

L'Organisation Internationale de la vigne et du vin (OIV), référence scientifique et technique du monde de la vigne et du vin définit le vin comme « Exclusivement la boisson résultant de la fermentation alcoolique complète ou non, ou du moût de raisin. Son titre alcoométrique acquis ne peut être inférieur à 8,5% vol. Toutefois, compte tenu des conditions de climat, de terroir ou de cépages, de facteurs qualitatifs spéciaux ou de traditions propres à certains vignobles, le titre alcoométrique total minimal pourra être ramené à 7% vol. par une législation particulière à la région considérée. » (<https://www.oiv.int/fr/>). Cette législation est définie dans différents règlements européens N° 1493/1999 et N° 1308/2013.

Les premières traces de sa production remontent au tout début de la civilisation et continuent aujourd'hui d'avoir une place importante dans notre société. Le vin représente un aspect fort du savoir-faire français, mais possède une place économique majeure dans notre économie en représentant plusieurs milliards d'euros chaque année grâce à l'exportation.

Selon le dernier rapport de l'OIV la surface viticole mondiale en 2020 (<https://www.oiv.int/public/medias/7899/oiv-note-de-conjoncture-vitivinicole-mondiale-2020.pdf>) représentait environ 7331 milliers d'hectares (mha). Avec une surface de 797 mha (soit 10,9% de la surface viticole mondiale), la France représente la deuxième plus grande surface mondiale derrière l'Espagne avec 961 mha (13.1% de la surface mondiale). Cela représente une production de vin mondiale (jus et moûts exclus) d'environ 260 millions d'hectolitres (Miohl), avec une production de 46,6 Miohl pour la France (soit 17.9% de la production mondiale) qui était donc en 2020 le deuxième plus gros producteur de vin derrière l'Italie avec 49,1 Miohl (18.9% de la production mondiale).

2.1. Composants majeurs du raisin et du vin

La matière première utilisée lors de l'élaboration d'un vin est le raisin, fruit issu de la vigne, *Vitis vinifera* ou *Vitis labrusca*. Le fruit se présente sous forme de baies associées en grappe et c'est à partir de son jus et suite au(x) fermentation(s) que le vin sera produit. La structure et les composants principaux des différentes couches constituant la baie de raisin sont présentés ci-dessous figure 2.6.

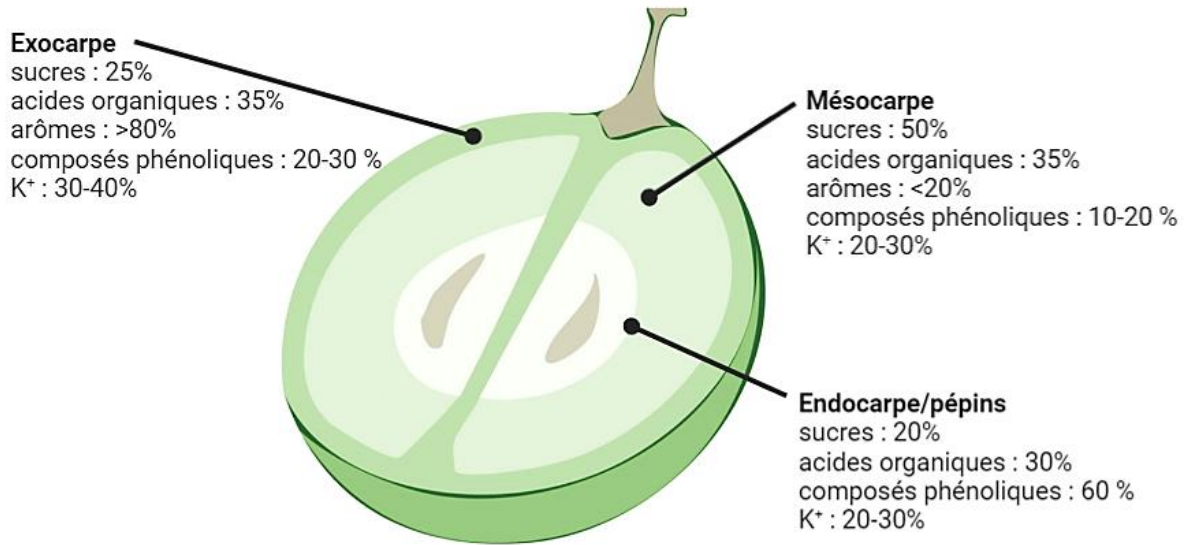


Figure 2.6 : Illustration de la structure d'une baie de raisin et la distribution de ses constituants selon Fontes et al., 2011 (Conde et al., 2007; Coombe, 1987; Jackson, 2008). Les valeurs indiquent le pourcentage de chaque type de composés dans les compartiments associés.

2.1.1. Les sucres

Les constituants majeurs des baies de raisin sont les sucres, ils atteignent à maturité une concentration de 100 à 250 g/L (Liu et al., 2006) et sont classés en trois catégories : monosaccharides, polysaccharides et hétérosides. Leurs structures et catégories sont présentés ci-dessous figure 2.7.

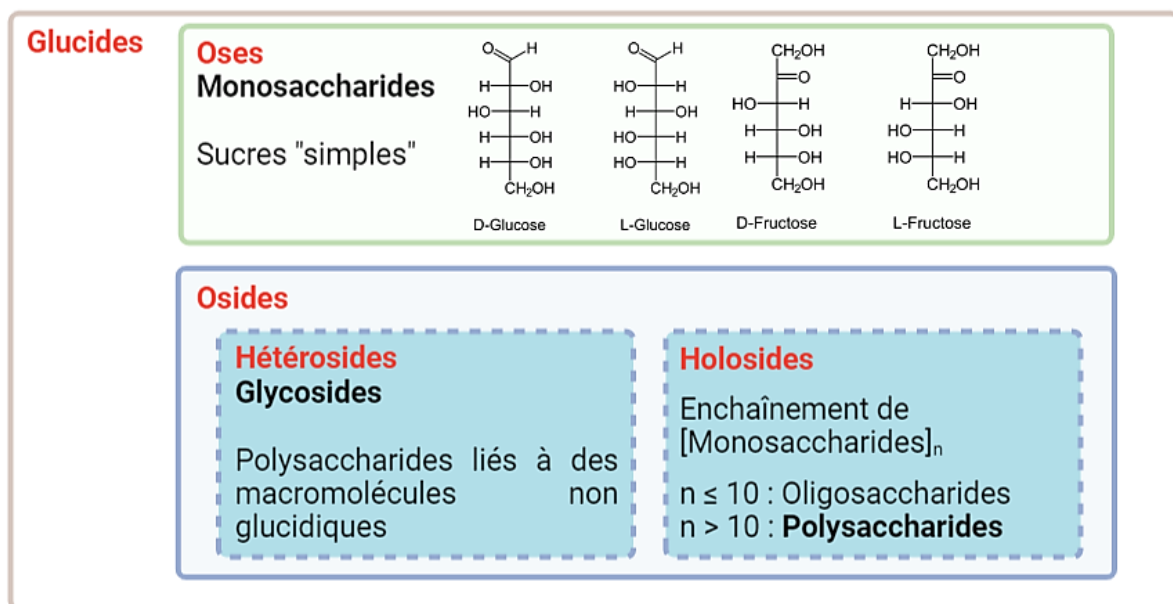


Figure 2.7 : Catégories principales de sucres présents dans les baies de raisin.

Les monosaccharides sont fermentescibles, mais les autres sucres ne sont pas fermentescibles par les levures ou seulement indirectement fermentescibles et servent de nutriments aux microorganismes présents dans le vin (Ribéreau-Gayon et al., 2007). Dans un vin fini la teneur en sucre va permettre de définir à quelles catégories il appartient (<https://www.oiv.int/fr/>), le vin est dit :

1. Sec, lorsque le vin contient 4 g/l de sucre au maximum ou 9 g/l lorsque la teneur en acidité totale (exprimée en grammes d'acide tartrique en litre) n'est pas inférieure de plus de 2 g/l à la teneur en sucre.
2. Demi-sec, lorsque la teneur en sucre du vin n'excède pas
 - a. 12 g/l ou
 - b. 18 g/l, lorsque la différence entre la teneur en sucre et la teneur en acidité totale exprimée en gramme par litre tartrique n'est pas supérieure à 10 g/l.
3. Demi-doux, lorsque le vin contient au maximum 45 g/l.
4. Doux, lorsque le vin a une teneur minimale en sucre de 45 g/l.

2.1.2. Les acides organiques

Les seconds constituants du raisin sont les acides organiques. Ces composés sont le produit du catabolisme d'acides aminés et font l'objet d'intermédiaires lors de voies métaboliques. Ils possèdent des capacités antibiotiques, des propriétés antimicrobiennes et augmentent la stabilité du vin (Chidi et al., 2015). Les principaux acides organiques identifiés sont l'acide tartrique (2 à 10 g/L), l'acide malique (1 à 7 g/L) et l'acide citrique (0,5 à 2 g/L) (Lasik, 2013; Lena do Nascimento Silva et al., 2015; Liu et al., 2006). Ces acides représente jusqu'à 92% de la totalité des acides organiques, soit la majeure contribution en acidité dans les vin finis (Kliewer, 1966). Leurs structures sont présentées dans la figure 2.8. Les acides majoritaires, l'acide malique et tartrique peuvent être utilisés comme indicateur de la maturation des baies de raisin et ainsi déterminer le moment de la récolte. Cette technique est basée sur le ratio entre les deux acides, soit acide malique/tartrique (Palma & Barroso, 2002), ou avec °Brix/ratio des acides (Zoecklein et al., 1999). La composition et la concentration en acides organiques des baies de raisin sont influencées par divers facteurs tels que le cépage, le climat ou les pratiques

de vinification (Baiano et al., 2012; Chidi et al., 2015; Conde et al., 2007; Kliwer et al., 1967; Lamikanra et al., 1995; Mato et al., 2005; Scutarașu et al., 2021; Zheng et al., 2009).

De nombreux auteurs confirment la contribution majoritaire des acides organiques aux propriétés sensorielles du vin (Chidi et al., 2015; González-Sáiz et al., 2014; Scutarașu et al., 2021; Zheng et al., 2009). Au cours des différentes fermentations, de nombreux autres acides organiques peuvent être produits tels que : l'acide succinique, pyruvique, lactique et acétique. Cela peut entraîner d'importants changements organoleptiques des vins et contribuer aussi à leur stabilité (Kučerová & Široký, 2014).

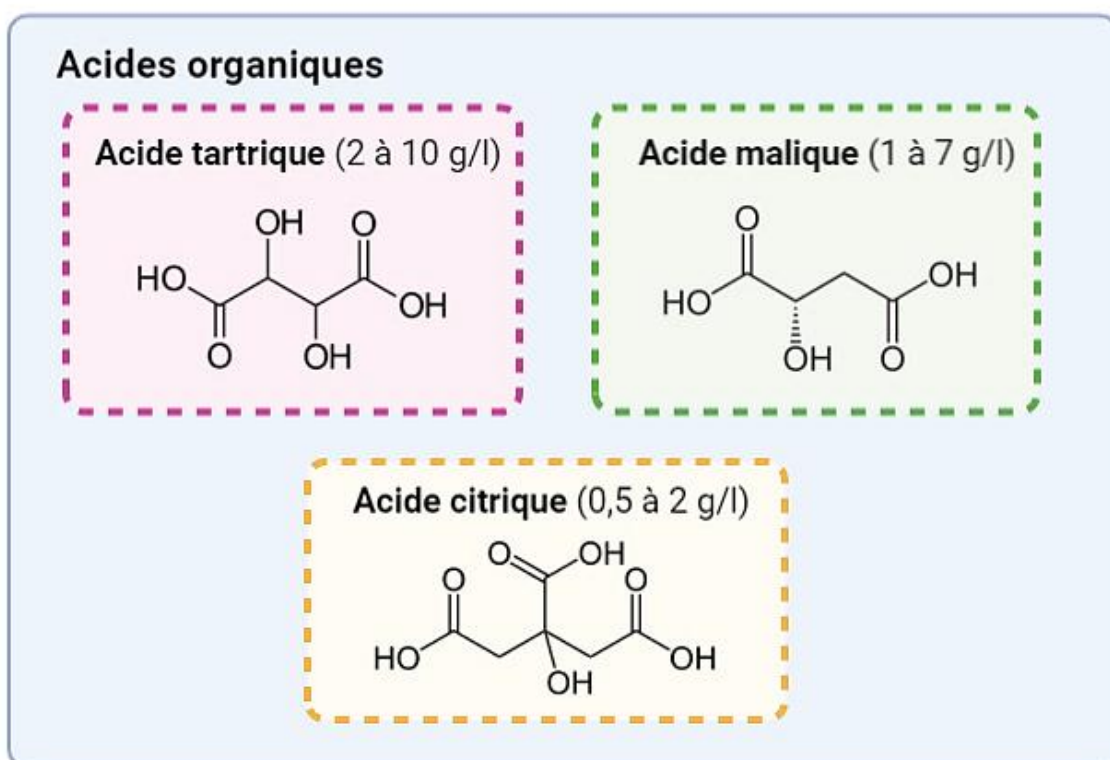


Figure 2.8 : Formule chimique et concentration des principaux acides organiques présents dans les baies de raisin.

2.1.3. Les composés phénoliques

On retrouve ensuite les composés phénoliques, présents à des concentrations de quelques dizaines à plusieurs centaines de mg/L (Emilio et al., 2017). Ils peuvent être définis comme des composés possédant un noyau phényle avec un groupe hydroxyle ou un autre substitut. On les retrouve dans les baies de raisin sous forme de deux différents groupes : les flavonoïdes et les non-flavonoïdes. Les composés phénoliques non-flavonoïdes sont retrouvés dans les baies ainsi

que dans le vin, à l'exception des acides hydroxycinnamiques présents en faible concentration (Conde et al., 2007; Kennedy et al., 2006). Les flavonoïdes sont présents en proportion significative dans les baies (Conde et al., 2007). Les flavonoïdes sont structurés en deux noyaux benzène (A et B) relié par une chaîne de 3 carbones fermés en un noyau hétérocycle oxygéné (A). Cette structure possède un squelette C₆-C₃-C₆, voir figure 2.9.

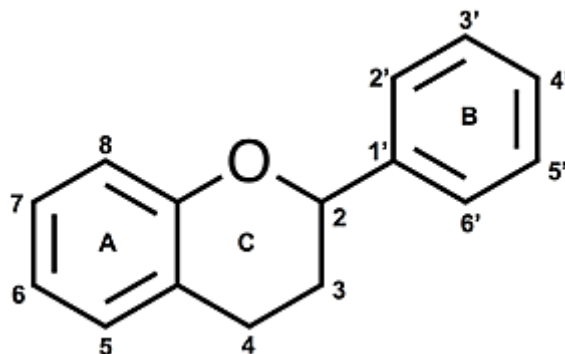


Figure 2.9 : Schéma de la structure du noyau flavonoïde issu de Teixeira et al., 2013

2.1.3.a. La famille des flavonoïdes

La famille des flavonoïdes est constituée des flavanols, flavonols, flavanones, flavones, chalcones, tanins et anthocyanidines. Un récapitulatif de ces composés et leurs structures est disponible à la fin de cette sous-partie, figure 2.10.

Les flavanols, connus aussi sous le nom de flavan-3-ols peuvent être retrouvés sous des formes libres comme la catéchine, l'épicatéchine, l'épigallocatechine ou épigallocatechine gallate, ou des formes condensés comme les proanthocyanidines ou les tannins non hydrolysables (Jeffery et al., 2008; Piñeiro et al., 2013). Les flavanols contribuent à la couleur et à certaines propriétés sensorielles telles que l'astringence ou l'amertume (Hornedo-Ortega et al., 2021). Dans les vins rouges, on retrouvera une concentration allant jusqu'à 800 mg/L, tandis que pour les vins blancs, on les retrouve dans une gamme de 15 à 25 mg/L (Gutiérrez-Escobar et al., 2021; Katalinić et al., 2004; McDonald et al., 1998; Waterhouse, 2002).

Les flavonols sont un autre groupe de composés présents dans la famille des flavonoïdes et comprennent la myricétine, la quercétine, la laricitrine, le kaempférol, l'isorhamnétine et la syringétine (Castillo-Muñoz et al., 2007). Ils forment des co-pigments avec les anthocyanidines et jouent un rôle important dans l'astringence et l'amertume des vins. Ces composés peuvent

être retrouvés jusqu'à une concentration de 60 mg/L (Gutiérrez-Escobar et al., 2021; Makris et al., 2006; McDonald et al., 1998).

Les flavanones possèdent une chaîne de carbone saturée pour les carbones C₂ et C₃. Le principal composé retrouvé dans les vins est la naringinine, possédant une concentration allant jusqu'à 25 mg/kg pour les vins rouges et 7,7 mg/kg pour les vins blancs (Visioli et al., 2020).

Les flavones possèdent elles une double liaison entre les carbones C₂ et C₃ et l'absence de groupement hydroxyle sur le carbone C₃. On retrouve ces composés dans des gammes de concentration de 0,2 à 1 mg/L (Agatonovic-Kustrin et al., 2015; Cabrera-Bañegil et al., 2017).

Les chalcones sont une sous-classe des flavonoïdes qui sont des intermédiaires importants, précurseurs pour les dérivés des flavonoïdes dans les baies de raisin et dans le vin (Garrido & Borges, 2013).

Les tanins peuvent être retrouvés sous deux formes : les tanins hydrolysables et les tanins condensés. Les tanins hydrolysables sont majoritairement représentés par des esters des acides gallique et ellagique liés à des glucoses ou autres sucres. On retrouve ces composés dans des concentrations finales variant de 0,4 à 50 mg/L (Basalekou et al., 2019; Ma et al., 2014; Stark et al., 2010). Les tanins condensés sont le résultat de la condensation des flavonols. Cette condensation permet la formation de tanins tels que l'épicatéchine qui est le tanin condensé le plus abondant dans les baies de raisin et le vin, et les proanthocyanidines présents principalement dans la peau des baies et les pépins (Rasmussen et al., 2005). La quantité de ces tanins augmente durant le vieillissement et augmente l'astringence des vins, ils peuvent aussi réagir et se polymériser avec d'autres molécules (Ma et al., 2014). La concentration de ces tanins peut varier entre 1,2 et 3,3 g/l (Basalekou et al., 2019; Chira et al., 2011).

Les anthocyanidines sont des pigments solubles dans l'eau responsables de la couleur rouge des baies de raisin et du vin rouge. Les principaux composés sont les anthocyanidines et les anthocyanines (les anthocyanines sont des anthocyanidines glycosylés). Les anthocyanines majoritairement identifiées sont la delphinine, la cyanidine, la pétunidine, la péonidine et la malvidine. Leurs concentrations peuvent varier de 90 mg/L à 700 mg/L (Berente et al., 2000; Villiers et al., 2004; Waterhouse, 2002) tandis que dans les vins blancs, ces composés sont absents (Visioli et al., 2020). La couleur des anthocyanines change en fonction du pH, de la concentration du dioxyde de soufre et des co-pigments présent dans le vin (Boulton, 2001). Pour des valeurs basses de pH (pH < 4), les anthocyanidines seront sous forme de cations

flavanes, soit rouges. Pour des valeurs supérieures de pH, la couleur change de transparent à violet ou bleu dans des solutions alcalines ou neutres (Brouillard & Delaporte, 1977).

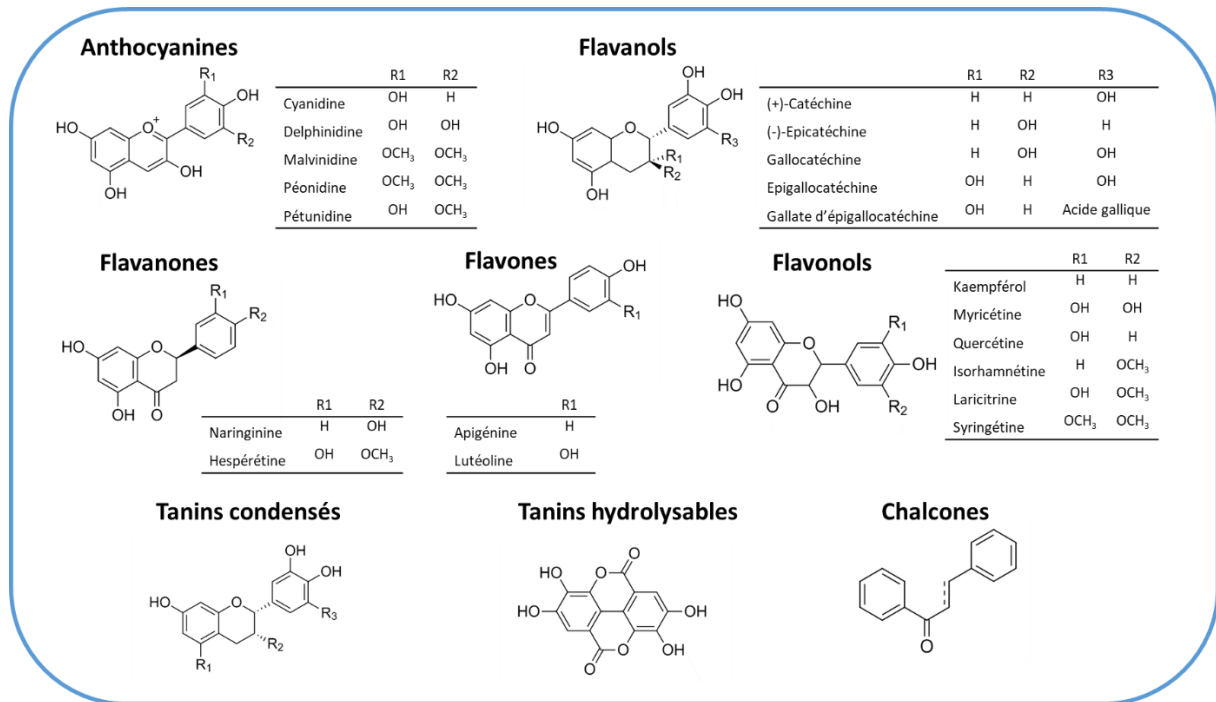


Figure 2.10 : Structure des composés flavonoïdes présents dans le vin. Illustration inspiré de Gutiérrez-Escobar et al., 2021.

2.1.3.b. La famille des non-flavonoïdes

La famille des non-flavonoïdes est composée principalement de polyphénols possédant une structure plus simple que les flavonoïdes. Ils sont majoritairement composés d'acides phénoliques tels que l'acide hydroxybenzoïque, l'acide hydroxycinnamique et les stilbènes (Garrido & Borges, 2013; Visioli et al., 2020). On retrouve ces composés dans des concentrations allant de 60 à 566 mg/L dans les vins rouges (Castaldo et al., 2019). Un récapitulatif de ces composés et leurs structures est disponible à la fin de cette sous-partie, figure 2.11.

Les acides hydroxybenzoïque possèdent une structure C₆-C₁ dérivée de l'acide benzoïque. Les composés majoritaires de cette famille sont l'acide p-hydroxybenzoïque, gallique, vanillique, gentisique, syringique, salicylique et protocatéchine (Moreno-Arribas & Polo, 2009). Dans les vins rouges, on retrouve des concentrations de ces composés dans des gammes allant de valeurs indétectables jusqu'à 218 mg/L (Castaldo et al., 2019). C'est l'acide gallique qui est considéré comme composé phénolique majoritaire dans les vins rouges, servant de précurseur pour les tanins hydrolysables. On retrouve pour ce composé une concentration autour de 70 mg/L pour

les vins rouges, tandis que pour les vins blancs, la concentration sera plus faible, aux environs de 10 mg/L (Waterhouse, 2002).

Les acides hydroxycinnamiques possèdent une structure C₆-C₃, ils proviennent de l'acide cinnamique et sont des composés polyphénoliques majoritaires dans les baies de raisin et sont responsables de brunissement (due à leurs oxydations facilitées) et de l'aromatique du vin. Ce sont aussi des précurseurs de composés phénoliques volatils (Kallithraka et al., 2009). On retrouve ces composés à des concentrations maximales de 30 mg/L pour les vins blancs et de 100 mg/L pour les vins rouges (Visioli et al., 2020), mais certains auteurs ont réussi à trouver des concentrations plus élevées de l'ordre de 130 mg/L pour les vins blancs et de 60 mg/L pour les vins rouges (Waterhouse, 2002). On peut retrouver d'autres formes d'acide hydroxycinnamique présentes dans les vins rouges et blancs tels que l'acide caféique, coumarique, sinapique et férulique, ainsi que leurs formes mono ou di-estérifiées avec les acides organiques, notamment avec l'acide tartrique (Ferreira-Lima et al., 2018).

Les stilbènes sont des composés constitués de deux noyaux aromatiques liés par un groupe éthyle. Les principaux composés retrouvés dans le vin sont le trans-Picéide, le trans-Resvératrol, l'hopéaphénol, l'ampélosine A, l'isohopéaphénol, le picéatannol, le pallidole, l' ϵ -viniférine, le miyabenol C, le r-viniférine et le r²-viniférine (Gorena et al., 2014; Houillé et al., 2015; Lambert et al., 2013; Pawlus et al., 2013). On les retrouve dans des concentrations faibles dans le vin, entre 0 et 5 mg/L (Fernández-Mar et al., 2012). Mais quand les baies de raisin sont soumises à des stress biotiques ou abiotiques, la quantité de certaines formes de resvératrol peut augmenter de façon significative jusqu'à 100 mg/L (Visioli et al., 2020).

Deux autres composés phénoliques antioxydants principalement présents dans l'huile d'olive ont été identifiés dans le vin blanc et rouge : **le tyrosol** et **l'hydroxytyrosol**. Le tyrosol est présent dans le vin blanc à une concentration de 45 mg/L et entre 20 et 60 mg/L pour le vin rouge (Garrido & Borges, 2013). Tandis que l'hydroxytyrosol est présent à des concentrations entre 1,98 et 3,89 mg/L (Boselli et al., 2006; Fernández-Mar et al., 2012). Ce dernier semble être synthétisé durant la fermentation alcoolique (Rodriguez-Naranjo et al., 2011).

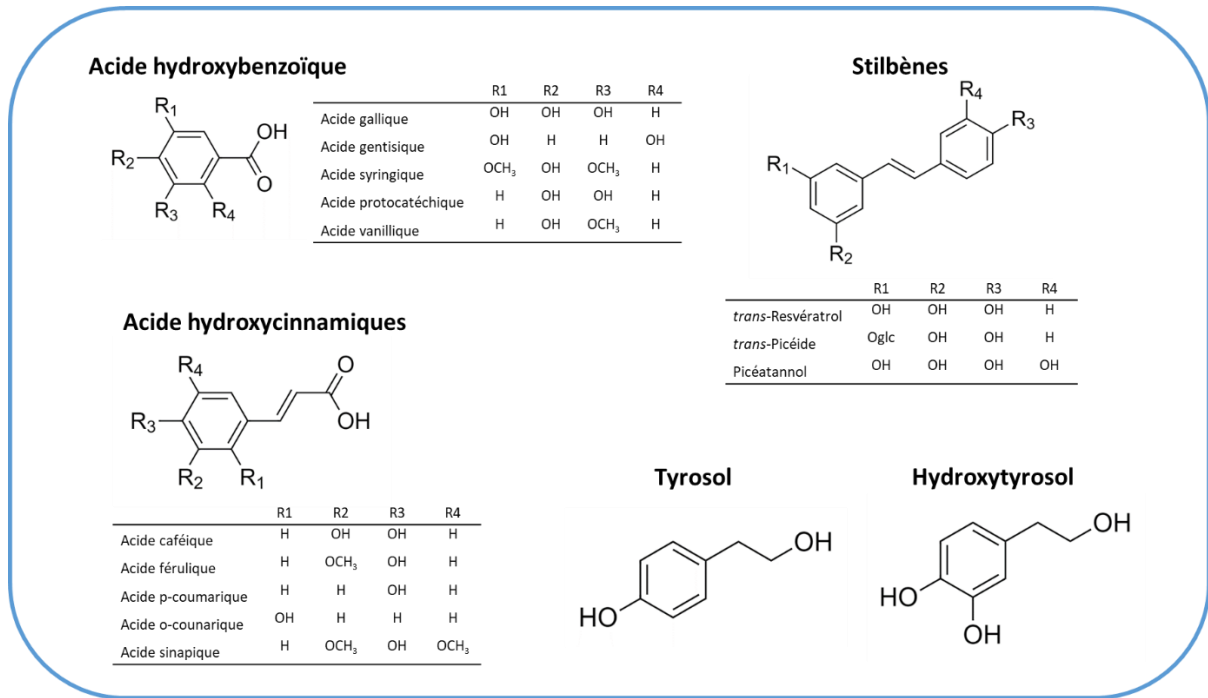


Figure 2.11 : Structure des composés flavonoïdes présents dans le vin. Illustration inspirée de Gutiérrez-Escobar et al., 2021.

2.2. Elaboration d'un vin

La vinification est une suite de processus permettant la transformation du raisin en vin en impliquant certaines transformations à l'aide de bactéries et de levures. Lors de la période des vendanges, on utilise l'échelle de Brix pour pouvoir déterminer la maturation des baies de raisin, définie par la quantité en sucres (g/l) ainsi que d'alcool potentiel (Vol %) dans le jus. L'échelle de Brix sert à mesurer en degrés Brix (°B ou °Brix) la fraction de saccharose dans un liquide. Un °Brix équivaut à 1 gramme de saccharose pour 100 grammes de matière sèche, et plus ce degré est élevé plus l'échantillon est sucré. Il a été suggéré d'utiliser le °Brix x (pH)² comme jauge de maturité (Zoecklein et al., 1999).

Les méthodes de vinification peuvent changer suivant les régions ou les pratiques. Les principales étapes sont décrites ci-dessous dans le cas de l'élaboration des vins rouges et blancs de Bourgogne (figure 2.12).

- I. Egrappage : Séparation des grains de raisins de leurs rafles, ou plus généralement enlèvement des rafles de la vendange avant la mise en fermentation.
- II. Encuvage : Mise en cuve en acier du jus (moût) ou dans des foudres en bois (grappes entières ou égrappées).

- III. Soutirage : Le vin est soutiré dans une cuve ou un fût, les lies sont éliminées.
- IV. Sulfitage : Le vin est sulfité (SO_2) afin de le protéger des micro-organismes qui pourrait le contaminer (ce qui inhibe la fermentation malolactique) et de l'oxydation (le SO_2 bloque les oxydases et capte l'oxygène dissous).
- V. Fermentation alcoolique : transformation des sucres du moût en alcool par les levures. Le moût devient vin.
- VI. Fermentation malolactique : des bactéries lactiques transforment l'acide malique en acide lactique, ce qui diminue l'acidité du vin et le stabilise.
- VII. Assemblages : mélange de différents vins avant l'élevage.
- VIII. Elevage : Le vin est conservé en fût (ou cuve) pendant plusieurs mois, ce qui permet dans le cas du fût d'avoir un échange avec le bois apportant des propriétés organoleptiques au vin.
- IX. Collages : Le vin est clarifié par une colle protéique, minérale ou synthétique qui précipite les particules en suspension.
- X. Filtration, mise en bouteilles.

La principale différence entre l'élaboration d'un vin blanc et rouge réside dans les opérations pré-fermentaires. Les baies de raisin éclatées et dans certains cas les rafles sont ajoutées lors du processus de macération pour le cas de l'élaboration des vins rouges. Puis l'opération de pigeage est effectuée, elle consiste à enfoncer le chapeau de marc (parties solides) dans le moût. Cette étape est essentielle pour extraire les tanins et donner leur couleur aux vins rouges. Pour les vins blancs et l'élaboration du moût, un pressurage est effectué dès la récolte des baies. Cette opération consiste à presser la vendange afin d'en extraire la partie liquide, en vue de la vinification en l'absence des matières solides du raisin. Il peut exister des différences dans l'ordre des étapes de la vinification. Les étapes importantes pour ce sujet de thèse sont la fermentation alcoolique et la fermentation malolactique.

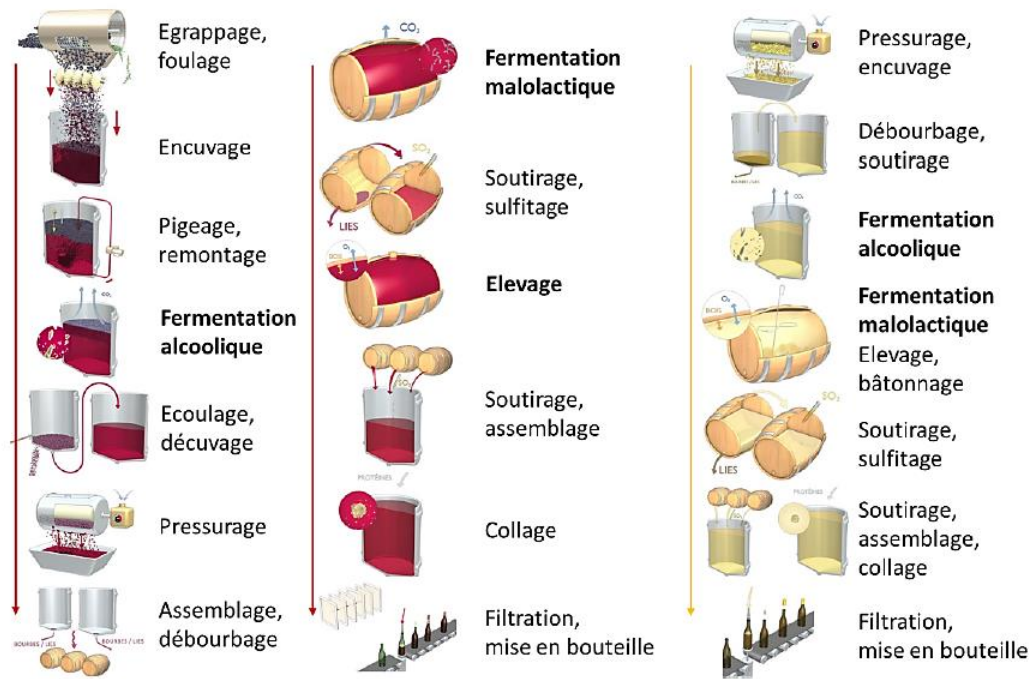


Figure 2.12 : Principes généraux de la fabrication du vin rouge et du vin blanc de Bourgogne (Illustration BIVB).

2.2.1. La fermentation alcoolique (FA)

La transformation des moûts de raisin au cours de la production de vin est le résultat de deux fermentations, qui peuvent survenir successivement ou simultanément. La première fermentation est la fermentation alcoolique (FA). C'est une étape essentielle de la vinification au cours de laquelle les levures consomment les éléments nutritifs du milieu en transformant notamment les sucres en éthanol et en dioxyde de carbone.

2.2.1.a. Les mécanismes de la FA

Durant cette fermentation, les sucres initialement présents dans les baies de raisins sont consommés (100 à 250 g/L (Liu et al., 2006)) jusqu'à une concentration résiduelle plus faible que 2 g/L. Un niveau d'éthanol acceptable (entre 10-14 % v/v) est produit, ainsi que d'autres métabolites (Albergaria & Arneborg, 2016). On peut retrouver beaucoup d'espèces de levures dans les baies de raisins notamment *Brettanomyces*, *Pichia*, *Hanseniaspora* et *Candida* (Renouf et al., 2007). Cependant *Saccharomyces cerevisiae* est la plus efficace pour l'accomplissement de cette étape (Albergaria & Arneborg, 2016; Beltran et al., 2002; Heard & Fleet, 1988; Torija et al., 2001). Les autres espèces ont été testées pour comparer leurs performances respectives, mais aucune autre levure n'est aussi efficace que *S. cerevisiae*. Dans la baie de raisin, sa population est largement minoritaire (Mortimer & Polsinelli, 1999) mais à la suite du

fouillage/pressurage elle sera considérablement favorisée. Cette levure peut se développer rapidement dans des concentrations en sucre supérieures à 200 g/L, mais elle possède aussi une tolérance importante pour réaliser la fermentation dans l'environnement du vin où le pH est acide (3,0 - 3,5) et la concentration en azote faible (150-200 mg/L) (Albergaria & Arneborg, 2016; Beltran et al., 2002; Heard & Fleet, 1988; Torija et al., 2001). Il est important de noter que la souche de levure effectuant la fermentation aura un impact sur le niveau des composés aromatiques et sur la perception de certains caractères fruités (Gammacurta et al., 2017).

Une représentation schématique de la réaction de fermentation alcoolique est présentée dans la figure 2.13 ci-dessous. La levure va métaboliser le glucose et le fructose à travers la glycolyse pour conduire à la formation du pyruvate. Le pyruvate généré est ensuite décarboxylé en acétaldéhyde par l'intermédiaire de la pyruvate décarboxylase. Ce dernier est ensuite réduit en éthanol par l'alcool déshydrogénase.

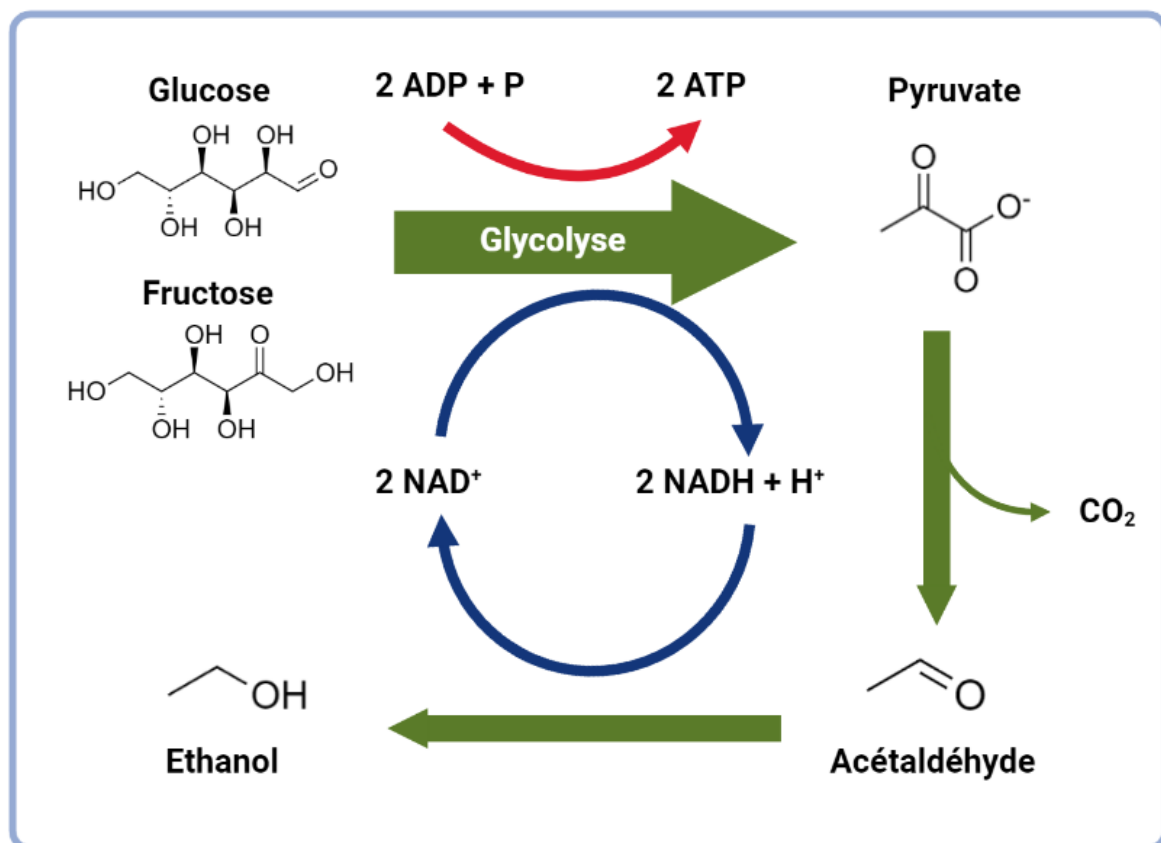


Figure 2.13 : Schéma simplifié des étapes principales de la fermentation alcoolique.

2.2.1.b. Les méthodes de contrôle

La fermentation alcoolique peut démarrer de façon spontanée, c'est-à-dire sans inoculation volontaire, du fait de la présence de levures sur les baies de raisin. Ces fermentations ne sont pas le fait d'une seule espèce et peuvent être déclenchées par plusieurs souches de levures différentes. Le contrôle de la fermentation est en enjeu majeur en œnologie. Mal contrôlée cette fermentation peut en effet entraîner des déviations organoleptiques et des problèmes de fermentations (Ribéreau-Gayon et al., 2007). La majorité des moûts sont ainsi inoculés avec des levains industriels. Une fermentation effectuée dans des conditions optimales permet d'éviter divers problèmes tels que des fermentations lentes, des fermentations languissantes ou bloquées.

Les principaux paramètres régissant le contrôle de la fermentation alcoolique sont : la température, la nutrition des levures et l'apport en oxygène. La température peut varier entre 13°C et 30°C, avec des températures optimales inférieures à 22°C pour les vins blancs et des températures légèrement supérieures pour les vins rouges (Masneuf-Pomarède et al., 2006; Molina et al., 2007; Ribéreau-Gayon et al., 2007; Torija et al., 2001). La nutrition des levures peut être contrôlée via la concentration en azote. Des moûts carencés en azote peuvent engendrer l'arrêt prématuré de la fermentation (Blateyron & Sablayrolles, 2001; Gutiérrez et al., 2012). Si besoin, un complément azoté peut être administré sous forme d'azote ammoniacal. La présence d'oxygène est le dernier paramètre à gérer lors de la fermentation alcoolique. Un manque en oxygène peut affecter la synthèse lipidique des levures (Fornairon-Bonnefond et al., 2003; Salmon et al., 1998), élément essentiel lors de la croissance cellulaire et pour le maintien de l'intégrité membranaire (Deytieux et al., 2005; Fornairon-Bonnefond et al., 2002). Ce manque engendrerait des problèmes dans le déroulement de la fermentation en la bloquant ou la rendant languissante (Blateyron & Sablayrolles, 2001). Il existe plusieurs moyens d'éviter ce type de problème, notamment via l'ajout de levures ou par des systèmes de remontage consistant à pomper la partie liquide de la cuve et de l'arroser, ce qui a pour effet d'oxygéner le moût.

2.2.1.c. Les apports organoleptiques

La fermentation alcoolique produit des métabolites qui auront un rôle sur la qualité organoleptique des vins et leurs propriétés sanitaires (Rainieri & Pretorius, 2000; Ribéreau-

Gayon et al., 2007). Les principaux métabolites fermentaires sont l'acide acétique, le glycérol, l'acide malique et des dérivés soufrés. L'acide acétique et des sous-produits sont produit par la levure pendant la fermentation alcoolique en différentes concentrations selon la souche de levure (Marullo et al., 2004; Patel & Shibamoto, 2002; Remize et al., 2000; Romano et al., 1994; Torrens et al., 2008). L'acide acétique constitue un défaut organoleptique lorsqu'il est présent à des concentrations supérieures à 0,6 g/L, il apportera alors une note vinaigrée (Ribéreau-Gayon et al., 2007). Le deuxième métabolite fermentaire, le glycérol, est retrouvé dans des concentrations variant selon les souches entre 5 et 9 g/L (Ribéreau-Gayon et al., 2007), mais ne participe pas à la qualité du vin (Marchal et al., 2011). Il joue un rôle important dans la régulation redox pendant la fermentation alcoolique. Le troisième métabolite fermentaire, l'acide malique, peut être considéré comme un défaut lorsqu'il est en excès. En effet, l'acidité apportée par cet acide peut être une composante recherchée dans certains cas et à éviter dans d'autres. Pour pouvoir contrôler ce paramètre, il est envisageable de cibler des souches de levures ayant une activité démaliquante (Rankine, 1966) ou acidifiante (Yéramian et al., 2007). Lors de la fermentation, de nombreuses réactions peuvent amener à développer des dérivés soufrés tels que le dioxyde de soufre (SO_2) ou le sulfure d'hydrogène (H_2S). Le H_2S apporte un défaut important au vin sous forme d'odeur d'œuf pourri (Mendes-Ferreira et al., 2009; Swiegers & Pretorius, 2007), tandis que le SO_2 est un composé toxique pour l'homme à des concentrations élevées, ce qui explique sa réglementation lors de la vinification (Freedman, 1980). Le SO_2 est présent sous plusieurs formes dans le vin. Une partie réagit avec les composés carbonylés donnant du bisulfite de carbonyle (SO_2 combiné) et l'autre partie et sous forme libre (SO_2 libre). Le vigneron devra chercher à obtenir une quantité de SO_2 active suffisante, pour préserver le vin, mais avoir à la fois une quantité de SO_2 inactive la plus bas possible. Ce ratio sera dépendant du pH du milieu, de la teneur en éthanol et de la température (Barbe et al., 2000; Divol et al., 2012).

Une fois la fermentation alcoolique terminée, lorsque les levures ont consommé une grande partie des nutriments nécessaires, les levures entrent en phase de déclin et d'autolyse ce qui aura pour effet de stimuler la croissance des bactéries lactiques du vin (Patynowski et al., 2002).

2.2.2. La fermentation malolactique (FML)

La seconde fermentation est la fermentation malolactique (FML) ; elle permet une dégradation de l'acide L-malique en acide L-lactique et est accompagnée d'un dégagement de dioxyde de carbone. Si la FA est essentielle dans la production des vins, ce n'est pas le cas pour la FML. La FML est recommandée dans certaines régions septentrionales de la France (Alsace, Bourgogne, Champagne, Loire), de l'Allemagne ou de l'Est des Etats-Unis où les baies de raisin ont des concentrations élevées en acide malique.

2.2.2.a. Les mécanismes de la FML

Théoriquement, la fermentation malolactique n'est pas à proprement parler une fermentation, une définition plus juste définirait la FML comme la conversion enzymatique de l'acide L-malique en acide L-lactique et CO₂ (voir schéma de la réaction ci-dessous, figure 2.14). Le processus de la FML est initié par des bactéries lactiques du genre *Lactobacillus* et *Oenococcus*. De nos jours, c'est l'espèce *O. oeni* qui est privilégiée pour réaliser la FML (Lasik, 2013; I. López et al., 2007; Maicas, 2001; Versari et al., 1999). Contrairement à d'autres bactéries lactiques, *O. oeni* convertit directement l'acide L-malique en acide L-lactique en une seule étape grâce à l'enzyme malolactique (Kourkoutas et al., 2004; Lonvaud-Funel & de Saad, 1982; Salou et al., 1994). Cette enzyme est composée de deux sous-unités identiques de 60 kDa (Ansanay et al., 1993). Elle a pour cofacteurs le manganèse (Mn²⁺) et le NAD⁺ et les conditions optimales pour son activité sont une température de 20°C et un pH de 5,0 (Lonvaud-Funel & de Saad, 1982; Salou et al., 1994). Il y a présence d'inhibiteurs compétitifs de l'enzyme malolactique dans le vin tels que les acides succinique, citrique et tartrique. Mais il y a aussi présence d'inhibiteurs non-compétitifs tels que l'acide L-lactique et l'éthanol (Lonvaud-Funel & de Saad, 1982; Naouri et al., 1990).

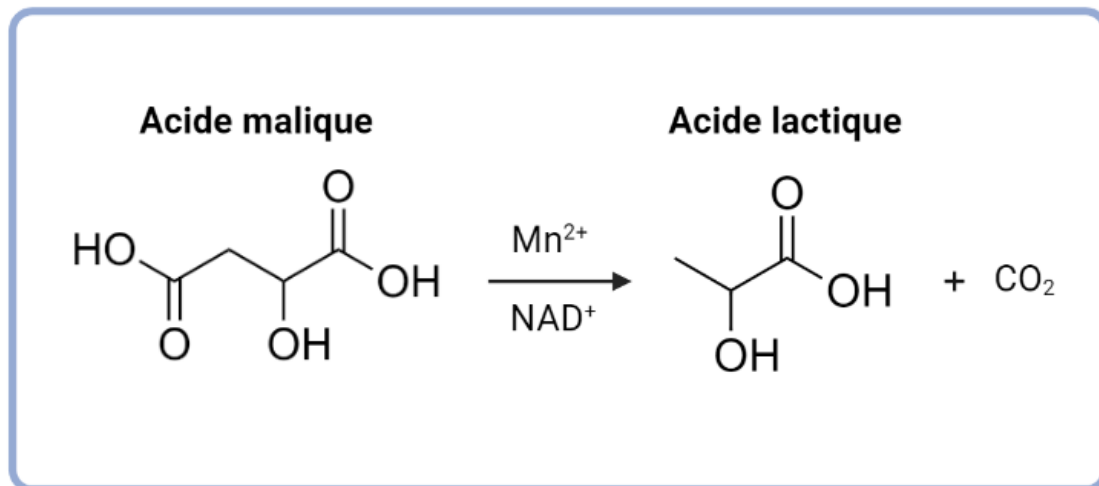


Figure 2.14 : Equation simplifiée de réaction pour la fermentation malolactique.

L'acide L-malique peut entrer de deux façons dans la cellule de *O. oeni* (voir schéma récapitulatif, figure 2.15). Sachant que les pKa de cet acide sont : $pK_{a1} = 3,46$ et $pK_{a2} = 5,10$. Pour une valeur de pH faible, l'acide L-malique sera sous forme protonée soit neutre. Dans cette forme, l'acide pénètre dans la cellule par diffusion passive à travers la membrane. Le transport passif représente 50 % à pH 3,2 tandis que pour des valeurs de pH supérieures à 4,5 le transport passif est de 0 % (Tourdot-Maréchal et al., 1993). L'acide lactique et les protons (H^+) produits lors de la décarboxylation de l'acide malique vont augmenter progressivement le pH du milieu extracellulaire et permettre l'ionisation de l'acide malique. Celui-ci se déprotone, ce qui empêche son passage via le transport passif au fur et à mesure de l'ionisation. L'acide L-malique rentre principalement sous forme anionique (anion malate) par transport actif via la malate-perméase. Une fois à l'intérieur de la cellule, l'acide L-malique est décarboxylé par l'enzyme malolactique en acide L-lactique et en CO_2 .

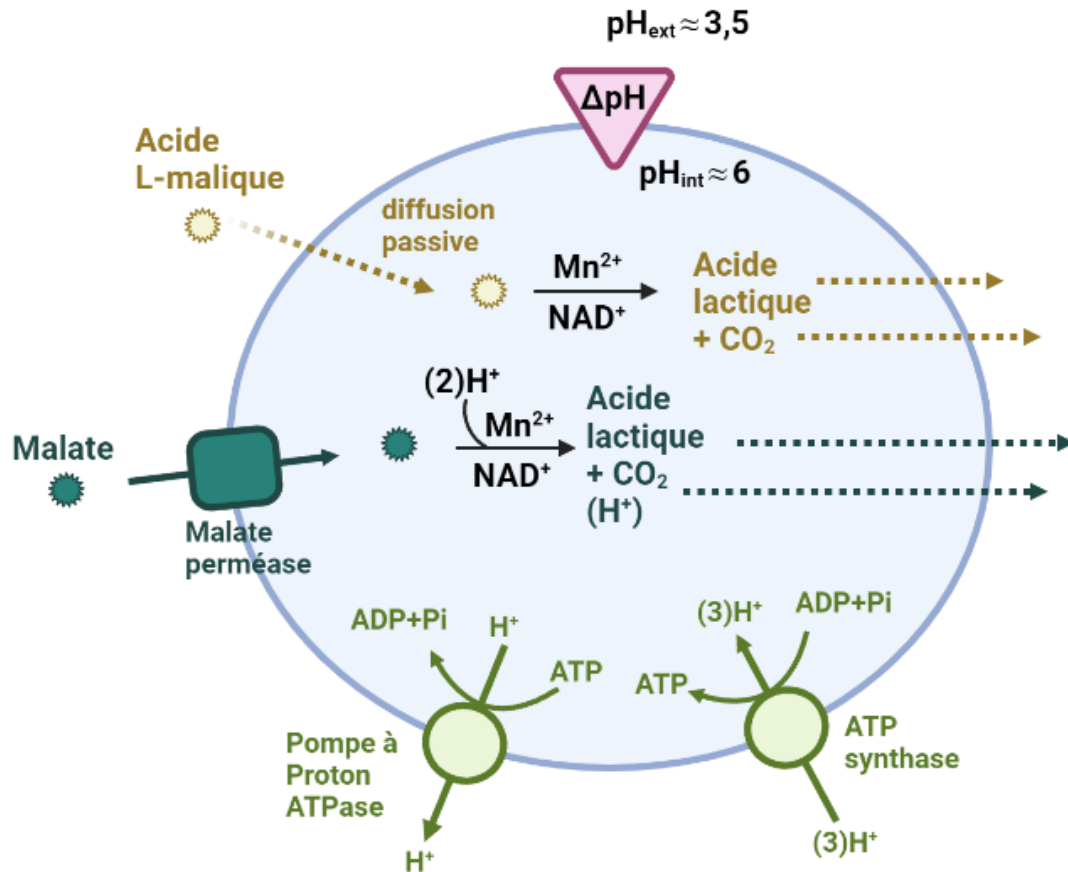


Figure 2.15 : Transport de l'acide L-malique dans la une cellule de *O. oeni* et le rôle de la FML dans le maintien du pH interne. Schéma réalisé à partir de Bartowsky, 2005; Bastard, 2015; Bouix & Ghorbal, 2015; Breniaux, 2018; Loubiere et al., 1992; Salema et al., 1994; Tourdot-Maréchal et al., 1993

2.2.2.b. Les méthodes de contrôle

Le déclenchement de la FML peut être spontané, mais reste imprévisible. Elle débute en général après la fin de la fermentation alcoolique. Il est aussi possible dans certains cas de lancer les deux fermentations en même temps. Dans certains vins, la FML se déclenche difficilement, principalement due fait d'un fort potentiel d'inhibition de l'éthanol et de l'acidité du vin. Une fermentation lancée simultanément (FA et FML) permet une meilleure conversion de l'acide malique en acide lactique. Les vins issus de ce type de fermentations simultanées sont immédiatement prêts pour différentes procédures telles que le soutirage, la clarification et le sulfitage. Ceci permet l'amélioration de la stabilité microbienne. Mais malgré les forts intérêts pour cette méthode, son application est limitée du fait d'appréhensions concernant la qualité du vin produit et le peu d'études actuelles (Lasik, 2013). On choisit donc principalement d'effectuer la FML à la fin de la fermentation alcoolique. Lorsqu'elle se produit spontanément

la FML peut mettre un certain délai avant de se déclencher. La quantité initiale d'acide malique, la population de *O. oeni* et les conditions environnementales plus ou moins favorables à l'activité bactérienne influencent la cinétique de la FML. Il arrive que la FML se lance tardivement, mais il est alors possible de résoudre cette problématique de diverses façons. Il est ainsi possible d'inoculer les lies provenant d'un fermenteur ayant presque terminé sa FML dans un autre fermenteur où la FML n'a pas encore débuté. Il est aussi possible d'avoir recours à des assemblages entre fermenteurs où la FML a eu lieu et ceux où la FML n'a pas encore débuté. Bien évidemment, cette méthode n'est applicable que si les vins peuvent être assemblés et qu'il n'y a pas de restrictions d'appellations.

Les problèmes liés au blocage de la FML sont moins récurrents aujourd'hui, notamment grâce à une meilleure maîtrise des conditions de vinification et en particulier au contrôle de la température et du sulfitage. Dans le vin, la température optimale pour la croissance d'*O. oeni* et la réalisation de la FML est d'environ 20 °C. Une température trop élevée peut ralentir la FML et favoriser la contamination par d'autres bactéries. La quantité de sulfite et notamment de SO₂ libre est toxique pour la cellule. Comme expliqué précédemment, le vigneron doit alors gérer le pH et surtout la concentration en dioxyde de soufre libre dans le vin pour pouvoir éviter des retards de FML dû à l'inhibition de la croissance des bactéries lactiques (Carreté et al., 2002; Fang & Dalmasso, 1993; Guzzo et al., 1998).

2.2.2.c. Les apports organoleptiques

L'effet principal de la fermentation malolactique est la diminution de l'acidité totale qui est due au remplacement d'un diacide par un monoacide, ce qui entraîne une légère augmentation de pH. Au niveau organoleptique, la FML donc conduit au remplacement du goût vif apporté par l'acide malique par un goût doux et léger de l'acide lactique et apporte une stabilité microbiologique (Davis et al., 1985; Maicas et al., 1999; Wibowo et al., 1985). Mais la FML ne se résume pas à une simple diminution de l'acidité, les bactéries lactiques responsables de la FML participent également à la « complexité du vin ». En effet, les souches des bactéries lactiques influencent la production de produits secondaires tels que les acides, les esters, les aldéhydes, les phénols, etc. qui participent à cette « complexité aromatique » en apportant des arômes de fruits et de fleurs (Davis et al., 1986; Hernandez-Orte et al., 2009; Izquierdo Cañas et al., 2008; Maicas et al., 1999; Ramos et al., 1995; Sagui & Manca de Nadra, 1996; Versari et

al., 1999). Bien que la contribution de chaque composé aux caractéristiques sensorielles n'est pas entièrement connue, il est généralement admis que ceux-ci ont un impact positif sur les qualités organoleptiques du vin (Sauvageot & Vivier, 1997). La FML permet également d'éliminer certaines molécules aux arômes désagréables. *O. oeni* participe ainsi à la dégradation de l'acétaldéhyde, sous-produit de la FA et considéré comme indésirable. Cette dégradation permet aussi de diminuer les doses de sulfites nécessaires à stabiliser le vin (Jackowetz & Mira de Orduña, 2012; Osborne et al., 2000, 2006).

2.3. Utilisation des techniques de fluorescence dans le domaine viticole

Comme montré dans la partie 2.1. de ce manuscrit, les baies de raisin et le vin sont constitués de nombreuses familles de composés. Parmi les constituants présentés, on retrouve des familles d'espèces chimiques capables de générer un phénomène de fluorescence. Ces composés sont principalement des espèces phénoliques, présentant des groupes fonctionnels (noyau aromatique et liaisons conjugués) induisant une importante autofluorescence dans le vin. Cependant, comme décrit précédemment, l'évolution au cours de la vinification et les propriétés du vin fini ne dépendent pas uniquement des composés phénoliques, les sucres et les acides organiques sont tout autant importants. Toutes ces espèces interagissent ensemble et leurs interactions sont essentielles pour pouvoir réaliser le produit final attendu. Ces familles de composés et leurs interactions sont amenées à évoluer au cours du processus de vinification, et induisant des changements des propriétés de fluorescence, et suivre cette évolution semble être un bon moyen d'évaluer les changements physico-chimiques au cours des procédés de vinification.

Dans le domaine agroalimentaire, les techniques de fluorescence sont utilisées sur diverses matrices d'intérêts, comme par exemple le lait ou l'huile, avec principalement l'authentification ou le contrôle de ces matrices par l'utilisation de sondes fluorescentes intrinsèque ou extrinsèque (Ayala et al., 2020; Karoui et al., 2005; Sikorska et al., 2019). Aujourd'hui de nombreux appareils et techniques associées permettent d'étudier l'évolution du profil physico-chimique d'un vin au cours des procédés de vinification. Parmi elles, la spectroscopie stationnaire ainsi que les empreintes 3D attribuées aux composés fluorescents des vins sont déjà très utilisées par de nombreux laboratoires. C'est une technique qui a fait ses preuves et qui est souvent combinée à un algorithme de décomposition (PARAFAC). Elle permet de nombreuses applications telles que : la discrimination de vins par des changements de pH induits (Saad et al., 2016), selon

leurs cépages ou encore selon leurs origines grâce à des algorithmes (Airado-Rodríguez et al., 2009; Azcarate et al., 2015; Dufour et al., 2006; Ranaweera et al., 2021a, 2021b; Sádecká & Jakubíková, 2020). La spectroscopie stationnaire permet également de suivre le comportement de certains vins suite à l'ajout de composés d'intérêts (Coelho et al., 2015), mais aussi de déterminer la qualité des vins (Elcoroaristizabal et al., 2016), et peut être envisagée comme outil de contrôle (Airado-Rodríguez et al., 2011).

Il est possible d'envisager le couplage de techniques d'analyse avec les mesures de fluorescence, la plupart du temps le couplage est réalisé avec les techniques de chromatographie liquide pour affiner la détection de certains composés d'intérêts (Carando et al., 1999; Hernández et al., 2006; Viñas et al., 2000; Vitrac et al., 2002), mais il est aussi possible de coupler avec d'autres méthodes telles que l'électrophorèse capillaire ou la spectroscopie de masse, l'apport multidimensionnel permettant d'améliorer les algorithmes de discrimination de vin par rapport à leurs cépages ou origines (Ranaweera et al., 2021b; Ríos-Reina et al., 2020).

La spectroscopie résolue dans le temps donnant accès aux temps de vie de fluorescence des composés est une technique moins répandue que la spectroscopie stationnaire dans le domaine viticole, mais trouve cependant quelques applications, notamment dans le développement de sondes et l'évolution de complexes possédant une fluorescence caractéristique (Trivellin et al., 2018), ou dans l'interaction de complexes (Trigueiro et al., 2018), ou encore dans l'étude approfondie de certains états excités de molécule d'intérêt (Silva et al., 2019).

Le couplage de la spectroscopie de fluorescence avec l'étude des temps de vie de fluorescence n'avait encore jamais été utilisé dans ce domaine, à notre connaissance. Or, le couplage de ces techniques permet d'obtenir de nouvelles données que la spectroscopie stationnaire seule ne peut apporter.

3. Généralités sur les spores bactériennes

3.1. Qu'est-ce qu'une spore bactérienne ?

Dans des conditions défavorables (essentiellement dû à la privation de ressource carbonée), certaines espèces de bactéries du genre *Bacillus* ou *Clostridium* sont capables de produire une forme de résistance appelée endospore. Cet état correspond à une forme dormante de la bactérie et permet de résister à des conditions environnementales extrêmes (P. Setlow, 2005). Dans le cadre de ce projet, nous utiliserons la bactérie *Bacillus subtilis* qui est l'organisme de référence dans l'étude des spores bactériennes du fait qu'il est l'organisme le plus étudié, son génome étant par ailleurs complètement analysé et documenté.

3.1.1. La sporulation

3.1.1.a. L'origine de la sporulation

Pour pouvoir survivre face à des conditions défavorables, la bactérie peut procéder à la formation de la spore grâce au processus appelé « sporulation ». L'initiation de la sporulation nécessite la présence de certaines conditions telles que l'épuisement d'une source de nutriment et une densité cellulaire importante (Errington, 1993; Gauvry et al., 2017; Grossman & Losick, 1988; Hoch, 1993; Parker et al., 1996; Piggot & Hilbert, 2004; Stephens, 1998). Ces deux déclencheurs peuvent conduire à l'activation par phosphorylation de la molécule régulatrice de la sporulation : Spo0A. Le facteur de transcription Spo0A et notamment son degré de phosphorylation permet d'induire l'entrée en sporulation (Stephens, 1998). Un degré de phosphorylation élevé induira la sporulation (D. López et al., 2009), tandis qu'un faible degré de phosphorylation entraînera plutôt la formation de biofilms ou du cannibalisme (González-Pastor, 2011). La lyse de cellules qui ne sont pas encore entrées sporulation, via différents enzymes, permet de libérer des nutriments. Ceci permettra aux cellules ayant initié le processus de sporulation de continuer leur cycle plutôt que de le terminer prématurément.

Pour les bactéries du genre *Bacillus*, c'est principalement le manque de carbone, d'azote et de phosphore (Sonenshein, 2000), mais aussi le manque en minéraux et en acides aminés qui peut induire la sporulation (Gauvry et al., 2017). La sporulation est déclenché par une cascade de réactions, entraînant la phosphorylation d'une protéine à l'initiation de la sporulation, Spo0A (Fujita & Losick, 2005; Piggot & Hilbert, 2004; Sonenshein, 2000). Tandis que l'appauvrissement en nutriments stimule la production de Spo0A, la densité cellulaire va

permettre de favoriser l'activation de Spo0A par phosphorylation (Hoch, 1976; Stephens, 1998; Strauch et al., 1990).

3.1.1.b. Les étapes de la sporulation

La sporulation étant un processus long (8 à 10 heures pour être complété (de Hoon et al., 2010)) et coûteux en énergie, il est nécessaire que le stress soit suffisant pour enclencher ce dernier recours de survie de la bactérie (Errington, 2003). Ce processus peut être décomposé en 7 étapes présentées ci-dessous (figure 2.16) et débute avec la cellule végétative considérée comme **l'étape I**.

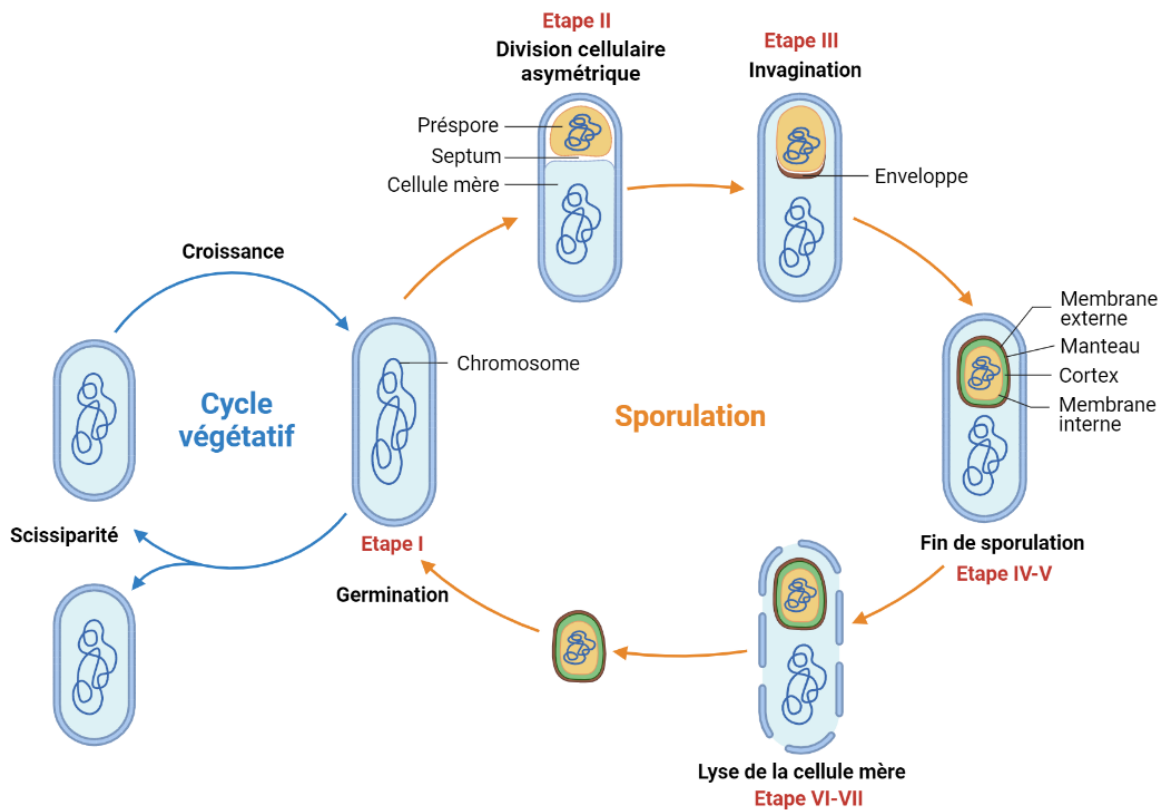


Figure 2.16 : Schéma simplifié des étapes du cycle de sporulation et de germination chez l'espèce *B. subtilis* d'après McKenney et al., 2013.

Etape II : La première étape est une division cellulaire asymétrique, par création d'un septum. Le septum de division pendant la sporulation contient une fine couche de peptidoglycane séparant ainsi les deux compartiments (Higgins & Dworkin, 2012). Cette division va alors séparer la cellule en deux compartiments : un petit compartiment qui va devenir la préspore et

un plus grand compartiment, la cellule mère qui sert à nourrir et à construire la préspore jusqu'à la sporulation complète.

Étape III : Le septum commence ensuite à s'incurver et est finalement complètement intégré à la cellule mère. Il s'agit de l'invagination, correspondant à l'étape III. La préspore est englobée par la cellule mère dans un processus ressemblant à la phagocytose (Higgins & Dworkin, 2012; McKenney et al., 2013; Morlot et al., 2010; Pogliano et al., 1999). Après l'achèvement de l'invagination, la préspore est libre dans la cellule mère et est entièrement entourée par deux membranes, internes et externes. C'est à ce moment que le processus de sporulation est irréversible (Higgins & Dworkin, 2012; Parker et al., 1996).

Étape IV-V : Une série de structures protectrices est assemblée autour du noyau de la spore (protoplasme). Le cortex, un peptidoglycane modifié, est synthétisés entre les deux membranes de la préspore (Popham, 2002). Simultanément, un minimum de 70 protéines de manteau sont synthétisées dans la cellule mère, se structurent en couches et se referment sur la spore pour former une structure en multicouches : le manteau (Henriques & Moran, Jr., 2007; McKenney et al., 2010). En même temps que la formation du cortex, plusieurs phénomènes se déroulent dans la préspore tels que la condensation des acides nucléiques, la synthèse des enzymes d'hydrolyse du cortex et de nombreuses protéines (B. Setlow et al., 1991). La préspore à ce stade perd de l'eau et des ions comme le potassium (K^+), ce qui suscite une forte diminution du volume et une baisse du pH d'environ d'une unité (Magill et al., 1994). Cette diminution s'accompagne de l'absorption de cations (Ca^{2+} , Mg^{2+} ou Mn^{2+}) et d'acide dipicolinique (DPA), précédemment synthétisé et accumulé par la cellule mère, principalement sous forme de complexe avec les ions Ca^{2+} . Le DPA et plus précisément la forme CaDPA est une molécule unique aux spores bactériennes impliquées dans de nombreux mécanismes de résistance, ces fonctions et implications seront détaillés plus tard dans cette partie.

Étape VI-VII : Il n'y a plus de changements morphologiques durant ces étapes. Cependant, c'est au cours de ces étapes que les propriétés caractéristiques de la résistance au stress se finalisent. Cette étape est appelée « maturation ». Lors de la dernière étape, la cellule mère se lyse pour libérer la spore mature (Errington, 2003; Leggett et al., 2012). Cette spore libérée peut rester dans un état de dormance sur de très longues périodes de temps (jusqu'à plusieurs années) (Errington, 2003) représentant la forme de vie la plus résistante sur notre planète (Nicholson et al., 2000). Cependant, lors d'expérimentations sur les propriétés de résistance au stress, l'importance de la dernière étape a été démontrée. En effet, une spore récoltée

directement après sa libération sera moins résistante à certains stress qu'une spore récoltée au minimum 24 h plus tard. Cette propriété semble être liée à une maturation supplémentaire de l'enveloppe (Sanchez-Salas et al., 2011).

Dès que des conditions environnementales sont favorables à la production de cellules végétatives, la spore quittera son état de dormance. Ce processus est connu sous le nom de germination et est déclenché par la présence de nutriments dans l'environnement (P. Setlow, 2003). Les nutriments sont détectés par des récepteurs spécifiques de la membrane et permettent la réhydratation du noyau, l'hydrolyse du cortex et la perte du manteau. Déclenchant ainsi la réplication de l'ADN et le cycle végétatif (de Hoon et al., 2010).

3.1.1.c. Effets des paramètres environnementaux sur la sporulation et les conséquences engendrées

Le processus de sporulation est dépendant des paramètres environnementaux qui induisent des changements métaboliques selon les différents stress endurés par la bactérie. Des conditions optimales permettent un bon développement de la bactérie, soit une bonne croissance (qui est impliqué dans la sporulation). Les principaux stress environnementaux auxquels la bactérie peut être soumise sont : la température, le pH, l'osmolarité, l'oxydation, le manque de certains minéraux ou nutriments.

La température : L'efficacité de la sporulation est hautement impactée par la température dans laquelle la sporulation se déroule. Une température basse induit une faible sporulation et augmente le temps pour compléter ce processus (Baril et al., 2012). Une température non-optimale induit des changements dans la composition en acides gras des membranes de la cellule. Une température basse induit la production d'acides gras ramifiés et insaturés ce qui augmente la fluidité de la membrane interne de la spore (Diomandé et al., 2015).

Une sporulation de *B. subtilis*, déroulée à 20 °C, induira une plus grande production de protéines Spo0A qu'une sporulation faite à 37 °C (Méndez et al., 2004), ce qui laisserais penser que la sporulation serait plus importante à cette température. Cependant, la sporulation est moins efficace à ces faibles températures comparées à celle réalisée à 37 °C, qui est plus rapide et on obtient une plus grande concentration finale en spore.

La composition en eau et en acide dipicolinique (DPA) peut également être affectée par la température de sporulation. L'augmentation de la température conduit à la diminution en eau

dans le protoplaste de la spore (Melly et al., 2002). La quantité de DPA augmente avec la hausse de température dans les spores de *B. cereus* et *B. anthracis*, mais pas pour les spores de *B. subtilis* (Baweja et al., 2007; Melly et al., 2002; Planchon et al., 2011).

Le pH : Le pH est un paramètre important dans la croissance de la bactérie. Le changement en pH, pour des valeurs en dessous et au-dessus des valeurs standards, a un impact sur la quantité de spores et le temps de sporulation. Par exemple, pour une culture de spores de *B. subtilis*, une concentration maximale de $2,5 \cdot 10^9$ spores/mL est obtenues pour un pH 8. Tandis que pour des cultures réalisées à un pH 10 et 6, il est obtenu respectivement une concentration de $1,6 \cdot 10^7$ et $1,5 \cdot 10^5$ spores/mL. Les temps de sporulation passent de 3 jours pour la culture à pH 8 à 20 jours pour les deux autres pH (Nguyen Thi Minh et al., 2011).

Il est possible qu'un faible pH induise une augmentation en espèces réactives à l'oxygène, ce qui réduirait l'expression d'un facteur nécessaire à la sporulation (Cosby & Zuber, 1997).

L'activité de l'eau : Tout comme le pH, l'activité de l'eau est un paramètre important dans la croissance de la bactérie et dans la sporulation. L'activité de l'eau peut être définie comme rapport de la pression partielle de vapeur d'eau sur la pression de vapeur de l'eau pure, ou en fonction de l'humidité relative moyenne.

$$a_w = \frac{\rho}{\rho_0} = \text{ERH} (\%) / 100 \quad (2.22)$$

Où ρ est la pression partielle de vapeur d'eau ; ρ_0 est la pression de vapeur de l'eau pure ; ERH est l'humidité relative moyenne.

Ce paramètre physico-chimique peut être mesuré via un A_w -mètre utilisant différentes techniques telles que l'hygrométrie, l'abaissement du point de congélation ou encore la méthode du point de rosée. Un moyen simple de faire varier ce paramètre est l'utilisation de dépresseurs tels que le glycérol ou encore des solutions de sels saturés.

Pour une culture standard à une concentration totale de $2,5 \cdot 10^9$ spores/mL. Une diminution de a_w à 0,950, avec deux dépresseurs le glycérol et le NaCl, donne respectivement une concentration totale de $2,8 \cdot 10^8$ et $8,8 \cdot 10^7$ spores/mL. Les temps de sporulation passent de 3 jours pour la culture standard à 17 jours pour les deux dépresseurs (Nguyen Thi Minh et al., 2011). Une activité de l'eau trop basse bloquera la sporulation due au choc osmotique (Nguyen Thi Minh et al., 2011; Ruzal et al., 1998).

L'abaissement de l'activité de l'eau modifie la morphologie de la spore, une diminution de

l'activité de l'eau diminuera le diamètre moyen des spores ainsi qu'une diminution de la production de protéines montrant un impact sur les couches externes de la spore (Nguyen Thi Minh et al., 2008).

L'aération : La quantité d'oxygène présente dans le milieu de sporulation est importante pour le rendement de sporulation. Pour de nombreuses espèces du genre *Bacillus*, la sporulation est hautement reliée à la quantité d'O₂ (Avignone-Rossa et al., 1992). Une fois le processus de sporulation déclenché, il se poursuit jusqu'à la fin même si l'apport en oxygène est interrompu (Sarrafzadeh & Navarro, 2006).

Les minéraux et nutriments : La composition en minéraux du milieu affecte le processus de sporulation ainsi que les propriétés des spores. Une carence en calcium stoppe la production des spores de *B. subtilis*. Pour des carences en calcium peu prononcées, permettant la sporulation, les spores ainsi produites seront plus petites que celles produites dans un milieu standard (Nguyen Thi Minh et al., 2011).

Les minéraux présents dans le milieu de culture jouent un rôle important dans la résistance des spores à la chaleur. En effet, l'ajout de Ca²⁺, Mg²⁺, Mn²⁺, Fe²⁺ et K⁺ dans le milieu permet la production de spores plus résistantes à la chaleur que des spores produites dans un milieu avec uniquement Mn²⁺ (Cazemier et al., 2001). Chez l'espèce *B. subtilis*, la déminéralisation des spores induit une résistance aux pressions plus importantes, puis diminue après re-minéralisation avec les ions Ca²⁺ et Mg²⁺, mais ne change pas après re-minéralisation avec les ions Mn²⁺ et K⁺ (Igura et al., 2003). La même étude montre aussi que la déminéralisation des spores entraîne une réduction de la résistance au traitement thermique et que la re-minéralisation induit une augmentation de leur thermorésistance. Tandis que la production dans un milieu carencé en calcium induit une production de spore de *B. subtilis* plus thermosensibles que celles produites dans un milieu standard (Nguyen Thi Minh et al., 2011).

3.1.2. Structure et composition de la spore

La structure des spores bactériennes est bien différente des cellules végétatives. La spore bactérienne est constituée de différentes couches qui lui confèrent des propriétés de résistances uniques. Ces propriétés de résistance ne sont pas seulement dues aux nombreuses couches, mais sont dues aussi influencées par la composition du protoplaste.

Comme présentée sur la figure 2.17, la spore bactérienne se compose de différentes couches telles que : l'exosporium (absent chez *B. subtilis*), le manteau, la membrane externe, le cortex, la paroi de la cellule germante, la membrane interne et le protoplaste.

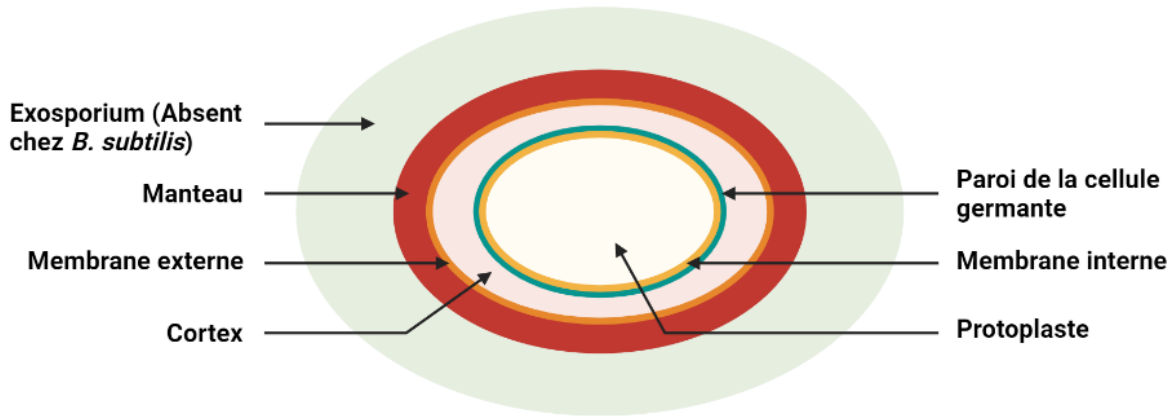


Figure 2.17 : Schéma général de la structure de la spore bactérienne. Les échelles des différentes structures ne sont pas respectées). Le diamètre d'une spore bactérienne est d'environ 1 μm .

L'exosporium : Cette structure principalement protéique est présente uniquement chez certaines espèces de *Bacillus*, comme *B. cereus*, *B. anthracis* ou *thurengiensis* (Aronson & Fitz-James, 1976; Beaman et al., 1972; Hachisuka et al., 1984; Kozuka & Tochikubo, 1985; Redmond et al., 2004; Todd et al., 2003). Mais dans le cas de *B. subtilis* l'exosporium est absent. Cette structure est principalement constituée de lipides, polysaccharides et de protéines (Leggett et al., 2012; Matz et al., 1970; P. Setlow & Johnson, 2007). La fonction de cette première couche de la spore bactérienne n'est pas encore mise en évidence, elle pourrait servir de résistance contre des traitements chimiques et enzymatiques, et prodiguer à la surface de la spore des propriétés hydrophobes qui augmenteraient ses propriétés d'adhésion (Kozuka & Tochikubo, 1985; Takumi et al., 1979).

Le manteau : Le manteau est organisé en deux parties : l'enveloppe interne et l'enveloppe externe. L'enveloppe interne est constituée de 3 à 6 fines lamelles juxtaposées, alignées à la surface de la spore, pour une épaisseur de 20 à 30 nm. L'enveloppe externe, elle, est constituée de 4 à 5 stries denses au passage des électrons, toutes alignées parallèlement à la surface de la spore, et avec une épaisseur de 40 à 90 nm (Henriques & Moran, Jr., 2007). Les couches du manteau sont principalement composées de protéines, environ 50 à 80% de la totalité des

protéines de la spore (Aronson & Fitz-James, 1976; Pandey & Aronson, 1979), pour un total d'environ 70 protéines (Henriques & Moran, Jr., 2007; Kim et al., 2006). Le manteau de la spore est important pour la résistance de la spore vis-à-vis de stress par des agents chimiques. Le manteau protège notamment contre les enzymes de dégradation du peptidoglycane, tel que le lysozyme qui provoque une hydrolyse entraînant soit la mort de la spore soit sa germination. Cette résistance au lysozyme est très utile dans certains environnements, puisque les enzymes hydrolysant les peptidoglycanes sont produits par des bactériophages et autres micro-organismes. L'implication des protéines du manteau dans les différents mécanismes de résistance est aujourd'hui encore mal comprise. Mis à part la protéine CotA laccase qui intervient dans la protection contre le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (Henriques & Moran, Jr., 2007), le rôle d'aucune autre protéine du manteau n'a été définis.

Le manteau sert également de voie de passage obligatoire pour les agents de germination et module ainsi la germination de la spore. Le manteau est lysé lors de la germination.

La membrane externe : La membrane externe se trouve sous le manteau. C'est une membrane phospholipidique très poche de la membrane des cellules végétatives. Elle est inversée du fait de sa formation par invagination. Sa fonction exacte demeure encore incertaine, cependant cette membrane est essentielle à la formation de la spore sans pour autant être une barrière de perméabilité de la spore. Son identification est complexe, mais des tests biochimiques ont prouvé sa présence dans la spore mature (Leggett et al., 2012). Cette membrane ne semble pas avoir de rôle particulier dans la résistance des spores aux radiations, à la chaleur ou à certains agents chimiques (Nicholson et al., 2000; P. Setlow, 2006), et elle disparaît lors de la germination.

Le cortex : Le cortex est principalement composé de peptidoglycanes (PG), presque similaire aux PG de la paroi des cellules végétatives. Mais présente quelques modifications notables spécifiques aux spores, notamment l'absence totale d'acide téichoïque dans les résidus d'acide N-acétylmuramique (NAM) dans les PG des spores (Atrih et al., 1996; Leggett et al., 2012). Les PG des cellules végétatives de *B. subtilis* sont constitués de N-acétylglucosamine (NAG) et de résidus NAM (Warth & Strominger, 1971), où 40 % des résidus NAM sont réticulés à d'autres brins glycanes via leur chaînes latérales peptidiques (Popham & Setlow, 1993; Warth & Strominger, 1971). Dans les PG du cortex de la spore, 50% des résidus de NAM n'ont pas de chaînes latérales et sont à la place cyclisés pour former d'autres résidus spécifiques aux spores, les acides muramiques γ -lactame, tandis que 25% des résidus NAM qui n'ont qu'une

chaîne latérale L-alanine (Warth & Strominger, 1969, 1972). Ces deux modifications de NAM réduisent considérablement la réticulation entre peptides et brins glycanes (Popham, 2002), seulement 3% des résidus NAM de spores contiennent des chaînes latérales peptidiques qui sont réticulées, soit environ 11 fois moins que dans la paroi d'une cellule végétative (Atrih et al., 1996; Leggett et al., 2012; Popham et al., 1996).

Le cortex joue un rôle essentiel dans la déshydratation et le maintien de l'état déshydraté du protoplaste, paramètre important dans la résistance des spores au stress thermique. Cependant, les mécanismes de déshydratation ne sont pas encore totalement compris (P. Setlow, 2006). Le degré de réticulation dans les spores a été identifié comme un possible mécanisme responsable de la faible hydratation du protoplaste et de son maintien. Le cortex constitue une couche de la spore qui apporte une résistance mécanique face à la forte pression osmotique générée par la concentration importante en soluté dans le protoplaste (Meador-Parton & Popham, 2000; Popham, 2002; Zhang et al., 2012).

Entre le cortex et la membrane interne, se situe la **paroi de la cellule germante**. Cette couche de PG ne contient pas de MAL, ce qui lui permet de rester intacte au cours de la germination et formera la paroi de la future cellule végétative lors de la germination.

La membrane interne : La membrane interne est une membrane qui deviendra la membrane plasmique de la cellule végétative après sa germination. Cette membrane est probablement dans un état très compacté dans la spore bactérienne (Cowan et al., 2004). Sa composition en lipides est similaire à celle de la membrane plasmique des cellules végétatives (Griffiths & Setlow, 2009; Leggett et al., 2012). Les lipides de la membrane interne sont en grande partie immobiles et deviennent mobiles lors de la germination des spores (Cowan et al., 2004). Par contre, sa composition en protéines est différente de celle des cellules végétatives (Leggett et al., 2012).

Cette zone de la spore est importante du fait des récepteurs de la germination localisés sur la membrane (Paidhungat & Setlow, 2001; P. Setlow, 2003). Elle constitue une importante barrière de perméabilité et protège le protoplaste de la spore des produits chimiques, et en particulier ceux pouvant altérer l'ADN (P. Setlow, 2006). La faible perméabilité de cette membrane participe aussi au maintien de l'état déshydraté du protoplaste.

Le protoplaste : La couche centrale de la spore bactérienne, elle contient la plupart des enzymes, des protéines de la spore et l'ADN comme une cellule végétative. Le protoplaste possède deux propriétés biochimiques propres à la spore (P. Setlow, 2006).

Le protoplaste de la spore présente ainsi une faible teneur en eau, seulement 27 à 55% du poids humide de la spore, comparé au 75 à 80% d'eau présent dans la cellule végétative (Gerhardt & Marquis, 1989; Lindsay et al., 1985; Nakashio & Gerhardt, 1985). Cette faible teneur en eau est le facteur le plus important dans la résistance à la chaleur humide. La variation des teneurs en eau provient des espèces et des conditions de sporulation.

La seconde propriété biochimique du protoplaste est son pH, qui diminue de 1 à 1,5 unités durant la sporulation ($\sim 6,5$), et qui est plus faible que celui de la cellule végétative ($\sim 7,5-8$) (Magill et al., 1994; B. Setlow & Setlow, 1980). Ces deux propriétés rendent les protéines et les macromolécules présentes dans le protoplaste plus stables. L'hydratation et le pH jouent un rôle majeur dans la modulation de la mobilité des enzymes et de l'activité enzymatique du protoplaste.

Outre ces propriétés, les spores bactériennes possèdent également deux substances uniques qui sont l'acide pyridine-2,6-dicarboxylique (acide dipicolinique ou DPA) et les petites protéines solubles dans l'acide (SASP). Ces molécules ont pour but de protéger le contenu du protoplaste contre les différents stress (radiation, thermique, etc.) (P. Setlow, 2006, 2007). Ces molécules et leurs implications dans la résistance aux différents stress seront détaillées dans la suite du manuscrit.

3.2. Les propriétés et composés impliqués dans la résistance des spores

3.2.1. Faible hydratation et mobilité réduite des composés du protoplaste

Le facteur majoritaire de la résistance des spores est leur faible teneur en eau, qui est de l'ordre de 27 à 55% du poids humide de la spore par rapport à celle des cellules végétatives qui est plutôt comprise en 75 et 80% (Gerhardt & Marquis, 1989; Lindsay et al., 1985; Nakashio & Gerhardt, 1985). Cette caractéristique des spores leur permet de développer une forte résistance à la chaleur en milieu liquide. Cette résistance est inversement proportionnelle à la teneur en eau dans le protoplaste, plus le protoplaste est hydraté et plus la résistance à la chaleur va diminuer (Popham et al., 1995). Cet effet a pu être démontré de nombreuses fois, que ce soit sur des spores mutantes ne possédant pas de DPA et donc ayant un protoplaste plus hydraté (Paidhungat et al., 2000), où sur des spores produites à différentes températures ayant une teneur en eau différentes (Beaman et al., 1984; Melly et al., 2002), et cet effet a pu être observé sur différentes souches et espèces de spores (Beaman et al., 1984; Lindsay et al., 1985).

Les spores sont significativement plus résistantes que les cellules végétatives aux rayonnements γ (Nicholson et al., 2000). Cette différence n'est pas encore bien comprise, mais la faible teneur en eau dans le protoplaste pourrait réduire la capacité des rayonnements γ à générer des radicaux hydroxyles (P. Setlow, 2006). Pour ce qui est des rayonnements UV, la faible teneur en eau du protoplaste semble avoir un rôle dans la formation de photoproduits de spores (« spores photoproducts » ou SP). Les SP sont des sous-produits issus du rayonnement UV et plus particulièrement en UVc (254 nm). Ils sont issus de la réaction entre des bases pyrimidiques (thymine et cytosine) (Desnous et al., 2010). On appelle plus communément « SP » une forme en particulier de photoproduit, le 5-(α -thyminyl)-5,6-dihydrothymine, qui est une forme largement favorisée par rapport aux autres photoproduits (CPD et 64PP). Les structures sont représentées ci-dessous figure 2.18.

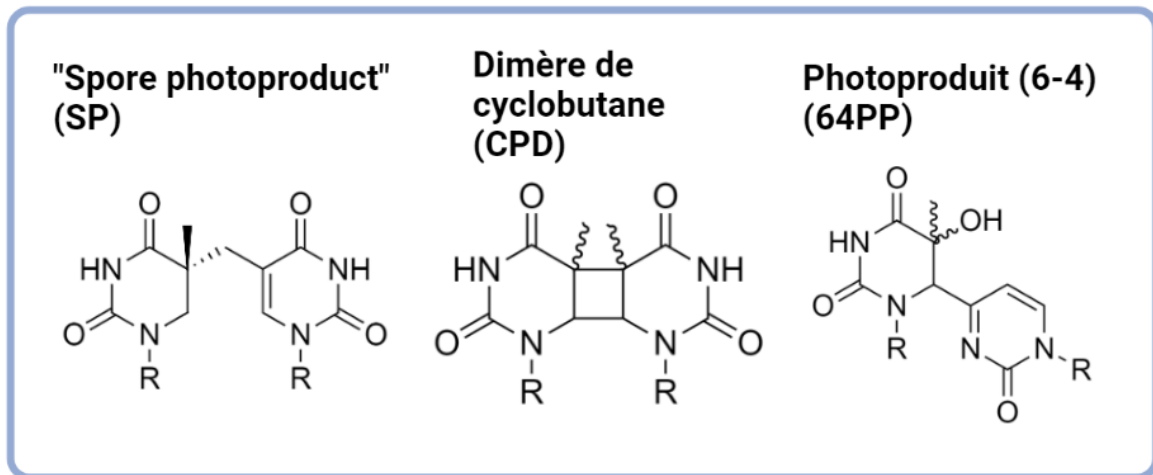


Figure 2.18 : Structure des différents photoproduits.

Ces deux autres photoproduits induisent plus de dommages sur l'ADN, dommages qui seront par ailleurs moins bien réparés. Les dégâts produits par les SP sont facilement réparables par la spore et ce processus se déroule principalement au début de la germination grâce à la SP lyase (Desnous et al., 2010).

La faible teneur en eau intervient aussi dans la capacité de la spore à maintenir son état de dormance. Il a été suggéré que le protoplaste de la spore ne se trouve pas dans un état vitreux (Sunde et al., 2009) mais l'état dans lequel il se trouve est encore incertain.

3.2.3. Les protéines SASP

Parmi les composants du protoplaste, un groupe de petites protéines solubles dans l'acide (SASP) est reconnue comme important dans la résistance des spores de *B. subtilis* (P. Setlow, 2006). Ces protéines sont abondantes et représentent 3 à 6% des protéines totales de la spore. Les SASP de type α/β sont présentes exclusivement dans le protoplaste où elles saturent l'ADN. Pour étudier l'implication de ces molécules dans la résistance des spores, l'utilisation de mutants dépourvus de SASP de type α/β a permis de mettre en corrélation l'association entre les SASP, l'ADN et la résistance face à de nombreux stress. La saturation de l'ADN par les SASP est un facteur important dans la résistance à la chaleur humide (Nicholson et al., 2000; P. Setlow, 2006). La chaleur humide ne tue pas les spores sauvages à cause de dégâts sur l'ADN. Dans les spores sauvages la liaison entre les SASP et l'ADN est telle que les dommages sont dus à d'autres mécanismes. Par contre, pour les spores dépourvus de SASP, la majorité des spores sont tuées rapidement du fait de dégâts sur l'ADN, principalement dus à la dépurination. Les spores sauvages présentent aussi une plus grande résistance face à la chaleur sèche que les spores mutantes (Popham et al., 1995; B. Setlow & Setlow, 1995). Contrairement à la chaleur humide, les spores sauvages soumises à une chaleur sèche présentent des dégâts à l'ADN lors de ce type de traitement.

La saturation de l'ADN par les SASP permet une plus grande résistance aux agents chimiques tels que le peroxyde d'hydrogène par exemple. Les spores mutantes dépourvues de SASP sont plus sensibles à ce genre d'agent et présentent des dommages sur l'ADN suite au stress chimique (B. Setlow & Setlow, 1993). Mais les souches sauvages ne sont pas protégées de tous les agents chimiques, il existe des agents alkylants qui produisent les mêmes dégâts peu importe la souche et qu'il y ai présence ou non de SASP (B. Setlow et al., 1998).

Pour finir, les SASP sont impliqués fortement dans la résistance au UV. La saturation de l'ADN par les SASP permet de promouvoir la formation de SP et supprime la formation de CPD et 64PP, ce qui semble dû aux changements de conformations de l'ADN induits lors de l'association ADN/SASP (P. Setlow, 2006).

3.2.4. L'acide dipicolinique

L'acide dipicolinique ou l'acide pyridine-2,6-dicarboxylique (DPA) est une molécule que l'on retrouve uniquement dans le protoplaste des spores. Cette molécule est synthétisée dans la cellule mère et est accumulée dans la préspore au cours de l'étape IV de la sporulation. La

concentration en DPA à l'intérieur du protoplaste est supérieur à 800 mM, soit au-dessus du seuil de solubilité (Kong et al., 2012), et représente entre 5 et 15% du poids sec de la spore ou 30 à 50% du poids sec du protoplaste (Huang et al., 2007). Le contenu peut varier selon l'espèce ou la souche et les conditions de sporulation (Huang et al., 2007). Cette molécule possède 3 pKa : $pK_{a1} = 0,49$, $pK_{a2} = 2,2$ et $pK_{a3} = 4,6$ (Crans et al., 2000; Tang et al., 1968). Sachant que le pH intracellulaire du protoplaste de la spore est strictement supérieur à 6, le DPA se trouve sous forme complètement déprotonée, soit DPA^{2-} comme le montre la figure 2.19 (Magill et al., 1994; B. Setlow & Setlow, 1980). La spectroscopie Raman montre qu'il est normalement présent en quantités équimolaires avec du calcium et forme un complexe appelé le dipicolinate de calcium (CaDPA) (Kong et al., 2012).

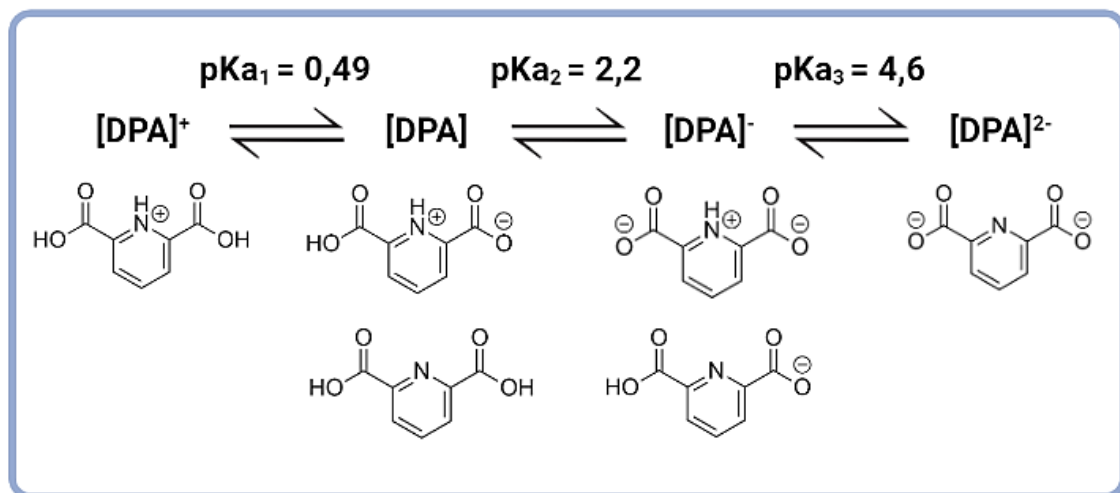


Figure 2.19 : Structure chimique de l'acide dipicolinique en fonction de ses différents pKa.

Le CaDPA est important dans les propriétés de résistance des spores, et l'étude de souches mutantes dépourvues de DPA a permis de montrer le rôle de cette molécule dans les propriétés de résistance. Chez ces mutants, en fonction des conditions expérimentales, la production de SP est diminuée de 4 à 7 fois (Douki et al., 2005). Bien que, les SP soient toujours les photoproduits majoritaires (42-71%), il y a une légère production de CPD (16-36%) (Douki et al., 2005). Le DPA dans le protoplaste de la spore influence les réactions photochimiques de l'ADN en jouant fortement un rôle de photosensibilisateur (Douki et al., 2005; Paidhungat et al., 2000). L'influente participation du DPA dans la formation de SP peut être due à un transfert sélectif d'énergie de l'état triplet du DPA excité par les UVc vers les bases thymine

(Douki et al., 2005). Ces transferts sélectifs d'énergie pourraient expliquer l'implication du DPA dans la formation exclusive de SP et par conséquent l'absence de photoproduits impliquant des résidus de cytosine.

La présence de DPA dans le protoplaste de la spore permet d'influencer l'hydratation du protoplaste et joue un rôle important dans la résistance de la spore à la chaleur. En effet, la souche mutante dépourvue de DPA possède une teneur en eau plus importante que celle des souches sauvages (Paidhungat et al., 2000). Comme attendu, ces spores mutantes sont plus sensibles à la chaleur humide que les souches contenant du CaDPA. Pour le moment, le rôle du DPA dans la résistance à la chaleur sèche n'est pas encore déterminé (P. Setlow, 2006).

3.3. Utilisation des techniques de fluorescence pour la caractérisation des spores bactériennes

Comme l'a montré la partie 3.1.2. la spore est une structure extrêmement complexe, ce qui lui confère une résistance extrême au stress externe. De plus, cette structure difficile à analyser pose un réel souci dans le développement d'outils de caractérisation du milieu interne de la spore. Les techniques de fluorescence (spectroscopie et microscopie) sont de plus en plus utilisées dans la détection et la caractérisation des spores et se déclinent en deux stratégies. La première est basée sur l'utilisation de sondes externes et/ou la construction de mutants exprimant des protéines fluorescentes (Imamura et al., 2010; Loison et al., 2013; Shuster et al., 2019). Ces techniques ont fait leurs preuves, mais nécessitent des moyens importants et des protocoles complexes pour arriver à implanter une sonde dans certaines couches de la spore bactérienne. La seconde stratégie, celle qui nous intéresse dans ce projet, est l'utilisation de composés natifs fluorescents tels que l'acide dipicolinique.

Naturellement, le DPA et son sel le CaDPA, sont connus pour posséder une faible fluorescence difficilement détectable. Sans aucune intervention physique sur le DPA, il est théoriquement possible d'utiliser cette molécule pour détecter la présence de spores bactériennes. Le DPA étant un composé unique aux spores bactériennes, il suffit d'en détecter des traces pour confirmer la présence de spores bactériennes. Il faut cependant augmenter son signal de fluorescence ou utiliser d'autres techniques que la fluorescence pour sa détection.

Pour ce faire, il est possible d'améliorer fortement la fluorescence du DPA en créant des complexes avec des lanthanides émettant des signaux caractéristiques du complexe. Ces

complexes émettent une fluorescence grâce au principe de fluorescence indirecte, le ligand (le DPA) absorbe la lumière à une fréquence caractéristique et le transfère à l'état triplet de l'ion lanthanide (Hindle & Hall, 1999). Il existe différents ions lanthanides pouvant convenir pour la détection du DPA, et qui émettent une fluorescence caractéristique au lanthanide utilisé, tels que l'euprimum, le terbium, le dysprosium. Mais c'est l'ion terbium qui se démarque par une émission de fluorescence plus importante et qui est utilisé de façon récurrente pour la mise en place de protocole de détection de spore bactérienne (Cable et al., 2007; Rosen et al., 1997). Cette technique nécessite la mise en place d'étalon *in vitro* et l'extraction du DPA des spores est généralement réalisée à l'aide de choc thermique, ce qui dénature la structure de la spore. Cependant, ces protocoles ne permettent pas de doser la forme [CaDPA] et l'utilisation des lanthanides n'est pas envisageable pour des études *in vivo* étant donné que ceux-ci ne pourraient pas atteindre le protoplaste de la spore sans une forte altération de celle-ci. De plus, les lanthanides sont connus pour bloquer la germination des spores (Yi et al., 2011).

Comme décrit précédemment, le DPA possède une faible fluorescence à son état initial. Cependant, il est possible d'augmenter fortement cette fluorescence par un autre moyen que par l'association de lanthanides. En effet, la molécule de DPA possède un cycle aromatique et des bandes d'absorption dans l'UV, avec une absorption maximale au environ de 270-280 nm et une bande d'absorption beaucoup plus faible à 350 nm (Alimova et al., 2003). Une étude théorique sur la fluorescence du DPA et du CaDPA a permis de supposer les effets de l'état excité sur la structure des deux molécules (Hameka et al., 1996). Il a été décrit que l'état excité est provoqué par la promotion d'un électron d'une orbitale liante π à une orbitale antiliante π . Et cette excitation est accompagnée de l'expansion du noyau pyridine pour le DPA, et d'une distorsion du noyau pyridine et d'une diminution de la conjugaison pour l'ion CaDPA.

Lorsque l'on soumet le DPA à une exposition au UVc (254 nm) il est possible d'augmenter drastiquement son intensité de fluorescence (Nudelman et al., 2000). On retrouve un maximum d'intensité de fluorescence pour un couple excitation/émission de 340/430 nm pour le DPA irradié en liquide et de 300/400 nm pour le CaDPA irradié en liquide, avec des variations en intensité suivant les conditions d'hydratations (Sarasananandarajah et al., 2005). Cette augmentation d'intensité de fluorescence suite à l'irradiation aux UVc s'explique par la production de photoproduits, et ces photoproduits possèdent une émission de fluorescence spécifique, ce qui permet de mettre en place des méthodes de détection de spores bactériennes (Alimova et al., 2003; Bronk et al., 2000; Lewis, 1967). Très peu d'études s'intéressent à la

composition réelle des photoproduits du DPA qui sont souvent décrits uniquement sous le terme générique de « photoproduits ». Contrairement au Terbium, il est possible de produire des photoproduits directement dans la spore par irradiation UV. Cette irradiation, suivant son intensité, n'est cependant pas sans conséquences sur les autres éléments vitaux de la spore (membrane, ADN, etc.).

Les techniques de fluorescences permettent de déceler la présence de spores bactériennes via la détection du DPA et du CaDPA avant ou après traitement UVc. Mais les méthodes présentées ne caractérisent pas l'environnement intracellulaire du protoplaste de la spore, et l'utilisation des temps de vie de fluorescence du DPA pourrait être envisagée pour réaliser cette caractérisation.

III. Objectifs

Le premier objectif de ce travail de thèse est de mettre en place un protocole couplant les deux techniques de fluorescence, stationnaire et résolue dans le temps. L'utilisation de techniques de spectroscopie de fluorescence pour caractériser les matrices alimentaires est déjà envisageable en routine, mais aucune étude n'a porté, à notre connaissance, sur le couplage des techniques de fluorescence stationnaire et résolue dans le temps. Les nombreux avantages liés à ces techniques en font une bonne alternative pour évaluer les modifications chimiques dans nos matrices d'études. En parallèle du développement de techniques de routine, il est envisageable d'utiliser ces techniques dans une approche fondamentale de l'investigation de composés fluorescents.

Le deuxième objectif est d'utiliser la méthodologie définie précédemment pour suivre les changements de composés fluorescents dans le vin, à la suite de la fermentation. Les procédés fermentaires sont des pratiques nécessaires à l'élaboration de vin, et leurs implications dans les propriétés organoleptiques des vins sont essentiels. Dans ce projet de thèse, nous nous sommes intéressé principalement à l'effet de la fermentation malolactique, procédé préférentiellement utilisé dans les régions septentrionales par les vignerons. Le développement d'outils pour évaluer les changements due à cette fermentation est nécessaire dans le domaine viticole. Si de nombreuses méthodes sont disponibles, aucune ne fait référence à l'utilisation couplée des techniques de spectroscopie en fluorescence stationnaire et résolue dans le temps.

Le troisième objectif est de caractériser les photoproduits du DPA et du CaDPA. Dans notre étude visant la caractérisation des paramètres intracellulaire des spores bactériennes, nous produisons des photoproduits fluorescents, dans le but de les utiliser comme sondes natives. Cependant, très peu de littérature existe à propos de la structure de ces photoproduits, la plupart des publications faisant référence à leur production sans pour autant les définir clairement. Une étude complète de ces photoproduits nous a semblé essentielle pour la suite de nos travaux. Les paramètres intracellulaires des spores bactériennes sont peu connus, et les seuls moyens de les obtenir nécessitent des techniques invasives ou destructives ce qui interfèrent avec une acquisition optimale de ces paramètres.

Enfin, le dernier objectif est d'évaluer les changements des propriétés de fluorescence des photoproduits du DPA et du CaDPA, en fonction du pH et de l' a_w , dans le but de mieux caractériser ces paramètres intracellulaires dans la spore bactérienne. Aucune étude à ce jour ne permet la détermination précise de ces paramètres intracellulaire pour les spores

bactériennes, et de visualiser les changements de ces derniers en fonction des paramètres de l'environnement externe ou de l'application de différents stress.

IV. Matériel et méthodes

1. Fluorescence stationnaire

Nous avons expliqué dans la première partie de l'état de l'art les principes de fluorescence utilisés pour l'analyse de différents composés. Nous allons maintenant décrire le principe de mesure des phénomènes de fluorescence. L'outil de mesure classique des spectres de fluorescence en solution est le spectrofluorimètre. Trois types de spectres de fluorescence peuvent être obtenus : les spectres d'émission, d'excitation et la matrice d'excitation-émission.

Les exemples issus des techniques de spectroscopie présentées par la suite sont tous le résultat d'acquisition de composés fluorescent en solution. Les mesures sont réalisées à l'aide de cuves quartz de 10,00 x 10,00 mm ou dans des cuves quartz à trajet réduit de 10,00 x 4,00 mm, ce qui représente respectivement des volumes de solution de 3 mL à 0,5 mL. Les cuves quartz sont nécessaires pour les mesures impliquant des longueurs d'onde dans l'UV, du fait de l'absorption du verre dans les longueurs d'ondes UV.

1.1. Spectres d'émission et d'excitation

Les spectres d'émission ou d'excitation ont été enregistrés via deux spectrofluorimètres : un Fluorolog-3 (Horiba, Jobin-Yvon) ou un FluoroMax-4 (Horiba, Jobin-Yvon). Ces deux appareils sont calibrés sur le signal Raman de l'eau (sensibilité de la détection) et le spectre de la lampe d'excitation (recalage en longueur d'onde) et acquièrent les spectres à l'aide du logiciel FluorEssence® (Horiba). La source de lumière excitatrice est formée d'une lampe et d'un monochromateur. La lampe au xénon permet une excitation pour des longueurs d'ondes entre 200 nm et 600 nm. Le monochromateur d'excitation permet de sélectionner une longueur d'onde d'excitation avec une certaine précision, cette précision est régie par l'ouverture de fente qui laisse passer plus ou moins de signal, les fentes d'entrée et de sortie sont usuellement réglées à 5 nm de bande passante. Le faisceau excitateur est dirigé vers la cuve contenant les fluorophores à analyser. Via un système de miroirs, une partie du faisceau est dirigé vers un système de comptage de photons pour corriger les spectres d'excitation des variations d'intensité de la lampe selon la longueur d'onde émise. Le signal d'émission de fluorescence est collecté à 90° du faisceau incident, passe dans un monochromateur et est amplifié par un photomultiplicateur. Les monochromateurs sont motorisés et balayent les gammes de longueurs d'ondes définies par l'utilisateur. La figure 4.1 ci-dessous montre le schéma de principe d'un spectrofluorimètre. Les principales différences entre nos deux appareils sont la puissance de la lampe au xénon et le nombre de monochromateurs. Pour le Fluorolog-3, la puissance de la lampe est de 450 W,

tandis que pour le FluoroMax-4 elle est de 150 W. Le Fluorolog-3 possède un système à double réseau dans ses monochromateurs, alors que le FluoroMax-4 possède des systèmes simple réseau.

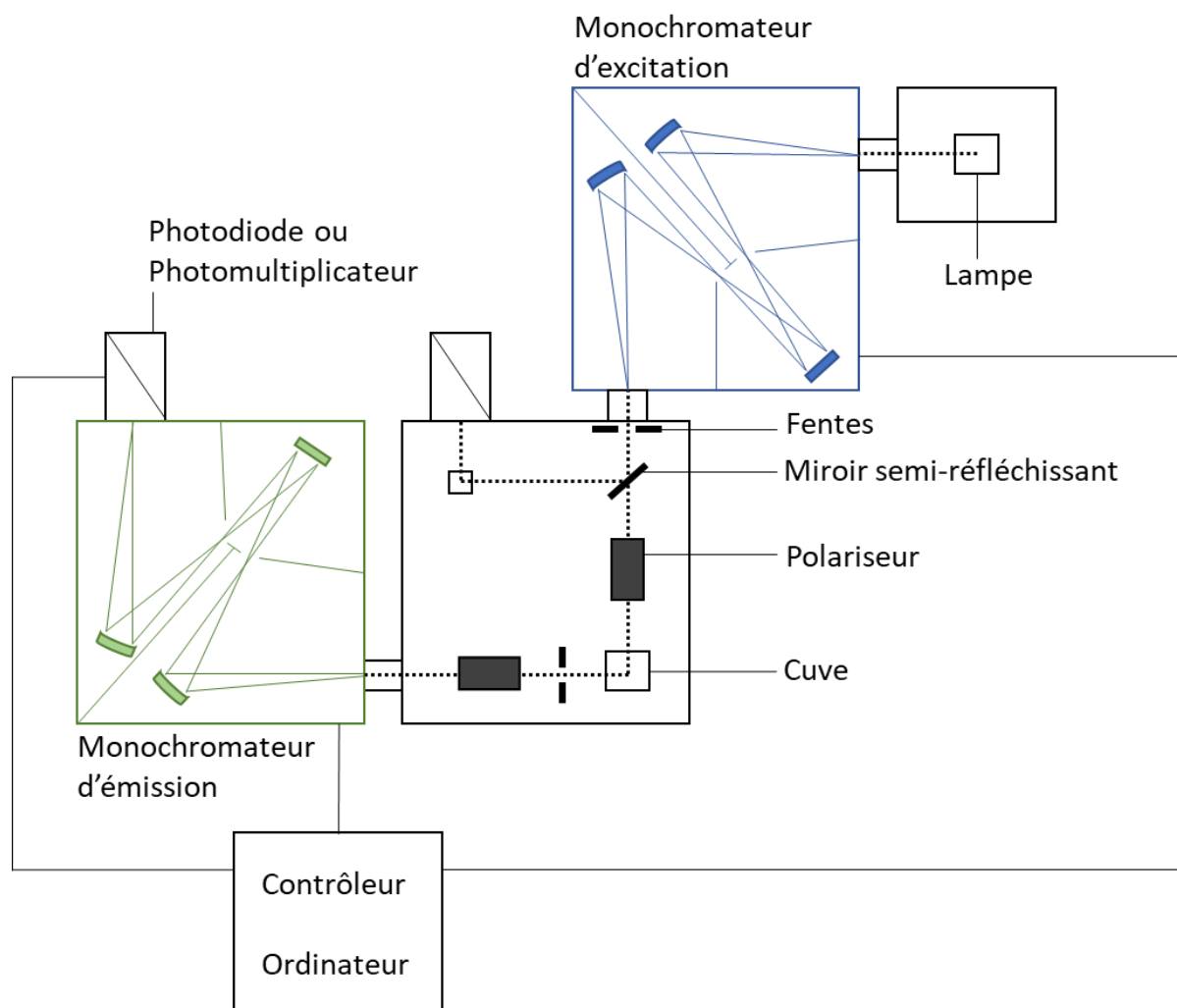


Figure 4.1 : Schéma de principe du spectrofluorimètre. Les traits en pointillés représentent le chemin optique et les monochromateurs sont des systèmes à un réseau dans cette représentation.

1.2. Matrices excitation-émission

En utilisant successivement les deux monochromateurs du spectrofluorimètre, il est possible de mesurer des spectres d'émission pour différentes longueurs d'ondes d'excitation et ainsi obtenir des matrices d'excitation et d'émission de fluorescence (MEEF ou EEMF en anglais). Les MEEF ont été enregistrés sur un spectrofluorimètre Aqualog[®] (Horiba), le schéma de principe est présenté sur la figure 4.2 ci-dessous.

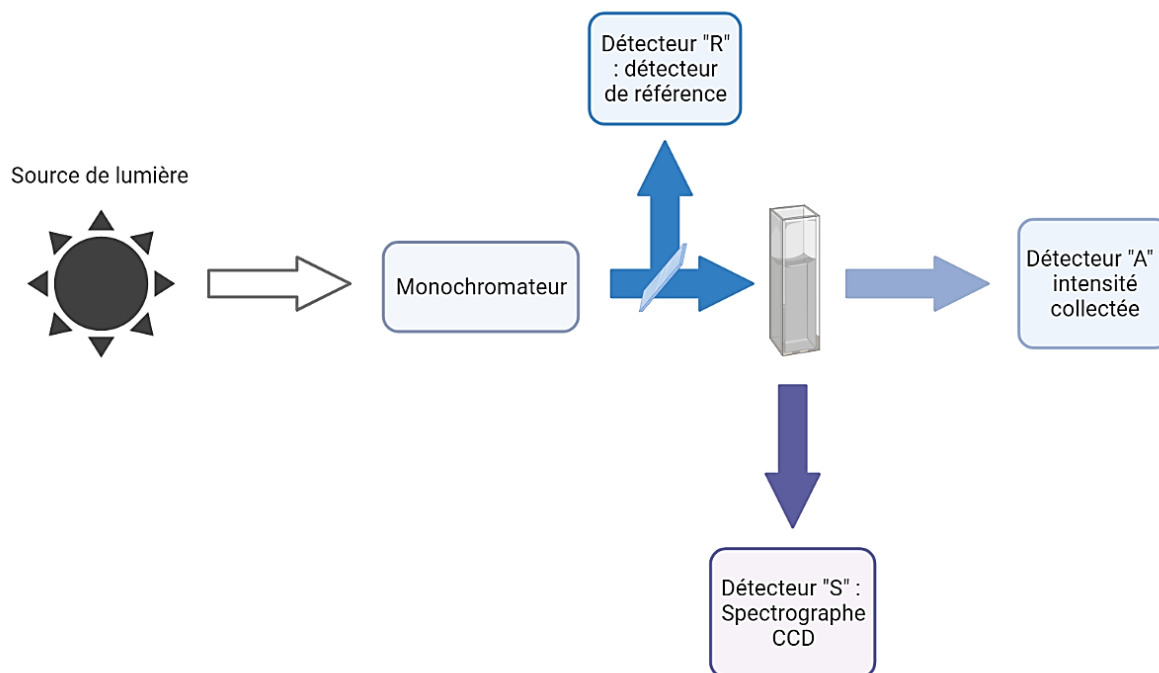


Figure 4.2 : Schéma du fonctionnement de l'Aqualog®.

La source de lumière excitatrice est constituée d'une lampe xénon (150 W) émettant en continu et d'un monochromateur d'excitation, ce dernier étant composé d'un système à double réseau et réglé à 5 nm de bande passante.

Cette lumière d'excitation monochromatique est majoritairement dirigée sur un échantillon, qui émet alors une luminescence, mais une petite partie de la lumière d'excitation est déviée vers un détecteur de référence (détecteur « R »), qui est une photodiode calibrée pour la correction de l'excitation pour des longueurs d'ondes de 200 à 980 nm.

La fluorescence de l'échantillon est collectée à 90° par rapport au faisceau d'excitation, puis dirigée vers un détecteur CCD (détecteur « S »). Les acquisitions sont réalisées pour des longueurs d'émission et d'excitation allant de 240 à 600 nm avec un pas de 3 nm.

La luminescence traversant l'échantillon est également dirigée vers un autre détecteur (détecteur « A »), qui est une photodiode en silicium et permet de calculer l'absorbance de l'échantillon.

Les signaux des détecteurs sont transmis à un contrôleur de système, où les données peuvent être manipulées et présentées à l'aide d'un logiciel spécifique (logiciel Aqualog® fonctionnant avec Origin®). Cette technique permet d'obtenir des MEEF, ce qui représente une « empreinte moléculaire » de nos fluorophores étudiés et est représenté sous forme de spectre 3D, voir exemple ci-dessous figure 4.3.

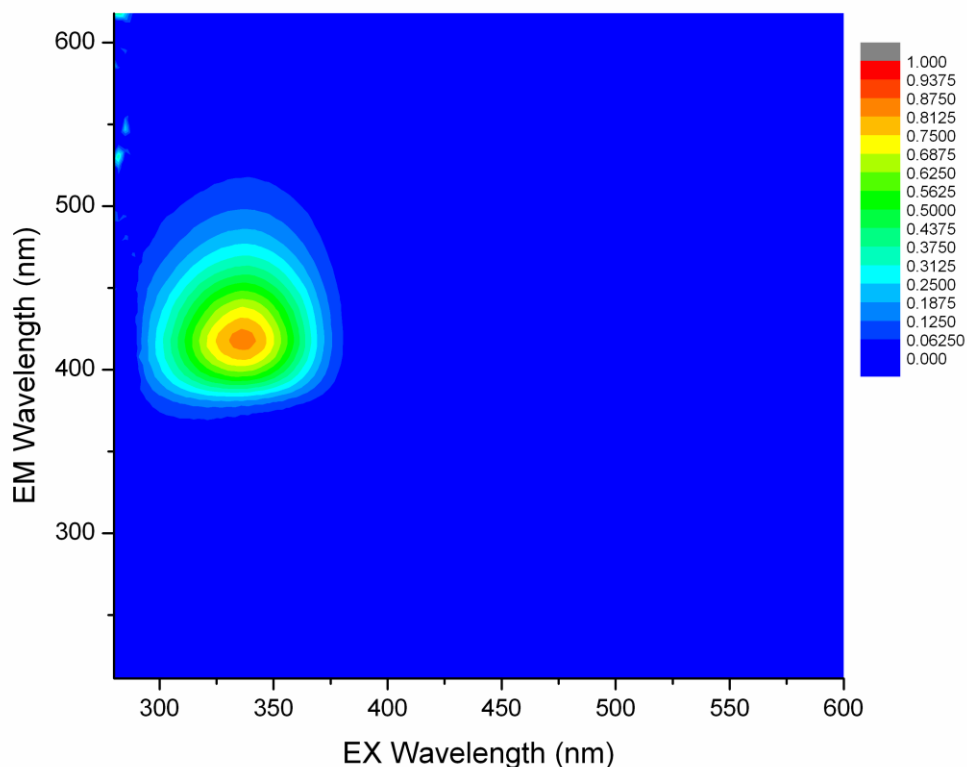


Figure 4.3 : MEEF corrigé de l'acide dipicolinique (10 mM) après une irradiation de 10 minutes à $0.120\text{J}/\text{cm}^2$, pour un pH de 8. L'axe X représente les longueurs d'ondes d'excitation (nm), l'axe Z représente les longueurs d'ondes d'émission (nm) et l'axe Z représente l'intensité de fluorescence (U.A.).

1.2.a. Corrections des spectres

L'obtention des MEEF nécessite des corrections et des calibrations pour éviter toute interférence avec les signaux de fluorescence. Les différentes corrections s'effectuent pour limiter « l'effet de filtre interne » (EFI), la soustraction des diffusions Rayleigh et Raman, ainsi qu'une normalisation de l'intensité de fluorescence par rapport à une solution contrôle de quinine.

Effet de filtre interne à l'excitation : dans les solutions concentrées, le faisceau d'excitation est atténué par l'échantillon de sorte que seule la surface faisant face au faisceau d'excitation émet une forte fluorescence. Le centre de la cuvette possède une émission de fluorescence plus faible, ce qui affecte le signal détecté. Cette atténuation est appelée **l'effet de filtre interne primaire**. De plus, si les spectres d'émission et d'excitation se chevauchent de manière significative, la lumière émise au centre de la cuve peut être réabsorbée par la partie de l'échantillon qui n'est pas excitée directement par le faisceau d'excitation. C'est ce qu'on appelle **l'effet de filtre interne secondaire**.

Le logiciel Aqualog[®] permet de corriger ces effets de filtre interne par l'utilisation

d'algorithmes. Les algorithmes EFI utilisés dans le logiciel constructeur impliquent de mesurer le spectre d'absorbance de l'échantillon pour la plage de chevauchement des spectres d'excitation et d'émission afin de corriger les EFI primaires et secondaires. L'algorithme EFI de base, utilisé dans le logiciel Aqualog[®] nécessite l'utilisation de cuvettes conventionnelles à trajet optique de 10,00 x 10,00 mm. L'équation ci-dessous est appliquée à chaque coordonnée de longueur d'onde d'excitation et d'émission de la MEEF.

$$F_{\text{idéale}} = F_{\text{obs}} \times 10^{\frac{\text{Abs}_{\text{Ex}} + \text{Abs}_{\text{Em}}}{2}} \quad (4.1)$$

Où, $F_{\text{idéale}}$ est le spectre de signal de fluorescence idéal attendu en l'absence d'EFI, F_{obs} est le signal de fluorescence observé, Abs_{Ex} et Abs_{Em} sont les valeurs d'absorbance des mesures aux coordonnées de longueur d'onde d'excitation et d'émission.

Diffusion Rayleigh et Raman : ces différents effets ont déjà été présentés dans la partie 1.2 de l'état de l'art. Ce sont des phénomènes de diffusion qui peuvent interférer avec les spectres de fluorescence. Le logiciel Aqualog[®] peut supprimer ces différents artefacts. La soustraction des blancs, issus de l'échantillon, à la MEEF permet de supprimer la diffusion Raman. En appliquant un algorithme de masquage de Rayleigh basé sur la largeur de bande spectrale d'excitation et d'émission, il est possible d'annuler les intensités de signal pour les diffusion Rayleigh du premier et second ordre (exemple figure 4.4).

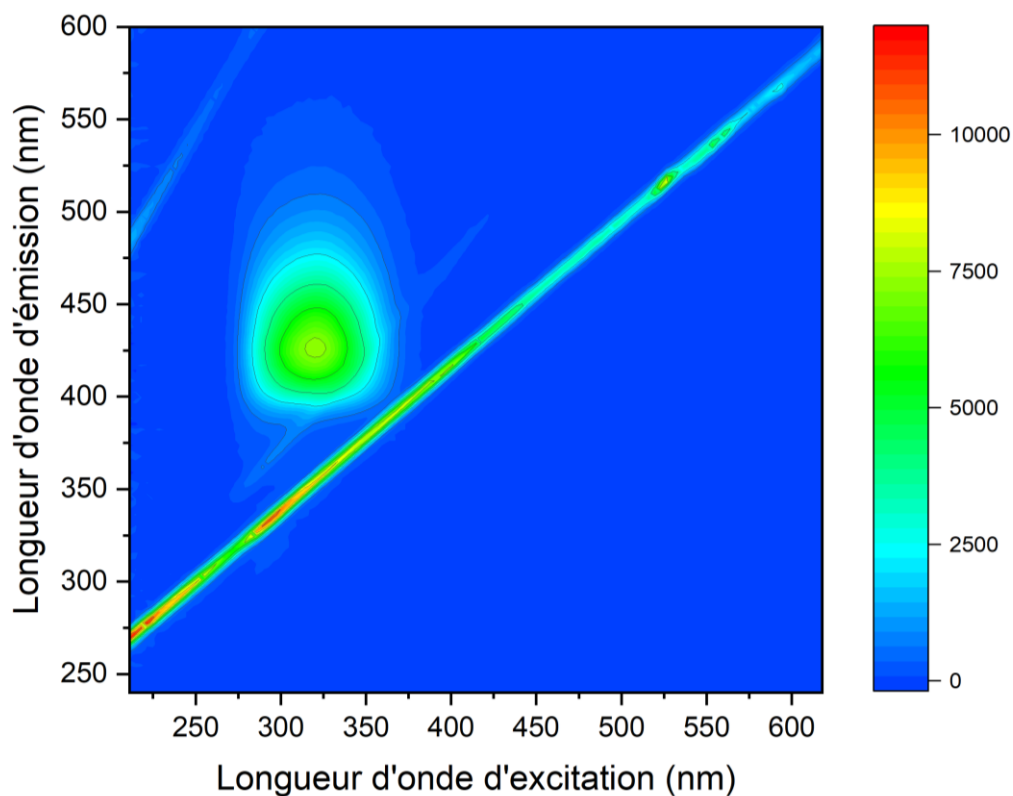


Figure 4.4 : Exemple de diffusion Raman et Rayleigh du premier ordre et du second ordre pour l'acide dipicolinique (10 mM).

Normalisation de l'intensité de fluorescence : la réponse spectrale d'absorbance de l'Aqualog[®] par rapport à la concentration de l'échantillon est généralement invariante. Il est cependant possible d'avoir des changements dans l'intensité de la source d'excitation ou dans la réponse du détecteur, qui doivent être surveillés régulièrement avec des conditions expérimentales standards. La réponse de l'instrument est étalonnée par rapport à un équivalent d'unité de sulfate de quinine (QSU), basé sur l'excitation à 347,5 nm de 1 ppm de QSU dissous dans 0,1 mol d'acide perchlorique, dont l'intensité est mesurée à une longueur d'émission de 450 nm. L'Aqualog[®] contient un outil pré intégré pour calculer et appliquer cette normalisation.

1.2.b. PARAFAC

La PARAllel FACtor analysis (PARAFAC) est une méthode d'analyse de données consistant à construire un modèle multilinéaire, le plus proche possible d'un jeu de données expérimentales. Cette technique appartient à la famille des méthodes multidimensionnelles applicables aux données qui sont disposées en tableau d'ordre trois ou plus. Les MEEF rentrent

dans cette catégorie, avec comme dimension le nombre d'échantillons \times longueur d'onde d'excitation \times longueur d'onde d'émission.

Supposons que nous disposons d'un jeu de données, noté X . Un modèle trilineaire de X consiste en une combinaison linéaire de trois variables et d'un écart résiduel :

$$X_{ijk} = \sum_{f=1}^F a_{if} b_{jf} c_{kf} + e_{ijk} \quad (4.2)$$

Où, $i = 1, \dots, I$; $j = 1, \dots, J$; $k = 1, \dots, K$.

La méthode PARAFAC permet d'estimer les variables a_{if} , b_{jf} , et c_{kf} à partir des mesures de X_{ijk} , tout en minimisant l'écart résiduel e_{ijk} avec le modèle trilineaire. Dans le cas de nos analyses de MEEF, X_{ijk} correspond à l'intensité de fluorescence de l'échantillon i mesuré au couple de longueurs d'onde d'excitation et d'émission (j, k) . a_{if} représente le facteur de fluorescence du fluorophore f dans l'échantillon i . b_{jf} représente la valeur du spectre d'émission du fluorophore f pour une longueur d'onde j . c_{kf} représente la valeur du spectre d'excitation du fluorophore f pour une longueur d'onde k . Cette méthode est utilisée pour nos échantillons de vin et nous a permis de décomposer notre jeu de données en 4 composantes, voir figure 4.5. Le modèle PARAFAC utilisé est issu des travaux de Murphy et al. (2013). Nous analysons notre base de données avec la drEEM box via le logiciel Matlab.

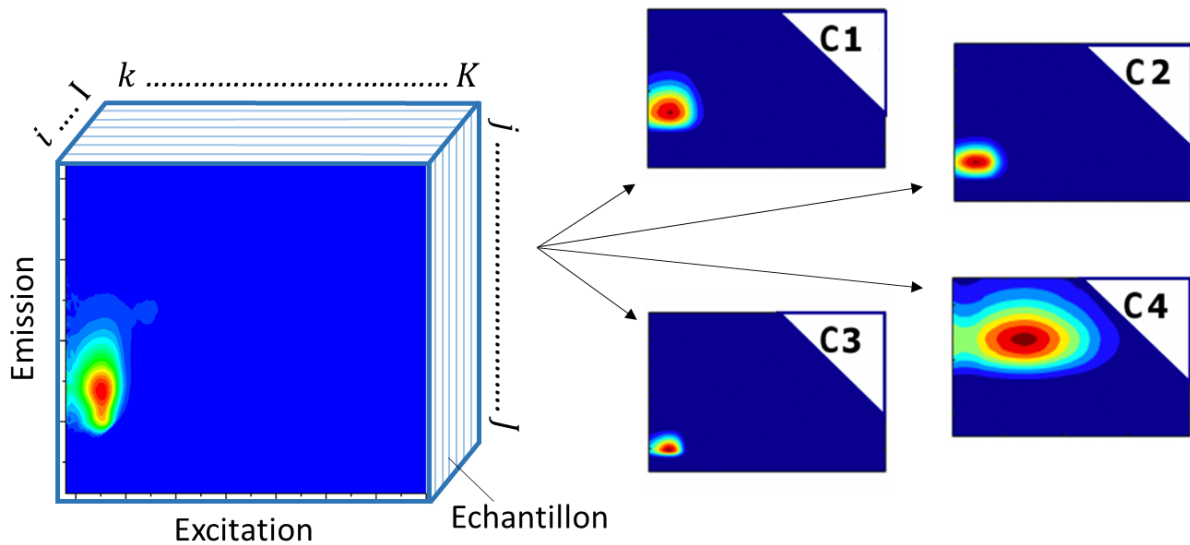


Figure 4.5 : Jeu de données de MEEF décomposé en 4 composantes PARAFAC.

2. Fluorescence résolue dans le temps

Avant de discuter des mesures des temps de vie de fluorescence, il est important de comprendre d'où viennent les équations régissant ces paramètres. Dans la partie 1.4.1, les équations 2.7, 2.8 et 2.9 définissent les temps de vie en fonction de nombreux paramètres. Il est alors possible de définir les temps de vie en fonction de l'intensité de fluorescence :

$$I(t) = I_0 \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) \quad (4.3)$$

Dans le cas de la présence de différentes populations de fluorophores et/ou de différents environnements, il est possible d'écrire l'équation 4.3 sous la forme suivante :

$$I(t) = I_0 \sum_i B_i \exp\left(-\frac{t}{\tau_i}\right) \quad (4.4)$$

Où, I_0 est l'intensité de fluorescence au temps 0 ; B_i est le facteur pré exponentiel lié au temps de vie τ_i , ce facteur peut être considéré comme étant la proportion de molécules émettant une fluorescence de temps de vie τ_i au sein d'une population de différents fluorophores et/ou environnements.

2.1. TCSPC

Les mesures de temps de vie de fluorescence pour des échantillons in vitro en solution ont été effectuées sur un spectrofluorimètre FluoroMax-4[®] (Horiba). Pour les mesures de fluorescence résolue dans le temps, une source excitatrice pulsée est utilisée. L'émission de fluorescence est toujours collectée à 90° par rapport au faisceau incident. Avant chaque série de mesure, le spectrofluorimètre est calibré à l'aide d'une solution de Ludox[®] pour une longueur d'onde d'émission égale à la longueur d'onde d'excitation, ce qui permet d'obtenir la réponse instrumentale.

Ce spectrofluorimètre utilise le principe du TCSPC (Time-Correlated Single Photon Counting, figure 4.6) pour permettre de déterminer les temps de vie de fluorescence. Les déclin de fluorescence sont obtenus à l'aide de diodes pulsées possédant une longueur d'onde de 280 ou de 340 nm, pour une durée de pulsation inférieure à 1 ns. La fréquence de pulsation est fixée à 1 MHz. Un détecteur détecte l'arrivée du premier photon après chaque pulse d'excitation et transmet l'information à un ordinateur. Le temps séparant l'impulsion d'excitation et la réception du premier photon est enregistré. Cette opération est répétée jusqu'à l'obtention d'un

nombre suffisant de photons pour construire un histogramme des temps d'arrivée des photons statistiquement exploitable. Le constructeur recommande un nombre de photons de 10 000 dans le canal correspondant au maximum de l'histogramme.

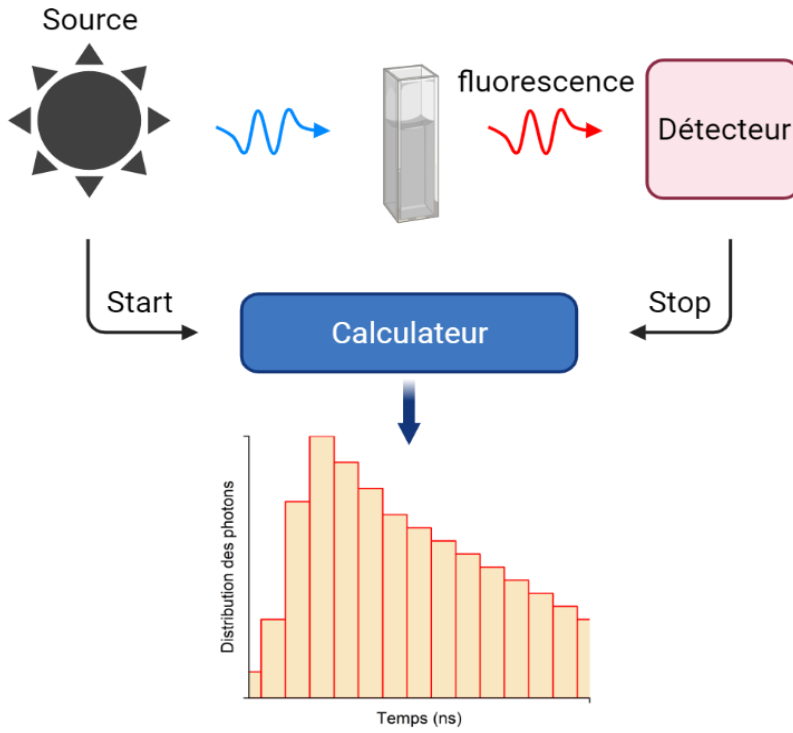


Figure 4.6 : Principe du TCSPC.

Une fois cet histogramme obtenu, on peut obtenir la valeur du ou des temps de vie de fluorescence de deux manières. Soit par ajustements mathématiques en utilisant des fonctions exponentielles, ou en utilisant une représentation graphique des temps de vie, appelée représentation phasor plot. Cette dernière sera détaillée dans une sous-partie, plus loin dans ce manuscrit. Pour ce qui est des ajustements par l'utilisation de fonctions exponentielles, le nombre d'exponentielles choisies pour réaliser l'ajustement est défini par l'expérimentateur. Ce nombre est adapté en fonction de la courbe des résidus, qui représente l'écart entre la valeur modélisée et la valeur expérimentale. Pour que l'ajustement soit considéré comme acceptable, les résidus doivent être faibles et dispersés de façon homogène autour de 0, soit une valeur du CHISQ (χ^2) autour de 1. Les temps de vie de fluorescence peuvent être déterminés avec les équations 4.3 et 4.4, où les temps de vie sont déterminés via la pente d'une courbe représentant $\log I(t)$ en fonction du temps t . Un exemple est disponible ci-dessous figure 4.7.

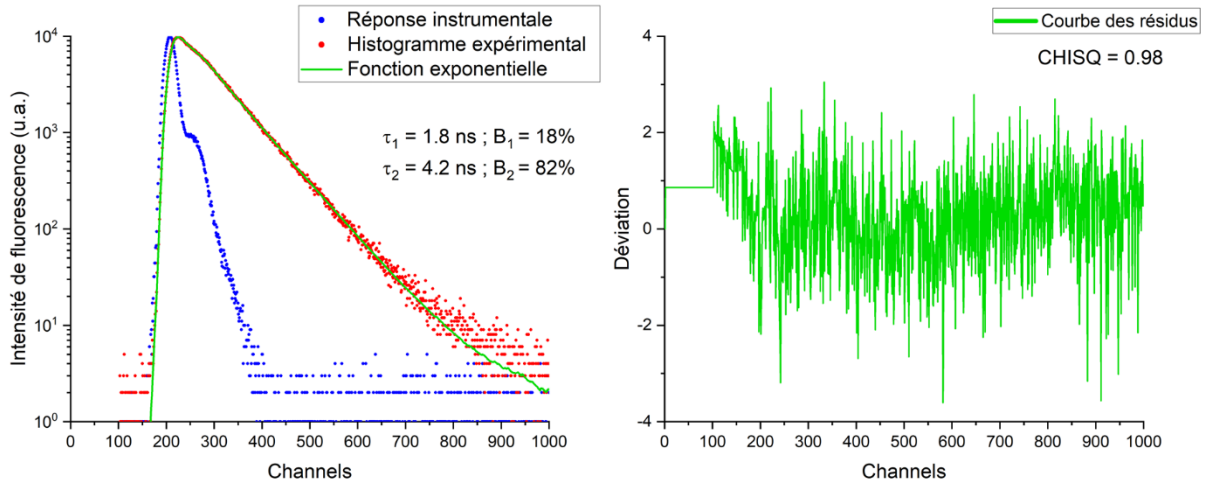


Figure 4.7 : Exemple d’histogramme des temps d’arrivée des photons après un pulse d’excitation. Sur le graphique de gauche : la courbe bleue représente la réponse instrumentale (IRF), en rouge l’histogramme expérimentale pour l’acide dipicolinique à 10 mM après une irradiation de 10 minutes à $0,120 \text{ J/cm}^2$ et en vert la modélisation du déclin par fonction exponentielle convoluée à l’IRF. Sur le graphique de droite : la courbe des résidus (traduisant l’écart entre la courbe expérimentale et son ajustement numérique).

3. Microscopie multi-photon

Le phénomène d’excitation multiphoton peut être décrit dans un diagramme de Perrin-Jablonski (Figure 4.8). Pour une absorption à un photon, un seul photon promeut le fluorophore dans un état excité. En fonction du spectre d’absorption et de la longueur d’onde d’excitation, le fluorophore peut être excité aux niveaux vibrationnels élevés de l’état S_1 ou même jusqu’à l’état S_2 . Peu importe dans quels états excités se trouve le fluorophore, presque tous les fluorophores émettent à partir du niveau vibrationnel le plus bas de l’état S_1 .

L’excitation multiphoton est réalisée en utilisant des photons de plus grandes longueurs d’onde d’excitation : il est nécessaire d’avoir 2 ou 3 photons pour pouvoir obtenir le même niveau d’énergie que dans le cas d’une absorption à un photon. Ce diagramme peut donner l’impression que l’absorption des photons se fait successivement, mais l’excitation multiphoton est due à l’absorption simultanée de plusieurs photons.

Pour une absorption à un photon dans une cuvette, la quantité de lumière absorbée dans n’importe quel plan est proportionnelle à l’intensité incidente. La focalisation sur le centre d’une cuvette modifie la taille du faisceau, mais ne modifie pas la quantité totale de lumière traversant un plan. L’intensité d’émission est constante à toutes les positions à travers la cuvette, en supposant l’absence d’effet de filtre interne. En considérant une absorption à deux photons, la quantité de lumière absorbée est proportionnelle au carré de l’intensité. La

focalisation du faisceau diminue sa taille, mais augmente son intensité. En conséquence, la quantité de lumière absorbée n'est pas constante dans la cuvette, mais présente un maximum au point focal où l'intensité incidente est la plus élevée. Cet effet se traduit par une excitation fortement localisée (Figure 4.8).

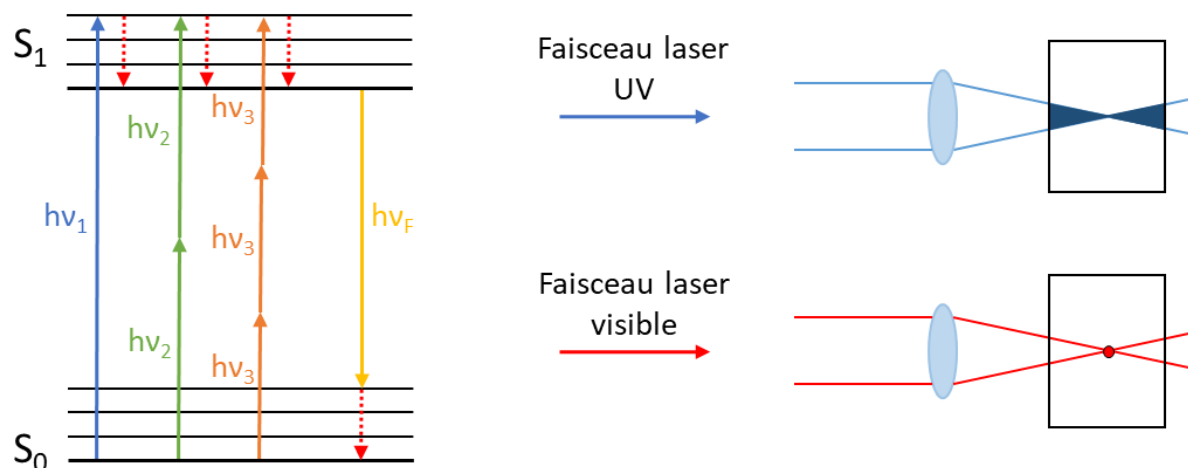


Figure 4.8 : Schéma de gauche : Diagramme de Perrin-Jablonski pour une excitation à un, deux et trois photons. Où, $hv_2 = hv_1/2$ et $hv_3 = hv_1/3$. Schéma de droite : Comparaison de l'absorption au cours du trajet du faisceau entre une excitation à un et deux photons.

Le principe de l'excitation multiphoton ayant été traité précédemment, nous pouvons nous intéresser au dispositif utilisé pour les différentes acquisitions. Une version simplifiée du trajet optique et des différents composants est disponible ci-dessous, figure 4.9. Le microscope multiphoton utilisé dans le cadre de ce projet est un microscope Nikon A1 MP (Nikon, Japon) et muni d'un objectif Plan Apo IR x 60 (Immersion dans l'eau, Nikon, Japon). Une première observation de nos échantillons est réalisée en binoculaire à l'aide d'une lampe émettant dans le visible (lampe Hg), ce qui nous permet de réaliser une première focalisation sur l'échantillon. L'excitation multiphoton dans ce dispositif est délivré par un laser pulsé Chameleon vision II (Laser Ti : saphir, Coherent[®], USA) à une fréquence de 80 MHz, disposant d'une gamme d'excitation entre 700 et 1080 nm. Dans le cadre de l'étude des photoproduits au sein des spores bactériennes, nous travaillons à une longueur d'onde de 710 nm.

Une fois le focus réalisé, le laser pulsé remplace la lampe comme source excitatrice et l'émission de fluorescence est collectée par 3 détecteurs (GaAsP PMT) associés à des filtres passe-bande qui séparent les longueurs d'ondes d'émissions : FF01-492/SP-25 (400-492 nm), FF03-525/50-25 (500-550 nm) et FF01-575/25-25 (563-588 nm) (Semrock, USA). Lors de l'acquisition

d'image au multiphoton, nous ajustons le focus en jouant sur la hauteur de l'objectif et on pilote les différents paramètres via le logiciel constructeur NiS-Element (Nikon, Japon).

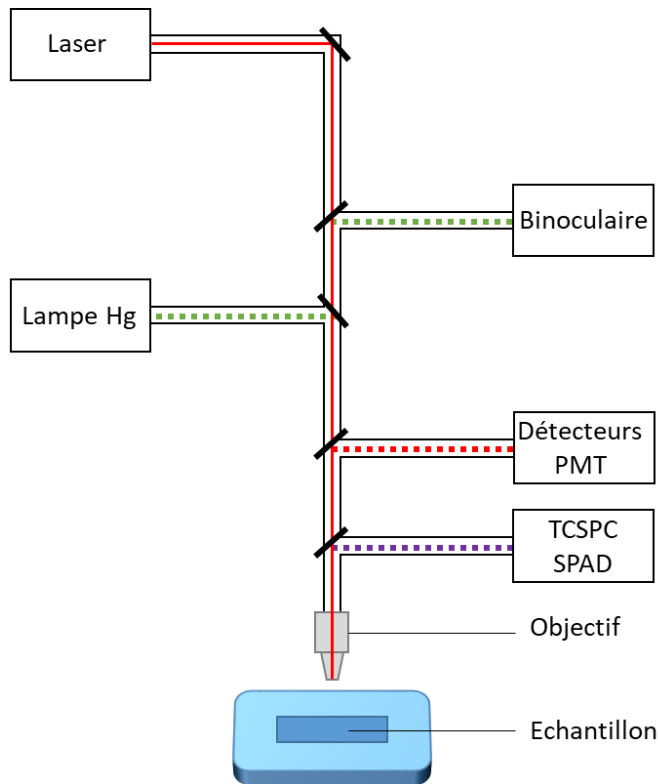


Figure 4.9 : Schéma du fonctionnement du microscope multiphoton. 3 modes d'observation sont disponibles : en lumière visible (pointillés vert), en excitation multiphoton (pointillés rouge) et en FLIM (pointillés violet).

3.1. FLIM

La « Fluorescence-Lifetime Imaging Microscopy » (FLIM) est une technique d'imagerie en microscopie, basée sur l'acquisition des temps de vie. Cette technique peut être associée à la microscopie multiphoton, du fait de l'usage d'un laser. Elle permet d'observer la répartition des temps de vie au sein de diverses matrices (Figure 4.10).

Pour réaliser les acquisitions des images FLIM, la source excitatrice et sa puissance reste identique, mais le signal est dévié non pas vers les détecteurs photomultiplicateurs mais vers des photodiodes à avalanche (SPAD, Picoquant, Allemagne) ainsi qu'un système TCSPC (PicoHarp 300 TCSPC module, Picoquant, Allemagne) qui compte les temps d'arrivée des photons après le pulse exciteur. Le système TCSPC permet d'établir les histogrammes de temps d'arrivée des photons. La fluorescence est collectée après le passage dans un filtre passe-bande 680/SP (Semrock, USA). Pour piloter les différents paramètres, nous utilisons le logiciel

constructeur Symphotime (Picoquant, Allemagne). Les ensembles de temps d'arrivée des photons sont ensuite traités via le logiciel MAPI, utilisant le principe du phasor plot, qui permet l'obtention des temps de vie de fluorescence de notre image FLIM.

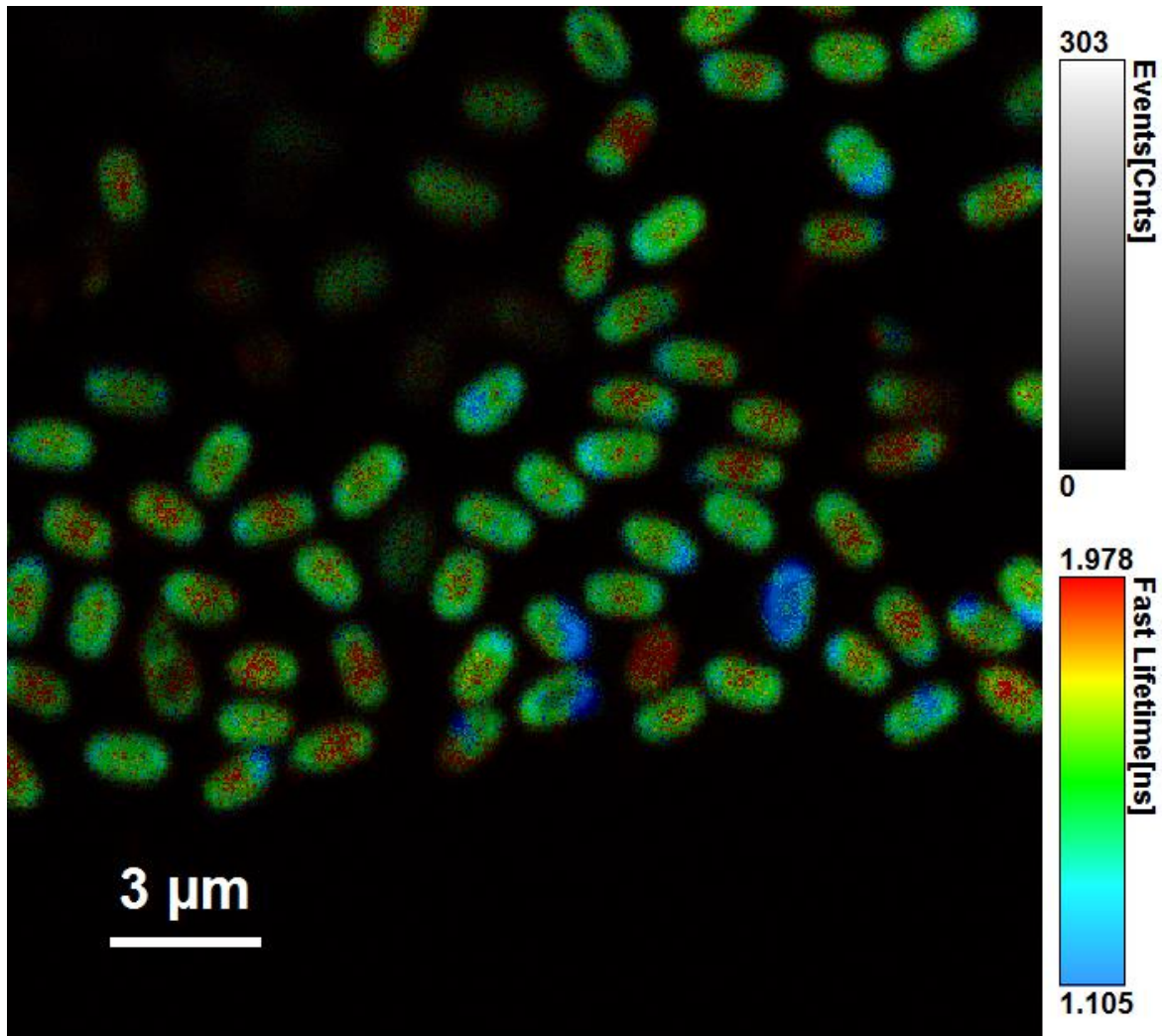


Figure 4.10 : Exemple d'image FLIM pour une souche sauvage de spore bactérienne avant traitement. L'échelle « Fast Lifetimes [ns] » indique la répartition des temps de vie au sein des spores, plus la couleur tend vers l'orange plus le temps de vie est long (~ 2 ns) et plus la couleur tend vers le bleu plus le temps de vie est court ($\sim 1,1$ ns).

4. Phasor plot

Le phasor est une représentation graphique des valeurs brutes des temps de vie de fluorescence obtenus par TCSPC, dans un espace vectoriel à 2 dimensions. Cette représentation est obtenue en convertissant les histogrammes de déclin de fluorescence en coordonnées (g,s) . Si $P(i,j)$ représente un pixel dans l'image FLIM aux coordonnées (i,j) et $I_{i,j}(t)$ est l'intensité du déclin de fluorescence associée au pixel, les coordonnées (g,s) sont définis :

$$g_{i,j}(\omega) = \frac{\int_0^T I_{i,j}(t) \cdot \cos(\omega t) dt}{\int_0^T I_{i,j}(t) dt} \quad (4.5)$$

$$s_{i,j}(\omega) = \frac{\int_0^T I_{i,j}(t) \cdot \sin(\omega t) dt}{\int_0^T I_{i,j}(t) dt} \quad (4.6)$$

Où, $\omega = 2\pi f$ et $f = 1/T$ est le taux de répétition du laser.

Dans le demi-cercle, les temps de vie de fluorescence courts seront proches des coordonnées $[1;0]$. Et les temps de vie de fluorescence longs s'approcheront de l'origine $[0;0]$. Pour un déclin mono exponentiel, les coordonnées seront positionnées sur un demi-cercle centré en $[0,5;0]$ et de rayon 0,5. Alors que les coordonnées pour un déclin multi exponentiel se trouveront à l'intérieur du demi-cercle, comme le montre la figure 4.11, le point orange aura une contribution venant des deux temps de vie (points noirs). Chaque contribution de ces points sera inversement proportionnelle à la distance f_1 et f_2 .

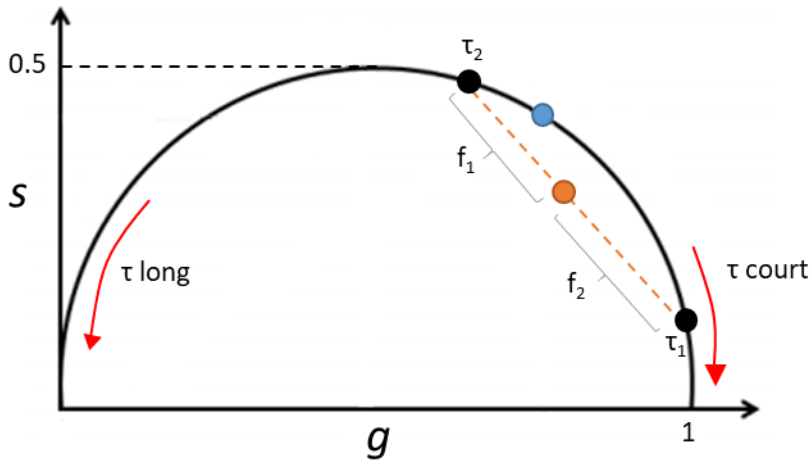


Figure 4.11 : Schéma récapitulatif de la représentation graphique du phasor. Point bleu : déclin de fluorescence mono exponentiel ; point orange : déclin multi exponentiel avec τ_1 et τ_2 les temps de vie associés, et f_1 et f_2 les facteurs de contributions.

La représentation phasor plot est un bon moyen de s'affranchir des problèmes liés aux ajustements numériques, qui est une méthode très répandue, mais qui pose des problèmes, notamment à cause du nombre de paramètres variables dans un ajustement multiexponentiel. C'est pourquoi, dans de nombreuses expériences, nous avons fait le choix d'utiliser cette technique en complément des ajustements exponentiels, ce qui permet d'affiner nos déterminations de temps de vie de fluorescence. Cette technique est aussi une représentation

graphique de temps de vie de fluorescence, facilite parfois la visualisation des évolutions des fluorophores ou familles de fluorophores en fonction de certains paramètres.

Pour extraire les temps de vie de fluorescence à partir de nos histogrammes de déclin de fluorescence, nous traitons nos données à l'aide d'outils adaptés. Le logiciel nommé MAPI nous permet d'obtenir la représentation des temps de vie sous forme de phasor plot à partir d'une image FLIM, voir figure 4.12. A partir des images obtenues par le logiciel MAPI, on extrait les contours de la « tache » obtenue ce qui nous permet de visualiser l'évolution des temps de vie en fonction de changements dus à des stress (via des irradiations UVC ou des changements de grandeurs physico-chimiques du type pH et a_w).

Pour les histogrammes de déclin de fluorescence obtenus par spectroscopie résolue dans le temps, nous utilisons un code Matlab développé au sein du laboratoire, nous permettant d'extraire les temps de vie de fluorescence.

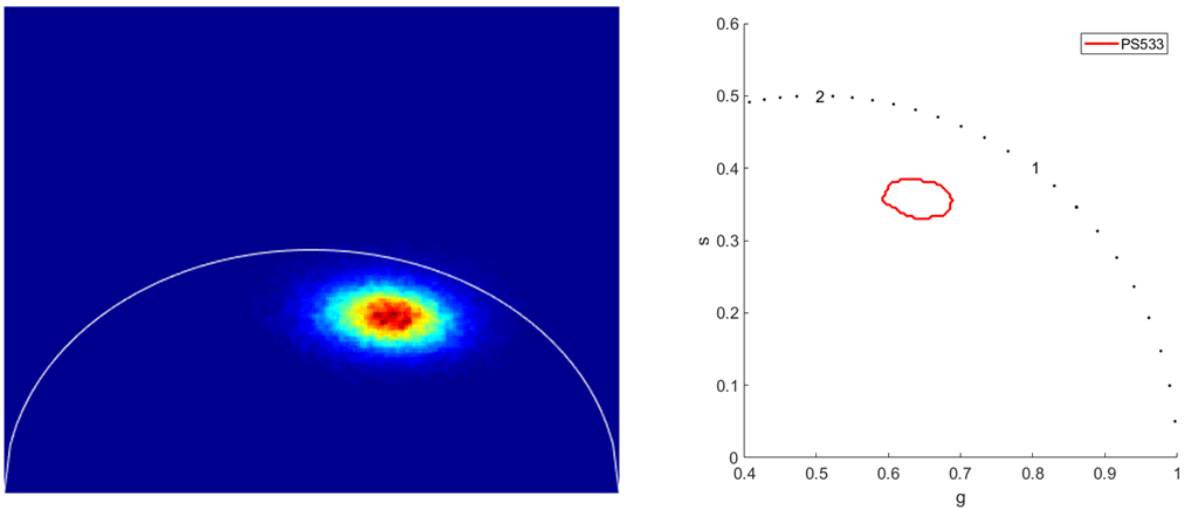


Figure 4.12 : Exemple de représentation phasor plot obtenue à partir d'une image FLIM d'une souche sauvage de spore bactérienne, traité dans le logiciel MAPI ainsi qu'une représentation de son contour via un code Matlab.

V. Résultats et discussions

Chapitre 1 : Développement de techniques spectroscopiques multidimensionnelles pour le suivi des changements en acides et polyphénols induits par la fermentation malolactique

Ce premier chapitre regroupe les résultats dédiés au couplage des techniques de fluorescence stationnaire et résolue dans le temps appliqué au développement d'une nouvelle technique de caractérisation dans le domaine viticole. Une attention particulière est portée à la fermentation malolactique, qui est un procédé fermentaire capital dans l'élaboration de certains vins, et plus particulièrement dans les vins issus de régions septentrionales. Rappelons que l'un des objectifs de ces travaux de thèse est de développer un outil capable de détecter et caractériser les changements de fluorescence de certaines molécules natives présentes dans le vin. Pour réaliser cette étude nous nous sommes principalement intéressés aux modifications moléculaires induites pendant la fermentation malolactique, à l'aide d'un échantillonnage de vins de Chardonnay (91 vins). Les résultats sont présentés dans l'article « *Multispectral fluorescence sensitivity to acidic and polyphenolic changes in Chardonnay wines – The case study of malolactic fermentation* » publié en 2021 dans le journal scientifique *Food Chemistry* (DOI : [10.1016/j.foodchem.2021.131370](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131370)). Pour étayer ce chapitre, des résultats supplémentaires seront discutés à la suite de l'article. Ces résultats permettent de conforter les résultats concernant la visualisation de l'effet de la FML sur les acides organiques et phénoliques. De plus ils amorceront une étude sur l'impact des souches bactériennes sur la FML et la visualisation de traitement *via* phasor plot.

Multispectral fluorescence sensitivity to acidic and polyphenolic changes in Chardonnay wines – The case study of malolactic fermentation

Maxime Pacheco ^a, Pascale Winckler ^{a,b}, Ambroise Marin ^{a,b}, Jean-Marie Perrier-Cornet ^{a,b}, Christian Coelho ^{a,c,*}

^a *UMR Procédés Alimentaires et Microbiologiques, AgroSup Dijon, Université de Bourgogne Franche-Comté, 1 Esplanade Erasme, 21000 Dijon, France.*

^b *Dimacell Imaging Facility, AgroSup Dijon, Université de Bourgogne Franche-Comté, 1 Esplanade Erasme, 21000 Dijon, France.*

^c *Université Clermont Auvergne, INRAE, Vetagro Sup campus agronomique de Lempdes, UMR F, F-15000 Aurillac, France.*

* Corresponding author :

Christian Coelho, Université Clermont Auvergne, INRAE, Vetagro Sup campus agronomique de Lempdes, UMR F, F-15000 Aurillac, France, christian.coelho@vetagro-sup.fr

Abstract:

In this study, stationary and time-resolved fluorescence signatures, were statistically and chemometrically analyzed among three typologies of Chardonnay wines (A, B and C) with the objectives to evaluate their sensitivity to acidic and polyphenolic changes. For that purpose, a dataset was built using Excitation Emission Matrices of fluorescence (N=103) decomposed by a Parallel Factor Analysis (PARAFAC), and fluorescence decays (N=22), mathematically fitted, using the conventional exponential modeling and the phasor plot representation.

Wine PARAFAC component C4 coupled with its phasor plot g and s values enable the description of malolactic fermentation (MLF) occurrence in Chardonnay wines. Such proxies reflect wine concentration modifications in total acidity, malic/lactic and phenol acids. Lower g values among fresh MLF+ wines compared to MLF- wines are explained by a quenching effect on wine fluorophores by both organic and phenolic acids. The combination of multispectral fluorescence parameters opens a novel routinely implementable methodology to diagnose fermentative processes.

Keywords:

Malolactic fermentation - organic acids – traceability - PARAFAC components - fluorescence lifetime – phasor plot

1. Introduction

Fluorescence spectroscopy techniques offer the advantage of a fast, robust and non-destructive characterization ability over expensive and time-consuming separative techniques. Their high sensitivity and specificity are important and allow the study of fluorescent compounds and chemical families among the complex chemistry present in food matrices and particularly wine. Over the past decade, much has been written on fluorescence usefulness in providing helpful classification indicators regarding cultural practices, varieties distinction, technological practices, regional authentication, adulteration and spoilage problematics (Airado-Rodríguez, Durán-Merás, Galeano-Díaz, & Wold, 2011; Cabrera-Bañegil, Valdés-Sánchez, Moreno, Airado-Rodríguez, & Durán-Merás, 2019; Coelho, Aron, Roullier-Gall, Gonsior, Schmitt-Kopplin, & Gougeon, 2015; Elcoroaristizabal, Callejon, Amigo, Ocana-Gonzalez, Morales, & Ubeda, 2016; Mierczynska-Vasilev et al., 2021; Moret et al., 2019; Ranaweera, Gilmore, Capone, Bastian, & Jeffery, 2021; Robert-Peillard, Boudenne, & Coulomb, 2014; Saad, Bouveresse, Locquet, & Rutledge, 2016; Sadecka, Jakubikova, & Majek, 2018; Santos, Bosman, Alexandre-Tudo, & du Toit, 2022; Wan, Pan, & Shen, 2012; Zhong et al., 2014).

From a practical point of view, fluorescence spectroscopy is classically used by winegrowers and winemakers to help them in their decision making process. For instance, red grape maturity can be estimated using anthocyanins and chlorophyll steady state fluorescence proxies (Agati et al., 2013; Agati, Meyer, Matteini, & Cerovic, 2007). Trivellin *et al.* used the fluorescence lifetime variations of a metal/porphyrin complex to measure oxygen concentrations in wine fermentation and ageing tanks (Trivellin et al., 2018). This technology is widely used in wine industries for dissolved oxygen measurement during winemaking steps and wine bottling. The detection of wine yeasts and bacteria is also based on the steady state fluorescence response of labelled microorganisms, sorted by a flow cytometer and used by several oenological laboratories (Longin, Petitgonnet, Guilloux-Benatier, Rousseaux, & Alexandre, 2017). Other applications consist in analysing the total steady state fluorescence of wines using Excitation Emission Matrices of fluorescence (EEMF) coupled to multivariate approaches in order to discriminate grape varieties, vintages, oenological or fermentation practices (Airado-Rodríguez, Galeano-Díaz, Durán-Merás, & Wold, 2009; Coelho et al., 2015). The measurement of fluorescence lifetimes of wine chemicals (resveratrol, flavylum and pyranoflavylum cations) when adsorbed on clay fining agents or adsorbents enabled the study of organic complexations and organic/inorganic interactions (Silva et al., 2019; Trigueiro et al., 2018). Some authors

tried to relate wine fluorescence patterns to wine quality and to wine chemical composition (Coelho et al., 2015; Coelho, Gougeon, Perepelkine, Alexandre, Guzzo, & Weidmann, 2019; Elcoroaristizabal et al., 2016; Saad et al., 2016; Sadecka et al., 2018).

Among the qualitative criteria enhancing wine quality, malolactic fermentation (MLF) is often achieved in cellars by endogenous or exogenous lactic acid bacteria, reducing acidity by conversion of malic acid into lactic acid and increasing organoleptic properties by generating new volatile compounds (Bauer & Dicks, 2017). MLF is a fermentative process that brings a reorganisation of the chemical composition of wines and contributes to flavour complexity. During this fermentative process, the phenolic profile of wines evolves and depends on the strains of lactic bacteria realizing MLF (T. Hernández, Estrella, Pérez-Gordo, Alegría, Tenorio, & Moreno-Arribas, 2007). MLF has been shown to influence the concentrations of hydroxycinnamic acids and their derivatives, increasing the concentrations of caffeic/p-coumaric/ferulic acids and decreasing those in their precursors such as caftaric/coutaric/fertaric acids (Cabrita, Torres, Palma, Alves, Patão, & Costa Freitas, 2008; Teresa Hernández, Estrella, Carlavilla, Martín-Álvarez, & Moreno-Arribas, 2006; T. Hernández et al., 2007; Martínez-Pinilla, Martínez-Lapuente, Guadalupe, & Ayestarán, 2012). MLF can also be accompanied by a wood contact time in wines providing novel sensory attributes to Chardonnay wines (González-Centeno, Chira, & Teissedre, 2019). Additionally MLF could distinguish cool-climate and warm-climate wine producing regions in the world (Bartowsky, 2005). In those regions, differences in malic lactic consumption and derived metabolisms during berry maturation phase, would increase the chemical variability on grapes and therefore on MLF+/-Chardonnay wines on a world scale (Bartowsky, 2005; Ruffner, 1982). For that reason, the use of high-throughput fluorescence spectroscopic techniques to diagnose an elevated number of diverse wine samples combining chemometric tools, appears to be a good alternative to evaluate both MLF+/- wine discrimination and associated chemical modifications.

In this paper, we discuss the application of multispectral fluorescence with chemometrics to differentiate Chardonnay wines based on their acidic modification once malolactic fermentation was achieved (MLF+) or not (MLF-). For that purpose, Excitation Emission Matrices of fluorescence (N=103) were decomposed by a Parallel Factor Analysis (PARAFAC) and fluorescence lifetime decays (N=22) were mathematically fitted, using the conventional exponential modeling and the phasor plot representation. The chemical significance of MLF

discrimination among Chardonnay wines by multispectral fluorescence was evidenced by organic acids and polyphenol concentration measurement on the analyzed wines.

2. Materials and methods

2.1. Wine Samples

One hundred and three Chardonnay wines were analyzed in this study gathering three typologies of Chardonnay wines, named as A, B and C wines. Twelve fresh wines during vintage 2021 from two Burgundian wineries, Jean Claude Boisset at Nuit Saint Georges (named as A) and Domaine de l'Université de Bourgogne at Marsannay La Côte (named as B), were sampled before (MLF-) and after (MLF+) malolactic fermentation. Ninety-one Chardonnay wines were sampled during the “Chardonnay du Monde 2018” wine contest (named as C) organized in March 2018 at Chateau des Ravatys (Saint Lager, France), originating from 18 countries of the world, with no information concerning the MLF achievement. Table Supplementary Information (S.I.) 1, 2 & 3 gathers information collected for the different analyzed wines.

2.2. Chemical analyses

Each wine was analyzed by the OenoFossTM (Foss, Nanterre, France) analyser for classical oenological parameters: ethanol, total acidity, glucose, pH and volatile acidity. A Beckman[®] P/ACE 5000 capillary electrophoresis (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) equipped with a UV detector was used to determine the amount of the four main organic acids in wine : tartaric acid, malic acid, lactic acid and citric acid following the methodology recommended by Organisation Internationale de la Vigne et du Vin (OIV, 2011). Polyphenolic compounds in wines were separated and quantified using an Acquity Waters UHPLC-DAD-fluorometer (Waters Corporation, Milford, MA, USA), using a previously described methodology (Coelho et al., 2019).

2.3. Wine Fluorescence measurements

All wines were diluted forty times with ultrapure water and poured in a 1 cm path-length quartz cuvette prior to steady state and time resolved spectroscopic measurements. For time-resolved fluorescence, five MLF+ wines and five MLF- wines were also diluted forty times with ultrapure water.

2.3.1. Steady state fluorescence

Excitation-Emission Matrices of Fluorescence (EEMF) were acquired on a Horiba Aqualog (Horiba Scientific, Kyoto, Japan) unit by setting the excitation wavelengths from 225 nm to 600 nm (3 nm interval) and the emission wavelengths from 200 to 600 nm (3.22 nm). Each EEMF was corrected daily for Rayleigh scattering and inner filtering and normalized to 1ppm quinine sulfate solution, using the constructor software (Aqualog software). All EEMF were gathered in a Chardonnay wine database and mathematically analyzed with a PARAFAC model using the Matlab (Mathworks, Natick, MA, USA) drEEM box (Murphy, Stedmon, Graeber, & Bro, 2013).

2.3.2. Time resolved fluorescence

Fluorescence decay measurements were performed using time-correlated single-photon counting (TCSPC) with a Horiba Jobin Yvon FluoroMax-4 (Horiba Scientific, Kyoto, Japan). Excitation was generated using a 950 ps pulsed 280 nm LED head source (DD-280L, pulse duration <1.5 ns) with a fixed working frequency of 1 MHz. We used a 280 nm diode instead of a 315 nm diode to be as close as possible to the maximum excitation with the pulsed light sources at our disposal. A Ludox[®] solution (Sigma Aldrich, Saint Louis, MI, USA) solution was used to daily calibrate the impulsional response function of the instrument. The fluorescence signal collected at emission maximum corresponding to PARAFAC component C4: 440 nm. In TCSPC the time difference between each photon detection and the corresponding excitation pulse is measured and stored into a histogram, showing the fluorescence decay after an excitation pulse. A total of 10000 photons were counted in the peak of each histogram before stopping the acquisition. Histograms were 4096 gates (4096 channels = 224.746 ns). The fluorescence decay was analyzed using the conventional exponential decay fitting function by the “DAS6 Analysis” analysis software (Horiba Scientific, Kyoto, Japan) and the phasor plot representation using the MAPI software (IRI, USR 3078 CNRS, BCF, available on request: <http://biophotonique.univ-lille1.fr/spip.php?rubrique60>) (Leray, Padilla-Parra, Roul, Hélot, & Tramier, 2013).

- **2.3.2.1. Exponential decay fitting**

If a uniform population of fluorophores are excited at a single excitation wavelength, the fluorescence intensity decay after an excitation pulse is described by a mono-exponential function, as follows:

$$\mathbf{F}(t) = \mathbf{F}_0 \cdot e^{-t/\tau} \quad (1)$$

Where $F(t)$ is the fluorescence intensity measured at time t , F_0 is the initial fluorescence intensity and τ is the fluorescence lifetime.

For complex samples, due to different fluorescent subpopulations and different chemical environments, a multi-exponential fitting procedure should be used to estimate as best as possible the number of fluorescent subpopulations contributing to the fluorescence decay curve. Such fitting procedures are validated by a “ χ^2 ” (CHISQ) close to 1 (Moore, McCabe, & Craig, 2017).

In this study, we used a double exponential fitting function for all Chardonnay wines fluorescence decays, as follows:

$$\mathbf{F}(t) = \mathbf{B}_1 \cdot e^{-t/\tau_1} + \mathbf{B}_2 \cdot e^{-t/\tau_2} \quad (2)$$

With $F_1 = B_1 / (B_1 + B_2)$ and $F_2 = B_2 / (B_1 + B_2)$

$F(t)$ is the fluorescence intensity measured at time t , B_1 and B_2 are the pre-exponential factors, F_1 and F_2 the fractional intensities expressed in percentage, respectively for the subpopulations with fluorescence lifetimes τ_1 and τ_2 ($\tau_1 < \tau_2$).

- **2.3.2.2. Phasor plot representation**

The phasor plot is a graphical representation of all the raw TCSPC data in a vector space obtained by the mathematical Fourier transform decomposition. Each wine fluorescence decay curve is converted into $[g ; s]$ coordinates, calculated by the cosine and sine transforms of the measured fluorescence intensity decay $I(t)$, defined by:

$$g_{i,j}(\omega) = \frac{\int_0^T I(t) \cdot \cos(n\omega t) dt}{\int_0^T I(t) dt} \quad (3)$$

$$s_{i,j}(\omega) = \frac{\int_0^T I(t) \cdot \sin(n\omega t) dt}{\int_0^T I(t) dt} \quad (4)$$

Where ω is the laser repetition angular frequency, n is the harmonic frequency and T is the finite width of the temporal measurement window. For a mono-exponential decay, the $[g ; s]$ coordinates are located on a semicircle centred on a point $[0.5;0]$ with a radius 0.5. Whereas for a multi-exponential decay, the $[g ; s]$ coordinates will no longer be located on the semicircle

but rather inside this semicircle. In the semicircle, the short fluorescence lifetimes are close to the coordinates [1;0], and the long fluorescence lifetimes approach the origin [0;0].

Fluorescein (fluorescence lifetime: 4.1 ns) was used in the phasor plot representation for calibrating measurements between values obtained by exponential decay fitting and phasor plot analysis.

2.4. Statistical analysis

The measured oenological parameters, PARAFAC components Fmax values, fluorescence lifetimes and phasor plot g and s values of Chardonnay wines were statistically analyzed with a variance analysis (p-value <0.05) to evaluate the significance of differentiation between MLF+ and MLF- wines. This was conducted with Origin pro 8.0 software (OriginLab, Northampton, MA). Two types of multivariate analysis were carried out with SIMCA software (Umetrics, AB, Umea, Sweden): principal component analysis (PCA) with PARAFAC components Fmax with and without g and s values, and partial least square analysis (PLS) to evaluate the discrimination of MLF achievement in Chardonnay wines based on PARAFAC components Fmax values and g and s values obtained for the three typologies of Chardonnay wines (N=22).

3. Results and discussion

3.1. Wine chemical composition

Table 1 illustrates the chemical constituents that statistically differentiate wines according to MLF achievement among the 103 Chardonnay wines. Citric acid and pH were not significantly different. Tartaric acid, volatile acidity and glucose appeared to be significantly different between the two groups at 95% of confidence interval. Mean values of glucose concentrations were comprised between 2.59 and 3.03 g.L⁻¹, indicating that all wines are dry white wines. Total acidity, malic acid and lactic acid are the only three parameters that are significantly different at 99 % of interval of confidence. Mean values of ethanol and malic acid are higher in MLF- wines compared to MLF+ wines, respectively. Inversely, total acidity and lactic acid mean values are higher in MLF+ wines compared to MLF- wines. The great variability of provenance among the Chardonnay contest wines (Table S.I.3), led to a statistical differentiation of alcohol content in wines, principally due to grape maturity variability among all countries, but no differentiation in ethanol content is generally admitted. Results from fresh wines highlight the

same tendency. Hence only the Total acidity and Malic/Lactic content of wines truly statistically differentiate those wines. Additionally, for Chardonnay contest wines, the distinction between MLF+ and MLF- wines should be attenuated by the fact that malic and lactic acid could be added up to 4 g.L⁻¹ (expressed in tartaric acid equivalent) in musts and wines for acidification purposes according to OIV regulations (OIV, 2017). Some wines could have been bottled and stabilized while malolactic fermentation was still in progress.

Table 1: Physicochemical parameters of wines for the 103 analyzed Chardonnay wines samples (A+B+C).

	MLF- wines	MLF+ wines
Alcohol (%v,v)	13.28 (0.83)	12.98 (0.67)*
pH	3.48 (0.14)	3.46 (0.14)
Glucose (g.L⁻¹)	2.59 (1.87)	3.03 (1.62)
TA (g.L⁻¹)	4.04 (0.42)	3.72 (0.34)**
Malic acid (g.L⁻¹)	2.56 (0.71)	0.52 (0.53)**
Lactic acid (g.L⁻¹)	0.39 (0.24)	3.59 (1.10)**
Tartaric acid (g.L⁻¹)	1.81 (0.57)	2.05 (0.54)*
Citric acid (g.L⁻¹)	0.50 (0.79)	0.61 (0.85)
N	50	53

TA: total acidity expressed in tartaric acid equivalent per liter; N: number of wine samples; figures in parentheses, standard deviations; **: significant with p-value < 0.01 between the two groups of wines (MLF+/-); * : significant with p-value < 0.05 between the two groups of wines (MLF+/-).

3.2. PARAFAC components describing Chardonnay wine diversity and sensitivity towards MLF achievement on full sample (A+B+C)

Fresh wines from two wineries (A and B), and Contest Chardonnay wines (C) were described by their EEMFs (examples of each group shown in Figure S.I.1). A wine PARAFAC model generates 4 PARAFAC components C1, C2, C3 and C4 describing all the analyzed wines (Figure 1). The PARAFAC model was pre-validated with a core consistency of 80% and further split half validated with four independent splits on the 4 component PARAFAC model, according to previously published procedures (Murphy et al., 2013). Figure 1A shows that the first two components of the PCA model cover 62.2 % of the fluorescence variability among the 103 analyzed wines. At a first glance, Chardonnay wines were heterogeneously distributed in terms of MLF achievement among these wines. Chardonnay wines from the two wineries A

and B were clearly differentiated by means of their steady-state fluorescence. A less evident distinction appeared between fresh wines and wines from the Chardonnay wine contest. Such differentiation could be related to some particular attributes already discussed in literature (Coelho et al., 2015; Suciú, Zarbo, Guyon, & Magdas, 2019) gathering the vintage effect (2020 for the fresh wines compared to 2015-2017 for the contest wines) and the winemaking techniques (stabilization, fining, filtration, bottling and surely the bottle ageing enabling to differentiate Chardonnay fresh wines from bottled contest wines). Even if it was not the objective of the study, some wine origins were rather well discriminated among wines from the typology C, particularly when representing Fmax values of PARAFAC C3 against C4 (Figure S.I.2).

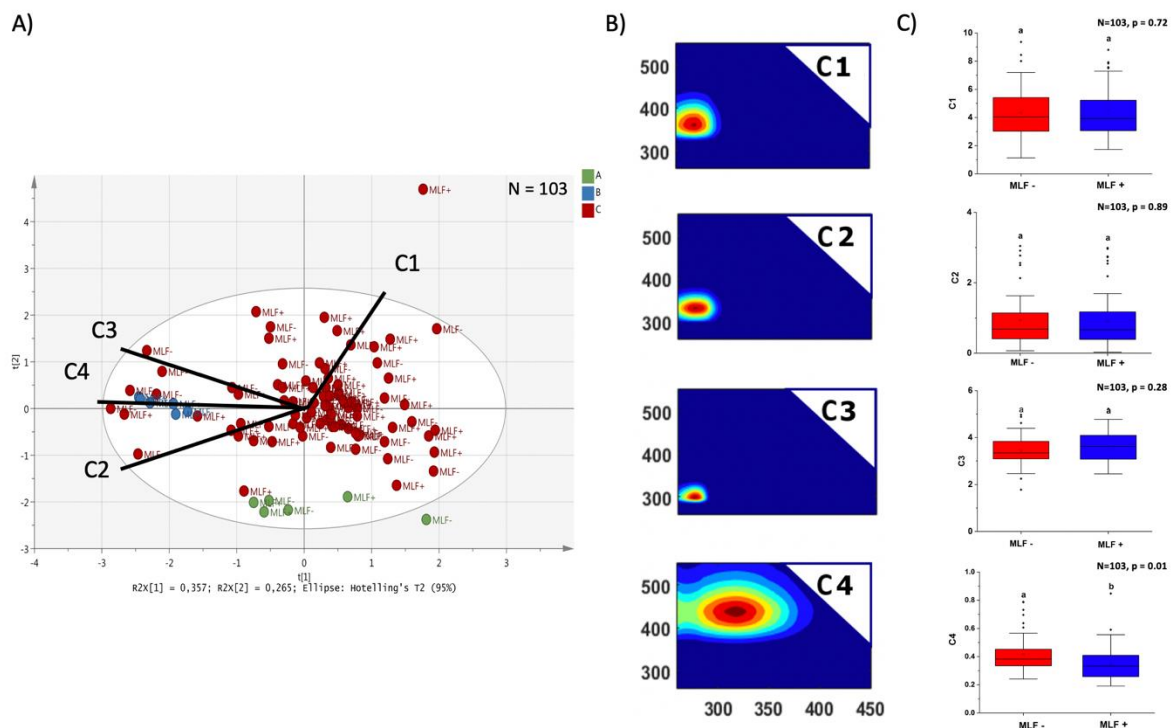


Figure 1: Biplot representation of the first two components of a PCA model describing Fmax values of PARAFAC components for Chardonnay fresh wines from wineries A (green) and B (blue) and from Chardonnay wine contest C (red) (A). PARAFAC components EEMFs that were used as loadings for the PCA model (B). Analysis of variance of the four PARAFAC components Fmax values depending on the malolactic fermentation achievement (MLF+) or not (MLF-) (C). Different letters above box plot (a,b) represent significant differences ($p=0.05$) between the fermentative conditions.

EEMFs of the four PARAFAC components were generated with a PARAFAC model validated with a core-consistency diagnostic and a split-half validation made on four independent splits. They were in accordance with results from recent studies carried out on wines (Coelho et al., 2015; Elcoroaristizabal et al., 2016; Ranaweera et al., 2021; Suciú et al., 2019). We further study the ability of PARAFAC components to differentiate MLF achievement among wines,

even though a global heterogeneity and variability from the wine provenance were previously discussed. Figure 1C shows the boxplot of the four PARAFAC components Fmax values. Within this variability and heterogeneity of Chardonnay wines: C1, C2 and C3 were not sensitive enough to distinguish the MLF achievement (same letter “a” between groups above the box plots). Nevertheless, PARAFAC component C4 Fmax values appeared to be statistically higher in MLF+ wines (0.41 ± 0.14) compared to MLF- wines (0.34 ± 0.12).

Previous studies highlighted this point among non-flavonoids compounds and more particularly tartaric esters of phenolic acids that are metabolized during MLF due to esterase activities present in several malolactic bacteria and liberating free phenolic and hydroxycinnamic acid derivatives (Cabrita et al., 2008; Collombel, Melkonian, Molenaar, Campos, & Hogg, 2019; Pérez-Martín, Seseña, Izquierdo, & Palop, 2013). As an example, tartaric acid has already been indicated as a good candidate with optical similarities and well correlated with PARAFAC component C4 but obviously this is not the only one (Roullier-Gall et al., 2017).

3.3. Fluorescence lifetime decay of PARAFAC component C4 in Chardonnay wines

3.3.1 Exponential decay fitting analysis of sample C

To interpret the discrimination between MLF- and MLF+ wines in terms of physico-chemistry of wine fluorophores behaving like the PARAFAC component C4 (Ex 315 nm/Em 440 nm) we investigate the fluorescence decays of wine fluorophores emitting at 440 nm when excited at 280 nm and not 315 nm for all this study. Figure 2 shows the fluorescence decays of MLF- and MLF+ Chardonnay wines, taken randomly from the Chardonnay contest wine series (C). They all present at least a bi-exponential decrease of intensity with short lifetimes τ_1 comprised between mean values of 4.19 ns and 4.53 ns and longer fluorescence lifetimes τ_2 comprised between 13.28 ns and 13.86 ns. Regardless of MLF achievement, fractional intensities were higher for the short fluorescence lifetime τ_1 comprised between 61.1 and 63.7 % compared to 36.3 and 38.9 % for lifetime τ_2 showing this general tendency for Chardonnay wines at constant pH equal to 5. This heterogeneous distribution of fluorescence lifetimes indicated that fluorescence decay is not attributed to sole monomeric fluorescent compound but also to condensed structures, which have already been associated with flavonoids dimers (Bergmann, Barkley, Hemingway, & Mattice, 1987) and for polyphenolic associations with proteins (Mueller-Harvey et al., 2012). Such chromophoric macromolecular compounds derived

from flavonoids or non-flavonoids should be present in Chardonnay white wines (Coelho et al., 2017). The four mathematical parameters (τ_1 , τ_2 , F_1 and F_2) present no statistical difference between MLF- and MLF+ wines, indicating that the fluorophores should reveal intimately close environments related to an abundant phenolic population. Those wine emitting moieties are characterized by a majority of short fluorescence lifetimes and they should be associated in larger structures covalently bound or attached by interaction as reflected by the contribution of longer fluorescence lifetimes.

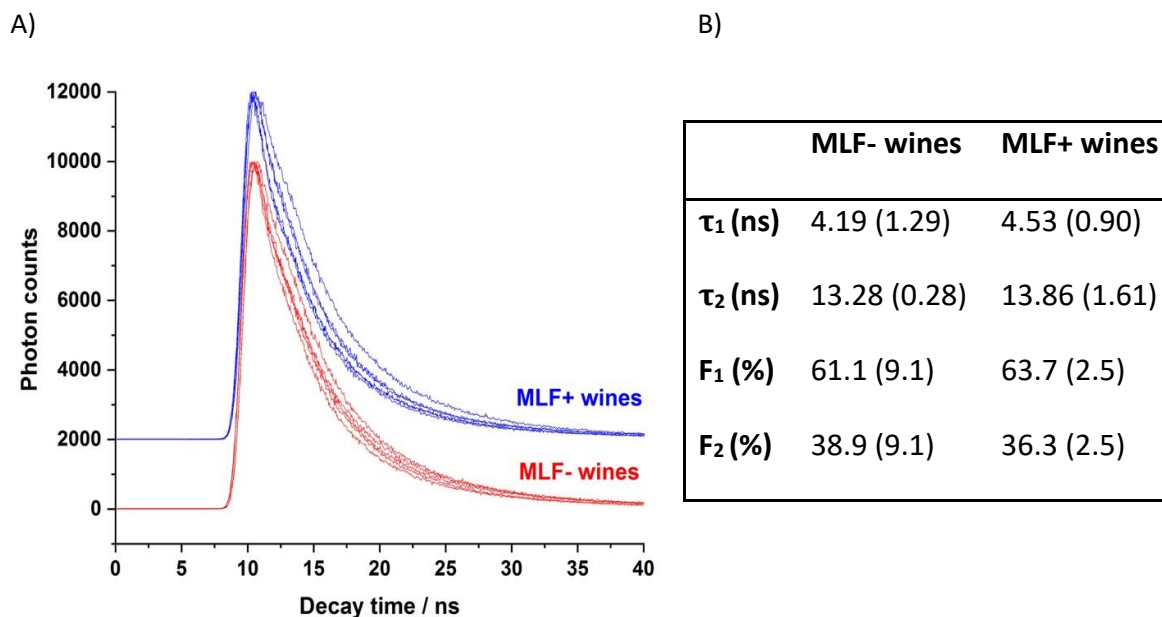


Figure 2: Decay of fluorescence measured at pH=5 of MLF+ (blue) and MLF- wines (red) sampled during Chardonnay wine contest C with an excitation wavelength set as 280 nm and emission set as 440 nm. The baseline of the blue curve is shifted to better observe changes in fluorescence decay (A). Mean values of decay lifetimes τ_1 and τ_2 , expressed in ns and their associated fractional intensities F_1 and F_2 expressed in percentage, as indicated in equation 2, at a fixed pH=5. Values in parenthesis indicate the mean standard deviations for the five MLF+ wines (N=5) and MLF- wines (N=5) (B).

3.3.2. Phasor plot analysis

For the following part, we use the (g,s) coordinates of wines to characterize fluorescence lifetime decays of wines from wineries A (N=6) and B (N=6) and from Chardonnay wine contest C (N=10). This type of analysis is commonly used in biology and medicine but has never been reported in food or wine science to our knowledge. This approach better assesses heterogeneous fluorescence as encountered in wine environments (Ranjit, Malacrida, Jameson, & Gratton, 2018; Stringari, Cinquin, Cinquin, Digman, Donovan, & Gratton, 2011) and to depict physico-chemical interactions of fluorophores due to changes in pH, metal and metabolite concentration (Battisti, Digman, Gratton, Storti, Beltram, & Bizzarri, 2012; Celli, Sanchez, Behne, Hazlett,

Gratton, & Mauro, 2010; Martelo, Fedorov, & Berberan-Santos, 2015). In our experimentation, the phasor plot approach helps to visualize the entire dataset of wine fluorescence decays dataset for MLF+/- wines. From the phasor plot (Figure 3) MLF+ wines appear to shift to higher g values. In order to validate this observation, we apply a variance analysis with a confidence interval of 95%. Mean values for the three typologies of wines are represented in the boxplot representations (Figure 3B, 3C, 3D and 3E). When all Chardonnay wines ($N=22$) are represented, g values are not statistically different between MLF- and MLF+ wines due to a high variability, even if a trend to higher g mean values is observed (from 0.60 to 0.62 in Figure 3B). This variability comes essentially from unfollowed fermentative processes during wine elaboration as observed in Figure 3E. Additional variability is brought by great discrepancies observed for g -values from winery A (Figure 3C) and winery B (Figure 3D) presenting mean g values of 0.65 and 0.55, respectively. Interestingly, for these fresh wines, regardless of the winery origin, MLF+ wines present systematically higher g mean values, meaning that wine fluorescence lifetimes decrease after the malolactic fermentation. This suggests the possibility of an input of wine quenchers during malolactic fermentation. This will be discussed in the next part in relation to wine acidic and polyphenolic composition (Table S.I.4).

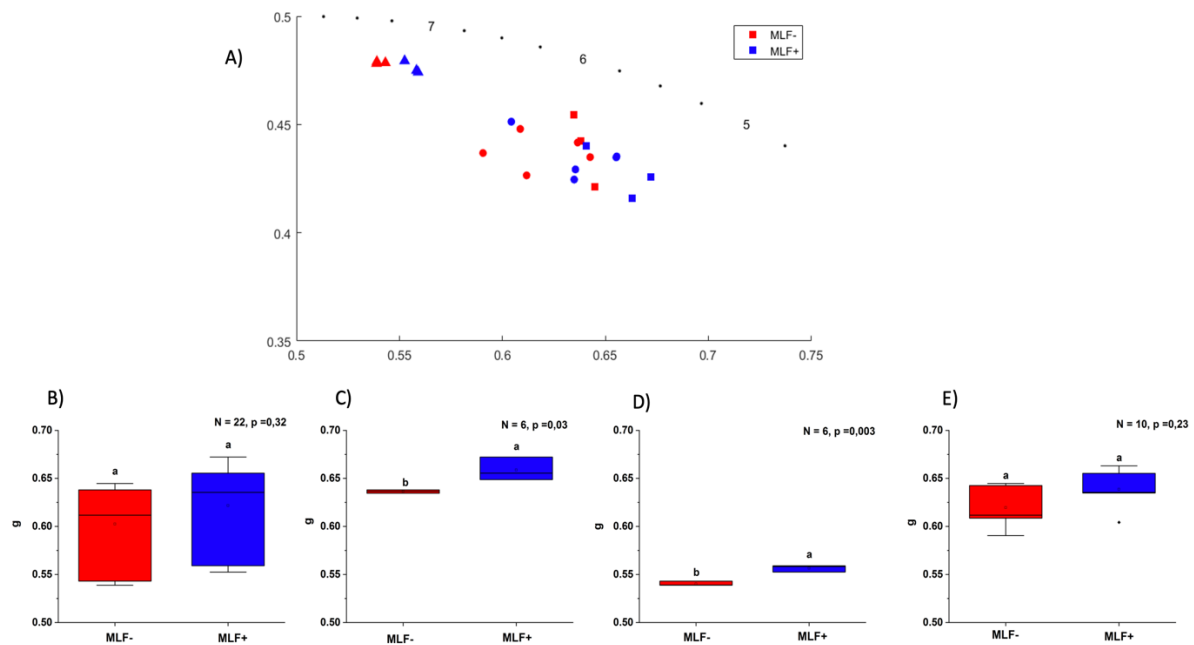


Figure 3: Phasor plot of fresh Chardonnay wines in winery A (squares), winery B (triangles) and Chardonnay contest wines C (circles) analyzed before and after malolactic fermentation, with an emission wavelength set at 440 nm for a fixed excitation at 280 nm (A). Chardonnay wines g values for all analyzed wines A+B+C (partly) ($N=22$) (B), fresh wines from winery A ($N=6$) (C), fresh wines from winery B ($N=6$) (D) and a selection of Chardonnay contest wines ($N=10$) (E). Different letters above box plot (a,b) represent significant differences ($p=0.05$) between the fermentative conditions.

3.4. Discussion of potential quenchers occurring during malolactic fermentation in Chardonnay wines

In order to deepen wine fluorescence lifetime changes upon malolactic fermentation, g and s values were plotted for the 22 Chardonnay analyzed wines upon total acidity expressed in tartaric acid equivalent. A low correlation between g values and total acidity of each wine was found (correlation coefficient $r = 0.36$ and coefficient of determination $R^2 = 0.1278$, Figure S.I.3), strengthening the role of organic acid in the fluorescence lifetimes decreasing with an increase of organic acids in wines upon MLF. Nevertheless, the increase in total acidity upon malolactic fermentation is not suspected due to the metabolization of a stronger acid, malic acid into lactic acid. Generally, pH tends to increase with MLF but in our study the correlation was not good (correlation coefficient $r = 0.06$ and coefficient of determination $R^2 = 0.0039$, Figure S.I.4). Nevertheless, the study of wine pH on wine fluorophores should be carefully detailed in the future due to deprotonation of polyphenolic moieties, changing drastically the fluorophores lifetimes. We also look at the correlation with polyphenolic compounds without satisfactory results meaning that their concentration does not influence wine fluorescence lifetime measurement (results not shown here).

In order to understand the increase of g values during MLF, we supplement one MLF- fresh wine with potential acidic and polyphenolic quenchers at their determined concentrations in wines. Results are presented in Figure 4. It appears that all organic acids present a quenching effect towards fluorescence decay in a similar order of magnitude for concentrations ranging from 2 to 4 g/L. With increasing concentration of tartaric acid in wine from 4 to 5 and to 6 g/L, g values of MLF- wine increase at 0.700, 0.710, 0.715. This is in accordance with the positive correlation of g values of wines as a function of their total acidity (shown previously in Figure S.I.3). Interestingly caffeic acid and caftaric acid when supplemented at 10 mg/L in MLF- wine present a quite stronger quenching effect, as visualized by a g value reaching up to 0.737.

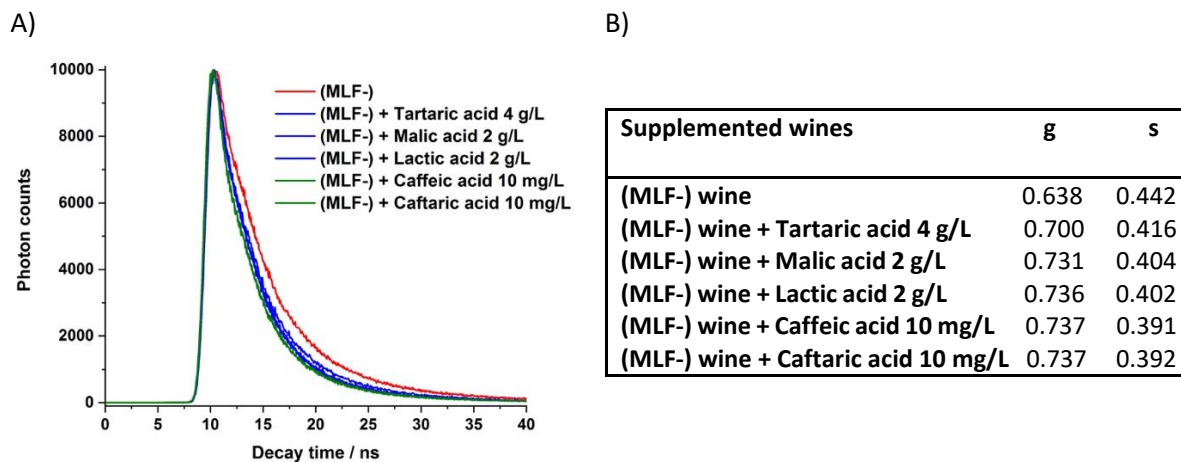


Figure 4: Decay of fluorescence measured at pH=5 of MLF+ (blue) and MLF- wines (red) sampled during Chardonnay wine contest C with an excitation wavelength set as 280 nm and emission set as 440 nm. The baseline of the blue curve is shifted to better observe changes in fluorescence decay (A). Mean values of decay lifetimes τ_1 and τ_2 , expressed in ns and their associated fractional intensities F1 and F2 expressed in percentage, as indicated in equation 2, at a fixed pH=5. Values in parenthesis indicate the mean standard deviations for the five MLF+ wines (N=5) and MLF- wines (N=5) (B).

3.5. MLF distinction in Chardonnay wines (sample A+B+C) using multispectral fluorescence and chemometric analysis

Chardonnay wines multispectral fluorescence parameters generated by PARAFAC modeling and phasor plot analysis (PARAFAC components Fmax, g and s values) were interpreted with a multivariate analysis in order to discuss MLF achievement among wines depending on their typologies. Results are illustrated in Figure 5. The three categories of Chardonnay wines were clustered separately in Figure 5A, along PC1 (55.7%) and PC2 (20.8%), but with no visible separation in relation with MLF achievement. In order to gain significance in MLF distinction, a PLS-DA model was attempted on the same dataset (Figure 5B). The PLS model fits with a pretty good predictive ability $Q^2Y = 0.632$ (N=21, with an exclusion of one MLF- Chardonnay contest wine). Results show a clear discrimination of MLF- wines (blue) and MLF+ wines (red) regardless of the three typologies of wines. The loadings of the models are represented and confirmed the importance of values from PARAFAC component C4 Fmax values and g values for the optimization of the MLF separation among Chardonnay wines. Such combined multispectral data could be used in future for a better traceability among Chardonnay wines, particularly related to fermentative processes during winemaking. Further research could deepen multispectral fluorescence in wines to diagnose microbiological and chemical processes naturally occurring in wines that could impact its final quality. Such developments could be

applied to other fermented food products and to research on adulteration and authentication issues.

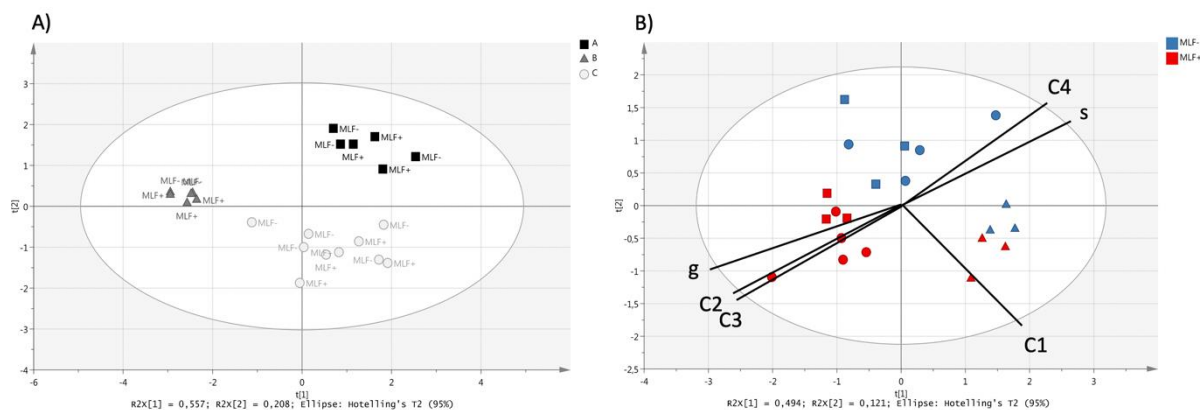


Figure 5: Biplot representation of the multispectral fluorescence Chardonnay wines from fresh wines from winery A (squares), winery B (triangles) and Chardonnay contest wines C (circles) obtained by a Principal component analysis (A) and by a Partial Least Square – Discriminant Analysis oriented on MLF achievement (B).

Conclusions

In conclusion, the combination of steady-state and time-resolved fluorescence techniques could be used to study the biochemical differences in Chardonnay wines. This study reveals that PARAFAC component C4 is a good biomarker index for MLF realization in wines. Chardonnay wine fluorophores with similar optical characteristics to the PARAFAC component C4 have been characterized at pH=5, by two fluorescence lifetimes: τ_1 (4.19 - 4.53 ns) and τ_2 (13.28 to 13.86 ns), respectively with two fractional intensities: F1 (61.1-63.7) and F2 (38.9-36.3). By applying a phasor plot analysis, wine fluorescence decays could be easily described by their (g,s) coordinates. g values appeared to systematically increase under malolactic fermentation on Chardonnay wines. Such an increase has been discussed by a quenching effect on wine fluorophores, occurring after acidic and polyphenolic modifications after MLF achievement in Chardonnay wines. When combining multispectral fluorescence to chemometric analysis, (MLF+) wines were clearly separated from (MLF-) wines, regardless of the origin of wines. Results from this study could motivate further wine research to combine multidimensional fluorescence measurements to gain in traceability towards fermentative processes occurring during winemaking.

Acknowledgement

The authors wish to acknowledge the research support of the FEDER Funding council and Horiba for their equipment support. We thank Y. Thierry, C. Bossuat and H.L. Arnould for the wine sampling at Boisset, Domaine de l'université de Bourgogne and during the “Chardonnay du Monde 2018” wine contest, respectively. We also thank F. Bagala for electrophoresis analysis assistance and J. Billon for carefully proof-reading and editing the manuscript. The authors also acknowledge the “Conseil régional de Bourgogne-Franche-Comté” for its funding.

References

- Agati, G., D'Onofrio, C., Ducci, E., Cuzzola, A., Remorini, D., Tuccio, L., . . . Mattii, G. (2013). Potential of a Multiparametric Optical Sensor for Determining in Situ the Maturity Components of Red and White *Vitis vinifera* Wine Grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *61*(50), 12211-12218. <https://doi.org/10.1021/jf405099n>.
- Agati, G., Meyer, S., Matteini, P., & Cerovic, Z. G. (2007). Assessment of Anthocyanins in Grape (*Vitis vinifera* L.) Berries Using a Noninvasive Chlorophyll Fluorescence Method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *55*(4), 1053-1061. <https://doi.org/10.1021/jf062956k>.
- Airado-Rodríguez, D., Durán-Merás, I., Galeano-Díaz, T., & Wold, J. P. (2011). Front-face fluorescence spectroscopy: A new tool for control in the wine industry. *Journal of Food Composition and Analysis*, *24*(2), 257-264. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jfca.2010.10.005>.
- Airado-Rodríguez, D., Galeano-Díaz, T., Durán-Merás, I., & Wold, J. P. (2009). Usefulness of Fluorescence Excitation–Emission Matrices in Combination with PARAFAC, as Fingerprints of Red Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *57*(5), 1711-1720. <https://doi.org/10.1021/jf8033623>.
- Bartowsky, E. J. (2005). Oenococcus oeni and malolactic fermentation – moving into the molecular arena. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, *11*(2), 174-187. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2005.tb00286.x>.
- Battisti, A., Digman, M. A., Gratton, E., Storti, B., Beltram, F., & Bizzarri, R. (2012). Intracellular pH measurements made simple by fluorescent protein probes and the phasor approach to fluorescence lifetime imaging. *Chemical communications (Cambridge, England)*, *48*(42), 5127-5129. <https://doi.org/10.1039/c2cc30373f>.
- Bauer, R., & Dicks, L. M. T. (2017). Control of Malolactic Fermentation in Wine. A Review. *2017*, *25*(2), 15. <https://doi.org/10.21548/25-2-2141>.
- Bergmann, W. R., Barkley, M. D., Hemingway, R. W., & Mattice, W. L. (1987). Heterogeneous fluorescence decay of (4 .fwdarw. 6)- and (4 .fwdarw. 8)-linked dimers of (+)-catechin and (-)-epicatechin as a result of rotational isomerism. *Journal of the American Chemical Society*, *109*(22), 6614-6619. <https://doi.org/10.1021/ja00256a009>.
- Cabrera-Bañegil, M., Valdés-Sánchez, E., Moreno, D., Airado-Rodríguez, D., & Durán-Merás, I. (2019). Front-face fluorescence excitation-emission matrices in combination with three-way chemometrics for the discrimination and prediction of phenolic response to vineyard agronomic practices. *Food Chemistry*, *270*, 162-172. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.07.071>.
- Cabrita, M. J., Torres, M., Palma, V., Alves, E., Patão, R., & Costa Freitas, A. M. (2008). Impact of malolactic fermentation on low molecular weight phenolic compounds. *Talanta*, *74*(5), 1281-1286. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.talanta.2007.08.045>.

- Celli, A., Sanchez, S., Behne, M., Hazlett, T., Gratton, E., & Mauro, T. (2010). The epidermal Ca(2+) gradient: Measurement using the phasor representation of fluorescent lifetime imaging. *Biophysical Journal*, *98*(5), 911-921. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2009.10.055>.
- Coelho, C., Aron, A., Roullier-Gall, C., Gonsior, M., Schmitt-Kopplin, P., & Gougeon, R. D. (2015). Fluorescence Fingerprinting of Bottled White Wines Can Reveal Memories Related to Sulfur Dioxide Treatments of the Must. *Analytical Chemistry*, *87*(16), 8132-8137. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b00388>.
- Coelho, C., Gougeon, R. D., Perepelkine, L., Alexandre, H., Guzzo, J., & Weidmann, S. (2019). Chemical Transfers Occurring Through *Oenococcus oeni* Biofilm in Different Enological Conditions. *Frontiers in Nutrition*, *6*(95). <https://doi.org/10.3389/fnut.2019.00095>.
- Coelho, C., Parot, J., Gonsior, M., Nikolantonaki, M., Schmitt-Kopplin, P., Parlanti, E., & Gougeon, R. D. (2017). Asymmetrical flow field-flow fractionation of white wine chromophoric colloidal matter. *Anal. Bioanal. Chem.*, *409*(10), 2757-2766. <https://doi.org/10.1007/s00216-017-0221-1>.
- Collombel, I., Melkonian, C., Molenaar, D., Campos, F. M., & Hogg, T. (2019). New Insights Into Cinnamoyl Esterase Activity of *Oenococcus oeni*. *Frontiers in Microbiology*, *10*(2597). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02597>.
- Elcoroaristizabal, S., Callejon, R. M., Amigo, J. M., Ocana-Gonzalez, J. A., Morales, M. L., & Ubeda, C. (2016). Fluorescence excitation-emission matrix spectroscopy as a tool for determining quality of sparkling wines. *Food Chem.*, *206*, 284-290. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.03.037>.
- González-Centeno, M. R., Chira, K., & Teissedre, P. L. (2019). Use of oak wood during malolactic fermentation and ageing: Impact on chardonnay wine character. *Food Chemistry*, *278*, 460-468. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.11.049>.
- Hernández, T., Estrella, I., Carlavilla, D., Martín-Álvarez, P. J., & Moreno-Arribas, M. V. (2006). Phenolic compounds in red wine subjected to industrial malolactic fermentation and ageing on lees. *Analytica Chimica Acta*, *563*(1), 116-125. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aca.2005.10.061>.
- Hernández, T., Estrella, I., Pérez-Gordo, M., Alegría, E. G., Tenorio, C., & Moreno-Arribas, M. V. (2007). Contribution of Malolactic Fermentation by *Oenococcus Oeni* and *Lactobacillus Plantarum* to the Changes in the Nonanthocyanin Polyphenolic Composition of Red Wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *55*(13), 5260-5266. <https://doi.org/10.1021/jf063638o>.
- Leray, A., Padilla-Parra, S., Roul, J., Héliot, L., & Tramier, M. (2013). 827Spatio-Temporal Quantification of FRET in Living Cells by Fast Time-Domain FLIM: A Comparative Study of Non-Fitting Methods. *PLOS ONE*, *8*(7), e69335. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069335>.
- Longin, C., Petitgonnet, C., Guilloux-Benatier, M., Rousseaux, S., & Alexandre, H. (2017). Application of flow cytometry to wine microorganisms. *Food Microbiology*, *62*, 221-231. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.10.023>.
- Martelo, L., Fedorov, A., & Berberan-Santos, M. N. (2015). Fluorescence Phasor Plots Using Time Domain Data: Effect of the Instrument Response Function. *The Journal of Physical Chemistry B*, *119*(32), 10267-10274. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.5b00261>.
- Martínez-Pinilla, O., Martínez-Lapuente, L., Guadalupe, Z., & Ayestarán, B. (2012). Sensory profiling and changes in colour and phenolic composition produced by malolactic fermentation in red minority varieties. *Food Research International*, *46*(1), 286-293. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.12.030>.
- Mierczynska-Vasilev, A., Bindon, K., Gawel, R., Smith, P., Vasilev, K., Butt, H.-J., & Koynov, K. (2021). Fluorescence correlation spectroscopy to unravel the interactions between macromolecules in wine. *Food Chem.*, *352*, 129343. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129343>.
- Moore, D. S., McCabe, G. P., & Craig, B. A. (2017). *Introduction to the Practice of Statistics*. (9th ed.).
- Moret, F., Lemaître-Guillier, C., Grosjean, C., Clément, G., Coelho, C., Negrel, J., . . . Adrian, M. (2019). Clone-Dependent Expression of Esca Disease Revealed by Leaf Metabolite Analysis. *Frontiers in Plant Science*, *9*(1960). <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01960>.

- Mueller-Harvey, I., Feucht, W., Polster, J., Trnková, L., Burgos, P., Parker, A. W., & Botchway, S. W. (2012). Two-photon excitation with pico-second fluorescence lifetime imaging to detect nuclear association of flavanols. *Analytica Chimica Acta*, *719*, 68-75. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.12.068>.
- Murphy, K. R., Stedmon, C. A., Graeber, D., & Bro, R. (2013). Fluorescence spectroscopy and multi-way techniques. PARAFAC. *Analytical Methods*, *5*(23), 6557-6566. <https://doi.org/10.1039/C3AY41160E>.
- OIV. (2011). *Recueil des Méthodes Internationales d'Analyse des Boissons Spiritueuses d'Origine Vitivinicole. Méthode OIV-MA-AS313-19 : R2011, resolution OIV-Oeno 407-2011*.
- OIV. (2017). *International Code of oenological practices. OIV Code Sheet - Issue 2017/01*.
- Pérez-Martín, F., Seseña, S., Izquierdo, P. M., & Palop, M. L. (2013). Esterase activity of lactic acid bacteria isolated from malolactic fermentation of red wines. *International Journal of Food Microbiology*, *163*(2), 153-158. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.02.024>.
- Ranaweera, R. K. R., Gilmore, A. M., Capone, D. L., Bastian, S. E. P., & Jeffery, D. W. (2021). Spectrofluorometric analysis combined with machine learning for geographical and varietal authentication, and prediction of phenolic compound concentrations in red wine. *Food Chemistry*, *361*, 130149. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130149>.
- Ranjit, S., Malacrida, L., Jameson, D. M., & Gratton, E. (2018). Fit-free analysis of fluorescence lifetime imaging data using the phasor approach. *Nature Protocols*, *13*(9), 1979-2004. <https://doi.org/10.1038/s41596-018-0026-5>.
- Robert-Peillard, F., Boudenne, J.-L., & Coulomb, B. (2014). Development of a simple fluorescence-based microplate method for the high-throughput analysis of proline in wine samples. *Food Chem.*, *150*, 274-279. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.10.135>.
- Roullier-Gall, C., Hemmler, D., Gonsior, M., Li, Y., Nikolantonaki, M., Aron, A., . . . Schmitt-Kopplin, P. (2017). Sulfites and the wine metabolome. *Food Chemistry*, *237*, 106-113. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.05.039>.
- Ruffner, H. P. (1982). Metabolism of tartaric and malic acids in *Vitis*: a review. Part B. *Vitis*, *21*(4), 346-358.
- Saad, R., Bouveresse, D. J.-R., Locquet, N., & Rutledge, D. N. (2016). Using pH variations to improve the discrimination of wines by 3D front face fluorescence spectroscopy associated to Independent Components Analysis. *Talanta*, *153*, 278-284. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.03.023>.
- Sadecka, J., Jakubikova, M., & Majek, P. (2018). Fluorescence spectroscopy for discrimination of botrytized wines. *Food Control*, *88*, 75-84. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.12.033>.
- Santos, I. d., Bosman, G., Aleixandre-Tudo, J. L., & du Toit, W. (2022). Direct quantification of red wine phenolics using fluorescence spectroscopy with chemometrics. *Talanta*, *236*, 122857. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.122857>.
- Silva, G. T. M., da Silva, K. M., Silva, C. P., Rodrigues, A. C. B., Oake, J., Gehlen, M. H., . . . Quina, F. H. (2019). Highly fluorescent hybrid pigments from anthocyanin- and red wine pyranoanthocyanin-analogs adsorbed on sepiolite clay. *Photochemical & Photobiological Sciences*, *18*(7), 1750-1760. <https://doi.org/10.1039/C9PP00141G>.
- Stringari, C., Cinquin, A., Cinquin, O., Digman, M. A., Donovan, P. J., & Gratton, E. (2011). Phasor approach to fluorescence lifetime microscopy distinguishes different metabolic states of germ cells in a live tissue. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *108*(33), 13582. <https://doi.org/10.1073/pnas.1108161108>.
- Suciu, R.-C., Zarbo, L., Guyon, F., & Magdas, D. A. (2019). Application of fluorescence spectroscopy using classical right angle technique in white wines classification. *Scientific Reports*, *9*(1), 18250. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54697-8>.
- Trigueiro, P., Pedetti, S., Rigaud, B., Balme, S., Janot, J.-M., dos Santos, I. M. G., . . . Jaber, M. (2018). Going through the wine fining: Intimate dialogue between organics and clays. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *166*, 79-88. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.02.060>.

- Trivellin, N., Barbisan, D., Trivellin, N., Meneghesso, G., Meneghini, M., Zanoni, E., . . . Pastore, P. (2018). Study and Development of a Fluorescence Based Sensor System for Monitoring Oxygen in Wine Production: The WOW Project. *Sensors (Basel)*, 18(4).
- Wan, Y., Pan, F., & Shen, M. (2012). Identification of Jiangxi wines by three-dimensional fluorescence fingerprints. *Spectrochim. Acta, Part A*, 96, 605-610. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2012.07.030>.
- Zhong, X.-D., Fu, D.-S., Wu, P.-P., Liu, Q., Lin, G.-C., Cao, S.-H., & Li, Y.-Q. (2014). Rapid fluorescence spectroscopic screening method for the sensitive detection of thiabendazole in red wine. *Anal. Methods*, 6(18), 7260-7267. <https://doi.org/10.1039/C4AY00991F>.

Supplementary information

Multispectral fluorescence sensitivity to acidic and polyphenolic changes in Chardonnay wines – The case study of malolactic fermentation

Maxime Pacheco ^a, Pascale Winckler ^{a,b}, Ambroise Marin ^{a,b}, Jean-Marie Perrier-Cornet ^{a,b}, Christian Coelho ^{a,c,*}

^a *UMR Procédés Alimentaires et Microbiologiques, AgroSup Dijon, Université de Bourgogne Franche-Comté, 1 Esplanade Erasme, 21000 Dijon, France.*

^b *Dimacell Imaging Facility, AgroSup Dijon, Université de Bourgogne Franche-Comté, 1 Esplanade Erasme, 21000 Dijon, France.*

^c *Université Clermont Auvergne, INRAE, Vetagro Sup campus agronomique de Lempdes, UMR F, F-15000 Aurillac, France.*

Table S.I.1: Oenological parameters and multispectral fluorescence parameters (PARAFAC components and phasor plot g and s values) of fresh Chardonnay wines from wineries A and B.

SAMPLE NAME	G	S	ETHANOL VOL%	GLUC/FRUC G/L	AT G/L	PH	MALIC G/L	ACID G/L	AV G/L	DENSITE G/ML	TOTAL G/L	SUGAR	C1	C2	C3	C4
A1 (MLF-)	0.6380	0.4422	11.32	1.10	4.79	3.09	2.20		0.24	0.99	2.90		1.14	1.17	1.78	0.24
A2 (MLF-)	0.6345	0.4544	11.35	1.00	4.34	3.10	2.70		0.29	0.99	3.00		2.56	2.77	2.25	0.37
A3 (MLF-)	0.6365	0.4417	10.65	1.20	3.51	3.28	2.50		0.24	0.99	2.90		2.36	2.62	2.70	0.37
B1 (MLF-)	0.5390	0.4790	12.92	1.60	3.71	3.27	1.50		0.26	0.99	3.40		5.70	2.91	4.36	0.43
B2 (MLF-)	0.5431	0.4785	12.51	9.70	3.81	3.22	1.90		0.25	0.99	12.50		4.76	2.56	4.40	0.39
B3 (MLF-)	0.5388	0.4781	12.8	2.80	3.54	3.26	0.60		0.34	0.99	4.80		5.09	2.50	4.17	0.40
A4 (MLF+)	0.6407	0.4403	11.13	1.00	4.17	3.18	0.30		0.32	0.99	3.30		1.78	1.69	2.67	0.26
A5 (MLF+)	0.6722	0.4259	11.30	1.00	3.46	3.19	0.20		0.30	0.99	3.60		2.41	2.99	2.45	0.37
A6 (MLF+)	0.6555	0.4352	10.54	0.80	3.14	3.28	0.40		0.21	0.99	3.40		2.17	2.75	2.84	0.37
B4 (MLF+)	0.5525	0.4794	13.03	1.70	3.27	3.33	0.40		0.35	0.99	3.60		5.93	2.96	4.46	0.44
B5 (MLF+)	0.5590	0.4742	13.09	2.00	3.23	3.31	0.40		0.31	0.99	4.20		5.21	2.73	4.78	0.41
B6 (MLF+)	0.5582	0.4749	12.75	2.40	3.50	3.29	0.40		0.44	0.98	4.90		5.30	2.54	4.36	0.41

Table S.I.2: Phasor plot g and s for a part of Chardonnay contest wines (C).

SAMPLE NAME	G	S
C19 (MLF+)	0.6631	0.4160
C31 (MLF+)	0.6348	0.4246
C57 (MLF+)	0.6043	0.4513
C84 (MLF+)	0.6552	0.4348
C89 (MLF+)	0.6354	0.4293
C1 (MLF-)	0.5905	0.4368
C5 (MLF-)	0.6117	0.4265
C29 (MLF-)	0.6447	0.4214
C45 (MLF-)	0.6086	0.4479
C80 (MLF-)	0.6426	0.4349

Table S.I.3: Oenological parameters and PARAFAC components Fmax values of Chardonnay contest wines (C). Abbreviations for wine country origin FR : France; US : United States; GER : Germany; CH : China ; AUS : Australia ; SW : Swiss ; UK : Ukraine ; IT : Italy ; CA : Canada ; JP : Japan ; EN : England ; RO : Romania ; MA : Macedonia ; NZ : New Zealand ; BE : Belgium ; AZ : Azerbaijan ; CZ : Czech Republic ; CHI : Chile.

SA MP LE	COUNT RY	VINT AGE	ETHAN OL (VOL%)	GLUC/FRU CT (G/L)	AT (G/L)	PH	MALIC ACID (G/L)	AV (G/L)	DENSI TY (G/L)	TOTAL SUGAR (G/L)	TARTARIC ACID (G/L)	CITRIC ACID (G/L)	LACTI C ACID (G/L)	C1	C2	C3	C4
C1	FR	2016	13.99	1.5	3.89	3.67	2.8	0.46	0.99	3.9	1.70	0.07	0.19	6.31	1.63	3.25	0.56
C2	US	2016	14.13	3	5.02	3.33	2.7	0.61	0.99	4.6	3.72	0.04	0.23	9.36	0.34	2.58	0.24
C3	FR	2015	12.73	0	3.41	3.46	0.1	0.39	0.99	2.5	1.39	0.19	3.09	5.66	0.15	3.77	0.41
C4	GER	2016	12.74	0.1	3.41	3.71	0.5	0.32	0.99	3.6	1.51	1.21	3.93	3.73	1.44	3.63	0.85
C5	CH	2016	13.06	0	4.58	3.77	4.6	0.43	0.99	1.1	1.37	1.24	0.16	5.10	1.04	3.29	0.47
C6	FR	2016	14.21	4.8	3.18	3.66	0.9	0.46	0.99	7	1.69	0.15	2.23	1.73	2.18	3.16	0.43
C7	FR	2016	12.87	0	3.88	3.3	0.1	0.35	0.99	1.9	3.38	0.06	2.35	7.57	0.03	4.15	0.36
C8	FR	2016	12.83	0	3.71	3.39	0.1	0.28	0.99	2	3.09	0.12	3.47	4.57	0.10	4.10	0.32
C9	FR	2016	13.25	1	3.4	3.51	0.7	0.42	0.99	3.5	1.94	0.06	1.30	3.13	1.47	4.07	0.42
C10	CHI	2017	13.83	0	3.87	3.59	2.4	0.39	0.99	1.2	2.05	3.21	0.29	6.51	0.86	3.53	0.34
C11	FR	2016	12.95	0.1	3.82	3.4	0	0.4	0.99	2.1	2.20	0.08	3.55	7.84	0.48	3.09	0.32
C12	FR	2016	13.21	0	4.09	3.36	0	0.39	0.99	1.9	2.72	0.06	3.76	7.34		4.06	0.33
C13	FR	2015	14.46	1.4	3.81	3.66	2	0.48	0.99	3.1	1.34	0.04	0.86	3.72	2.13	4.89	0.57
C14	CH	2016	12.94	0	4.15	3.44	2.7	0.42	0.99	0.9	1.43	0.05	0.19	4.10	0.38	3.42	0.31
C15	FR	2016	13.06	0.8	3.71	3.33	0.2	0.38	0.99	3.2	2.61	0.10	3.43	4.59		4.34	0.39
C16	AUS	2016	12.78	2.2	3.98	3.46	1.8	0.52	0.99	3.9	1.41	2.00	2.39	5.02	0.34	3.62	0.34
C17	FR	2016	13.74	3.1	3.45	3.6	0.4	0.64	0.99	5	1.57	0.04	3.66	3.36	1.16	3.99	0.59
C18	FR	2016	13.25	0.7	3.89	3.36	0	0.49	0.99	2.5	2.80	0.04	4.76	5.23	0.39	2.69	0.29
C19	GER	2015	13.5	1.6	3.94	3.37	0	0.52	0.99	3.6	2.43	1.01	3.99	3.98	0.35	3.75	0.29
C20	SW	2016	13.1	0.8	3.52	3.46	0.1	0.38	0.99	2.7	1.95	1.63	3.99	2.90	0.27	2.49	0.24
C21	UK	2016	13.94	0	4.41	3.56	2.6	0.61	0.99	0.4	1.74	0.16	0.16	4.63	0.40	3.38	0.42
C22	UK	2014	13.77	0	4.22	3.47	2.5	0.49	0.99	1.2	1.97	0.15	0.23	4.47	0.09	3.86	0.44

C23	UK	2014	14	0	4.22	3.47	2.3	0.47	0.99	1.4	2.13	0.18	0.22	4.65		3.96	0.44
C24	FR	2016	12.57	0.2	3.82	3.3	0	0.31	0.99	2.8	2.67	0.09	3.29	2.98	0.27	3.30	0.41
C25	IT	2016	13.43	0	4.07	3.49	3.1	0.37	0.99	0.8	1.40	2.42	0.48	4.45	0.46	2.71	0.25
C26	IT	2016	12.99	0.8	3.56	3.53	0.2	0.44	0.99	2.6	1.79	1.34	4.54	3.89	0.27	2.69	0.21
C27	EN	2016	13.63	1.4	3.75	3.48	0.5	0.47	0.99	2.5	2.90	1.61	4.33	3.77	0.27	2.47	0.26
C28	EN	2016	11.73	0	4.29	3.22	0.9	0.36	0.99	1.6	2.34	0.63	2.89				
C29	AUS	2016	12.8	0	5.05	3.42	4.1	0.45	0.99	1.2	1.59	0.04	0.23	3.79	0.42	3.83	0.25
C30	CH	2016	13.23	1.2	4.54	3.59	2.8	0.39	0.99	3.4	2.66	0.90	0.58	3.41	0.75	3.84	0.33
C31	CA	2015	13.42	0	3.96	3.52	0.1	0.56	0.99	1	2.77	0.58	4.79	3.74	0.61	3.49	0.34
C32	CHI	2017	13.45	1.1	3.53	3.44	2.2	0.32	0.99	2.6	1.28	0.55	0.36	5.21	0.61	3.34	0.35
C33	CA	2016	13.23	4.6	3.48	3.61	0.3	0.31	0.99	7.4	2.09	0.98	4.45	2.59	0.39	5.23	0.35
C34	CHI	2017	13.28	4.1	3.77	3.46	0.8	0.37	0.99	7.3	2.75	1.70	1.67	3.13	1.23	3.39	0.56
C35	CHI	2017	13.29	4.3	3.71	3.45	0.8	0.4	0.99	7.6	2.92	1.72	1.71	3.02	1.05	3.17	0.51
C36	CA	2015	13.1	0.9	3.94	3.49	2.6	0.4	0.99	2.3	1.56	0.14	0.61	3.16	0.40	3.67	0.35
C37	GER	2016	13.08	0.7	4.32	3.47	2.9	0.42	0.99	1.6	1.49	0.17	1.12	2.35	0.72	3.42	0.33
C38	RO	2017	13.42	0.1	3.49	3.55	2.2	0.23	0.99	1.4	1.89	0.05	0.14	2.53	0.44	2.76	0.73
C39	SW	2016	12.73	1.2	4.05	3.52	2.7	0.34	0.99	2.7	2.11	2.98	0.93				
C40	SW	2017	12.68	1.5	3.71	3.6	2.1	0.36	0.99	2.9	1.64	0.05	3.40	3.30	0.23	3.63	0.29
C41	SW	2016	12.95	0	3.9	3.61	3.1	0.43	0.99	1.1	1.27	1.29	0.55	4.61		3.66	0.34
C42	FR	2016	15.03	0.8	4.04	3.37	1.4	0.54	0.99	2.6	2.50	0.05	0.59	2.98	1.19	4.23	0.41
C43	JP	2016	12.31	0	3.38	3.76	1	0.42	0.99	0.3	1.56	1.74	3.11	2.36	0.64	4.28	0.29
C44	JP	2016	12.77	0.2	3.53	3.49	0.8	0.37	0.99	0.9	1.80	0.86	2.49	1.80	0.18	4.60	0.23
C45	GER	2016	13.63	0.4	4.38	3.67	3.2	0.45	0.99	1.2	1.46	0.61	0.87	5.35	0.67	3.47	0.36
C46	GER	2016	13.88	0.6	4.41	3.68	3.4	0.54	0.99	1.6	1.24	0.06	0.70	5.18	0.69	3.34	0.34
C47	SW	2017	14.13	2.6	3.1	3.54	0.1	0.36	0.99	4.6	1.38	0.17	3.85	1.82	0.91	2.49	0.25
C48	RO	2016	13.03	0	4.12	3.57	2.9	0.3	0.99	1.5	1.99	0.22	0.20	4.84	0.80	3.28	0.41
C49	RO	2011	13.15	0	4.45	3.55	3.4	0.37	0.99	1.6	1.71	0.18	0.12	8.44	0.58	3.08	0.64
C50	MA	2017	13.55	0.4	3.84	3.44	2.3	0.29	0.99	1.9	2.37	0.18	0.21	2.25	0.45	2.82	0.29
C51	MA	2017	14.23	1.6	4.13	3.38	1.7	0.34	0.99	3.4	3.47	0.12	0.42	2.80	0.35	3.19	0.34
C52	AUS	2016	13.06	0.1	4.09	3.36	1.3	0.4	0.99	1.7	2.60	0.46	2.49	4.22	1.19	3.21	0.25

C53	NZ	2016	13	2.1	3.77	3.53	0.5	0.49	0.99	4	1.69	0.07	3.51	4.22	0.72	4.30	0.19
C54	NZ	2016	12.33	1.5	3.86	3.52	0.2	0.54	0.99	3.3	1.88	0.13	4.46	2.84	0.62	3.71	0.22
C55	NZ	2016	12.6	0.2	3.74	3.57	0.4	0.45	0.99	1.8	1.49	0.13	4.76	3.40	0.55	4.31	0.21
C56	NZ	2016	13.34	0.8	3.8	3.51	0.4	0.51	0.99	2.7	1.82	0.16	3.97	4.01	0.81	4.09	0.23
C57	NZ	2016	13.06	0	3.58	3.59	0.2	0.54	0.99	1.5	2.31	0.09	3.99	8.80	0.88	3.10	0.21
C58	NZ	2016	13.02	0.2	3.47	3.66	0.5	0.46	0.99	1.7	1.39	0.14	4.64	4.42	0.62	3.73	0.24
C59	NZ	2016	12.93	0.2	3.52	3.53	0.7	0.41	0.99	1.6	1.28	0.09	3.39	3.62	0.40	3.07	0.25
C60	RO	2017	13.63	0.9	3.89	3.59	2.9	0.34	0.99	2.7	1.13	0.29	0.31	5.48	0.99	3.74	0.79
C61	RO	2017	13.57	0	4.26	3.57	3.3	0.38	0.99	1.8	1.18	0.25	0.25	5.60	0.89	4.62	0.70
C62	RO	2017	13.84	0	4.09	3.62	2.8	0.39	0.99	1.7	1.71	0.26	0.32	4.13	1.11	4.16	0.79
C63	FR	2016	12.96	0.3	3.78	3.35	2	0.36	0.99	2	1.83	0.05	0.25	5.79	0.51	2.51	0.37
C64	FR	2016	13.09	0.3	3.77	3.43	2.1	0.33	0.99	1.8	1.98	0.14	0.40	3.98	1.09	3.27	0.43
C65	FR	2016	13.65	0.9	3.77	3.41	1.8	0.38	0.99	2.6	2.19	0.08	0.22	3.09	3.04	4.39	0.43
C66	FR		13.47	0.8	3.82	3.46	2.2	0.38	0.99	2.3	1.96	0.08	0.56	3.23	1.02	3.38	0.39
C67	FR	2016	13.6	0.3	3.92	3.42	0.1	0.45	0.99	2.9	2.11	0.11	3.75	7.50	0.28	3.89	0.33
C68	FR	2016	13.69	0.1	3.9	3.47	0	0.44	0.99	2.4	2.04	0.08	4.96	7.92	0.52	4.39	0.46
C69	FR	2016	13.41	0.5	4	3.38	1.4	0.37	0.99	2.8	2.36	0.05	0.69	3.89	1.56	4.97	0.49
C70	AUS	2015	13.34	0	5.11	3.22	1.7	0.48	0.99	1.3	2.77	0.07	2.37	16.81	0.76	2.95	0.21
C71	FR	2016	13.3	0.2	3.41	3.58	1.2	0.37	0.99	2.3	1.94	0.04	2.21	3.81	0.72	3.46	0.44
C72	FR	2015	13.25	0.6	3.66	3.54	1.6	0.39	0.99	2.7	1.57	0.04	1.80	3.83	0.59	3.52	0.40
C73	CZ	2015	13.66	2.6	4.09	3.49	1.5	0.47	0.99	4.1	1.82	0.07	2.14	7.29	0.70	3.90	0.47
C74	RO	2017	14.56	2.5	3.95	3.71	2.8	0.4	0.99	3.6	1.55	0.04	0.35	7.20	0.63	3.10	0.28
C75	RO	2017	14.78	3	4.16	3.67	2.9	0.41	0.99	4	2.16	0.25	0.31	8.00	0.69	3.19	0.35
C76	BE	2015	13.02	1.4	4.39	3.57	1.5	0.62	0.99	2.9	1.82	1.42	5.83	6.38	0.43	2.93	0.30
C77	SW	2016	13.88	0	3.79	3.63	0.1	0.48	0.99	0.4	1.44	3.03	5.73	4.06	0.80	3.55	0.31
C78	RO	2016	12.21	4.7	4.09	3.46	2.9	0.38	0.99	6.8	1.31	0.17	0.44	3.44	0.60	3.24	0.38
C79	RO	2017	11.76	0.8	4.61	3.35	3.5	0.35	0.99	1.8	2.13	0.21	0.23	1.83	0.17	2.46	0.25
C80	RO	2016	12.47	0.2	4.72	3.52	4	0.5	0.99	1.4	1.35	0.25	0.34	2.62	0.15	2.96	0.33
C81	RO	2016	13.43	1.1	4.25	3.39	2.5	0.41	0.99	2.7	1.88	0.08	0.25	5.64	0.07	3.39	0.61
C82	SW	2016	13.53	1.3	3.67	3.67	0.6	0.44	0.99	2.9	1.79	3.78	5.23	5.91	1.22	3.00	0.31

C83	SW	2016	13.22	0.8	3.87	3.61	0.2	0.55	0.99	2.3	1.56	0.10	4.62	4.93	0.71	3.89	0.32
C84	SW	2015	13.33	0.5	3.86	3.65	0.3	0.47	0.99	2	1.56	0.05	4.63	4.77	0.73	4.07	0.40
C85	FR		13.49	0.3	3.72	3.51	2.1	0.34	0.99	2	2.29	0.21	0.29	3.42	0.44	3.22	0.38
C86	FR		13.22	1.1	3.5	3.45	1.9	0.29	0.99	3.1	1.89	0.04	0.21	3.86	1.26	3.36	0.47
C87	CA	2016	13.46	2.5	3.03	3.58	1.9	0.34	0.99	4.2	1.18	1.86	0.67	2.06	0.19	3.06	0.39
C88	CA	2015	13.16	0.7	3.37	3.65	2.6	0.36	0.99	1.7	1.02	0.47	0.41	3.79		3.42	0.33
C89	FR	2016	12.36	0.8	3.83	3.33	0.1	0.3	0.99	3.8	2.31	0.15	3.21	3.59	0.46	4.11	0.37
C90	FR	2016	12.53	0	3.99	3.43	0.3	0.51	0.99	2.5	2.02	0.04	4.68	4.30	0.54	4.17	0.39
C91	AZ	2016	13.78	0.4	3.28	3.57	2.5	0.3	0.99	2.3	1.21	1.91	0.13	2.80	0.24	3.12	0.37

Table S.I.4: Polyphenolic concentrations, expressed in mg/L for Chardonnay fresh wines from wineries A and B.

		(MLF-) A1	(MLF-) A2	(MLF-) A3	(MLF-) B1	(MLF-) B2	(MLF-) B3	(MLF+) A4	(MLF+) A5	(MLF+) A6	(MLF+) B4	(MLF+) B5	(MLF+) B6	
Non-flavonoid compounds	Phenol acids	Gallic acid	0.13	0.14	0.26	0.10	0.12	0.10	0.66	0.13	0.45	0.11	0.09	0.11
		Protocatechuic acid	0.43	0.76	0.78	0.43	0.33	0.36	0.62	0.92	1.05	0.53	0.54	0.58
		Hydroxybenzoic acid	0.08	0.10	0.11	0.04	0.06	0.05	0.13	0.12	0.11	0.08	0.10	0.08
		Caftaric acid	0.41	18.11	17.54	19.75	18.81	20.60	0.14	19.36	18.48	18.81	19.03	18.91
		Gentisic acid	0.01	0.04	0.05	0.01	0.01	0.02	0.01	0.06	0.04	0.02	0.02	0.02
		Caffeic acid	0.76	1.03	1.18	1.01	0.98	1.13	1.35	1.46	1.95	1.69	1.44	2.17
	Coumaric acid	0.23	0.23	0.21	0.79	0.02	0.11	0.24	0.41	0.55	0.91	0.20	0.26	
	Phenolic alcohols family	Hydroxytyrosol	0.43	0.69	0.81	0.67	0.48	0.68	0.31	1.03	1.20	0.96	0.97	1.02
Tyrosol		5.28	3.87	3.43	10.95	3.09	11.03	5.14	3.93	3.13	11.05	13.56	11.01	
Flavonoid compounds	Flavans 3-ols (tannins)	B1 Dimer	0.15	0.14	0.94	0.14	0.11	0.3	0.17	0.53	1.63	0.33	0.37	0.60
		(+)Catechin	0.00	0.62	2.16	0.72	0.69	0.86	0.00	1.10	2.60	0.88	0.95	0.95
		B2 Dimer	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	4.35	0.00	0.00	0.00
		(-)Epicatechin	3.39	10.63	28.21	15.22	10.19	17.30	32.69	20.83	41.12	16.24	20.47	23.74

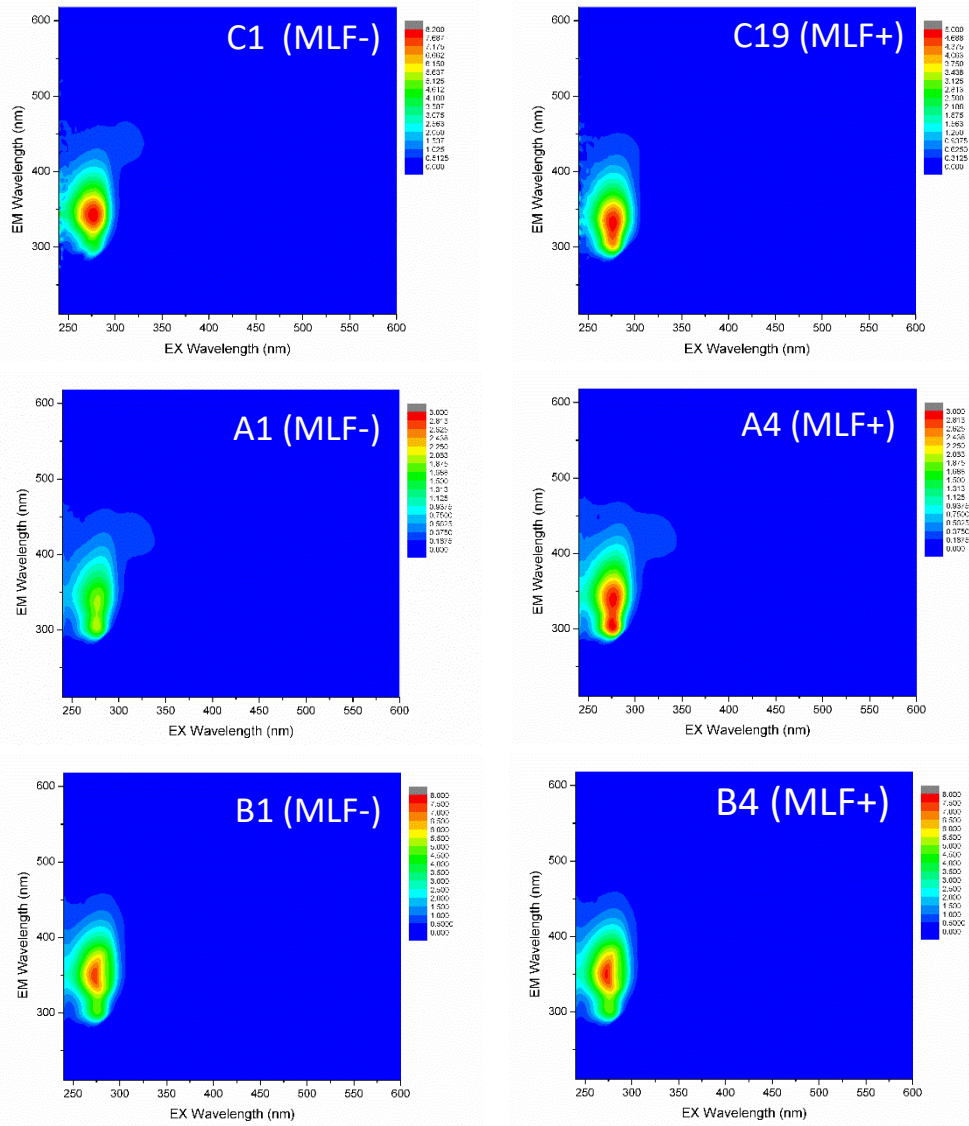


Figure S.I.1: EEMS for each MLF-/ + group for the three typologies of Chardonnay wines.

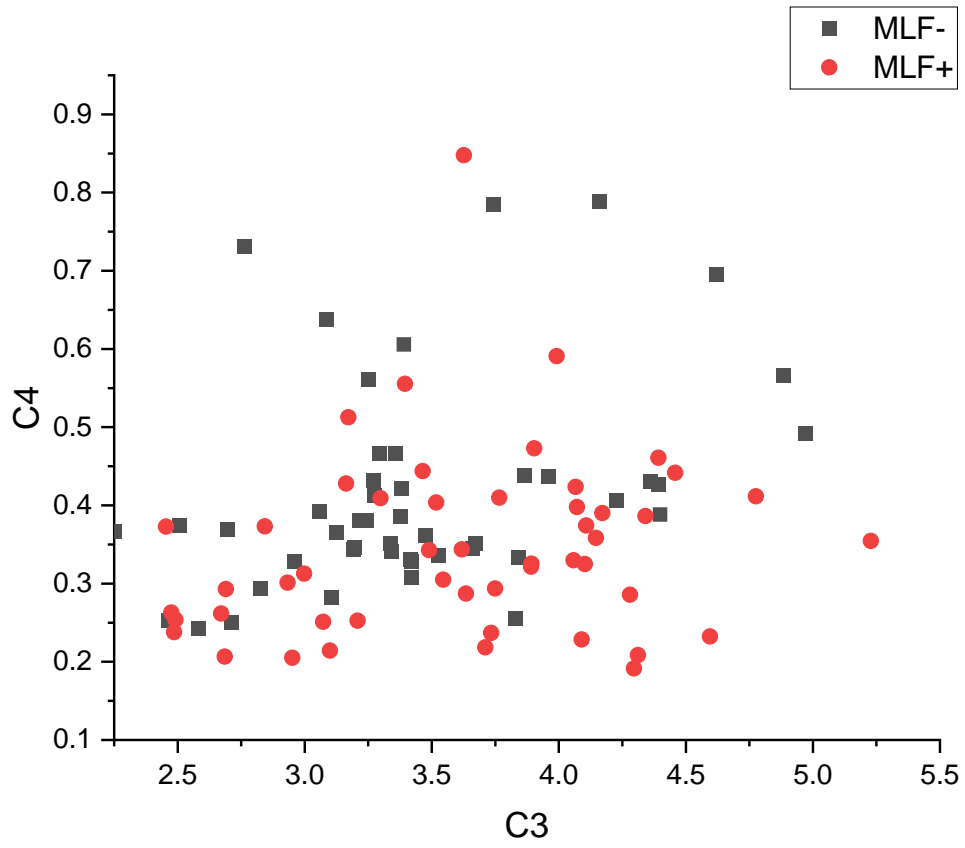


Figure S.I.2: Fmax values of PARAFAC C3 against C4 for all the Chardonnay wines before and after MLF.

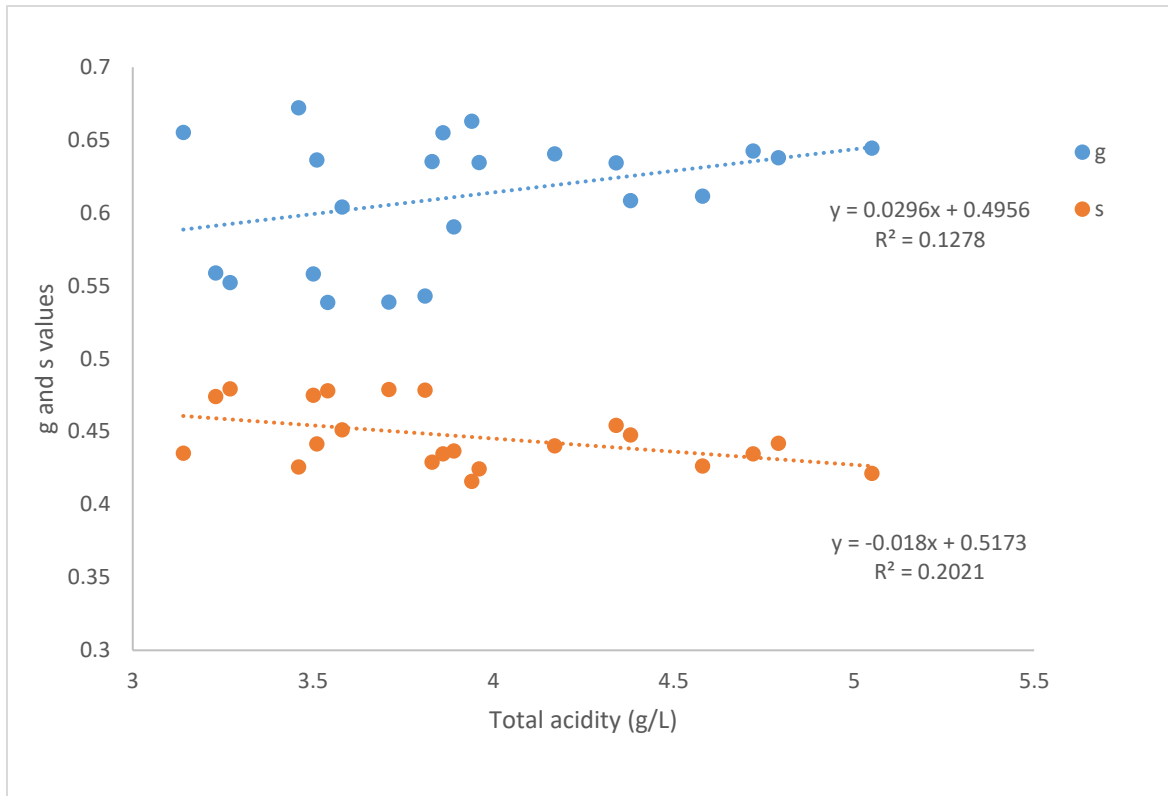


Figure S.I.3: Phasor plot g and s values for the 22 Chardonnay wines in function of their associated total acidity (expressed in equivalent g/L H₂SO₄).

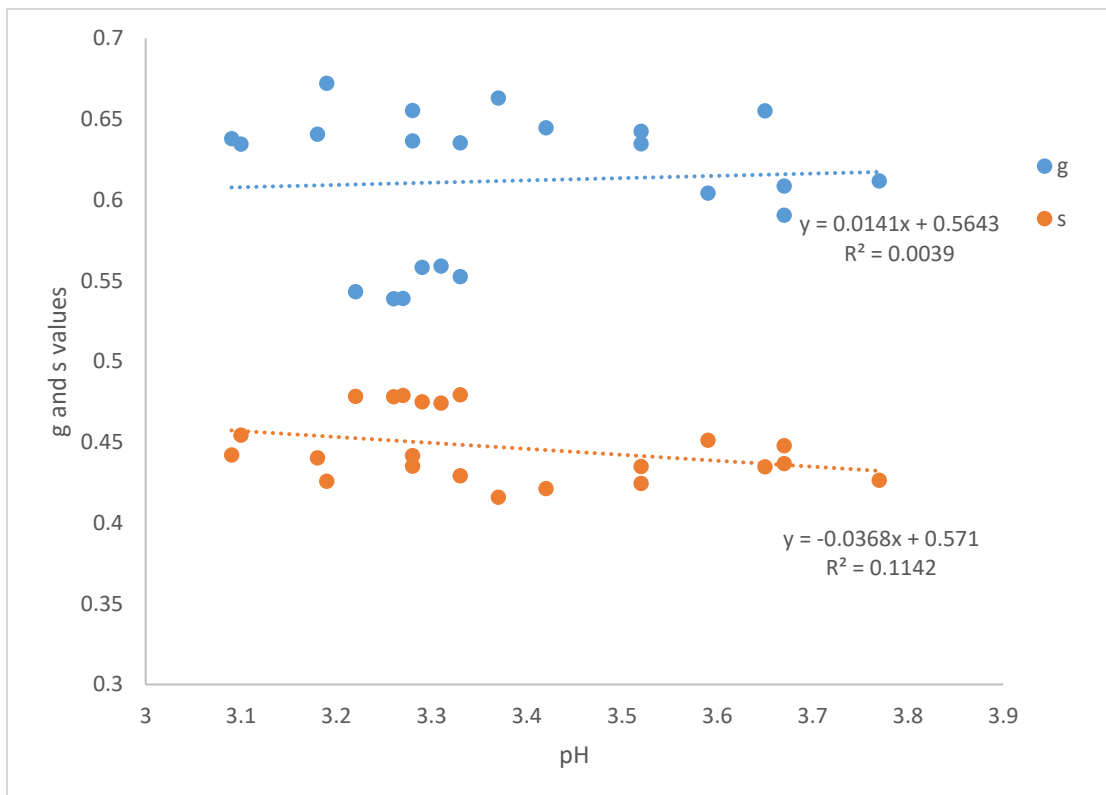


Figure S.I.4: Phasor plot g and s values for the 22 Chardonnay fresh wines in function of their associated pH.

Résultats complémentaires

1. Effet de la fermentation malolactique

Une méthodologie analogue à celle présentée dans la publication précédente a été réalisée sur un second lot de vins (N = 54). Ces vins sont originaires de domaines différents et proviennent des appellations AOC Côtes d’Auvergne, Beaujolais et Hermitage. Les vins de ce lot sont issus des cépages Gamay et Syrah du même millésime (2021). Ils ont été prélevés avant (N = 29) et après fermentation malolactique (N = 25). Nos expériences sur ce lot nous amènent à une conclusion similaire à celle présentée dans la publication. L’analyse des différentes composantes PARAFAC nous permet en effet de déterminer qu’il y a quatre composantes présentes, identiques à celle de la publication. Les différentes composantes correspondent aux couples EX/EM (nm) suivants : C1 (280/300), C2 (280/330), C3 (280/365) et C4 (315/440). Contrairement aux résultats obtenus précédemment, la valeur Fmax C4 augmente après FML alors que nos anciens résultats montraient une diminution après FML. Cette différence peut être dû à un effet millésime. Une fois de plus, c’est la composante PARAFAC C4 qui permet de discriminer les vins ayant effectué ou non la FML, voir figure 5.1 ci-dessous. Pour la suite des analyses, nous utiliserons une diode laser émettant à une longueur d’onde de 284 nm, la plus proche de $\lambda_{ex}(C4)$ à notre disposition, pour les mesures de temps de vie de fluorescence.

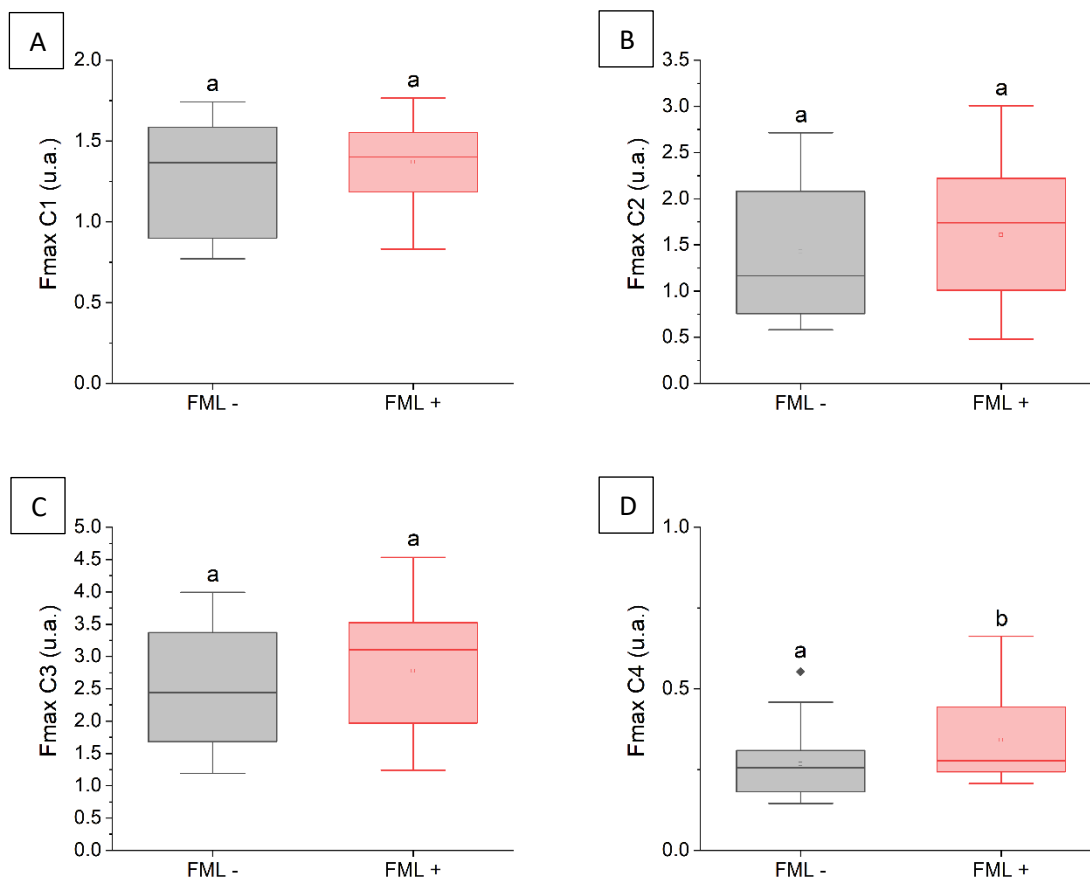


Figure 5.1 : Valeurs de Fmax (u.a.) pour les 4 composantes PARAFAC du second lot de vins en fonction de la FML. (A) : Fmax C1 ; (B) : Fmax C2 ; (C) : Fmax C3 ; (D) : Fmax C4. « FML - » (N = 29) : la FML n'a pas été réalisée ; « FML + » (N = 25) : la FML a été réalisée. La différence de lettre au dessus des boîtes à moustaches indiquent une différence significative ($p < 0.05$).

Les temps de vie de fluorescence des vins de ce lot sont mesurés puis représentés à l'aide du phasor plot, voir figure 5.2(A). Là encore, ces résultats sont en accord avec ceux présentés dans le précédent papier. Les temps de vie de fluorescence semblent se déplacer vers des valeurs plus faibles après FML. Une diminution des temps de vie est définie par une augmentation des valeurs de g et une diminution des valeurs de s . Dans le cadre de nos expériences, ces tendances sont indiquées comme significatives, par les deux boîtes à moustaches de la figure 5.2(B) et 5.2(C).

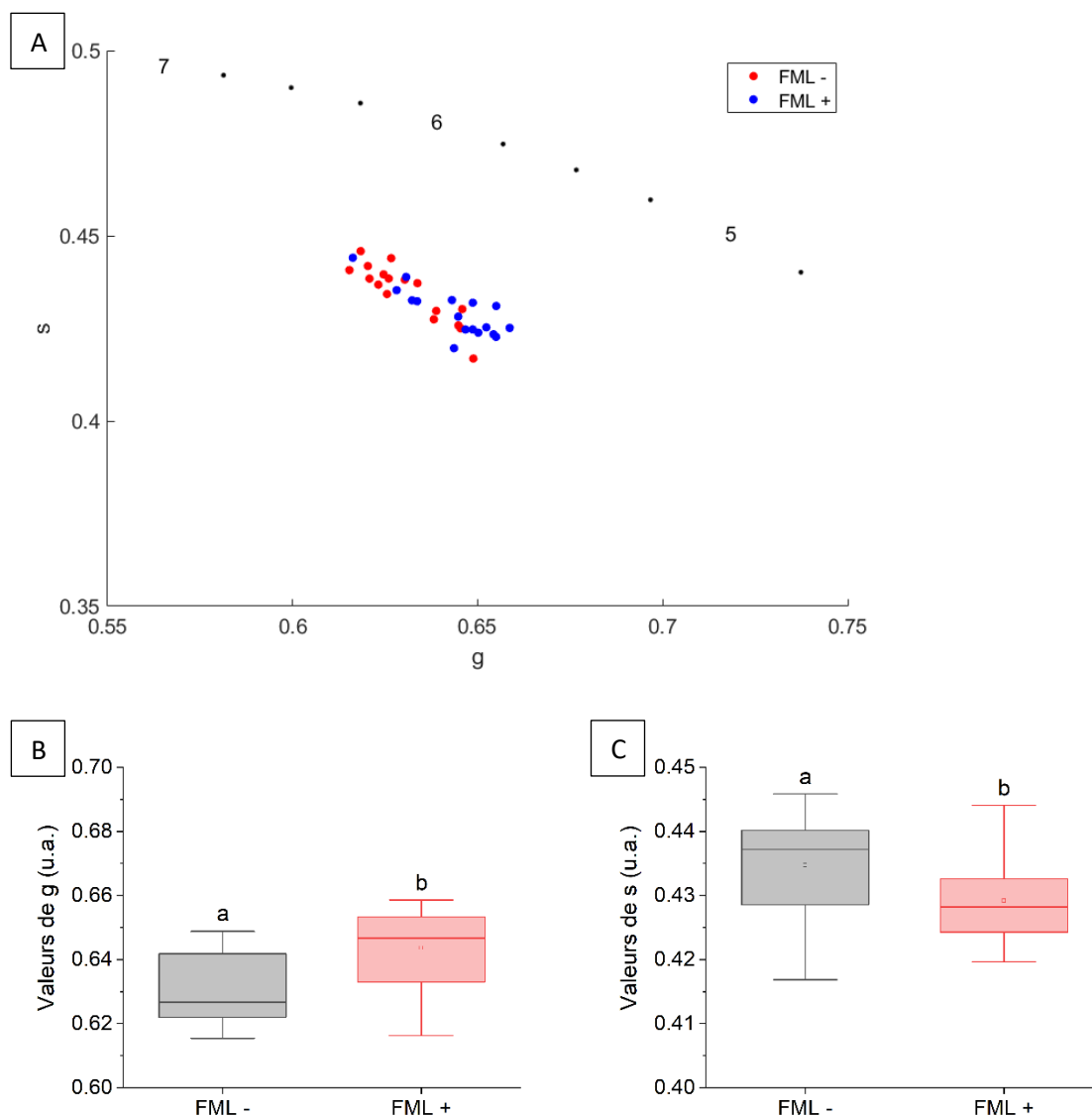


Figure 5.2 : (A) : représentation phasor plot des temps de vie de fluorescence du second lot de vins. Les acquisitions sont réalisées au couple EX/EM (nm) de C4 : 315/440. « FML - » : la FML n'a pas été réalisée ; « FML + » : la FML a été réalisée. Valeurs de g (B) et de s (C) en fonction de la FML. La différence de lettre au dessus des boîtes à moustaches indiquent une différence significative ($p < 0.05$).

Ces données viennent consolider les résultats présentés lors de la publication présentée dans ce chapitre. L'effet de la FML sur certains composés, supposé être dû aux changements d'acides et des composés phénoliques, est capable d'être caractérisé par cette association de deux méthodes de spectroscopie. D'autres études sont maintenant envisageables pour utiliser cet outil dans le suivi des changements induits par la FML.

2. Effet de la souche bactérienne impliqué dans la FML

Dans la complémentarité de cette étude, nous nous sommes demandé si « La fluorescence multidimensionnelle des vins (stationnaire et temporel) pouvait évaluer des différences de compositions physico-chimiques à l'échelle de la souche de bactérie lactique utilisée pendant la FML. ». Pour réaliser cet objectif, nous avons récupéré un troisième lot d'échantillons ($N = 48$). Ce lot est composé de deux séries de moûts issus de raisins (Merlot) ayant subi des traitements de protection sanitaire au vignoble (Contrôle - et +) et proviennent du même millésime (2021). Chacune de ces séries ayant subi une FML à l'aide de quatre souches bactériennes (A, B, C et D). Chaque vin a réalisé la FML à l'aide d'une souche et échantillonné sous deux conditions, biofilm et planctonique, et pour chaque condition des *triplicatas* sont réalisés (voir tableau 5.1 récapitulatif ci-dessous).

Tableau 5.1 : Tableau récapitulatif du plan expérimental. Contrôle - ($N = 24$) et Contrôle + ($N = 24$). Quatre souches : A, B, C et D. Deux conditions BF (biofilm) et PL (planctonique), et des triplicatas pour chaque condition.

Contrôle -								Contrôle +							
A		B		C		D		A		B		C		D	
BF	PL	BF	PL	BF	PL	BF	PL	BF	PL	BF	PL	BF	PL	BF	PL
x 3	x 3	x 3	x 3	x 3	x 3	x 3	x 3	x 3	x 3	x 3	x 3	x 3	x 3	x 3	x 3

Nous souhaitons voir l'effet des différentes souches sur la FML. En prenant en compte nos précédents résultats, nous avons travaillé par la suite au couple EX/EM (nm) de la composante C4, soit 315/440. C'est cette composante qui semblait être le plus impactée par la FML, il était donc envisageable que ce soit cette composante qui permette une discrimination entre souches,

le cas échéant. Nous avons alors réalisé une étude des temps de vie de fluorescence pour chaque échantillon, en fonction des différentes souches, et représenté ces temps de vie à l'aide de phasor plot, voir figure 5.3. En faisant abstraction de l'effet du traitement ou des différentes conditions (BF/PL), on remarque principalement que les différentes souches ne se distinguent pas entre elles et que l'effet de la FML implique une augmentation des temps de vie, ce qui est contraire aux précédents résultats. L'effet de la FML peut s'expliquer par les modèles d'études qui sont des moûts contrairement aux précédents résultats issus de vin fini. Pour l'effet des souches bactériennes on peut émettre différentes hypothèses, soit que les souches utilisées pour réaliser la FML n'ont pas d'impact sur les temps de vie des composés spécifiques à la composante C4, soit que nous n'analysons pas les temps de vie de fluorescence à un couple EX/EM adapté pour discriminer les souches. D'autres analyses à une composante différente (C3) n'ont pas permis de mettre en évidence une discrimination des souches.

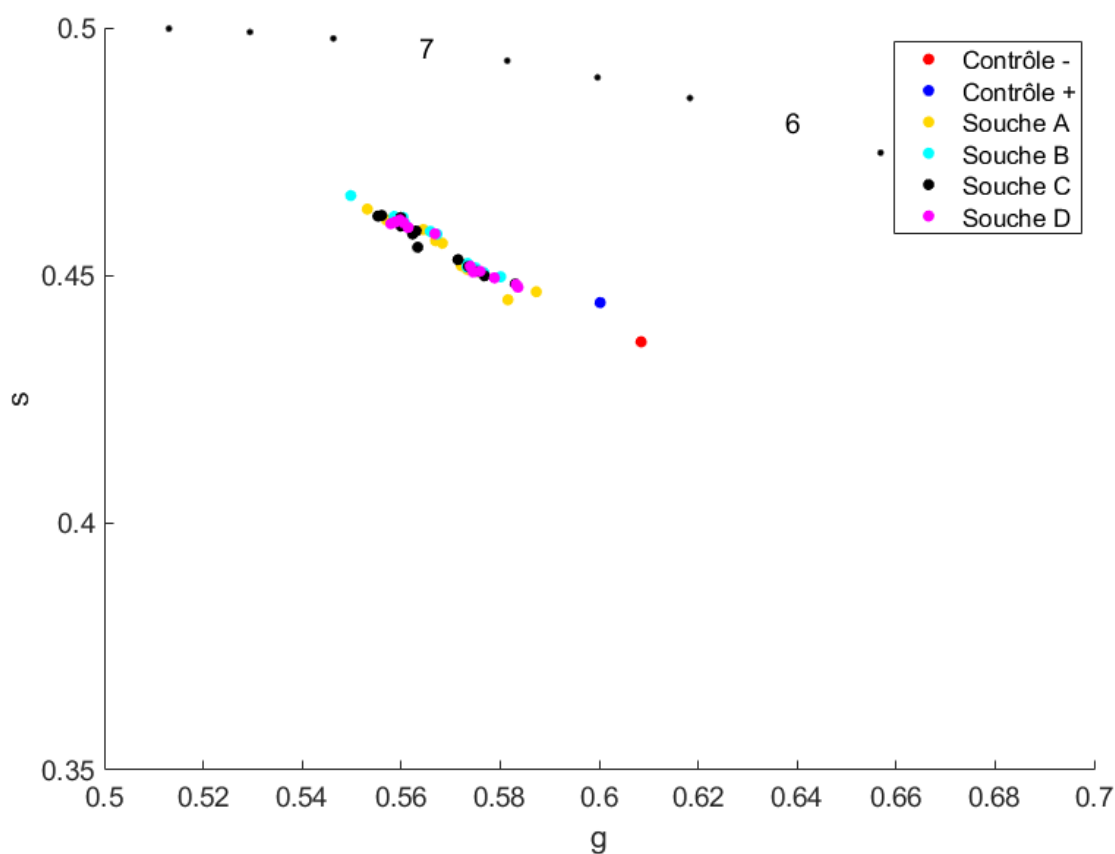


Figure 5.3 : Représentation phasor plot des temps de vie de fluorescence des moûts du 3^{ème} lot en fonction de la souche utilisée, pour un couple EX/EM correspondant à celui de C4 (315 nm/440 nm). Les « contrôles -/+ » représentent les moûts ayant été traités ou non avant FML. Points jaunes : souche A ; points cyan : souche B ; points noirs : souche C ; points roses : souche D.

En partant du même échantillonnage, on peut se demander si l'effet des conditions de traitement phytosanitaire impacte les changements des temps de vie de fluorescence. On sépare alors notre lot de moût en deux parties : d'un côté les moûts issus du « contrôle - » et de l'autre ceux issus du « contrôle + ». On observe ensuite l'évolution des temps de vie en fonction des deux conditions, biofilm et planctonique, mais aussi en fonction des différentes souches utilisées. On représente alors ces temps de vie en deux graphiques, voir figure 5.4. Que ce soit pour les vins issus du contrôle « + » ou « - », on observe des changements identiques, il n'y a pas de discrimination ou de tendance en fonction des conditions biofilm et planctonique pour chaque souche.

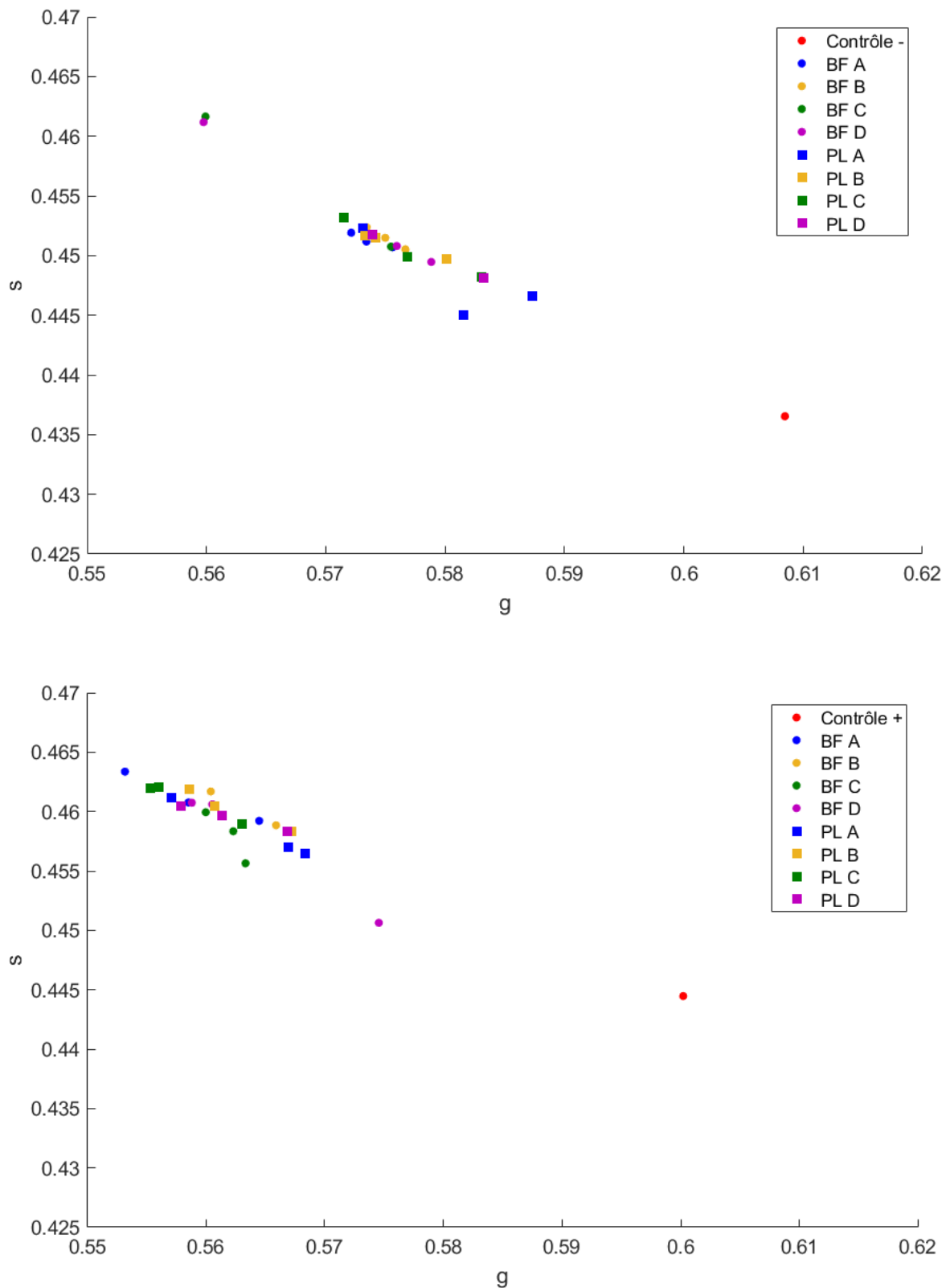


Figure 5.4 : Représentation phasor plot des temps de vie de fluorescence des moûts du 3^{ème} lot en fonction des conditions BF ou PL, pour un couple EX/EM correspondant à celui de C4 (315 nm/440 nm). Graphique du haut : pour les moûts issus du « contrôle - ». Graphique du bas : pour les moûts issus du « contrôle + ».

Aucune de nos données ne permet de relier les changements des temps de vie de fluorescence pour les analyses à la composante C4 aux différentes souches utilisées, ou aux différentes conditions biofilm et planctonique. Cependant, cette étude nous permet d'ouvrir d'autres perspectives pour la suite de nos travaux avec notamment les effets de traitement, voir figure 5.5. On distingue deux groupes séparés entre les moûts ayant été traités ou non. Cela signifie que la composition des moûts dont la modification chimique a été induite par un traitement phytosanitaire sur raisins au vignoble est préservée une fois que la fermentation malolactique a été réalisée. En effet les moûts, fermentés ou non, issus de raisins ayant subi un traitement (« + ») ont des valeurs de « g » plus basse et de « s » plus grandes comparativement aux moûts, fermentés ou non, issus de raisins qui n'ont pas subi ce traitement. Ces résultats nécessiteront plus d'approfondissement pour pouvoir être correctement exploités et apportent de nouvelles perspectives d'applications pour notre technique de caractérisation.

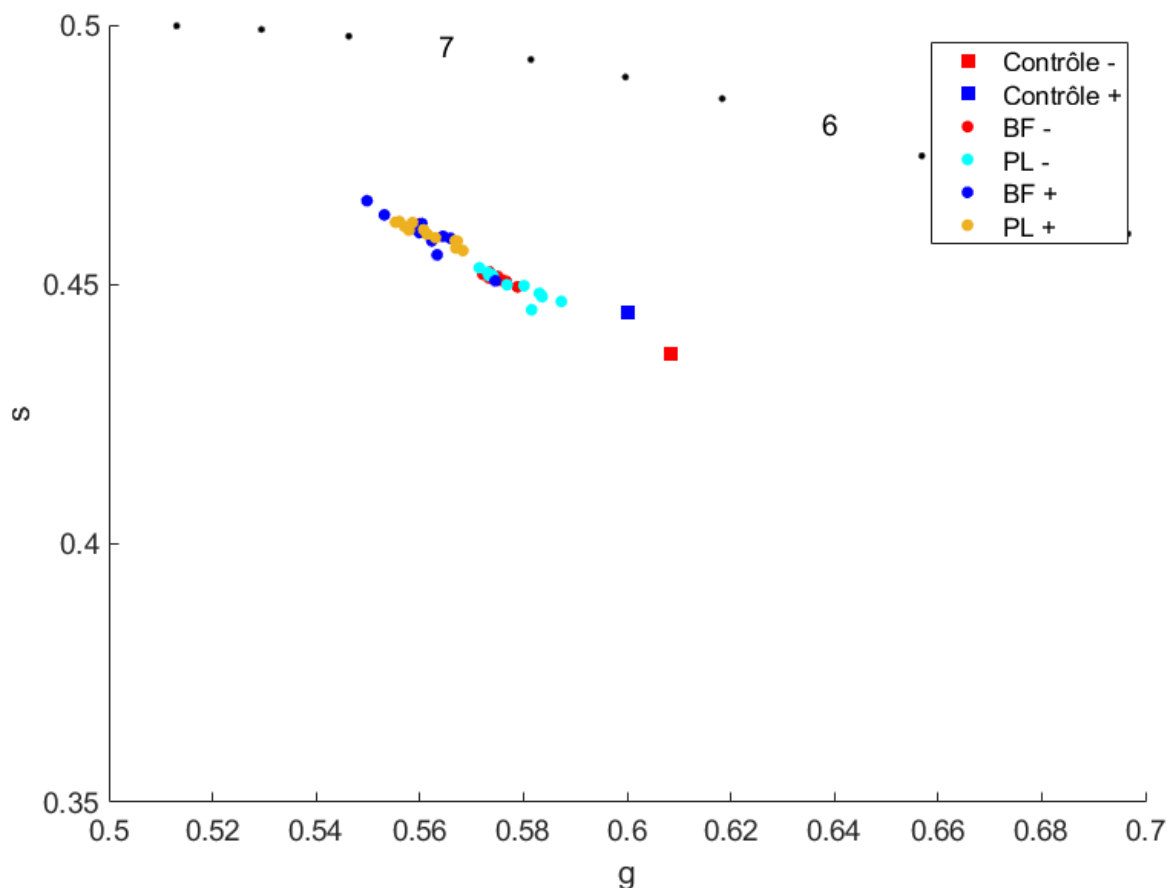


Figure 5.5 : Représentation phasor plot des temps de vie de fluorescence des moûts du 3^{ème} lot en fonction des moûts ayant subi ou non un traitement, pour un couple EX/EM correspondant à celui de C4 (315 nm/440 nm). Les moûts n'ayant pas été traités apparaissent en points rouges (BF -) et en points cyans (PL -) ; les moûts ayant été traités apparaissent en points bleus (BF +) et en points jaunes (PL +).

Chapitre 2 : Caractérisation des photoproduits de l'acide dipicolinique et du dipicolinate de calcium *via* des techniques de spectroscopie et microscopie de fluorescence

Ce deuxième chapitre regroupe les résultats consacrés à la caractérisation des photoproduits du DPA (DPAp) et du CaDPA (CaDPAp). Lorsque ces deux molécules sont soumises à un traitement lumineux de type UVc (254 nm) elles produisent des photoproduits émettant une forte fluorescence. Ces photoproduits ont déjà fait l'objet d'études dans la littérature. Cependant, de nombreuses publications ne font mention que du nom « photoproduit » et ces molécules restent mal caractérisées. Récemment, deux publications (dont une, publiée pendant nos recherches préliminaires) ont apporté les premières pistes quant aux structures des photoproduits. Avant d'utiliser ces photoproduits comme sondes natives dans les spores bactériennes, il semble important de mieux les connaître. Nous avons donc utilisé des techniques de fluorescence en spectroscopie et microscopie pour caractériser et visualiser les DPAp et CaDPAp. Les résultats sont présentés et discutés dans l'article « *Spectroscopic and microscopic characterization of dipicolinic acid and its salts photoproducts – A UVc effect study on DPA in solution and in bacterial spores.* » publié en 2022 dans le journal scientifique *Spectrochimica Acta Part A : Molecular and Biomolecular Spectroscopy* (DOI : [10.1016/j.saa.2022.121502](https://doi.org/10.1016/j.saa.2022.121502)). Pour conclure ce chapitre, des résultats supplémentaires sont introduits à la suite de l'article. Ces résultats complémentaires sont dédiés à l'effet de l'état d'hydratation sur la production des photoproduits.

Spectroscopic and microscopic characterization of dipicolinic acid and its salt photoproducts - A UVc effect study on DPA in solution and in bacterial spores.

Maxime Pacheco¹, Jonathan Dikec¹, Pascale Winckler^{1,2}, Christian Coelho³, Jean-Marie Perrier-Cornet^{1,2,*}.

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

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

³ *Université Clermont Auvergne, INRAE, VetAgro Sup campus agronomique de Lempdes, UMR F, 15000 Aurillac, France.*

* Corresponding author.

E-mail address: jean-marie.perrier-cornet@agrosupdijon.fr (J.-M. Perrier-Cornet)

Abstract:

Bacterial spores can cause significant problems such as food poisoning (like neurotoxin or emetic toxin) or serious illnesses (like anthrax or botulism). This dormant form of bacteria made of several layers of barriers which provide extreme resistance to many abiotic stresses (radiation, temperature, pressure, etc.), are difficult to investigate *in situ*. To better understand the biological and chemical mechanisms involved and specific to spores resistance, the acquisition of environmental parameters is necessary. For that purpose, our research has been focused on the detection and analysis of a unique spore component, dipicolinic acid (DPA), used as the main *in situ* metabolite for sporulating bacteria detection. In its native form, DPA is only weakly fluorescent but after Ultraviolet irradiation at the wavelength of 254 nm (UVC), DPA photoproducts (DPAp) exhibit a remarkable fluorescence signal. These photoproducts are rarely identified and part of this study gives new insights offered by mass spectrometry (MS) in the determination of DPA photoproducts. Thanks to DPA assay techniques and fluorescence spectrometry, we highlighted the instability of photoproducts and introduced new assumptions on the effects of UVC on DPA. Studies in spectroscopy and microscopy allowed us to better understand these native probes in bacterial spores and will allow the implementation of a new method for studying the physico-chemical parameters of spore resistance.

Keywords:

Bacterial spore – DPA – Photoproducts – Native probe – Fluorescence lifetime – Phasor plot
– Two-photon microscopy

1. Introduction

Bacterial spores are a dormant form of bacteria structured in several layers: exosporium (absent from *B. subtilis*), coats, outer membrane, cortex, inner membrane and a core; which result in high resistance to extreme conditions (Nicholson et al., 2000; P. Setlow, 2006). These structures are mainly composed of lipids, polysaccharides or proteins. Because of its multilayer structure, the molecules and their structure involved in the resistance properties of this bacterial form are difficult to study separately. Moreover, analysis often requires invasive or destructive methods. There is a need to determine the physico-chemical parameters of bacterial spores leading to their resistance. These parameters should be measured inside the spore core. The investigation difficulties explain the lack of knowledge concerning the physical state and mobility of spore core. The form of CaDPA inside the spore core is not clear, some authors suggest, for example, that CaDPA is probably present in a powder form inside the spore (Kong et al., 2012). Moreover, pH inside the spore core and water activity are still not been easily measured *in vivo* and require destructive or complex methods to be investigated. These parameters are important for spore resistance against physical stresses used in sterilization processes like wet heat resistance or even UV resistance. Having new insights of what are the precise internal physico-chemical parameters could lead to the development of more precise and destructive methods to sterilize spores in food matrix and avoid spoilage or diseases caused by pathogenic sporulated bacteria. To achieve this objective, it is interesting to look at native probes (intrinsic probes in the medium) present in bacterial spores. There are two native biomolecules sufficiently concentrated in the core that could govern spore resistance, particularly against temperature and UV exposure. Water is the first of these molecules as H₂O makes up 27-55% of the spore core wet weight depending on the species (P. Setlow, 2014; Tiburski et al., 2014; Zhang et al., 2010). Dipicolinic acid, also named 2,6-pyridinedicarboxylic acid (DPA) is the second core molecule involved in spore resistance (Paidhungat et al., 2000; B. Setlow et al., 2006; Slieman & Nicholson, 2001). DPA is involved in low water activity of the spore core. This gives the bacterial spore its high thermal resistance properties. DPA is a specific spore molecule present in large quantities in bacterial spores (5-15% of spore dry weight) (Huang et al., 2007). DPA is located only in the core, and Raman spectroscopy showed that it should be present in equimolar amounts with calcium, as CaDPA (Kong et al., 2012). The use of DPA and CaDPA as a probe for the study of bacterial spores has been largely documented (Alexander et al., 2003; Cable et al., 2007; Goodacre et al., 2000; Paulus, 1981;

Smith et al., 2011; Tabor et al., 1976). Those studies used destructive methods of the spore structures to extract DPA outside the core. Another approach consists in analyzing the photoproduct forms of DPA and CaDPA (DPAp and CaDPAp), because of their fluorescent emission properties (Nudelman et al., 2000; Sarasanandarajah et al., 2005). DPA and CaDPA are only very weakly fluorescent thus irradiation at 254 nm is required to create DPAp and CaDPAp that will emit fluorescence signals. This method has already been used for the analysis of bacterial spores (Alimova et al., 2003; Germaine & Murrell, 1974) but very few publications succeeded in determining the characteristics of these photoproducts (Nardi et al., 2021; Noell et al., 2015). Even if DPA seems present mainly in chelated forms, particularly with calcium, studies showed the interest in studying both compounds (DPA and CaDPA) because of the sensitivity of fluorescence to diagnose environmental conditions of bacterial spores (Sarasanandarajah et al., 2005).

This paper aims to discuss the photochemical effect of UVc on DPA and CaDPA and to characterize the resulting molecules DPAp and CaDPAp to detect them in bacterial spores. For that purpose, the fluorescence of these photoproducts was investigated with excitation emission matrices of fluorescence (EEMF) and emission spectra at fixed excitation wavelengths. The characterization of photoproducts and their stability has been studied using various techniques, such as the dosage of Terbium-DPA complex and mass spectrometry. The visualization of its photoproducts was carried out by multi-photon microscopy techniques and by analysis of the fluorescence lifetimes associated with these molecules.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

DPA (Sigma-Aldrich, Germany, 167.12 g/mol, purity > 98 %) solution (10 mM) was prepared in water and stored at room temperature. The pH was adjusted to 8 with a Tris base buffer (Sigma-Aldrich, Germany, 121 g/mol, purity > 99.9 %). CaDPA solution (50 mM) was prepared with a 1:1 mix of DPA solution and CaCl₂ (Sigma-Aldrich, Germany, 110.98 g/mol, purity > 96 %).

2.2. Bacterial strains and culture conditions

B. subtilis strains used in this study were PS533 (wild-type), PS4150 and FB122. PS533 was obtained from the courtesy of P. Setlow from the Department of Molecular, Microbial, and

Structural Biology, University of Connecticut Health Center, USA. This strain was carrying a plasmid encoding resistance to kanamycin. PS4150 was a strain that was unable to form the majority of proteins from the outer coat layer because of the deletion of *cotE* and *gerE* coding sequences, making this strain non autofluorescent (Ghosh et al., 2008). FB122 was a strain deleted for the *spoVF* operon and *SleB* gene, resulting in a strong depletion of DPA content (Paidhungat et al., 2000).

For spores production, the different strains were first isolated on LB agar medium containing antibiotics (10µg/mL of kanamycin for PS533, spectinomycin 100 µg/ml + 10µg/mL tetracycline for PS4150 and FB122) at 37°C for 12h. An isolated colony was then placed on double strength Schaeffer's-glucose liquid medium (2xSG) at 37°C under agitation until reaching an OD of 0.6. Then the culture was diluted 10 times on a fresh 2xSG medium and incubated under agitation 5 days at 37°C. All purified spores were washed at least 3 times with sterilized distilled water at 4°C until 98% purity was reached and stored at 4°C.

2.3. Photolysis conditions

Ultraviolet (UV) corresponds to wavelengths of light between about 100 and 400 nm, that are divided into several categories according to their ranges in this spectrum (UVa, UVb and UVc). The wavelength used for the photolysis is 254 nm, which correspond to UVc. UVc irradiation of DPA and CaDPA solutions was performed in distilled water, by means of a UV irradiation system CROSSLINKER® CL-508 (UVItec Ltd, UK) with 5 UVc tubes at 0.120 J/cm². For the mass spectrometry (MS) experiment, DPA with greater purity (Sigma-Aldrich, Germany, 167.12 g/mol, purity > 99.5 %) (3 g/L) was diluted in ultrapure water. Water was removed after irradiation using a rotary evaporator. The residues of DPAP for each irradiation time were dissolved in methanol solution (Sigma-Aldrich, Germany, Chromasolv™ for HPLC min. 99.9 %). Irradiations of bacterial spores were performed in a liquid sample by means of 2 minutes UVc irradiation at 0.120 J/cm², at a concentration of 1.10⁷ cell/ml to avoid any shielding effect (Reidmiller et al., 2003).

2.4. Steady state fluorescence

Excitation-emission matrices of fluorescence (EEMF) was acquired on a Horiba Aqualog (Horiba Scientific, Kyoto, Japan) unit by setting the excitation wavelengths from 225 nm to 600 nm (3 nm interval) and the emission wavelengths from 200 to 600 nm (3.22 nm). Each

EEMF was corrected daily for Rayleigh scattering and inner filtering. It was normalized to a 1ppm quinine sulphate solution using the manufacturer's software (Aqualog software).

Emission spectra were acquired on a Jobin Yvon Fluorolog 3 (Horiba Scientific, Kyoto, Japan) by setting the excitation wavelengths at 300 nm and 340 nm and the emission wavelengths from 380 to 500 nm with a 5 nm bandpass and a 1 nm step.

2.5. DPA assay

DPA assay was performed according to the protocol proposed by Hindle and Hall (1999). This stock solution of 0.1 mM DPA was prepared in a 16 g/L NaOH solution (Sigma-Aldrich, Germany, 40.00 g/mol, purity > 98 %). Different volumes of this DPA were added to 3 mL of 1 M acetate buffer ($C_2H_3NaO_2 \cdot 3H_2O$, Sigma-Aldrich, Germany, 136.08 g/mol, purity > 99 %) (pH 5.6) and 3 μ L of 10 mM $TbCl_3$ solution (Sigma-Aldrich, Germany, 373.38 g/mol, purity = 99.9 %) in quartz cuvettes to make the standard curve. Emission spectra were acquired on a Jobin Yvon FluoroMax-4 (Horiba Scientific, Kyoto, Japan). The excitation and emission wavelengths were 280 ± 10 nm and 545 ± 5 nm respectively. A glass slide was placed in front of the detector to filter the Rayleigh diffusion of water. The standard curve can be found in Supplementary Information (S.I.) Fig. S1 & S2.

2.6. Q-ToF MS analysis

Direct injection of DPA solution (3g/L in methanol) and DPAP identification was performed with a MaXis plus MQ ESI-Q-TOF mass spectrometer (Bruker, Bremen, Germany). MS experiments aim of identifying new photoproducts, and was not a quantitative method. Acquisitions were done in the m/z 100 to 1500 mass range in positive ionization mode with an electrospray ionization source. The injection flow was 200 μ L/h, the nebulization pressure was 2 bar and the dry nitrogen flow was 10 L/min. The mass spectrometer parameters were 500 V for end plate offset and 4500 V for capillary voltage. Before analysis, the mass spectrometer was calibrated by injecting Na Formate clusters. This calibration was realized in "enhanced quadratic" mode with an error of less than 0.5 ppm. Data were treated using Compass DataAnalysis v4.3 software (Bruker, Bremen, Germany). Elementary formula were determined using an isotopic profile.

2.7. Multi-photon & fluorescence lifetime microscopy

Fluorescence lifetime images were collected using a time-correlated single-photon counting (TCSPC) module (Picoquant, Germany) on a Nikon A1-MP scanning microscope equipped

with a Plan Apo IR x 60 objective (NA: 1.27, Water Immersion, Nikon, Japan) at a scanning speed of 1 frame per second. A 700 nm excitation was provided by an IR laser (Chameleon, Coherent, California) delivering femtosecond pulses at a repetition rate of 80 MHz. Fluorescence emission of spores was collected on three detection channels for multiphoton imaging: FF01-492/SP-25 (400-492 nm), FF03-525/50-25 (500-550 nm) and FF01-575/25-25 (563-588 nm) (Semrock, USA). For fluorescence lifetime imaging, fluorescence was collected through a band-pass emission filter 680/SP (Semrock, USA). TCSPC recording was performed over 200 temporal channels (final resolution 0.64 ps). We performed fluorescence lifetime image acquisition on spores using Symphotime software (Picoquant, Germany). Then fluorescence lifetimes were calculated by using the MAPI software (See next paragraph).

2.8. Time resolved fluorescence analysis

Fluorescence lifetime is a photo-physical parameter that varies with the conformation of the fluorophore molecule and with the external physico-chemical conditions of the local environment. Fluorescence lifetime analysis was performed using the phasor plot representation provided by the MAPI software (IRI, USR 3078 CNRS, BCF, available on request at: <http://biophotonique.univ-lille1.fr/spip.php?rubrique60>) (Leray et al., 2013).

2.8.1. Phasor plot representation

The phasor plot is a graphical representation of the raw TCSPC data in a vector space obtained by the mathematical Fourier transform decomposition. Each fluorescence decay curve is converted into $[g ; s]$ coordinates, calculated by the cosine and sine transforms of the measured fluorescence intensity decay $I(t)$, defined by:

$$g(\omega) = \frac{\int_0^T I(t) \cdot \cos(n\omega t) dt}{\int_0^T I(t) dt} \quad (1)$$

$$s(\omega) = \frac{\int_0^T I(t) \cdot \sin(n\omega t) dt}{\int_0^T I(t) dt} \quad (2)$$

Where ω is the laser repetition angular frequency, n is the harmonic frequency and T is the finite width of the temporal measurement window. For a mono-exponential decay, the $[g ; s]$ coordinates are located on a semicircle centered on point $[0.5;0]$ with a radius of $s = 0.5$. Whereas for a multi-exponential decay, the $[g ; s]$ coordinates will no longer be located on the semicircle

but rather inside this semicircle. In the semicircle, the short fluorescence lifetimes are close to the coordinates [1;0], and the long fluorescence lifetimes approach the origin [0;0].

2.9. Statistical analysis

The DPA concentration and fluorescence intensity of bacterial spores were statistically analyzed with a variance analysis (ANOVA performed with Origin[®] (OriginLab[®], USA), p-value <0.05) to evaluate the differentiation significance between before and after UVc irradiation.

3. Results & Discussion

3.1. Stationary spectroscopy on DPAP and CaDPAP

Fig. 1 shows the effect of UVc irradiation on DPA (10 mM) and CaDPA (50 mM). Untreated DPA and CaDPA were very weakly fluorescent, which was already known (Nudelman et al., 2000). After the UVc treatment, there were no changes in wavelengths of maximum absorbance (to collect the absorbance spectra, the solutions were diluted which did not change the couples excitation/emission wavelengths (EX/EM) (S.I. Fig. S3 & S4)). The EEMFs of DPAP and CaDPAP solution highlight the presence of two groups of fluorophores at EX/EM (nm): 340/430 nm and another one at 300/400 nm. The first group of fluorophores with the EX/EM couple of 340/430 nm were mainly present in the DPAP solution but also observed in the CaDPAP solution. However, in CaDPAP solution, it was the group of fluorophores at the couple EX/EM of 300/400 nm that had the most influence on the fluorescence intensity. These results were in accordance with the literature (Alimova et al., 2003; Nudelman et al., 2000; Sarasanandarajah et al., 2005). Those EEMF showed at the same time the influence of the calcium salt on the fluorescence of the photoproducts and the importance of working at two different EX/EM couples to target and distinguish DPAP/CaDPAP fluorophores.

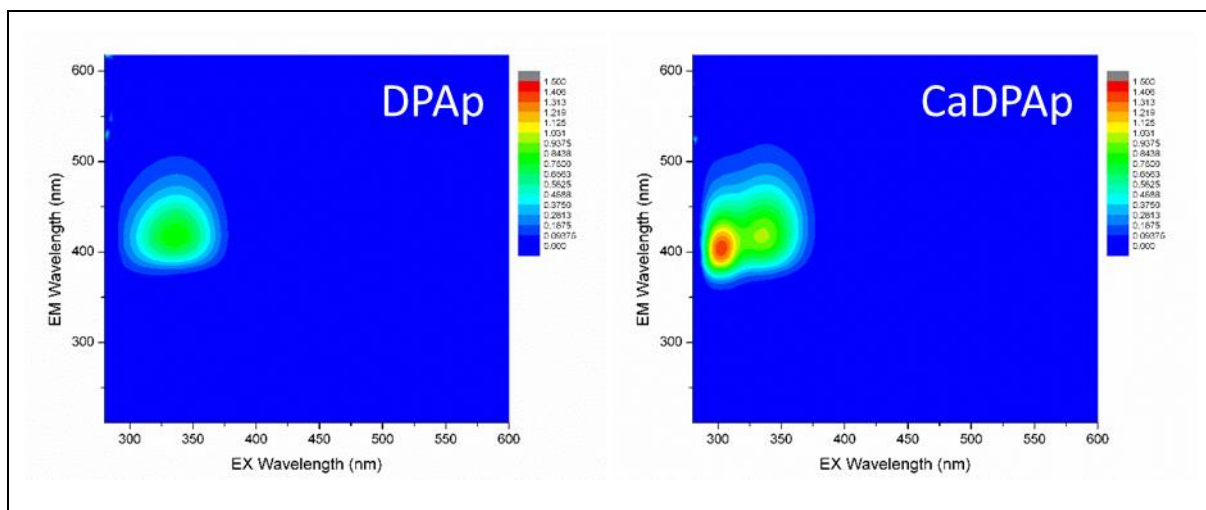


Figure 1: UVc irradiation (λ_{ex} : 254 nm, 10 min at 0.120 J/cm^2) on DPA (10mM) and CaDPA (50mM). EEMF of resulting photoproducts: DPAp and CaDPAp. DPA and CaDPA EEMF were not shown because the compounds did not emit enough fluorescence to be detected. The same intensity (a.u.) scale was used for all spectra.

To confirm the previous results and observe the stability of the photoproducts, emission spectra were obtained for DPA and CaDPA before and after UVc treatment. As shown in Fig. 2, the fluorescence intensity significantly increased with irradiation (10 min at 0.120 J/cm^2). For DPA, the maximum of fluorescence intensity increased respectively by 156 and 216 times for EX/EM couples of 340/430 nm and 300/400 nm. For CaDPA, the maximum of fluorescence intensity increased respectively by 21 and 22 times. However, these experiments also highlighted that the photoproducts were partly unstable. For DPAp and CaDPAp, and for each EX/EM couple, the fluorescence intensity blatantly increased, by 1.6 to 3.4 times after 24 hours. A possible hypothesis of such instability of DPAp/CaDPAp obtained after UVc treatment could be attributed to the aromatic ring stretch and the bonds of the acidic functional groups becoming shortened (Hameka et al., 1996). These changes in the conformation of the molecule, and possibly others, may be responsible for the instability of DPAp. Subsequently the rearrangement of part of excited DPA or CaDPA (DPA* or CaDPA*) is probably oriented towards the production of photoproducts, which may explain the slight increase in fluorescence intensity.

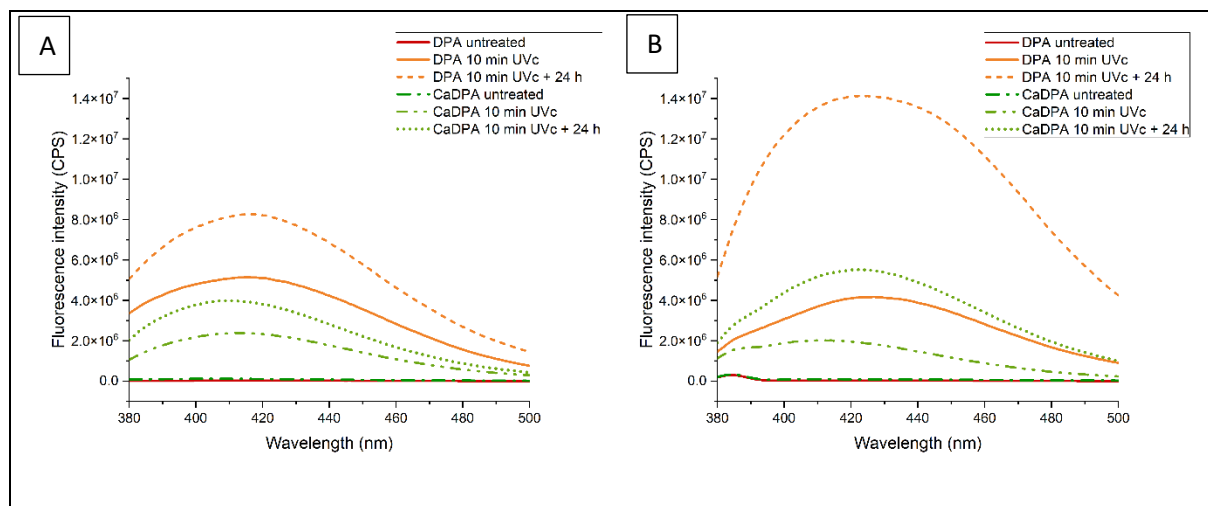


Figure 2: Fluorescence emission spectra of DPA (10 mM) and CaDPA (50 mM) for two excitation wavelengths: $\lambda_{\text{ex}} = 300$ nm (A) and $\lambda_{\text{ex}} = 340$ nm (B). The red (DPA) and the dark green (CaDPA) lines were obtained before UVc treatment (irradiation of 10 min. at 0.120 J/cm^2). The orange and light green solid line correspond to DPAP and CaDPAP emission spectra after irradiation. The corresponding dotted lines come from the same samples after 24h.

3.2. UVc effect on DPA

Complexation between DPA and certain lanthanides makes it possible to drastically increase DPA fluorescence, with emission bands characteristic of these complexes, it allows a quantitative and specific detection of DPA. Terbium was the best lanthanide for the detection of DPA, as it provides a greater fluorescence compared to other lanthanides (Hindle & Hall, 1999). For the DPA assay, we used TbCl_3 as lanthanide able to form highly fluorescent complex with DPA. As shown in Fig. 3(A), after UVc irradiation of 10 minutes at 0.120 J/cm^2 , the concentration of a DPA solution initially close to 100 nM decreased to a mean value of 43.2 nM. For the same group of samples, after 24 hours of waiting, the DPA dosage leads to a significant increase of the DPA concentration up to a mean value of 59.8 nM. The same behavior was observed with another set of samples submitted to 20 minutes irradiation, as shown in Fig. 3(B). In this case, the DPA concentration decreased up to a mean value of 16.8 nM after the 20 minutes irradiation and increased up to a mean value of 23.6 nM after 24 hours. This behavior was observed on the same set of samples irradiated twice 10 minutes (S.I. Fig. S5). This experiment highlights the fact that excited DPA^* reverts to the DPA form some time after irradiation, which to our knowledge, has never been demonstrated until now. Our hypothesis was clarified as follows: after a UVc irradiation, the DPA^* will partly be transformed in photoproducts but a part of this DPA^* stays in an unstable form. This unstable form of DPA^* will then break down into two parts, a first that will return to its initial form of DPA

and another part that will rearrange itself to form DPAp. Only a small part of this DPA* was supposed to rearrange into the photoproducts form, would have explained the slight increase in fluorescence intensity after 24 hours, as observed in part 3.1 (Fig. 2(A) and 2(B)).

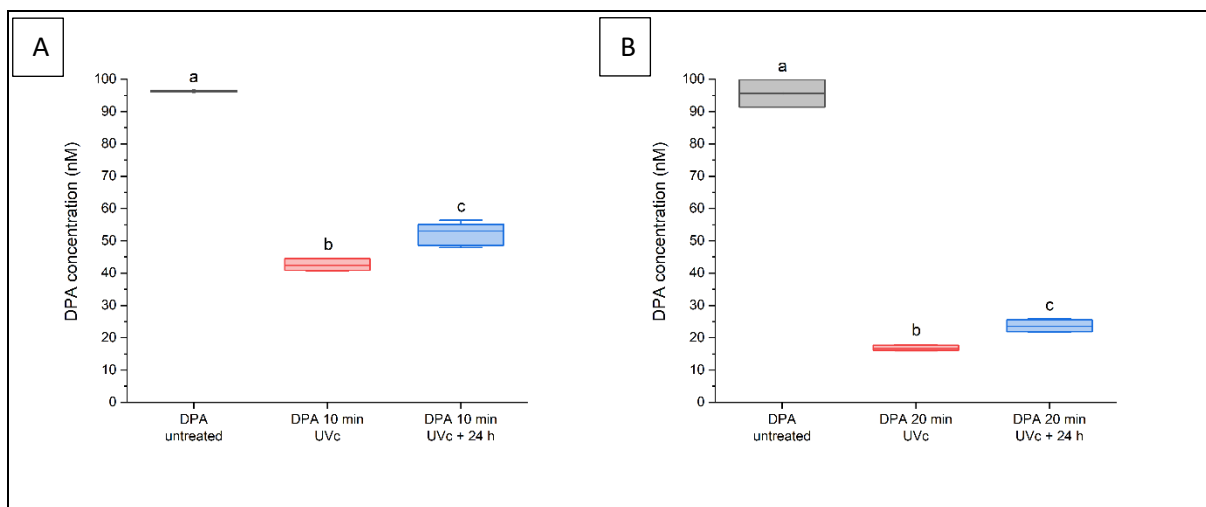


Figure 3: Analysis of variance of DPA concentration (nM) depending if DPA was dosed immediately after or 24 hours after the UVC irradiation. Two irradiation times were used: 10 min at 0.120 J/cm^2 (A) and 20 min at 0.120 J/cm^2 (B) with an initial DPA concentration of 100nM. Each irradiated group ($N(A)=6$; $N(B)=4$) was dosed directly after irradiation and 24 hours after irradiation. Different letters above box plot (a,b) represent significant differences ($p=0.05$) between the time conditions.

3.3. Identification of DPAp

The influence of the UVC treatment on the DPA was directly visible on our mass spectrometry spectra, shown in Fig. 4. There were five MS peaks significantly present before irradiation corresponding to m/z of 122.0236, 150.0184, 168.0290, 182.0447 and 190.0110. After irradiation of 10 min, many MS peaks appear at m/z of 12.0392, 130.1589, 157.0758, 186.2217, 201.0658, 202.2165, 217.0607, 245.0556, 261.0505, 270.5129 and 372.9975. We also observe the disappearance of a peak at 182.0447 that reappears for prolonged irradiation. By using longer irradiation time, the amount of certain photoproducts was amplified such as the molecules corresponding to the m/z at 124.0392, 157.0758, 201.0658 and 217.0607. This prolonged irradiation highlighted the consumption of one of the photoproduct present at the 202.2165 m/z peak.

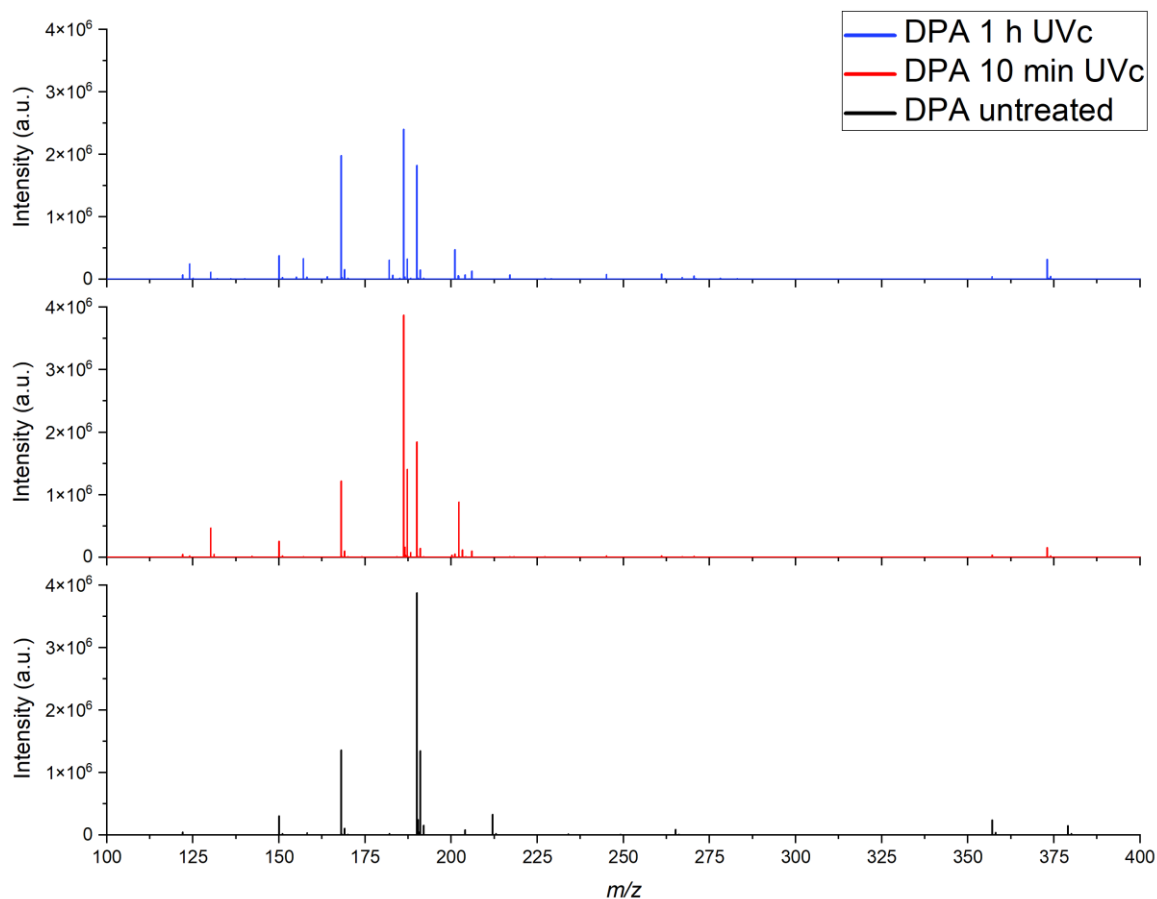


Figure 4: MS spectra obtained for DPA before and after UVC treatment (0.120 J/cm^2) at different times (10 min and 1 h). Only m/z values from 100 to 400 were representing on the X-axis, as all changes occur in this range.

Based on the previous recent literature (Nardi et al., 2021; Noell et al., 2015) and knowing the configuration of the DPA molecule, we were able to provide information concerning the identification of certain photoproducts and to propose structural formula, as shown in Table 1. These results were accompanied by a precision, Err in ppm, which represented the deviation from the theoretical monoisotopic mass, as well as an mSigma value, which represented the correspondence between theoretical and experimental isotopic profiles. The lower Err and mSigma values were, the stronger the correspondence was. The UVC treatment may allow the decarboxylation of one of the acidic functions of dipicolinic acid that would lead to the production of picolinic acid. This acid would serve as a precursor for the creation of bipyridine complexes such as Dimethyl 2,2'-Bipyridine-6,6'-dicarboxylate and Dimethyl 2,3'-Bipyridine-6,6'-dicarboxylate. The molar masses obtained in mass spectrometry were consistent with these compounds and support the proposed models.

The following putative compounds: $C_6H_4NO_2$, $C_7H_4NO_3$, $C_7H_6NO_4$, $C_8H_8NO_4$ and $C_4H_4N_3O_6$ were present in the DPA solution before UVc, which means that all these compounds were already present in either DPA or the results of chemical reactions due to the solvent which was methanol. Among this list of compounds, some of them might participate to the weak fluorescence of DPA. Knowing the compounds present before UVc treatment, we were able to determine which molecules were produced.

The first effect was the decarboxylation of the acid functions of dipicolinic acid and maybe a double decarboxylation of this compound. As the mass of DPA is around 168 m/z , a double decarboxylation would have resulted in a molecular weight around 78 m/z , which would have been outside of the mass scan range of 100-1500 m/z . Therefore, the double decarboxylation hypothesis could not be verified. These molecules, $C_6H_6NO_2$ and perhaps C_5H_6N (not seen) could have been precursors to other molecules.

The first hypothesis was that the UVc treatment would break the pyridine and favour a polymeric form with an azote at the center of this structure, as shown in the following compounds: $C_8H_{20}N$, $C_{12}H_{28}N$ and $C_{12}H_{28}NO$. The second hypothesis was the production of bipyridine complexes with two isomers in 2,2' or 2,3' for the following compounds: $C_{10}H_9N_2$, $C_{11}H_9N_2O_2$, $C_{11}H_9N_2O_3$, $C_{12}H_9N_2O_4$ and $C_{12}H_9N_2O_5$.

Some molecules, which showed a negligible intensity on the mass spectra, could not be determined based solely on their molecular weights: $C_6H_4NO_2$, $C_7H_4NO_3$ and $C_4H_4N_3O_6$. A literature review of DPA and its photoproducts did not provide any additional information. Other molecules on the MS spectra, whose molecular mass (m/z) were 270.5129 and 372.9975, could not be determined. Further experiments, like molecular fragmentation or separation and purification followed by infrared or NMR studies, will be needed to determine these molecules and characterize still undetermined photoproducts.

It should be noted that the irradiation time had an important influence on the production of photoproducts. Even if mass spectrometry direct injection can not be used to accurately quantify the detected compounds, a strong change in intensity gives an indication of the shift in relative proportions. We noticed that the compounds that present the main shift after prolonged irradiation were the picolinic acid and the majority of the bipyridine complexes. There was also an increase in the proportion of the polymeric structure $C_{12}H_{28}NO$. The shift of other compound intensities was not large enough to draw any conclusions. It seems that a

longer irradiation time would promote the production of precursors such as picolinic acid and thus increase the proportion of complexes formed from this compound.

Table 1: List of the major compounds found by mass spectrometry by direct injection of DPA solution, before and after UVc treatment at different irradiation times (10 min. and 1h.). ND: Not Determined. NP: Not Proposed, a.u.: arbitrary unit.

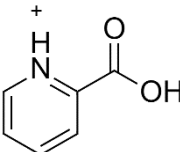
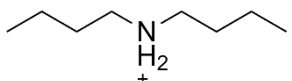
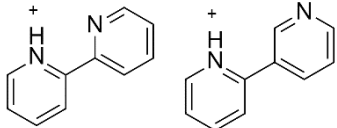
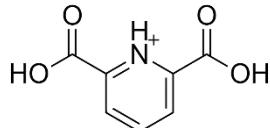
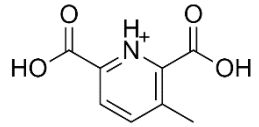
$m/z_{\text{experimental}}$ [M+H] ⁺	Err [ppm]	mSigma	Ion formula	putative	Proposed structural formula	Intensity (a.u.)		
						DPA untreated 1 x 10 ⁻² M	DPA 10 min UVc	DPA 1 h UVc
122.0236	0.7	5.8	C ₆ H ₄ NO ₂	NP		5.26 x 10 ⁴	4.58 x 10 ⁴	7.26 x 10 ⁴
124.0392	0.8	3.7	C ₆ H ₆ NO ₂			ND	2.51 x 10 ⁴	2.47 x 10 ⁵
130.1589	0.7	2.5	C ₈ H ₂₀ N			ND	4.67 x 10 ⁵	1.14 x 10 ⁵
150.0184	1.2	1.1	C ₇ H ₄ NO ₃	NP		3.10 x 10 ⁵	2.58 x 10 ⁵	3.78 x 10 ⁵
157.0758	1.1	3.6	C ₁₀ H ₉ N ₂			ND	1.25 x 10 ⁴	3.33 x 10 ⁵
168.0290	0.6	1.5	C ₇ H ₆ NO ₄			1.36 x 10 ⁶	1.23 x 10 ⁶	1.97 x 10 ⁶
182.0447	0.2	n.a.	C ₈ H ₈ NO ₄			2.28 x 10 ⁴	ND	3.08 x 10 ⁵

Table 1 (continue)

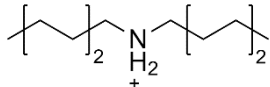
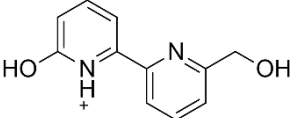
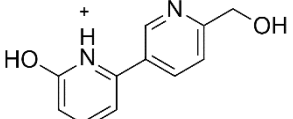
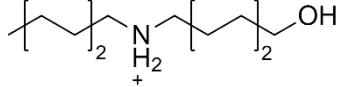
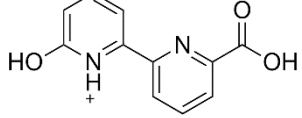
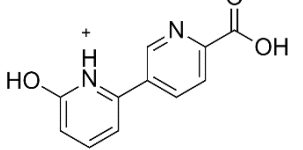
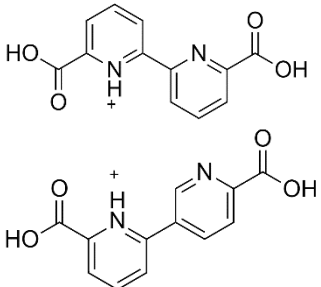
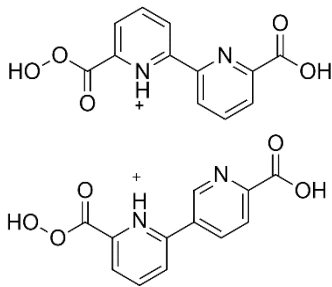
$m/z_{\text{experimental}}$ [M+H] ⁺	Err [ppm]	mSigma	Ion formula	putative	Proposed structural formula	Intensity (a.u.)		
						DPA untreated 1 x 10 ⁻² M	DPA 10 min UVc	DPA 1 h UVc
186.2217	-0.3	0.6	C ₁₂ H ₂₈ N			ND	3.88 x 10 ⁶	2.39 x 10 ⁶
190.0110	-8.2	12.9	C ₄ H ₄ N ₃ O ₆	NP		3.87 x 10 ⁶	1.86 x 10 ⁶	1.81 x 10 ⁶
201.0658	0.5	1.7	C ₁₁ H ₉ N ₂ O ₂		 	ND	5.28 x 10 ⁴	4.71 x 10 ⁵
202.2165	0.3	12.9	C ₁₂ H ₂₈ NO			ND	8.83 x 10 ⁵	4.44 x 10 ⁴
217.0607	0.4	13.5	C ₁₁ H ₉ N ₂ O ₃		 	ND	7.71 x 10 ³	7.04 x 10 ⁴

Table 1 (continue)

$m/z_{\text{experimental}}$ [M+H] ⁺	Err [ppm]	mSigma	Ion formula	putative	Proposed structural formula	Intensity (a.u.)		
						DPA untreated 1 x 10 ⁻² M	DPA 10 min UVc	DPA 1 h UVc
245.0556	0.2	13.3	C ₁₂ H ₉ N ₂ O ₄			ND	2.37 x 10 ⁴	8.16 x 10 ⁴
261.0505	0.5	15.2	C ₁₂ H ₉ N ₂ O ₅			ND	2.30 x 10 ⁴	8.60 x 10 ⁴
270.5129	ND	ND	NP	NP		ND	1.60 x 10 ⁴	5.33 x 10 ⁴
372.9975	ND	ND	NP	NP		ND	1.56 x 10 ⁵	3.19 x 10 ⁵

3.4. Application of DPAP and CaDPAP analysis in bacterial spores

UVc treatment made it possible to observe photoproducts formation using fluorescence measurement, as shown in Fig. 5. Nevertheless, the treatment applied *in vitro* (0,120 J/cm² during 10 min) killed all bacterial spores (inactivation of more than 6 log) in our sample as given by CFU experiment (not shown). A DPA assay has been carried out to check if CaDPA and its fluorescent photoproducts were not released outside the spore after this UVc treatment. No release of CaDPA was detected, except for strain PS4150 that shown partial permeability by releasing a very small part of its CaDPA content (data not shown). This CaDPA release after UVc exposure can be explained by a greater impact of UVc on PS4150 spore structure, particularly on the inner membrane, due to the lack of the spore coat. A treatment just as lethal as the previous one was carried out by reducing the irradiation time to 2 minutes, which allows the strain PS4150 to retain its DPA and CaDPA. However, shorter treatments in terms of irradiation time, and especially at non-lethal dose, did not make it possible to clearly distinguish the increase in fluorescence intensity. Thus, although our treatment was lethal, it allowed our bacterial spores to retain the intracellular DPA and CaDPA.

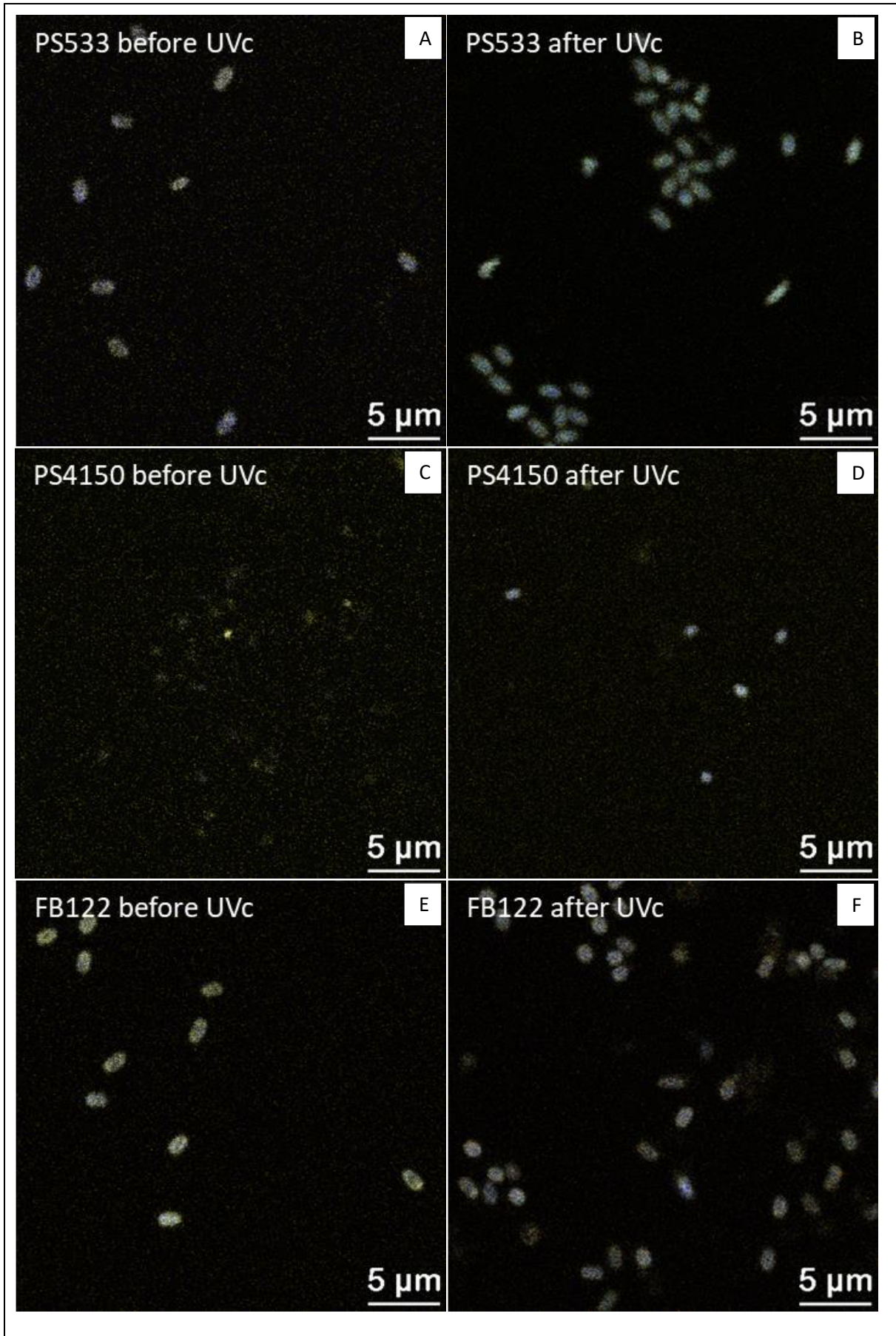


Figure 5: Two photon microscopy images for each strain before and after UVc treatment (2 minutes at 0.120 J/cm^2) with the same contrast. PS533 (wild-type) before irradiation (A) and after irradiation (B). PS4150 (without coat) before irradiation (C) and after irradiation (D). FB122 (lack of DPA) before irradiation (E) and after irradiation (F).

Fig. 6 showed the fluorescence intensity variations after UVc irradiation of 2 minutes at 0.120 J/cm^2 for all the strains. It increased in all cases. The reference was the strain PS533 which was a wild type. For this strain, the mean value of fluorescence intensity (a.u.) changes from 532 to 787, as shown in Fig. 6(A). PS4150, the strain whose coat was highly degraded, serves as a control for the spores autofluorescence. In Fig. 6(B), its mean value of fluorescence intensity increased from 117 to 419 (a.u.). Fig. 6(C) clearly showed that our strain control without DPA and CaDPA, FB122, had the weakest increase. Its mean value of fluorescence intensity changed from 568 to 664 (a.u.). Fig. 6(D) showed the increase in fluorescence intensity for each strain before and after UVc treatment. This figure allows us to compare the direct effect of UVc treatment between our different strains and to see the influence of the coat in the resistance to UVc. The PS4150 strain had a much higher increase in fluorescence intensity than the other strains which was approximately 301 ± 55 (a.u.). We have hypothesized that the coat may have absorbed a part of the UVc, which could explain the significant reduction in the production of DPAP and CaDPAP for the strains possessing the coat. The FB122 strain, lacking DPA and CaDPA, had the lowest increase in fluorescence intensity after irradiation, which was around 95 ± 41 (a.u.). This weak UVc effect might be generated by photochemical reactions with the coat or with compounds present in the bacterial spore, or could have been due to the low remaining presence of DPA and CaDPA in this strain (Paidhungat et al., 2000). The increase in fluorescence intensity for the PS533 spores which was approximately around 254 ± 53 (a.u.), had suggested that the UVc effect might be mainly governed by the production of DPAP and CaDPAP.

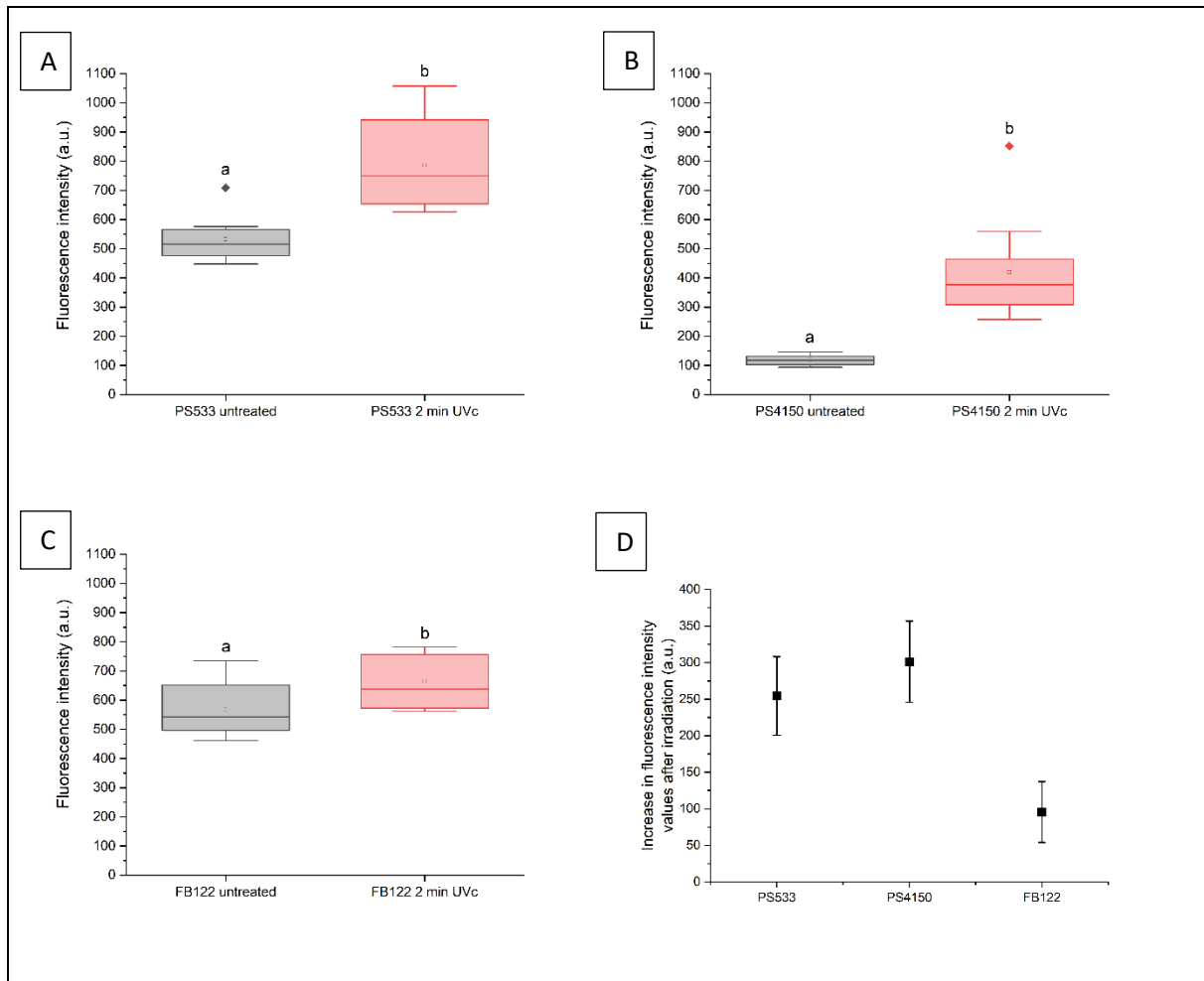


Figure 6: Fluorescence intensity of bacterial spores (N=10) before and after irradiation for strains PS533 (wild-type) (A), PS4150 (without coat) (B), FB122 (lack of DPA) (C). Increase in fluorescence intensity values after irradiation for each strain (D). Different letters above box plot (a,b) represent significant differences ($p=0.05$) between the time conditions.

Moreover, we have performed an analysis of the contours of each of our phasor plot representations to be able to observe the shifts in our fluorescence lifetimes as a function of irradiation, Fig. 7(A). This allows us to highlight the elongation of lifetimes for strain PS533 that moved mainly on a horizontal axis, suggesting an increase in the proportion of long fluorescence lifetimes. Strain PS4150 seemed to move weakly towards the inside of the semicircle, which means the appearance of multiple fluorescence lifetimes. For strain FB122, the irradiation did not seem to shift the phasor plot representation to higher values, but on the contrary moved it towards a greater proportion of short fluorescent lifetimes. With the lack of DPA, the effect of irradiation could be due to many compounds, such as coat proteins. The associated table, Fig. 7(B), shows the mean fluorescence lifetimes obtained for all the studied strains. For PS533 strain, the mean fluorescence lifetime increased significantly from $1.54 \pm$

0.15 ns to 1.85 ± 0.19 ns. The two other strains had mean fluorescence lifetime that did not change significantly. The constant PS4150 fluorescence lifetimes before and after irradiation could be explained by a lower production of photoproducts, but this is not consistent with the intensity changes reported (cf. Figure 6). Otherwise, we may assume that natural DPA photoproducts are already present in the bacterial spore, explaining the initial presence of a long lifetime. For PS4150, no short fluorescence lifetime from coat proteins will reduce the spore mean lifetime, as they do for PS533, so irradiation of PS4150 will increase the rate of DPA photoproducts without changing the lifetime. For strain FB122, there was a very small decrease in fluorescence lifetime from 1.48 ± 0.13 ns to 1.43 ± 0.16 ns with a small increase in fluorescence intensity. Thus, we propose that the slight observed changes should be related to proteins rather to residual DPA. These results were in line with our previous observations, since we expected no change for this strain without DPA/CaDPA. The irradiation seemed to increase significantly the fluorescence intensity and lifetime only for strain PS533, counterbalancing the short lifetime of coat proteins. The PS533 lifetime shifts closer to the PS4150 one, which stay stable after irradiation because of the absence of coat proteins. Conversely, strain FB122 do not change significantly in lifetime nor in intensity due to its deficiency in DPA.

We hypothesize that fluorescence lifetime changes should be driven primarily by the creation of CaDPA photoproducts. To explain this increase, we know that the pH inside the bacterial spore, regardless of its state (dormant or during sporulation), was greater than pH 6 (Magill et al., 1994; B. Setlow & Setlow, 1980). This intracellular pH corresponds to a pH value greater than its pK_{a3} (pK_{a1} : 0.49; pK_{a2} : 2.2 and pK_{a3} : 4.6) (Funahashi et al., 1977; Rajan et al., 1978; Tang et al., 1968). In such an environment, the DPA is in a twice deprotonated form (DPA^{2-}) with a mean fluorescence lifetime of 4.3 ns and a mean fluorescence lifetime of 3.2 ns for CaDPA in their irradiated form (data not shown). These lifetimes were greater than those of the spore before irradiation for the strain PS533 and FB122. This allows us to explain the increase in lifetime with to the appearance of photoproducts that will lengthen the lifetimes for strain PS533, and could explain the slight change for the strain PS4150, that had fluorescence lifetimes close to these values.

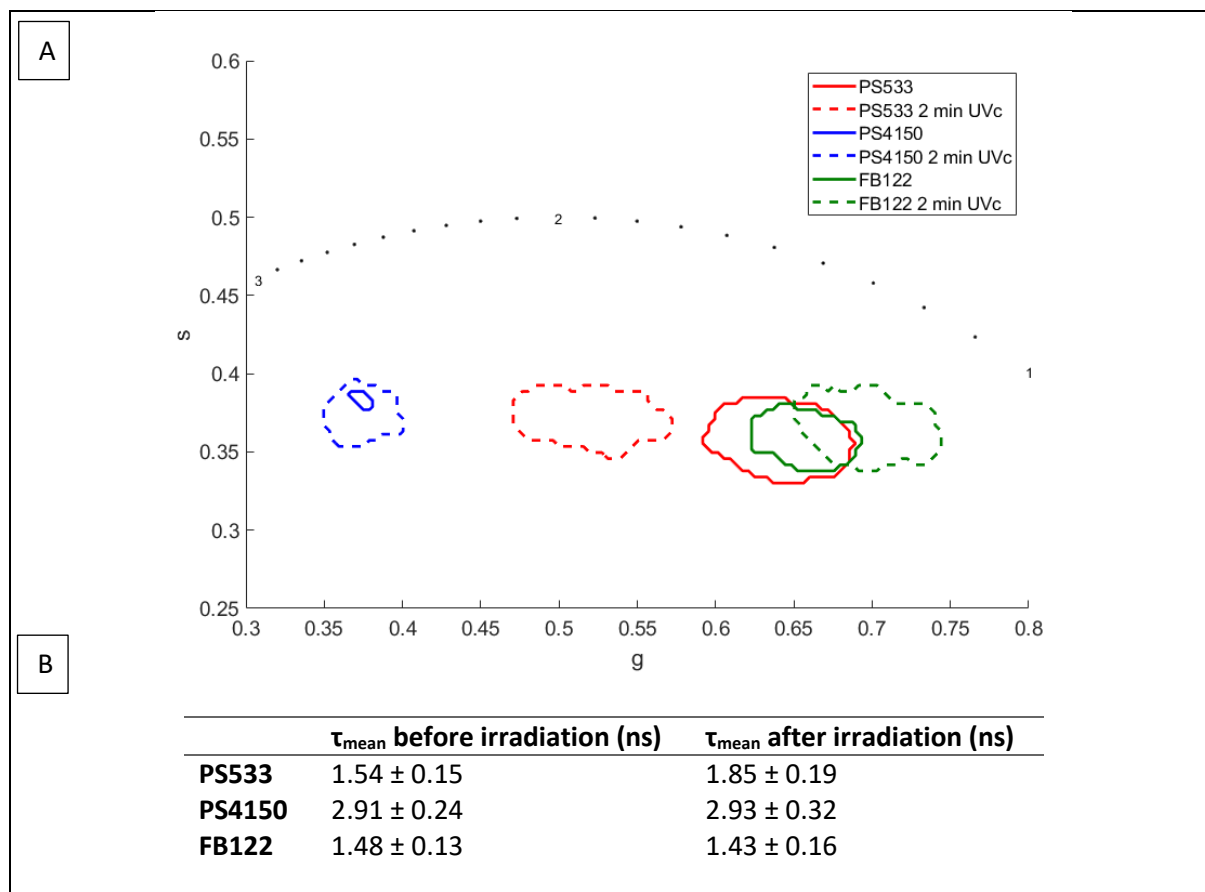


Figure 7: (A) Phasor plot image outlines before (line) and after irradiation (dotted line) for each strain: PS533 (red), PS4150 (blue) and FB122 (green). (B) Table: Mean fluorescence lifetime (τ_{mean}) obtained by phasor plot representation for all strains used before and after irradiation (0.120 J/cm^2 for 2 min). Where g and s represent the values at the two coordinates [g;s] of the phasor plot.

4. Conclusions

In conclusion, this study demonstrates the instability of the photoproducts of DPA and CaDPA, which continue to reorganize as DPAP and CaDPAP, 24 hours after irradiation. To complete this observation, we measured the consumption of DPA for the production of these compounds, in amounts linked to the irradiation time. The loss of DPA was about 60% of the initial concentration after 10 minutes of irradiation. This study also demonstrates the rearrangement of unstable photoproducts into the form of DPA 24 hours after irradiation. It allows us to hypothesize that the DPA excited via UVc produces photoproducts, but that part of this DPA* will take longer to either rearrange in the form of DPAP or in the form of DPA. Mass spectrometry experiments confirm the presence of photoproducts already identified and suggest the presence of still unidentified molecules. All of these data enable us to better understand the effects of UVc on DPA and its CaDPA salt, which may be useful for further studies on bacterial spores. This work also highlights the benefits of using fluorescence

microscopy and fluorescence lifetime imaging to study the inner compartment of bacterial spores and more specifically to use the DPA photoproducts as environmental probes.

Acknowledgement

The authors wish to thank the DIVVA platform (Développement Innovation Vigne Vin Aliments) for the mass spectrometry analyses and especially Dr. Remy Romanet for the technical support as well as the critical reading of the manuscript. We also thank Dr. Ambroise Marin for his help on the development of the phasor plot image analysis tool. The authors are very grateful to Maud Pegeot for the careful proofreading and correction of the manuscript. The authors also acknowledge the region “Bourgogne Franche-Comté” and the University of Burgundy for its funding.

References

- Alexander, T. A., Pellegrino, P. M., & Gillespie, J. B. (2003). Near-Infrared Surface-Enhanced-Raman-Scattering-Mediated Detection of Single Optically Trapped Bacterial Spores. *Applied Spectroscopy*, *57*(11), 1340–1345. <https://doi.org/10.1366/000370203322554482>
- Alimova, A., Katz, A., Savage, H. E., Shah, M., Minko, G., Will, D. V., Rosen, R. B., McCormick, S. A., & Alfano, R. R. (2003). Native fluorescence and excitation spectroscopic changes in *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus* bacteria subjected to conditions of starvation. *Applied Optics*, *42*(19), 4080. <https://doi.org/10.1364/AO.42.004080>
- Cable, M. L., Kirby, J. P., Sorasane, K., Gray, H. B., & Ponce, A. (2007). Bacterial Spore Detection by [Tb³⁺ (macrocycle)(dipicolinate)] Luminescence. *Journal of the American Chemical Society*, *129*(6), 1474–1475. <https://doi.org/10.1021/ja061831t>
- Funahashi, Shigenobu., Haraguchi, Kensaku., & Tanaka, Motoharu. (1977). Reactions of hydrogen peroxide with metal complexes. 2. Kinetic studies on the peroxo complex formation of nitrilotriacetatodioxovanadate(V) and dioxo(2,6-pyridinedicarboxylato)vanadate(V). *Inorganic Chemistry*, *16*(6), 1349–1353. <https://doi.org/10.1021/ic50172a019>
- Germaine, G. R., & Murrell, W. G. (1974). Use of Ultraviolet Radiation to Locate Dipicolinic Acid in *Bacillus cereus* Spores. *Journal of Bacteriology*, *118*(1), 202–208. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC246658/>
- Ghosh, S., Setlow, B., Wahome, P. G., Cowan, A. E., Plomp, M., Malkin, A. J., & Setlow, P. (2008). Characterization of Spores of *Bacillus subtilis* That Lack Most Coat Layers. *Journal of Bacteriology*, *190*(20), 6741–6748. <https://doi.org/10.1128/JB.00896-08>
- Goodacre, R., Shann, B., Gilbert, R. J., Timmins, É. M., McGovern, A. C., Alsberg, B. K., Kell, D. B., & Logan, N. A. (2000). Detection of the Dipicolinic Acid Biomarker in *Bacillus* Spores Using Curie-Point Pyrolysis Mass Spectrometry and Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *Analytical Chemistry*, *72*(1), 119–127. <https://doi.org/10.1021/ac990661i>
- Hameka, H. F., Jensen, J. O., Jensen, J. L., Mellow, C. N., & Vlahacos, C. P. (1996). Theoretical studies of the fluorescence of dipicolinic acid and its anion. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM*, *365*(2–3), 131–141. [https://doi.org/10.1016/0166-1280\(96\)04487-9](https://doi.org/10.1016/0166-1280(96)04487-9)
- Hindle, A. A., & Hall, E. A. H. (1999). Dipicolinic acid (DPA) assay revisited and appraised for spore detection. *The Analyst*, *124*(11), 1599–1604. <https://doi.org/10.1039/a906846e>

- Huang, S., Chen, D., Pelczar, P. L., Vepachedu, V. R., Setlow, P., & Li, Y. (2007). Levels of Ca²⁺-Dipicolinic Acid in Individual Bacillus Spores Determined Using Microfluidic Raman Tweezers. *Journal of Bacteriology*, *189*(13), 4681–4687. <https://doi.org/10.1128/JB.00282-07>
- Kong, L., Setlow, P., & Li, Y. (2012). Analysis of the Raman spectra of Ca²⁺-dipicolinic acid alone and in the bacterial spore core in both aqueous and dehydrated environments. *The Analyst*, *137*(16), 3683. <https://doi.org/10.1039/c2an35468c>
- Leray, A., Padilla-Parra, S., Roul, J., Héliot, L., & Tramier, M. (2013). 827Spatio-Temporal Quantification of FRET in Living Cells by Fast Time-Domain FLIM: A Comparative Study of Non-Fitting Methods. *PLoS ONE*, *8*(7), e69335. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069335>
- Magill, N. G., Cowan, A. E., Koppel, D. E., & Setlow, P. (1994). The internal pH of the forespore compartment of Bacillus megaterium decreases by about 1 pH unit during sporulation. *Journal of Bacteriology*, *176*(8), 2252–2258. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC205346/>
- Nardi, G., Lineros-Rosa, M., Palumbo, F., Miranda, M. A., & Lhiaubet-Vallet, V. (2021). Spectroscopic characterization of dipicolinic acid and its photoproducts as thymine photosensitizers. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, *245*, 118898. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2020.118898>
- Nicholson, W. L., Munakata, N., Horneck, G., Melosh, H. J., & Setlow, P. (2000). Resistance of Bacillus Endospores to Extreme Terrestrial and Extraterrestrial Environments. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *64*(3), 548–572. <https://doi.org/10.1128/MMBR.64.3.548-572.2000>
- Noell, A. C., Ely, T., Bolser, D. K., Darrach, H., Hodyss, R., Johnson, P. V., Hein, J. D., & Ponce, A. (2015). Spectroscopy and Viability of Bacillus subtilis Spores after Ultraviolet Irradiation: Implications for the Detection of Potential Bacterial Life on Europa. *Astrobiology*, *15*(1), 20–31. <https://doi.org/10.1089/ast.2014.1169>
- Nudelman, R., Bronk, B. V., & Efrima, S. (2000). Fluorescence Emission Derived from Dipicolinic Acid, its Sodium, and its Calcium Salts. *Applied Spectroscopy*, *54*(3), 445–449. <https://doi.org/10.1366/0003702001949564>
- Paidhungat, M., Setlow, B., Driks, A., & Setlow, P. (2000). Characterization of Spores of Bacillus subtilis Which Lack Dipicolinic Acid. *Journal of Bacteriology*, *182*(19), 5505–5512. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC110995/>
- Paulus, H. (1981). Determination of dipicolinic acid by high-pressure liquid chromatography. *Analytical Biochemistry*, *114*(2), 407–410. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(81\)90502-9](https://doi.org/10.1016/0003-2697(81)90502-9)
- Rajan, K. S., Jaw, R., & Grecz, N. (1978). Role of Chelation and Water Binding of Calcium in Dormancy and Heat Resistance of Bacterial Endospores. *Bioinorganic Chemistry*, *8*(6), 477–491. [https://doi.org/10.1016/0006-3061\(78\)80002-7](https://doi.org/10.1016/0006-3061(78)80002-7)
- Reidmiller, J. S., Baldeck, J. D., Rutherford, G. C., & Marquis, R. E. (2003). Characterization of UV-Peroxide Killing of Bacterial Spores. *Journal of Food Protection*, *66*(7), 1233–1240. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-66.7.1233>
- Sarasanandarajah, S., Kunnil, J., Bronk, B. V., & Reinisch, L. (2005). Two-dimensional multiwavelength fluorescence spectra of dipicolinic acid and calcium dipicolinate. *Applied Optics*, *44*(7), 1182. <https://doi.org/10.1364/AO.44.001182>
- Setlow, B., Atluri, S., Kitchel, R., Koziol-Dube, K., & Setlow, P. (2006). Role of Dipicolinic Acid in Resistance and Stability of Spores of Bacillus subtilis with or without DNA-Protective α/β -Type Small Acid-Soluble Proteins. *Journal of Bacteriology*, *188*(11), 3740–3747. <https://doi.org/10.1128/JB.00212-06>
- Setlow, B., & Setlow, P. (1980). Measurements of the pH within dormant and germinated bacterial spores. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *77*(5), 2474–2476. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC349422/>
- Setlow, P. (2006). Spores of Bacillus subtilis: Their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals. *Journal of Applied Microbiology*, *101*(3), 514–525. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02736.x>
- Setlow, P. (2014). Spore Resistance Properties. *Microbiology Spectrum*, *2*(5). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.TBS-0003-2012>

- Slieman, T. A., & Nicholson, W. L. (2001). Role of Dipicolinic Acid in Survival of *Bacillus subtilis* Spores Exposed to Artificial and Solar UV Radiation. *Applied and Environmental Microbiology*, *67*(3), 1274–1279. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.3.1274-1279.2001>
- Smith, C. B., Anderson, J. E., Edwards, J. D., & Kam, K. C. (2011). In Situ Surface-Etched Bacterial Spore Detection Using Dipicolinic Acid–Europium–Silica Nanoparticle Bioreporters. *Applied Spectroscopy*, *65*(8), 866–875. <https://doi.org/10.1366/10-06167>
- Tabor, M. W., MacGee, J., & Holland, J. W. (1976). Rapid determination of dipicolinic acid in the spores of Clostridium species by gas-liquid chromatography. *Applied and Environmental Microbiology*, *31*(1), 25–28. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC169712/>
- Tang, T., Rajan, K. S., & Grecz, N. (1968). Mixed Chelates of Ca(II)-Pyridine-2,6-Dicarboxylate with Some Amino Acids Related to Bacterial Spores. *Biophysical Journal*, *8*(12), 1458–1474. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1367448/>
- Tiburski, J. H., Rosenthal, A., Guyot, S., Perrier-Cornet, J.-M., & Gervais, P. (2014). Water Distribution in Bacterial Spores: A Key Factor in Heat Resistance. *Food Biophysics*, *9*(1), 10–19. <https://doi.org/10.1007/s11483-013-9312-5>
- Zhang, P., Kong, L., Setlow, P., & Li, Y. (2010). Characterization of Wet-Heat Inactivation of Single Spores of Bacillus Species by Dual-Trap Raman Spectroscopy and Elastic Light Scattering. *Applied and Environmental Microbiology*, *76*(6), 1796–1805. <https://doi.org/10.1128/AEM.02851-09>

Supplementary information

Spectroscopic and microscopic characterization of dipicolinic acid and its salt photoproducts - A UVc effect study on DPA in solution and in bacterial spores.

Maxime Pacheco¹, Jonathan Dikec¹, Pascale Winckler^{1,2}, Christian Coelho³, Jean-Marie Perrier-Cornet^{1,2,*}.

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

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

³ *Université Clermont Auvergne, INRAE, VetAgro Sup campus agronomique de Lempdes, UMR F, 15000 Aurillac, France.*

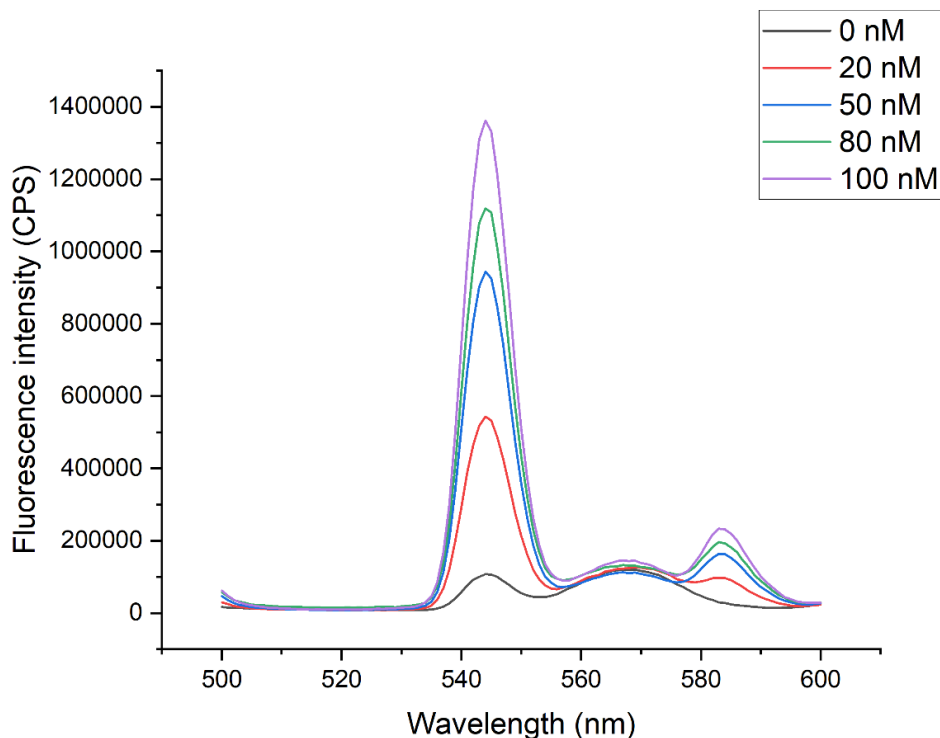


Figure S1: Fluorescence intensity has been measured using a fluorescence spectrometer (FluoroMax-4). For DPA assay, the fluorescence intensity was measured using a DPA-Tb³⁺ solution with concentration from 0 to 100 nM. Emission spectra were measured for λ_{ex} : 280 ± 10 nm. CPS: Counts per second, is the measurement unit of the fluorescence intensity.

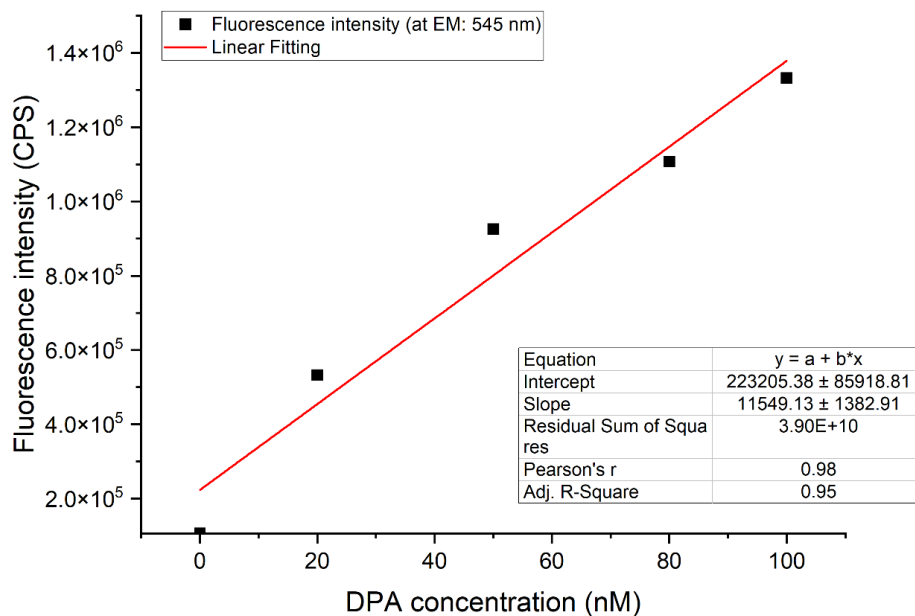


Figure S2: Standard curve for DPA dosage was obtained using the fluorescence intensities of the DPA-Tb³⁺ complex at the excitation wavelength of 280 ± 10 nm, and emission wavelength of $545 \text{ nm} \pm 5$ nm. The fitting function was used to calculate the DPA concentration as a function of the measured complex fluorescence intensity.

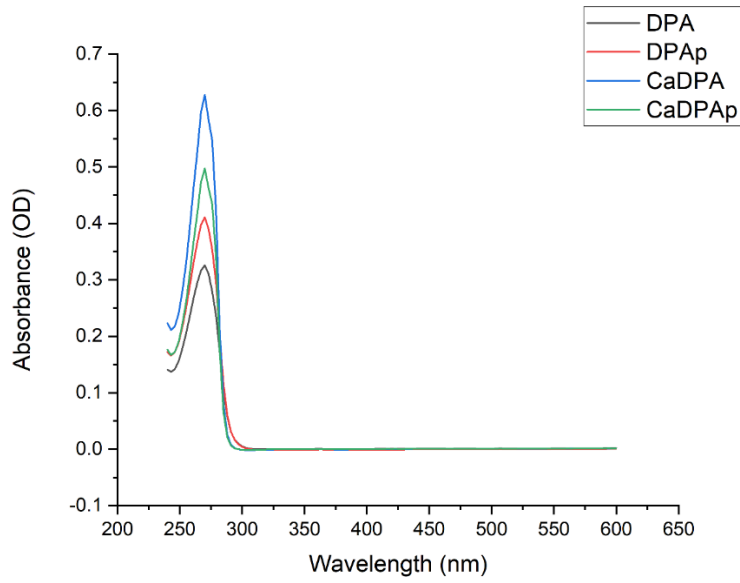


Figure S3: Absorbance spectra for untreated DPA (black line), DPA photoproducts DPAp (blue line), untreated CaDPA (red line) and its photoproducts CaDPAP (green line). The concentration of each sample was 0.1 mM.

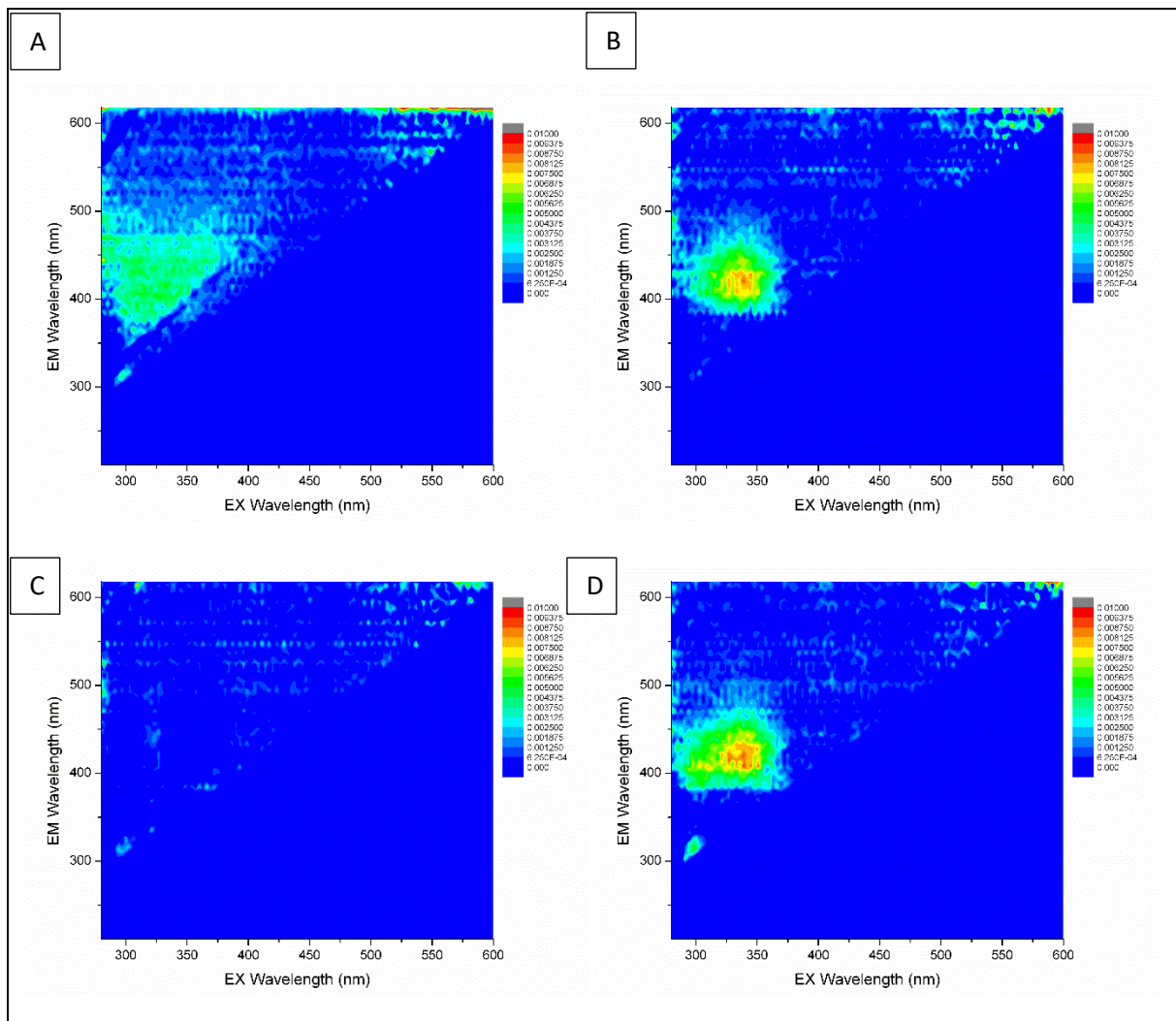


Figure S4: Figure S3 associated EEMF. EEMF of untreated DPA (A), untreated CaDPA (C), DPAP (B) and CaDPAP (D). The concentration of each samples was 0.1 mM. X axis represents the excitation wavelength (nm), Y axis represents the emission wavelength (nm) and Z axis represented the fluorescence intensity (a.u.). Different letters above box plot (a,b) represents significant differences ($p=0.05$) between the time conditions.

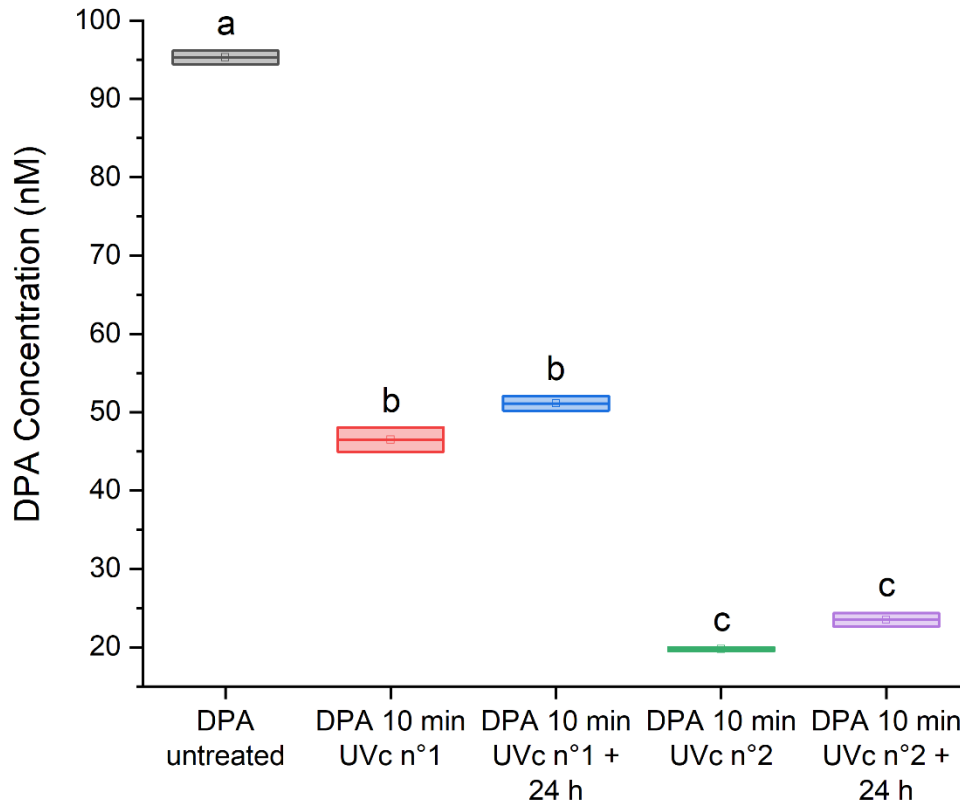


Figure S5: Analysis of variance of DPA concentration (nM) depending on when DPA assay was realized. The DPA was assayed for the first time directly after irradiation then 24 hours later (n°1). The same samples were irradiated again and were assayed directly after this second irradiation and 24 hours later (n°2).

Résultats complémentaires

1. Effet de l'UVc en fonction de l'état d'hydratation

Jusqu'à présent, ce manuscrit présente les résultats d'irradiations en solutions du DPA et du CaDPA. L'état d'hydratation au moment de l'irradiation apparaît cependant comme un paramètre important à étudier. En effet, l'état dans lequel se trouve le CaDPA à l'intérieur de la spore bactérienne est encore mal déterminé. Du fait de la faible hydratation des spores, le CaDPA n'est plus soluble dans la spore mais les études structurales n'ont pas montré d'organisation spécifique de cette molécule qui semble rester à l'état amorphe. L'eau va cependant jouer un rôle dans la mobilité et la réactivité de cette molécule. C'est pourquoi, il nous a semblé intéressant de voir comment la production de photoproduits évolue en fonction de cet état d'hydratation. Pour ce faire, une solution de DPA à 3 g/L a été déposée sur une surface en verre, pour évaporation du solvant. Le dépôt sec a été irradié pendant 1 heure (UVc – 254 nm). Une fois l'irradiation terminée, le dépôt a été resolubilisé dans du méthanol puis injecté directement en spectrométrie de masse. Les intensités des pics détectées sont ajoutées au tableau issu de la publication, voir tableau 5.2.

Ce tableau nous permet de comparer les différences de masses des produits obtenus par une irradiation effectuée en condition liquide et par une irradiation réalisée en condition sèche (cf tableau 5.2). La principale différence entre les deux conditions est l'apparition des composés $C_8H_{20}N$, $C_{11}H_9N_2O_2$, $C_{12}H_{28}NO$, $C_{11}H_9N_2O_3$, $C_{12}H_9N_2O_4$ et $C_{12}H_9N_2O_5$ en condition liquide, absents en condition sèche. Les composés supposés issus de la rupture du cycle aromatique ne semblent donc pas favorisés par la condition sèche. Le composé de masse 186.2217 (m/z) est certes présent et est l'un des composés issus de la rupture du cycle, mais son intensité est très faible et peut-être considéré comme négligeable. On remarque également que seul un des produits issus de la complexation est détectable dans le cas de la condition sèche. L'intensité des pics qui est plus faible en condition sèche, avec quasiment une puissance de différence entre les deux conditions. A la suite de ces résultats, nous pouvons émettre l'hypothèse que la condition peu hydratée semble moins favoriser la diversité de production de photoproduits ou bien ne permet pas la stabilisation des photoproduits néoformés par rapport à la condition liquide.

Tableau 5.2 : Listes des composés majoritaires détectés par spectrométrie de masse, par une injection directe d'une solution de DPA avant et après une exposition aux UVc. Nous avons réalisé des irradiations de 1 heure sur du DPA (3 g/L), pour deux conditions d'irradiations : liquide et sec. m/z représente la masse molaire détectée. Err [ppm] et

mSigma sont des indicateurs représentant la fiabilité des formules brutes proposées. L'intensité des différents pics détectés est indiquée en u.a.. ND : Non Détecté ; NP : Non Proposé ; n/a : aucune réponse possible.

m/z	Err [ppm]	mSigma	Formule brute proposée	Intensité (u.a.)		
				DPA (1 x 10 ⁻² M)	DPA UVc 1 heure (liquide)	DPA UVc 1 heure (sec)
122.0236	0.7	5.8	C ₆ H ₄ NO ₂	5.26 x 10 ⁴	7.26 x 10 ⁴	1.26 x 10 ⁵
124.0392	0.8	3.7	C ₆ H ₆ NO ₂	ND	2.47 x 10 ⁵	1.05 x 10 ⁴
130.1589	0.7	2.5	C ₈ H ₂₀ N	ND	1.14 x 10 ⁵	ND
150.0184	1.2	1.1	C ₇ H ₄ NO ₃	3.10 x 10 ⁵	3.78 x 10 ⁵	7.26 x 10 ⁵
157.0758	1.1	3.6	C ₁₀ H ₉ N ₂	ND	3.33 x 10 ⁵	1.48 x 10 ⁴
168.0290	0.6	1.5	C ₇ H ₆ NO ₄	1.36 x 10 ⁶	1.97 x 10 ⁶	3.31 x 10 ⁶
182.0447	0.2	n/a	C ₈ H ₈ NO ₄	2.28 x 10 ⁴	3.08 x 10 ⁵	3.30 x 10 ⁴
186.2217	-0.3	0.6	C ₁₂ H ₂₈ N	ND	2.39 x 10 ⁶	6.35 x 10 ³
190.0110	-8.2	12.9	C ₄ H ₄ N ₃ O ₆	3.87 x 10 ⁶	1.81 x 10 ⁶	3.65 x 10 ⁵
201.0658	0.5	1.7	C ₁₁ H ₉ N ₂ O ₂	ND	4.71 x 10 ⁵	2.97 x 10 ⁴
202.2165	0.3	12.9	C ₁₂ H ₂₈ NO	ND	4.44 x 10 ⁴	ND
217.0607	0.4	13.5	C ₁₁ H ₉ N ₂ O ₃	ND	7.04 x 10 ⁴	ND
245.0556	0.2	13.3	C ₁₂ H ₉ N ₂ O ₄	ND	8.16 x 10 ⁴	ND
261.0505	0.5	15.2	C ₁₂ H ₉ N ₂ O ₅	ND	8.60 x 10 ⁴	ND
270.5129	NP	NP	NP	ND	5.33 x 10 ⁴	7.33 x 10 ⁴
372.9975	NP	NP	NP	ND	3.19 x 10 ⁵	1.59 x 10 ⁵

Ces informations sont primordiales pour la compréhension de la nature des photoproduits, si l'on souhaite les utiliser comme sondes natives de la spore. D'après les résultats, l'état d'hydratation des spores bactériennes pourrait fortement influencer les photoproduits induits, ce qui peut être gênant pour la transposition entre études réalisées *in vitro* et *in vivo*. Diverses perspectives à cette étude préliminaire seront proposées dans la dernière partie de ce manuscrit.

Chapitre 3 : Etude spectroscopique de l'effet des changements de pH et d'activité de l'eau sur les photoproduits de l'acide dipicolinique et du dipicolinate de calcium

Ce chapitre regroupe les résultats de l'étude des effets de changements de pH et d' a_w sur les DPAP et CaDPAP. Nous avons montré précédemment les effets de l'UVc (254 nm) sur le DPA et le CaDPA. Les photoproduits induits étant mieux définis, cela nous permet de nous intéresser à leurs évolutions en fonction de paramètres physico-chimiques. Cependant, avant de travailler *in vivo* sur des spores bactériennes, il a été nécessaire de définir les variations des propriétés des photoproduits dans des solutions *in vitro*. Nous avons donc étudié l'effet du pH et de l' a_w sur les photoproduits à l'aide des techniques de spectroscopie stationnaire et résolue dans le temps. Les résultats sont présentés et discutés dans l'article « *Spectroscopic study of the effects of pH and water activity on the photoproducts of dipicolinic acid and calcium dipicolinate* » en cours de soumission. Pour conclure ce chapitre, des résultats supplémentaires sont introduits à la suite de l'article. Ces résultats traitent de l'application de la base de données réalisée pour la caractérisation *in vitro* des changements de pH et d' a_w dans les spores bactériennes.

Spectroscopic study of the effects of pH and water activity on the photoproducts of dipicolinic acid and calcium dipicolinate

Maxime Pacheco¹, Pascale Winckler^{1,2}, Christian Coelho³, Jean-Marie Perrier-Cornet^{1,2,*}.

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

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

³ *Université Clermont Auvergne, INRAE, VetAgro Sup campus agronomique de Lempdes, UMR F, 15000 Aurillac, France.*

* Corresponding author.

E-mail address: jean-marie.perrier-cornet@agrosupdijon.fr (J.-M. Perrier-Cornet)

Abstract:

Bacterial spores are the most resistant known life form and are a metabolically dormant state. They are an important cause of food spoilage and food-borne disease. Spores consist of several layers that provide significant resistance to various stresses (heat, radiation, and toxic chemicals). This gives them an exceptional ability to survive for long periods. Moreover, this structure makes *in situ* investigations complicated. The knowledge of acquisition of environmental parameters through spectroscopy is a rapid and simple way to investigate the properties of this resistant microorganism. Our research was directed towards the study of a specific compound of bacterial spores: the dipicolinic acid (DPA), a native biomolecule that can serve as a probe for the local environment. In its native form, DPA is only weakly fluorescent. However, after Ultraviolet irradiation at the wavelength of 254 nm (UVC), DPA photoproducts (DPAp) exhibit a remarkable fluorescence signal. By applying a pH and water activity (a_w) gradient, the fluorescence emission properties of these photoproducts were characterized by their excitation emission matrices of fluorescence (EEMF) and fluorescence lifetimes. The evolution of fluorescence emission of these photoproducts were examined by changing these two physico-chemical parameters involved in bacterial spore's resistance. It was possible to create a database which allowed the determination of photoproducts fluorescence changes as a function of pH and a_w . This database can be use to determine the intracellular physico-chemical parameters of the bacterial spore.

Keywords:

Dipicolinic acid – Native probe – EEMF – Fluorescence lifetime – phasor plot – pH – a_w

1. Introduction

In case of starvation, certain bacteria can start a sporulation process allowing the transformation into a spore. The spore is a dormant form of bacteria consisting of several layers: exosporium, coats, outer membrane, cortex, inner membrane and a core, which provides high resistance to extreme conditions (Nicholson et al., 2000; P. Setlow, 2006). This structure makes investigations difficult, which explains the poor knowledge of the physico-chemistry of the core. For example, pH and water activity inside the spore core have not been easily measured *in vivo*. These parameters play an important role for spore resistance against physical stresses like wet heat resistance or UV resistance. As pathogenic sporulated bacteria cause food spoilage or diseases, proper decontamination procedures are a major concern in the food industry. New insights into the precise internal physico-chemical parameters could lead to the development of improved methods for sterilizing spores in food matrices.

There are two native biomolecules found in the core which are involved in the resistance of spores. Water is the first of these molecules, as H₂O makes up 27-55% of the spore core wet weight depending on the species (Gerhardt & Marquis, 1989; Tiburski et al., 2014; Zhang et al., 2010). The amount of free water in the spore core is extremely low, and this low core water content is the most important factor determining the spore's resistance to wet heat (Gerhardt & Marquis, 1989). Dipicolinic acid (DPA), also named 2,6-pyridinedicarboxylic acid is the second core molecule involved in spore resistance (Paidhungat et al., 2000; B. Setlow et al., 2006; Slieman & Nicholson, 2001). It is a unique constituent present in large quantity in bacterial spores (5-15% of spore dry weight) (Huang et al., 2007), with a concentration above 800 mM and above its solubility limit (Kong et al., 2012). It is located only in the core, and Raman spectroscopy show that it is normally present in equimolar amounts with calcium (Kong et al., 2012). The pH inside the bacterial spore, regardless of its state (dormant or during sporulation), is greater than pH 6 (Magill et al., 1994; B. Setlow & Setlow, 1980). This pH is above the pK_{a3} of DPA (pK_{a1}: 0.49; pK_{a2}: 2.2 and pK_{a3}: 4.6) (Funahashi et al., 1977; Rajan et al., 1978; Tang et al., 1968), which implies that chelation with the calcium ion is possible. It has been suggested that CaDPA is involved in dormancy, spore stability, germination, heat resistance, DNA protection, ultraviolet and gamma irradiation resistance (Paidhungat et al., 2000; B. Setlow et al., 2006).

DPA and CaDPA are only very weakly fluorescent, but it is possible to induce the production of DPA and CaDPA photoproducts (DPAP and CaDPAP) emitting a characteristic

fluorescence signals (Nudelman et al., 2000; Sarasanandarajah et al., 2005). To produce the DPAP and CaDPAP an irradiation treatment at 254 nm is required. This method has already been used for the analysis of bacterial spores (Alimova et al., 2003; Germaine & Murrell, 1974) but very few publications succeeded in determining the characteristics of these photoproducts (Nardi et al., 2021; Noell et al., 2015). A recent study has provided new insights into the production and characterization of unidentified photoproducts (Pacheco et al., 2022). We were able to localize these photoproducts in spores with microscopy and see their changes thanks to their fluorescence lifetimes. However, before probing directly the *in vivo* changes of the physico-chemical parameters inside the spores through the fluorescence of DPAP and CaDPAP, it is necessary to carry out an *in vitro* study concerning the evolution of the fluorescence emission properties of these photoproducts as a function of pH and a_w .

Thus, this paper aims to discuss the effect of pH and a_w on DPAP and CaDPAP, in order to develop a database of the fluorescence characteristics of these photoproducts as function of pH and a_w . It may allow in future studies the determination of the physico-chemical intracellular parameters of the bacterial spore. For that purpose, the fluorescence of these photoproducts was investigated with excitation emission matrices of fluorescence (EEMF) and acquisition of fluorescence lifetimes. The lifetimes were analysed with both bi-exponential fitting and phasor plot representation.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

DPA (Sigma-Aldrich, Germany, 167.12 g/mol, > 98 %) solution (10 mM) was prepared in water and stored at room temperature. The pH was adjusted to 8 with a Tris base buffer (Sigma-Aldrich, Germany, 121 g/mol, > 99.9 %). CaDPA solution (50 mM) was prepared with a 1:1 mix of DPA solution and CaCl₂ (Sigma-Aldrich, Germany, 110.98 g/mol, > 96 %).

For pH and a_w changes experiments, DPAP and CaDPAP solutions were diluted in pH buffers and in NaCl solutions. The buffer solutions, ranging from 0 to 11, were prepared as described by Robinson & Stokes (2002), Stoll & Blanchard (2009). NaCl solutions were prepared at different percentage weight, corresponded to water activities around 0.95, 0.85, 0.75 and 0.65. The water activity were calibrated with a water activity meter, Aqualab® Series 3TE (Decagon Devices, Inc., USA).

2.2. Photolysis conditions

Ultraviolet (UV) corresponds to wavelengths of light between about 100 and 400 nm and are divided into several categories according to their ranges in this spectrum (UVa, UVb and UVc). The wavelength used for the photolysis is 254 nm, which correspond to the UVc. UVc irradiation of DPA and CaDPA solutions was performed in distilled water, by means of a UV irradiation system CROSSLINKER[®] CL-508 (UVItec Ltd, UK) with 5 UVc tubes, for 10 min at 0.120 J/cm².

2.3. Steady state fluorescence

Excitation-Emission Matrices of Fluorescence (EEMF) were acquired on a Horiba Aqualog (Horiba Scientific, Kyoto, Japan) unit by setting the excitation wavelengths from 225 nm to 600 nm (3 nm interval) and the emission wavelengths from 200 to 600 nm (3.22 nm). Each EEMF was corrected daily for Rayleigh scattering and inner filtering and normalized to 1ppm quinine sulphate solution, using the constructor software (Aqualog[®] software, Horiba Scientific, Kyoto, Japan).

2.4. Time resolved fluorescence

Fluorescence decay measurements were performed using time-correlated single-photon counting (TCSPC) with a Horiba Jobin Yvon FluoroMax-4 (Horiba Scientific, Kyoto, Japan). Excitation was generated using a pulsed 280 or 340 nm LED head source (with respectively a pulse duration < 1.2 ns and 1 ns) with a fixed working frequency of 1 MHz. A Ludox[®] solution (Sigma Aldrich, Saint Louis, MI, USA) solution was used to daily calibrate the impulsional response function of the instrument. The fluorescence signal was collected at emission maximum corresponding to: 400 nm (for CaDPAp) and 430 nm (for DPAP). In TCSPC the time difference between each photon detection and the corresponding excitation pulse is measured and stored into a histogram, showing the fluorescence decay after an excitation pulse. A total of 10,000 photons were counted in the peak of each histogram before stopping the acquisition. Histograms were 4096 channels (one channel = 0.0548 ns). The fluorescence decay was analyzed using the conventional exponential decay fitting function by the “DAS6 Analysis” analysis software (Horiba Scientific, Kyoto, Japan) and the phasor plot representation using the MAPI software (IRI, USR 3078 CNRS, BCF, available on request: <http://biophotonique.univ-lille1.fr/spip.php?rubrique60>) (Leray et al., 2013).

2.4.1. Exponential decay fitting

If a uniform population of fluorophores is excited at a single excitation wavelength, the fluorescence intensity decay after an excitation pulse is described by a mono-exponential function, as follows:

$$I(t) = I_0 \cdot e^{-t/\tau} \quad (1)$$

Where $I(t)$ is the fluorescence intensity measured at time t , I_0 is the initial fluorescence intensity and τ is the fluorescence lifetime.

For complex samples, due to different fluorescent subpopulations and different chemical environments, a multi-exponential fitting procedure should be used to estimate as best as possible the number of fluorescent subpopulations contributing to the fluorescence decay curve. Such fitting procedures are validated by a CHISQ close to 1 (Moore et al., 2017).

In this study, we used a double exponential fitting function for all DPAP and CaDPAP fluorescence decays, as follows:

$$I(t) = B_1 \cdot e^{-t/\tau_1} + B_2 \cdot e^{-t/\tau_2} \quad (2)$$

Where B_1 and B_2 are the pre-exponential factor, which were expressed in percentage of presence of a fluorescence lifetime.

2.4.2. Phasor plot representation

The phasor plot is a graphical representation of the raw values of the fluorescence lifetimes obtained by TCSPC in a 2-dimensional vector space by converting the fluorescence decay histograms into (g, s) coordinates, calculated by the cosine and sine transforms of the measured fluorescence intensity decay $I(t)$, defined by:

$$g(\omega) = \frac{\int_0^T I(t) \cdot \cos(\omega t) dt}{\int_0^T I(t) dt} \quad (3)$$

$$s(\omega) = \frac{\int_0^T I(t) \cdot \sin(\omega t) dt}{\int_0^T I(t) dt} \quad (4)$$

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

For a mono-exponential decay, the $[g ; s]$ coordinates are located on a semicircle centred on a point $[0.5; 0]$ with a radius 0.5. Whereas for a multi-exponential decay, the $[g ; s]$ coordinates will no longer be located on the semicircle but rather inside this semicircle. In the semicircle,

the short fluorescence lifetimes were closed to the coordinates [1;0], and the long fluorescence lifetimes approached the origin [0;0]. Fluorescein (fluorescence lifetime: 4.1 ns) was used in the phasor plot representation for calibrating measurements between values obtained by exponential decay fitting and phasor plot analysis.

3. Results & Discussion

3.1. The different forms of DPAP and the influence of calcium ion

As previously described, dipicolinic acid (DPA) has three pKa (pK_{a1} : 0.49; pK_{a2} : 2.2 and pK_{a3} : 4.6), enabling to determine, for a defined pH, the form and/or forms present (Figure 1). For pH values lower than 0.49 the majority form was the completely protonated form ($[DPA^+]$), but there was presence, in smaller proportions, of the neutral form ($[DPA]$). The pH value of 1.3 corresponds to the pH_{i1} between pK_{a1} and pK_{a2} . For this pH value, the neutral form was mostly present, still with the presence of the protonated form, but with the added one deprotonated form (at this value, $[DPA^+]$ and $[DPA^-]$ were equivalent). With the increase in pH up to the value of 3.4 (pH_{i2} , between pK_{a2} and pK_{a3}), the majority form became $[DPA^-]$. The neutral form was still present and there was appearance of the twice deprotonated form, $[DPA^{2-}]$ (at this value, $[DPA]$ and $[DPA^{2-}]$ were equivalent). For pH values higher than 4.6, it is the $[DPA^{2-}]$ form, which was predominant, with a presence of 100 % when the pH exceeded the value of 8.

These figures showed us the effect of pH on the forms present. This information were crucial for the rest of our experiments, and specifically in the study of the DPA salt, the calcium dipicolinate (CaDPA). The presence of this salt was only possible for pH values above 2.2, but would be predominant for pH values greater than 4.6.

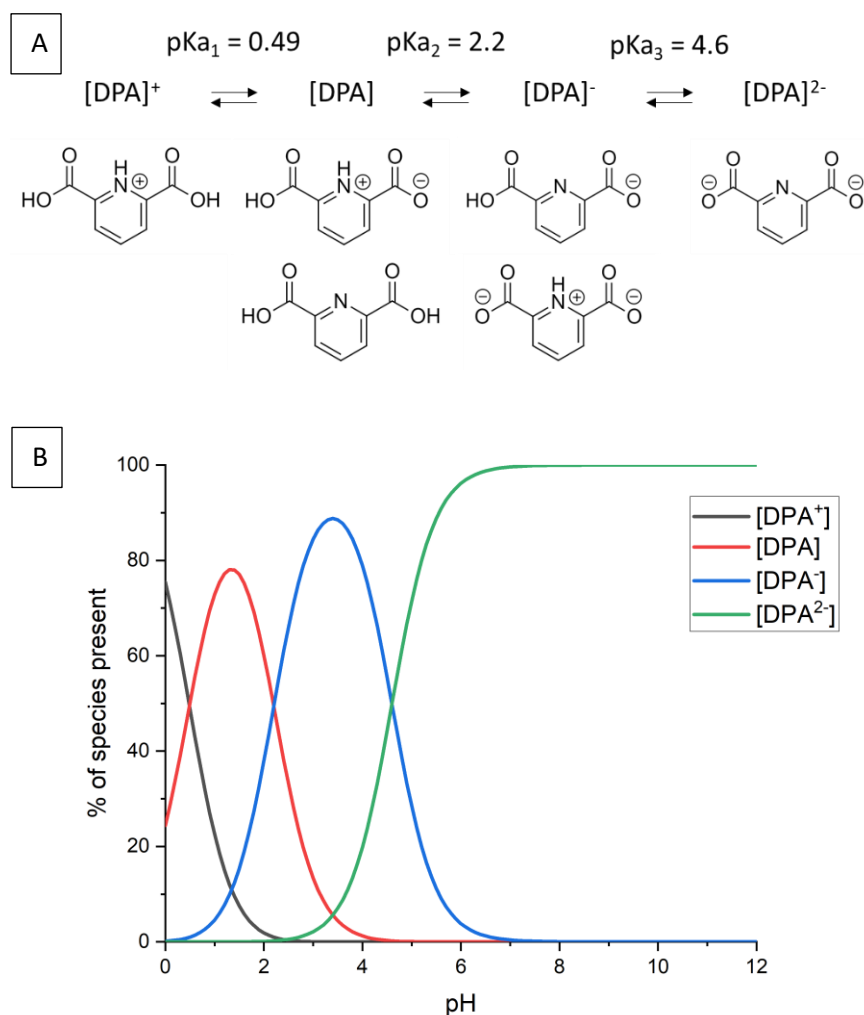


Figure 1: (A) Formula of the major forms of DPA according to its pKa, and (B) the associated dissociation diagram for the different forms of DPA as function of pH.

We had to consider several important parameters in addition to the different forms of DPA. As described above, in order to make DPA fluorescent, we had to perform an ultraviolet irradiation (UVc, 254 nm) at a constant pH. This irradiation changed the chemistry of DPA by producing photoproducts (DPAp). It was important to target the pKa of our precursor, but the pKa of our photoproducts may be different from those presented previously. The fluorescence of the photoproducts may not be impacted in the same way by calcium as the DPA molecule. We established that for a pH value of 8, the photoproducts had different excitation/emission couples (nm) depending on the presence or absence of calcium: 300/400 nm for CaDPAp and 340/430 nm for DPAp (result not shown).

We performed EEMF acquisition of a CaDPAp solution at a pH value of 3, which confirmed that calcium could not chelate these molecules at this pH value (Figure 2). After increasing the

pH to 11, we noticed that the major EX/EM couple became the 300/400 nm couple, which correspond to the CaDPAp. At pH 7, we expected to see no more fluorescence emission for the DPAP couple, as we were supposed to have no more [DPA] form for this pH value. These EEMFs allowed us to observe that it was the chelation with calcium that induced the appearance of another EX/EM couple, at 300/400 nm, since the EMMFs of DPAP did not change as a function of pH and there was only the presence of the EX/EM couple at 340/430 nm (data not shown). It was hypothesized that the DPA photoproducts had higher pKa than those of DPA, from the fact that for pH values higher than 7, there should be only the form [DPA²⁻]. However, we found the presence of the couple corresponding to DPAP, which could be explained by a change of the pKa.

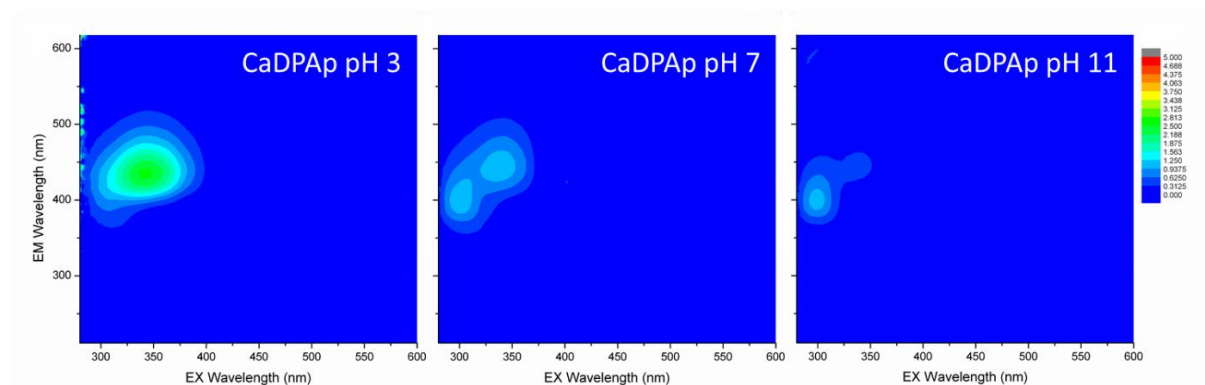


Figure 2: EEMF of CaDPAP (50 mM with irradiation condition set at λ_{ex} : 254 nm, 10 min at 0.120 J/cm²), as function of pH. The same intensity (a.u.) scale was used for all spectra.

3.2. Effect of pH on photoproducts

We performed a study on the changes in fluorescence lifetimes of DPAP and CaDPAP as a function of pH, using two exponential fitting (Table 1). We considered the different forms of DPA to achieve a proper pH ranging from 0 to 11. The high CHISQ were probably due to the low fluorescence intensity, which resulted in difficulty in acquiring the fluorescence decay histograms and affected the fitting. For DPAP and CaDPAP we found the same trend with increasing pH between pH 0 and 3.4. For pH 0, we had a short lifetime about 2.8-3.6 ns with a proportion of 28-34 %. For pH 1.3 and 3.4, there was the presence of a short lifetime around 0.8 ns predominating with a presence between 56 and 72 %. The long lifetimes for these pH were 3.7-4.2 ns for DPAP (35-43 %) and slightly higher for CaDPAP, between 4.6 and 4.9 ns (27-37 %). For this pH, we should have found the same values of lifetimes since only [DPA] should be present. The differences in lifetimes could be explained by the high CHISQ values.

For pH above 5, in the case of DPAP, the long lifetime around 4.3-4.7 ns became predominant (60-78 %) and the short lifetime was around 2.3-2.9 ns (21-39 %). For the CaDPAP, the two lifetimes were almost equivalent, with a short lifetime around 0.4-0.6 ns and a long lifetime around 4.1-4.2 ns. It is probable that the lifetimes as well as the proportions evolved slightly because for these pH ranges, $[DPA^{2-}]$ should be the majority form. The small changes from pH 5 to 7 could be due to a small percentage of $[DPA^-]$ and perhaps $[DPA]$ still being present and declining as the pH increased.

These changes in lifetimes could potentially be useful in determining the different forms of DPA. Increasing pH showed the trend of lifetimes values going higher and stagnating after pH 5. Moreover, it could be considered to differentiate the lifetimes between DPAP and CaDPAP for pH higher than 5, where the short lifetimes and the proportions of lifetimes were largely different between the two molecules.

Table 1: Fluorescence lifetimes obtained for DPA and CaDPA after irradiation (0.120 J/cm^2 for 10 min) as function of pH (from 0 to 11). τ_1 and τ_2 were the fluorescence lifetimes (ns), B_1 and B_2 were the pre-exponential factor (%) and CHISQ the factor that allowed to validate the fitting.

	<i>pH</i>	τ_1 (ns)	τ_2 (ns)	B_1 (%)	B_2 (%)	CHISQ
<i>DPAP</i>	0	1.4	3.6	71.8	28.2	2.6
	1.3	0.8	3.7	64.4	35.6	1.8
	3.4	0.8	4.2	56.1	43.9	1.9
	5	2.4	4.4	25.8	74.2	1.0
	7	2.3	4.3	21.3	78.7	1.0
	9	2.9	4.6	39.6	60.4	1.1
	11	2.8	4.7	37.7	62.3	1.1
<i>CaDPAP</i>	0	1.1	2.8	65.8	34.2	1.4
	1.3	0.8	4.9	72.5	27.5	1.9
	3.4	0.7	4.6	62.6	37.4	1.7
	5	0.6	4.2	38.5	61.5	1.4
	7	0.4	4.2	46.8	53.2	1.1
	9	0.4	4.2	50.2	49.8	1.1
	11	0.4	4.1	47.3	52.7	1.0

In addition to the bi-exponential fitting, the same samples were analyzed using the phasor plot representation (Figure 3). It was noticed that the position of the lifetimes was in agreement with the lifetimes values found using the bi-exponential fitting and that the lifetimes shifted to longer values with increasing pH. The only difference was that DPAP lifetimes between pH 5

and 11 were on the semicircle, which meant that these fluorescence decays were mono exponential despite we found two lifetimes with non-negligible proportion (20-40%) for the shorter lifetime and a good confident chi-square test values (1-1.1) for this pH range were obtained with exponential fitting.

As shown on phasor diagram (Figure 3), there was a clear effect of pH on fluorescence lifetimes of DPAP and CaDPAP. The presence of calcium ions appeared to decrease all observed lifetimes for DPAP (around 0.25 ns at pH 0, and 1 ns at pH 11) but the plot remained similar. Increasing pH led to an increase of fluorescence lifetimes (increase of s values and decrease of g values) and a position closer to the semi-circle of the phasor for low and high pH. This proximity to the phasor semi-circle was greater for DPAP than CaDPAP at pH above 5.

The first three pH values (pH 0, 1.3 and 3.4) led to three distinct positions in phasor diagram while higher pH values were almost clustered. Although the physico-chemistry of DPA and CaDPA was unrelated to their photoproducts, this distinction in pH points was compatible with acid/base equilibrium of DPA and CaDPA (Figure 1). Three first pH values (pH 0, 1.3 and 3.4) exhibited different forms of DPA (respectively $[DPA^+]$, $[DPA]$ and $[DPA^-]$), whereas with higher pH values, a single form was predominant, $[DPA^{2-}]$. To explain this relationship, native DPA were still present even after irradiation and could modulate DPAP fluorescence lifetimes or DPAP had a similar pKa to DPA.

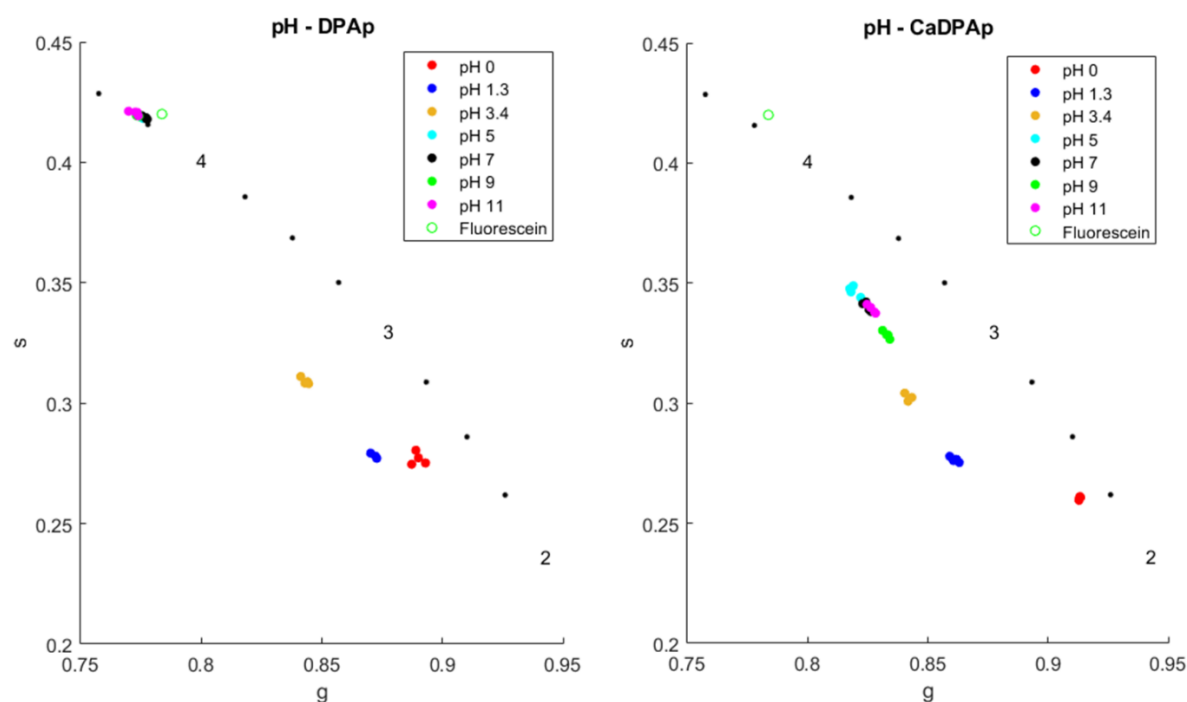


Figure 3: Phasor plot image of DPAP and CaDPAP solutions ($N=4$) as function of pH (from 0 to 11). Emission wavelength was set at 400 nm for CaDPAP and 430 nm for DPAP, for a fixed excitation at 300 nm for CaDPAP and 340 nm for DPAP.

3.3. Effect of a_w on photoproducts

Effect of a_w has been obtained in increasing NaCl concentration in a solution at constant pH. The variation of the DPAP and CaDPAP fluorescence lifetimes, were shown in Table 2. In this table, a bi-exponential fitting has been used as for pH changes. The fluorescence lifetimes of DPAP and CaDPAP remained almost constant except with pure water, which led to a slight increase of the longer lifetimes (τ_2), and increased from 3.7 to 5.2 ns for DPAP and from 4.2 to 5.4 ns for CaDPAP. There was a slight decrease of the long lifetimes proportion (B_2) from 40% to 25% for DPAP and from 53% to 28% for CaDPAP, with an equivalent increase in the proportion of short lifetimes (B_1). These variations led to a reduction in global lifetime with decreasing water activity.

Table 2: Fluorescence lifetime obtained for DPA and CaDPA after irradiation (0.120 J/cm^2 for 10 min) as a function of solvent a_w (from 1.000 to about 0.650, at pH 1.3 for DPAP and 7 for CaDPAP). τ_1 and τ_2 were the fluorescence lifetimes (ns), B_1 and B_2 were the pre-exponential factor (%) and CHISQ the factor that allowed to validate the fitting.

	a_w	τ_1 (ns)	τ_2 (ns)	B_1 (%)	B_2 (%)	CHISQ
<i>DPAP</i>	1.000	0.8	3.7	64.4	35.6	1.8
	0.956	0.6	5.2	60.5	39.5	1.4
	0.875	0.7	5.1	66.9	33.1	1.1
	0.755	0.8	5.2	71.6	28.4	1.1
	0.653	0.9	5.3	74.6	25.4	1.1
<i>CaDPAP</i>	1.000	0.4	4.2	46.8	53.2	1.1
	0.958	0.6	5.4	57.8	42.2	1.9
	0.825	0.8	5.6	64.9	35.1	1.6
	0.771	0.8	5.7	70.8	29.2	1.4
	0.672	0.9	5.6	71.4	28.6	1.4

The same samples were also analyzed by phasor plot (Figure 4). The lifetimes observed for both molecules were consistent with the results obtained in bi-exponential fitting. As shown, on bi-exponential results (Table 2), pure water points (a_w of 1.000) had a specific position for DPAP and CaDPAP. For the other values, we observed a decrease of fluorescence lifetimes with decreasing water activity. This decrease in lifetime was also correlated with a decrease in

its distance from the phasor semi-circle. Furthermore, the data points were well aligned. For the representation of the DPAP lifetimes, we noticed that they were longer after the decrease of a_w . In the case of CaDPAP, the increase in long lifetimes was visualized by a shift to multi-exponential lifetimes. Indeed, the fluorescence lifetimes inside the semi-circle are multi-exponential, while the values on the semi-circle are mono-exponential. The decrease in a_w decreased the lifetimes, but the DPAP or CaDPAP lifetimes did not move toward mono-exponential lifetimes. As previously reported, it was noticed that a decrease of the a_w leads to a decrease of the fluorescence lifetimes.

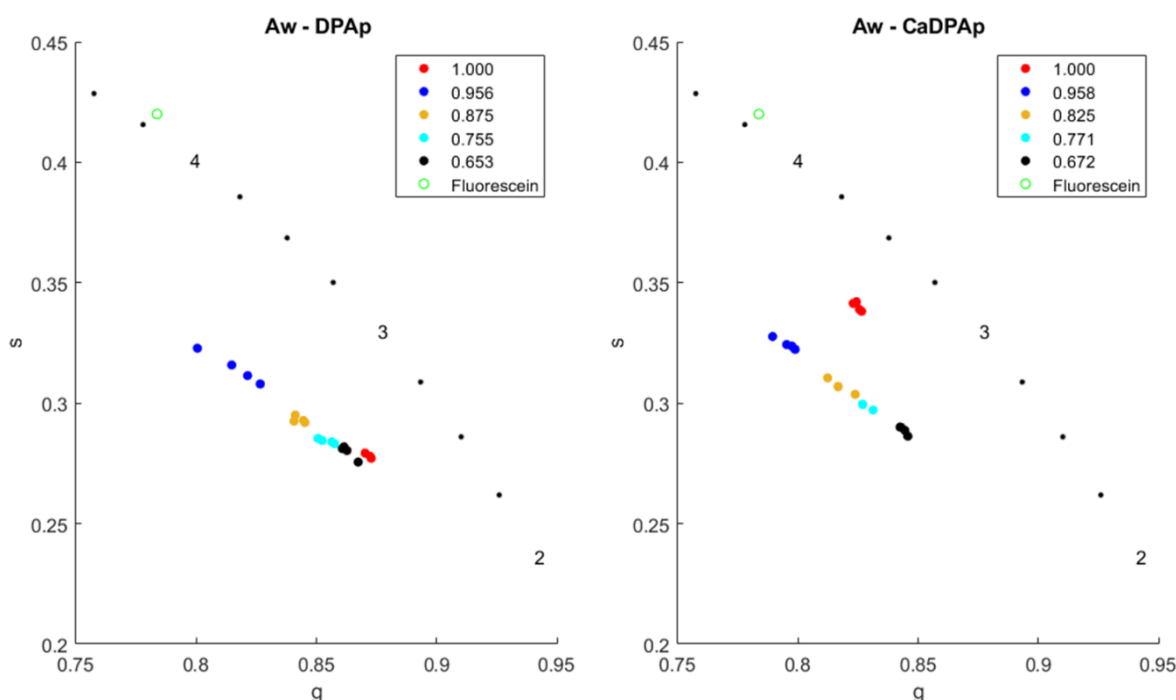


Figure 4: Phasor plot image of DPAP and CaDPAP solutions ($N=4$) as function of solvent a_w (from 1.000 to about 0.650, at pH 1.3 for DPAP and 7 for CaDPAP). Emission wavelength was set at 400 nm for CaDPAP and 430 nm for DPAP, for a fixed excitation at 300 nm for CaDPAP and 340 nm for DPAP.

This study was only performed with NaCl as a_w depressor and such shift in fluorescence lifetimes could be due to specific interaction between NaCl and fluorescent DPAP that could explain the specific fluorescence of pure water (A_w of 1.000). The addition of NaCl also increased viscosity of aqueous solution, and we know that solvent viscosity can also participate in fluorescence lifetimes. This change could also be explained by an increase in pH. Indeed, when the DPA solution was added to the salt solution at pH 1.3, the buffering capacity of the tris base buffer used to dissolve the DPA must have been greater than that of the salt solution and must have slightly increased the pH. Further experiment with other solutes could show whether

the observed effect depended on the water activity or other parameters (viscosity, temperature...).

4. Conclusions

In conclusion, this study shows that the fluorescence of DPA and CaDPA photoproducts do not evolve in the same way with pH and a_w . The pKa of the DPAP should be different from those of DPA, as suggested by the presence of the EX/EM couples as those of DPA at pH value where it should not be present (pH 7). Calcium and chelation with $[DPA^{2-}]$ seems to be well implicated in the EX/EM shift between DPAP (340/430 nm) and CaDPAP (300/400 nm). An increase of pH induce an increase of the fluorescence lifetimes towards longer lifetimes. For pH values above 5, the long lifetime stabilizes slightly above 4 ns with a proportion of 60-70 % for DPAP and 50-60 % for CaDPAP. A visual distinction of fluorescence lifetimes between DPAP and CaDPAP is possible with the phasor plot, for pH values above 5. A decrease of the a_w will lead to a decrease of the lifetimes, especially because the proportion of short lifetimes around 0.8 ns increases as the a_w decreases. The evolution of these lifetimes may be used to evaluate the changes of intracellular physico-chemical parameters of bacterial spore.

Acknowledgement

The authors acknowledge the “Région Bourgogne Franche-Comté” for its funding. We also thank Dr. Ambroise Marin for his help on the development of the phasor plot analysis tool.

References

- Alimova, A., Katz, A., Savage, H. E., Shah, M., Minko, G., Will, D. V., Rosen, R. B., McCormick, S. A., & Alfano, R. R. (2003). Native fluorescence and excitation spectroscopic changes in *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus* bacteria subjected to conditions of starvation. *Applied Optics*, *42*(19), 4080. <https://doi.org/10.1364/AO.42.004080>
- Funahashi, Shigenobu., Haraguchi, Kensaku., & Tanaka, Motoharu. (1977). Reactions of hydrogen peroxide with metal complexes. 2. Kinetic studies on the peroxo complex formation of nitrilotriacetatodioxovanadate(V) and dioxo(2,6-pyridinedicarboxylato)vanadate(V). *Inorganic Chemistry*, *16*(6), 1349-1353. <https://doi.org/10.1021/ic50172a019>
- Gerhardt, P., & Marquis, R. E. (1989). Spore Thermoresistance Mechanisms. *Slepecky, R.A. and Setlow, P., Eds., Regulation of Prokaryotic Development, American Society for Microbiology, Washington DC*, 43-63.

- Germaine, G. R., & Murrell, W. G. (1974). Use of Ultraviolet Radiation to Locate Dipicolinic Acid in *Bacillus cereus* Spores. *Journal of Bacteriology*, *118*(1), 202-208. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC246658/>
- Huang, S., Chen, D., Pelczar, P. L., Vepachedu, V. R., Setlow, P., & Li, Y. (2007). Levels of Ca²⁺-Dipicolinic Acid in Individual *Bacillus* Spores Determined Using Microfluidic Raman Tweezers. *Journal of Bacteriology*, *189*(13), 4681-4687. <https://doi.org/10.1128/JB.00282-07>
- Kong, L., Setlow, P., & Li, Y. (2012). Analysis of the Raman spectra of Ca²⁺-dipicolinic acid alone and in the bacterial spore core in both aqueous and dehydrated environments. *The Analyst*, *137*(16), 3683. <https://doi.org/10.1039/c2an35468c>
- Leray, A., Padilla-Parra, S., Roul, J., Héliot, L., & Tramier, M. (2013). 827Spatio-Temporal Quantification of FRET in Living Cells by Fast Time-Domain FLIM: A Comparative Study of Non-Fitting Methods. *PLoS ONE*, *8*(7), e69335. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069335>
- Magill, N. G., Cowan, A. E., Koppel, D. E., & Setlow, P. (1994). The internal pH of the forespore compartment of *Bacillus megaterium* decreases by about 1 pH unit during sporulation. *Journal of Bacteriology*, *176*(8), 2252-2258. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC205346/>
- Moore, D. S., McCabe, G. P., & Craig, B. A. (2017). *Introduction to the Practice of Statistics* (9th éd.).
- Nardi, G., Lineros-Rosa, M., Palumbo, F., Miranda, M. A., & Lhiaubet-Vallet, V. (2021). Spectroscopic characterization of dipicolinic acid and its photoproducts as thymine photosensitizers. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, *245*, 118898. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2020.118898>
- Nguyen Thi Minh, H., Perrier-Cornet, J.-M., & Gervais, P. (2008). Effect of the osmotic conditions during sporulation on the subsequent resistance of bacterial spores. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *80*(1), 107. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1519-x>
- Nicholson, W. L., Munakata, N., Horneck, G., Melosh, H. J., & Setlow, P. (2000). Resistance of *Bacillus* Endospores to Extreme Terrestrial and Extraterrestrial Environments. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *64*(3), 548-572. <https://doi.org/10.1128/MMBR.64.3.548-572.2000>
- Noell, A. C., Ely, T., Bolser, D. K., Darrach, H., Hodyss, R., Johnson, P. V., Hein, J. D., & Ponce, A. (2015). Spectroscopy and Viability of *Bacillus subtilis* Spores after Ultraviolet Irradiation: Implications for the Detection of Potential Bacterial Life on Europa. *Astrobiology*, *15*(1), 20-31. <https://doi.org/10.1089/ast.2014.1169>
- Nudelman, R., Bronk, B. V., & Efrima, S. (2000). Fluorescence Emission Derived from Dipicolinic Acid, its Sodium, and its Calcium Salts. *Applied Spectroscopy*, *54*(3), 445-449. <https://doi.org/10.1366/0003702001949564>
- Pacheco, M., Dikec, J., Winckler, P., Coelho, C., & Perrier-Cornet, J.-M. (2022). Spectroscopic and microscopic characterization of dipicolinic acid and its salt photoproducts – A UVC effect study on DPA in solution and in bacterial spores. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, *280*, 121502. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2022.121502>
- Paidhungat, M., Setlow, B., Driks, A., & Setlow, P. (2000). Characterization of Spores of *Bacillus subtilis* Which Lack Dipicolinic Acid. *Journal of Bacteriology*, *182*(19), 5505-5512. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC110995/>
- Rajan, K. S., Jaw, R., & Grecz, N. (1978). Role of Chelation and Water Binding of Calcium in Dormancy and Heat Resistance of Bacterial Endospores. *Bioinorganic Chemistry*, *8*(6), 477-491. [https://doi.org/10.1016/0006-3061\(78\)80002-7](https://doi.org/10.1016/0006-3061(78)80002-7)
- Robinson, R. A., & Stokes, R. H. (2002). *Electrolyte Solutions: Second Revised Edition*. Courier Corporation.
- Sarasananandarajah, S., Kunnil, J., Bronk, B. V., & Reinisch, L. (2005). Two-dimensional multiwavelength fluorescence spectra of dipicolinic acid and calcium dipicolinate. *Applied Optics*, *44*(7), 1182. <https://doi.org/10.1364/AO.44.001182>
- Setlow, B., Atluri, S., Kitchel, R., Koziol-Dube, K., & Setlow, P. (2006). Role of Dipicolinic Acid in Resistance and Stability of Spores of *Bacillus subtilis* with or without DNA-Protective α/β -Type Small Acid-Soluble Proteins. *Journal of Bacteriology*, *188*(11), 3740-3747. <https://doi.org/10.1128/JB.00212-06>

- Setlow, B., & Setlow, P. (1980). Measurements of the pH within dormant and germinated bacterial spores. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 77(5), 2474-2476. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC349422/>
- Setlow, P. (2006). Spores of *Bacillus subtilis*: Their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals. *Journal of Applied Microbiology*, 101(3), 514-525. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02736.x>
- Slieman, T. A., & Nicholson, W. L. (2001). Role of Dipicolinic Acid in Survival of *Bacillus subtilis* Spores Exposed to Artificial and Solar UV Radiation. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(3), 1274-1279. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.3.1274-1279.2001>
- Stoll, V. S., & Blanchard, J. S. (2009). Chapter 6 Buffers. In *Methods in Enzymology* (Vol. 463, p. 43-56). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(09\)63006-8](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(09)63006-8)
- Tang, T., Rajan, K. S., & Grecz, N. (1968). Mixed Chelates of Ca(II)-Pyridine-2,6-Dicarboxylate with Some Amino Acids Related to Bacterial Spores. *Biophysical Journal*, 8(12), 1458-1474. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1367448/>
- Tiburski, J. H., Rosenthal, A., Guyot, S., Perrier-Cornet, J.-M., & Gervais, P. (2014). Water Distribution in Bacterial Spores: A Key Factor in Heat Resistance. *Food Biophysics*, 9(1), 10-19. <https://doi.org/10.1007/s11483-013-9312-5>
- Zhang, P., Kong, L., Setlow, P., & Li, Y. (2010). Characterization of Wet-Heat Inactivation of Single Spores of *Bacillus* Species by Dual-Trap Raman Spectroscopy and Elastic Light Scattering. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(6), 1796-1805. <https://doi.org/10.1128/AEM.02851-09>

Résultats supplémentaires

A la suite de nos expériences *in vitro*, nous avons entamé les prémisses de l'étude *in vivo*. Pour pouvoir observer *in vivo*, dans la spore, des changements de temps de vie dus à des changements de pH ou d' a_w , il était déjà nécessaire de pouvoir modifier ces paramètres au sein même de la spore. Dans ce but, nous avons fait varier le pH et l' a_w du milieu de culture des différentes souches avant sporulation. En effet, bien que la bactérie cherche à maintenir des conditions physico-chimiques internes idéales, il est probable que ces constantes puissent légèrement évoluer en fonctions des conditions externes, au moins pour l' a_w . La modification du pH externe de sporulation n'est pas censée modifier le pH interne (B. Setlow & Setlow, 1980) mais uniquement la minéralisation de la spore (Bender & Marquis, 1985). Les trois souches étudiées, sont celles déjà utilisées lors des publications précédentes : la souche PS533 qui est notre souche sauvage, la souche PS4150 qui est une souche mutante dépourvue de manteau et la souche FB122 qui est une souche mutante dépourvue de DPA (il reste environ 5 % de DPA dans le protoplasme). Nous avons fait varier le pH du milieu de culture entre pH 6 et 8 à l'aide d'acide ou de base, ainsi que l' a_w entre 0,99 et 0,95 à l'aide de sels (NaCl). Le changement en activité de l'eau augmente le temps de culture nécessaire à l'obtention d'une concentration de spores suffisante et ce paramètre ne peut pas être descendu en dessous d'un seuil (a_w de 0,95) (Nguyen Thi Minh et al., 2011). En effet, le processus de sporulation semble s'initier lorsque l'on se trouve sous cette valeur et le peu de cellules présentes lors de l'inoculation (issues de la pré-culture) meurent peu de temps après. Inversement, le pH ne semble pas perturber la croissance des spores et la quantité de spores varie peu entre les cultures à différents pH.

1. Etudes des changements de pH dans les spores bactériennes

Comme présenté précédemment, nous avons travaillé sur des spores bactériennes issues de différents milieux de culture ajustés à un pH variant de 6 à 8. Nous avons observé ces spores bactériennes en microscopie multiphoton et acquis les temps de vie de fluorescence en FLIM. Ces images de temps de vie ont été analysées *via* phasor plot (logiciel MAPI), et plus spécifiquement en représentant les contours des « tâches » obtenus par MAPI, voir figure 5.6. Les déplacements dus à l'irradiation ont déjà été observés dans la publication du chapitre 2. La souche PS533 est celle dont le déplacement sur le phasor plot est le plus significatif et la souche PS4150 se démarque des autres avec un temps de vie supérieur potentiellement dû à

l'absence de manteau. La souche FB122 nous sert de contrôle et ne se déplace que très peu après traitement.

Ces observations sont en accord avec les résultats présentés précédemment. Cependant, le but de cette étude est de différencier les photoproduits des spores en fonction du pH. Les résultats présentés ci-dessous montrent que le pH externe du milieu de culture ne semble pas avoir d'effets significatifs sur les temps de vie des photoproduits ce qui est cohérent avec la littérature. Les seuls changements de temps de vie dus au pH de sporulation sont visibles pour la souche FB122, et ne peuvent pas être imputables aux photoproduits. L'hypothèse la plus probable est que le changement de pH des milieux de cultures n'était pas assez important pour influencer le pH intracellulaire des spores.

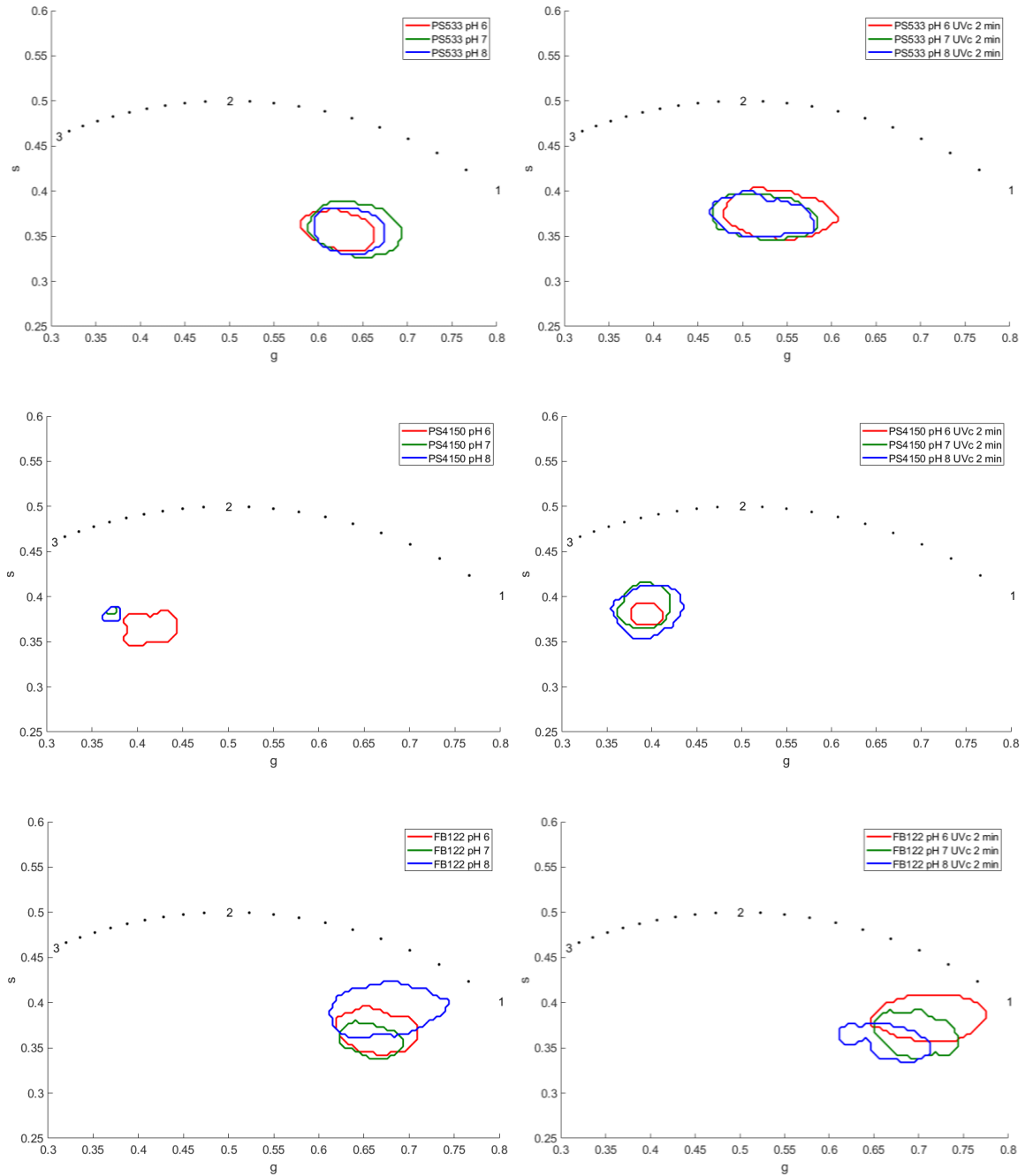


Figure 5.6 : Représentation phasor plot des contours des "tâches" obtenus via le logiciel MAPI pour différentes souches de spores bactériennes en fonction du pH du milieu de culture, avant et après irradiation de 2 minutes à 0.120 J/cm^2 . Longueur d'onde du laser pour le FLIM en microscopie multiphotonique : 710 nm . PS533 : souche sauvage ; PS4150 : souche dépourvue de manteau ; FB122 : souche dépourvue de DPA (environ 5 % de DPA).

Lorsque l'on s'intéresse aux temps de vie moyen issus des analyses *via* le logiciel MAPI, on ne remarque pas non plus d'évolution significative en fonction du pH, voir tableau 5.3. En effet, les temps de vie moyens stagnent autour de 1,85 ns pour les spores issues de la souche PS533, autour de 2,65 ns pour ceux de PS4150 et autour de 1,4 - 1,5 ns pour ceux de FB122. Nos

résultats ne nous permettent donc pas de différencier les temps de vie des photoproduits en fonction du pH. D'autres investigations seront nécessaires pour mettre au point un moyen d'induire des changements de pH intracellulaire plus conséquents et ainsi espérer détecter des différences de temps de vie de fluorescence.

Tableau 5.3 : Temps de vie moyens (ns) après irradiation de 2 minutes à 0.120 J/cm^2 obtenus par la représentation phasor plot dans la Figure 1. PS533 : souche sauvage ; PS4150 : souche dépourvue de manteau ; FB122 : souche dépourvue de DPA (environ 5 % de DPA).

<i>Souches</i>	τ (pH 6) (ns)	τ (pH 7) (ns)	τ (pH 8) (ns)
<i>PS533</i>	$1,70 \pm 0,14$	$1,56 \pm 0,16$	$1,62 \pm 0,15$
<i>PS533 (UVc 2 min)</i>	$1,80 \pm 0,19$	$1,85 \pm 0,19$	$1,88 \pm 0,19$
<i>PS4150</i>	$2,61 \pm 0,28$	$3,14 \pm 0,43$	$2,85 \pm 0,32$
<i>PS4150 (UVc 2 min)</i>	$2,69 \pm 0,28$	$2,75 \pm 0,25$	$2,62 \pm 0,15$
<i>FB122</i>	$1,48 \pm 0,14$	$1,48 \pm 0,14$	$1,69 \pm 0,15$
<i>FB122 (UVc 2 min)</i>	$1,44 \pm 0,19$	$1,43 \pm 0,16$	$1,58 \pm 0,17$

2. Etude des changements d' a_w dans les spores bactériennes

Comme indiqué précédemment, nous avons fait varier l'activité de l'eau du milieu de sporulation pour nos trois souches de spores. L'objectif était de modifier ainsi l'activité de l'eau du protoplasme intracellulaire. Le temps de culture a été alors beaucoup plus long pour toutes les souches utilisées et ces changements ne permettaient pas à la souche PS4150 de sporuler. Une diminution de l'activité de l'eau entraîne un changement de la morphologie en diminuant la taille des spores (Nguyen Thi Minh et al., 2008). La souche PS4150 est une souche mutante dépourvue de manteau, et les spores produites sont déjà de plus petites tailles que les spores issues de souche sauvage. Il est envisageable que l'absence de manteau combinée à une faible activité de l'eau favorise la dégradation des pré-spores et les empêche d'arriver à l'état de spore. Aucune donnée concernant la souche PS4150 n'a donc pu être obtenue.

Nous avons donc focalisé nos investigations sur les autres souches, PS533 et FB122. L'évolution des temps de vie de fluorescence en fonction de l' a_w est donnée dans la figure 5.7. Avant traitement UVc, on remarque chez nos deux souches un déplacement des temps de vie de l'autofluorescence vers des valeurs plus élevées, avec un effet principalement présent pour les valeurs d' a_w de 0,95. De plus, en observant les intensités de fluorescence de ces différentes souches (Figure 5.8), on constate que les intensités de fluorescence de l'autofluorescence (donc du manteau) diminuent avec la baisse de l'activité de l'eau. On a donc à faible a_w une

modification du manteau qui entraîne une diminution de ses propriétés de fluorescence et une augmentation du temps de vie de fluorescence.

Après une irradiation aux UVc de 2 minutes, les temps de vie de la souche FB122 (dépourvue de DPA) s'allongent pour les souches sporulées à faible a_w contrairement aux souches sporulées dans le milieu classique, dont les temps de vie de fluorescence ne se déplacent pas. Ceci signifie que la sporulation à basse a_w conduit à la formation d'un manteau différent (moins fluorescent et possédant des temps de vie plus longs). D'autre part, ce manteau semble plus sensible aux UVc contrairement aux souches préparées dans un milieu à l' a_w de 0,99. Il est notable que l' a_w intermédiaire 0,97 conduit à une mesure intermédiaire aussi bien en intensité de fluorescence qu'en temps de vie de fluorescence.

Pour les spores de la souche PS533, qui possèdent du DPA, on compare les résultats obtenus avec ceux des mutants FB122 pour les mêmes conditions. On observe avant irradiation des résultats comparables, ce qui est logique car le DPA ne fluorescence pas à son état naturel. Par contre, lorsque l'on irradie les spores, les comportements diffèrent suivant l' a_w de la sporulation. Quel que soit l' a_w de sporulation, l'irradiation des PS533 par rapport au FB122 conduit à un déplacement des temps de vie vers des temps de vie plus longs, qui proviennent essentiellement de la fluorescence des DPAP. Les phasor plot permettent d'apercevoir que le déplacement des spores à faible a_w de sporulation se déplacent moins vers les temps longs après irradiation et que les 3 contours sont beaucoup plus espacés pour la souche FB122 par rapport à la souche PS533 où elles sont très proches. Pourtant du faible de la faible intensité de fluorescence du manteau et de son temps de vie plus long pour les spores sporulées à faible a_w , nous devrions avoir une contribution plus importante des DPAP et donc un temps de vie nettement plus long. La contribution de la fluorescence des DPAP est plus faible pour les basses a_w . Deux hypothèses pourraient expliquer ce phénomène :

- Le DPA est moins concentré dans les spores à faibles a_w ou les photoproduits créés dans ces spores sont moins nombreux pour la même irradiation.
- Les DPAP ont un temps de vie plus faible du fait de l' a_w interne de la spore.

Nous n'avons actuellement aucun élément de réponses concernant ces hypothèses. Ces résultats montrent que les travaux *in vitro* ne peuvent être appliqués que si les DPAP sont les seules molécules fluorescentes. La souche PS4150 aurait pu apporter une réponse plus précise car la fluorescence du manteau initiale est bien plus faible. Malheureusement ces spores n'ont pas pu sporuler dans des milieux à a_w réduite.

Cependant, les temps de vie de fluorescence et la formation de DPAp peuvent apporter des éléments importants, voire indispensables, à la connaissance des spores de *Bacillus* et de leurs mutants.

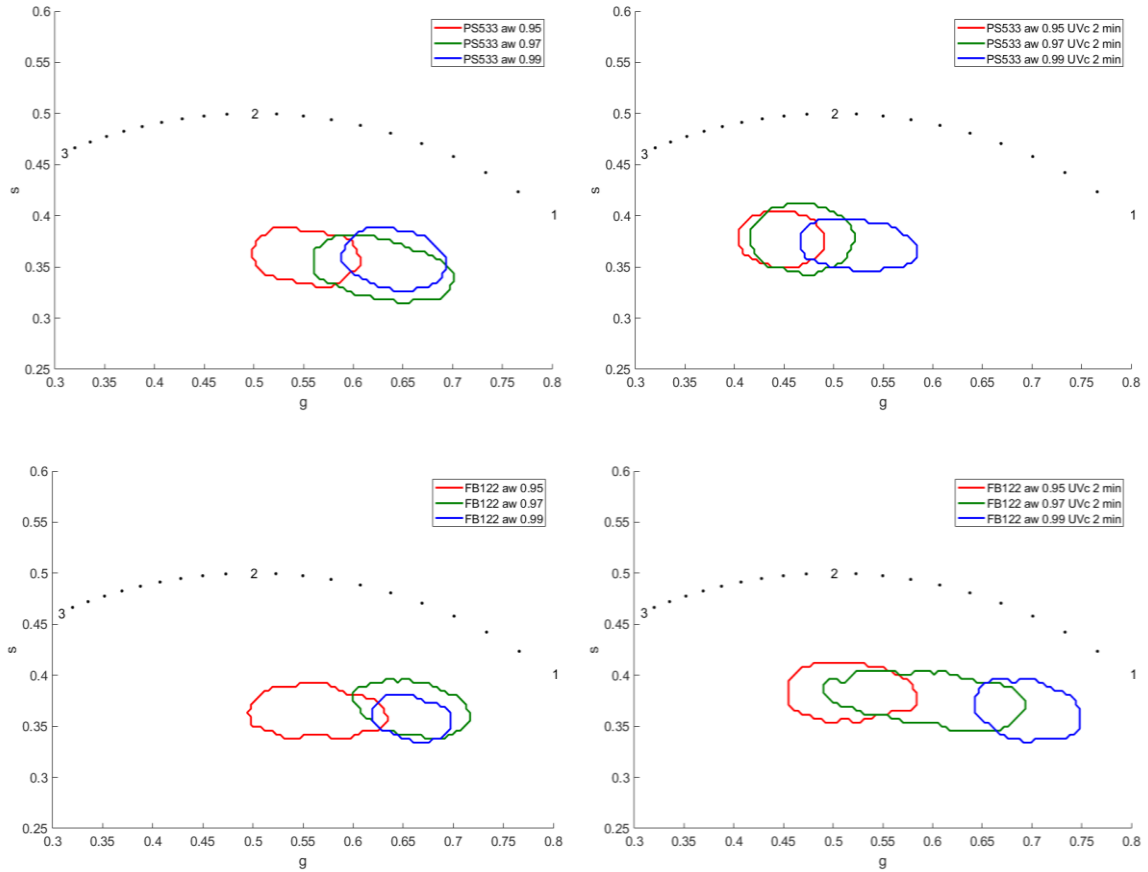


Figure 5.7 : Représentation phasor plot des contours des "tâches" obtenus via le logiciel MAPI pour différentes souches de spores bactériennes en fonction de l' a_w du milieu de culture, avant et après irradiation de 2 minutes à 0.120 J/cm^2 . Longueur d'onde du laser : 710 nm. PS533 : souche sauvage ; FB122 : souche dépourvue de DPA (environ 5 % de DPA).

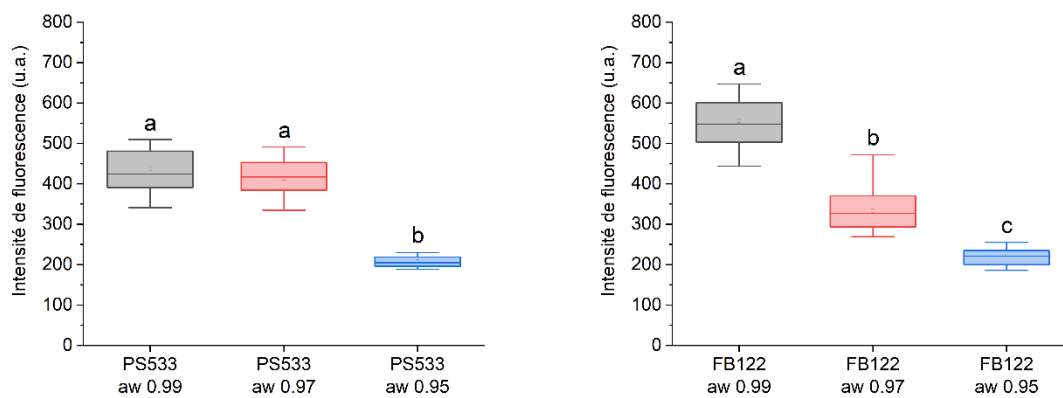


Figure 5.8 : Valeurs des intensités moyennes de fluorescences de spores bactériennes ($N = 15$) en fonction de l' a_w , avant traitement. PS533 : souche sauvage ; FB122 : souche dépourvue de DPA (environ 5 % de DPA). Les boxplot ne partageant pas la même lettre sont significativement différents ($p < 0.05$).

L'évolution des temps de vie moyens, présentés dans le tableau 5.4, confirme les observations vues sur le phasor plot. Une diminution de l' a_w tend à augmenter les temps de vie significativement pour les deux souches. Les temps de vie moyens passent de $1,85 \pm 0,19$ ns à $2,31 \pm 0,17$ ns en diminuant l' a_w de 0,99 à 0,95 pour la souche PS533. Et les temps de vie moyens augmentent de $1,43 \pm 0,16$ ns à $1,94 \pm 0,19$ ns en diminuant l' a_w de 0,99 à 0,95 pour la souche FB122.

Tableau 5.4 : Temps de vie moyen (ns) après irradiation de 2 minutes à $0,120 \text{ J/cm}^2$ obtenus par la représentation phasor plot dans la Figure 2. PS533 : souche sauvage ; FB122 : souche dépourvue de DPA (environ 5% de DPA).

<i>Souches</i>	$\tau (a_w 0,99) (ns)$	$\tau (a_w 0,97) (ns)$	$\tau (a_w 0,95) (ns)$
<i>PS533</i>	$1,56 \pm 0,16$	$1,56 \pm 0,24$	$1,94 \pm 0,18$
<i>PS533 (UVc 2 min)</i>	$1,85 \pm 0,19$	$2,22 \pm 0,20$	$2,31 \pm 0,17$
<i>FB122</i>	$1,48 \pm 0,14$	$1,57 \pm 0,21$	$1,84 \pm 0,20$
<i>FB122 (UVc 2 min)</i>	$1,43 \pm 0,16$	$1,82 \pm 0,22$	$1,94 \pm 0,19$

Chapitre 4 : Effet des photoproduits du DPA induits par UVc sur la germination et la résistance aux UVc des spores de *Bacillus subtilis*

Ce chapitre regroupe les résultats de l'effet des photoproduits sur la croissance de la spore bactérienne et sur sa résistance aux UVc. L'implémentation de notre méthodologie caractérisant les paramètres physico-chimiques intracellulaires des spores bactériennes pouvant être compliquée à mettre en place, une nouvelle méthode a été envisagée. Cette méthode consiste à supplémenter des souches de spores bactériennes initialement dépourvues en DPA avec des photoproduits. Cette méthode, non létale, pourrait être envisagée pour contourner le problème posé par une irradiation directe des spores dans le but de générer des photoproduits pour leur fluorescence. Cette étude a permis d'évaluer les effets des photoproduits sur la croissance des spores bactériennes ainsi que leurs résistances aux UVc. Les résultats sont présentés dans l'article « *Interaction of UVc induced DPA photoproducts of Bacillus subtilis spore on their germination and UVc resistance* », qui a été publiée en 2022 dans le journal scientifique *Environmental microbiology* (DOI : [10.1016/j.jphotobiol.2022.112569](https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2022.112569)).

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

J. Dikec¹, M. Pacheco¹, M. Lavaud^{1,2}, P. Winckler^{1,2}, JM Perrier-Cornet^{1,2*}.

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

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

* Corresponding author.

E-mail address: jean-marie.perrier-cornet@agrosupdijon.fr (J.-M. Perrier-Cornet)

Abstract:

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

Keywords:

Dipicolinic acid – Bacterial spore – photoproducts – Germination – UVc resistance

1. Introduction

Bacterial spores are dormant forms of bacteria able to survive in extreme environments. Their resistance properties are due to a complex multilayer structure and a dehydrated core. This core contains DNA and other specific spore molecules, including dipicolinic acid (DPA). In spores, DPA is chelated to a large extent with Ca^{2+} , forming the CaDPA complex. This key molecule represents a large proportion of the dry weight of the spore, attaining 10%¹. DPA is produced by the mother cell during the sporulation process and is taken up by the developing forespore². This active process is still not completely understood. Some studies have shown that protein transporters, such as SpoVAD and SpoVV, may play a major role^{3,4}. These two channels form a two-step transport pathway allowing DPA to be translocated from the mother cell into the forespore during the sporulation process. The DPA molecule participates in spore germination by triggering the activation of a cortex lytic enzyme called CwIJ⁵.

DPA is known to play a role in spore resistance to various physical stresses such as high temperature, desiccation and radiation exposure through dehydration of the spore core⁶⁻⁸. The role of DPA photochemical properties in spore resistance to UVC radiation has already been pointed out⁹. Indeed, DPA may play the role of photosensitizer or photoprotector depending on the hydration of the environment^{6,7,10}. DPA may cause bacterial spore inactivation through the production of specific spore DNA damage called Spore Photoproducts (SP). Moreover, previous studies have revealed that UVC exposure produces a variety of partially fluorescent DPA photoproducts (DPAP) and that some of them may also be photosensitizers^{7,9,11}. It should be noted that natural DPA and CaDPA show some UVC absorption but exhibit only very weak fluorescence following excitation¹². Although major steps toward a fuller comprehension of DPA photochemistry have been taken in the past decades, certain points remain unclear. Few DPAP molecules have been identified and the biological impact of DPAP on spore survival and outgrowth is not clear^{9,13}. The photochemistry of DPA in spores is not easy to study because of the extreme impermeability of this resistant bacterial form. Studies have most frequently used destructive methods to obtain access to the spore DPA or used chemically synthesized DPA. It is nonetheless difficult to relate *in vitro* studies with the *in vivo* photochemistry of DPA within the spore protoplast, because of the high specificity of this structure. In order to meet the challenge of investigating *in vivo* UVC induced DPAP without recourse to destructive extracting methods, we rely here on the detection of DPAP fluorescence by spectroscopic methods¹¹⁻¹⁵.

The aims of the present study were I) to provide a protocol of DPAP supplementation on bacterial spores, without exposing the spores to UVc; II) to observe the biological effects of these artificially introduced DPAP on spore germination and UVc resistance. As UVc can affect living systems in many ways, it is highly challenging to distinguish *in vivo* the possible effects of the DPAP produced during UVc exposure from the overall effect of UVc. For example, UVc exposure can result in the production of reactive oxygen species (ROS) and disturb the plasma membrane integrity^{16,17}. It has been shown that it can degrade bacterial spore crust and directly affect DNA^{14,18}. As mentioned above, there is possibly spore-specific DNA damage (SP) caused by DPA upon UVc irradiation. A method which distinguishes the effects of DPAP from those of UVc would provide new understanding on UVc resistance in bacterial spores. To create such a method, bacterial spores from the FB122 strain, which are DPA deficient, were supplemented with DPAP produced by *in vitro* UVc exposition of synthetic DPA. This method thus bypassed the overall effects of UVc irradiation on spores, revealing the biological effects of DPAP alone. Our study not only provides information on the biological effects of DPAP, but also contributes to the understanding of DPA photochemistry, advancing research that has taken place in recent years.

2. Experimental procedures

2.1. Chemicals

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

2.2. Bacterial strains

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

2.3. Spore production and DPA supplementation protocol

For spore production, FB122 was first isolated on Luria-Bertani (LB) agar medium containing spectinomycin 100 µg/ml + 10 µg/mL tetracycline. An isolated colony was then incubated on double strength Schaeffer's-glucose liquid medium (2xSG) at 37°C under agitation. When an

OD of 0.6 was reached, the culture was diluted 10 times on fresh 2xSG medium supplemented or not with native DPA or UVc irradiated DPA, with a final concentration of 100 µg/ml. It was then incubated 5 days at 37°C under agitation. Spores were harvested by centrifugation at 11,000 g for 15 min and washed with sterilized cold (4°C) distilled water until purity of around 98% was observed by means of phase-contrast microscopy.

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

- FB122 for FB122 spores which were not supplemented.
- FB122 DPA for FB122 spores which were supplemented with DPA.
- FB122 DPAP_{Xmin} for FB122 spores which were supplemented with DPAP produced by UVc irradiation of DPA for X min.

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

2.4. UVc exposure protocol

UVc irradiation was performed using a UV irradiation system CROSSLINKER® CL-508 (UVItec Ltd, UK) at 254 nm, with a flux of 0.120 J/cm². To produce DPAP, each spore suspension (500 µl) or DPA solution (1 ml) was exposed to UVc in a quartz cuvette, over various exposure times. To avoid a shielding effect due to a high spore concentration,¹⁹ suspensions were adjusted to a concentration of 10⁷ spore/ml.

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

- FB122 UVc_{Ymin} for FB122 exposed to UVc for Y min.
- FB122 DPA_{UVc Ymin} for FB122 supplemented with DPA and exposed to UVc for Y min.

2.5. DPA assay

Bacterial spore PS533 strain (considered as wild type) has been UVc exposed during 2, 5 and 10 min with a flux of 0.120 J/cm². After 30 minutes autoclaving at 100 °C to extract DPA from the spores, the irradiated spores solutions were centrifuged for 15 minutes at 12,000 g. The supernatant containing DPA was then harvested. DPA assay was performed according to the protocol proposed by Hindle and Hall (1999)²⁰. The previous DPA solution was diluted one-fourth in 1M sodium acetate buffer (C₂H₃NaO₂·3H₂O, Sigma-Aldrich, Germany, 136.08

g/mol, purity > 99 %) pH 5.6, containing 30 μM terbium (TbCl_3 , Sigma-Aldrich, Germany, 373.38 g/mol, purity = 99.9 %). Fluorescence emission spectra were acquired on a Jobin Yvon FluoroMax-4 (Horiba Scientific, Kyoto, Japan). The excitation and emission wavelengths were 280 ± 10 nm and 545 ± 5 nm, respectively. A glass slide was placed in front of the detector to filter out Rayleigh scattering from the water.

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

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

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

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

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

2.7. Spore germination, outgrowth, and viability measurements

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

It is important to note that FB122 DPA and DPAP supplemented spores, like the wild type spore, can germinate without the addition of DPA in the medium, whereas FB122 cannot. Moreover, FB122 DPA supplemented spores appear bright in phase contrast microscopy, like the wild type spore, whereas FB122 non-DPA supplemented spores did not appear as bright as WT spores. These observations were used to confirm the DPA uptake by FB122 spores.

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

2.8. Statistical analysis and growth curve fitting

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

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

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

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

3. Results and discussion

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

In order to characterize the effects of DPAP in the spore, the FB122 strain, initially DPA deficient, was used. This strain has been widely used in various studies, sometimes in conjunction with DPA supplementation^{5,22,23}. Thanks to the DPA supplementation protocol in place, the spores of this strain may or may not contain DPA depending on the sporulation conditions. UVc exposure of DPA is known to produce DPAP, some of which exhibit fluorescence properties^{9,11,24}. Since the FB122 strain is able to uptake DPA from its environment

during sporulation, incorporation of fluorescent DPAP in the spores may potentially occur. Fluorescence measurements can then be used to monitor this process.

FB122 and FB122 spores supplemented with DPA were irradiated with UVc over increasing exposure times, as described in the experimental procedures section. The fluorescence of each sample was measured after irradiation. Results are presented Fig. 1A. The untreated spores were naturally fluorescent due essentially to the proteins of the coat. The incorporation of DPA in FB122 spores did not significantly change the spore fluorescence level, although a slight decrease was observed. This finding was consistent with the very weak fluorescence of DPA. After UVc exposition, an increase in fluorescence as a function of exposure time was observed in FB122 spores supplemented with DPA only. On the contrary, FB122 spores without DPA supplementation exposed to UVc did not exhibit a significant increase in fluorescence. A similar observation was made in a previous work comparing the fluorescence of FB122 and PS533 (wild type) spores after UVc irradiation, where only the fluorescence of the PS533 spores (which contain DPA) increased after the UVc exposure¹¹. This increased fluorescence was attributed to the production of DPAP within the spore core. It is known that the longer the DPA is irradiated by UVc, the higher the fluorescence, in relation to the kinetics of DPAP production^{9,24,25}. It was also observed that the rate of DPA consumption *in vivo* increased with the duration of UVc exposure, using a terbium-DPA assay as described in the experimental procedures section (Supplementary Material Fig. S1). The fluorescence increases in FB122 supplemented with DPA when exposed to UVc (FB122 DPA_{UVc} Y_{min}) confirmed that the forespore had indeed taken up DPA during the sporulation process and that this added DPA was sensitive to UVc. This conclusion was further supported by the observation that FB122 spores supplemented with DPA were able to germinate in a medium with no added DPA, unlike standard FB122 spores. In addition, these supplemented FB122 spores appeared bright under phase contrast microscopy, like the wild type PS533, whereas standard FB122 spores appeared darker (data not shown).

The fluorescence of FB122 spores supplemented with DPAP (FB122 DPAP_{Xmin}), in place of DPA, was then quantified (Fig. 1B). DPAP were obtained by prior UVc irradiation of DPA in sterilized water, over increasing exposure times. The fluorescence intensity of irradiated DPA solutions used to supplement FB122 spores during sporulation was monitored as a function of UVc exposure time (Supplementary Material Fig. S2). The results show that the fluorescence intensity of DPA is a function of exposure time, meaning that the more DPA is irradiated, the

more DPAP is formed. The fluorescence intensity of the spores supplemented with DPAP increased significantly compared to the control FB122 supplemented with DPA. This increase in fluorescence suggested that forespores were able to uptake DPAP during the sporulation process, as they did with DPA. For DPA uptake, it has been shown that SpoVA and SpoVV channels, located respectively in the inner and outer membrane, could play a major role. It has also been shown that the SpoVA channel, which is located in the inner membrane, binds with weaker affinity to some DPA and CaDPA isomer forms. Indeed, it has been suggested that providing a mix of DPA and DPA isomers in the sporulation medium results in a specific uptake of DPA, and not the isomer forms³, by the SpoVAD channel subunits. Other studies have demonstrated that after UVc irradiation, DPA can undergo dimerization or conformational change to create DPAP with a similar structure to DPA^{9,11}. Thus, it is hypothesized that only DPAP whose structure is very similar to that of DPA can be taken up during sporulation and be responsible for the fluorescence increase observed in comparison to the control. The fluorescence intensity of FB122 supplemented with DPAP was maximum for photoproducts created by prior UVc exposition of DPA of 5 minutes. It decreased in cases where DPAP were created by longer UVc exposition times (Fig. 1B). This behavior was not observed in FB122 supplemented with DPA and then irradiated with UVc (Fig. 1A) nor in the irradiated DPA solutions (supplementary material Fig. S2). In these latter case, fluorescence increased with irradiation time, in line with previous work which has shown that the concentration of DPAP depends on the exposure time to UVc¹¹. These differences support the hypothesis of a selective uptake, one in which only DPAP with a structure very similar to that of DPA are selected to pass into the SpoVV then SpoVA channels. Indeed, the nature of fluorescent DPAP may change over a long exposure to UVc, morphing from a structure similar to DPA to a structure not compatible with the transport channels. It is also conceivable that the duration of irradiation reduces the amount of photoproduct that can be integrated into the spore. In short, it appears that DPAP within the spore core may be different depending on whether these DPAP were produced by DPA irradiated *in vivo*, directly within the spore core (Fig. 1A), or created by *in vitro* exposure of DPA to UVc, prior to supplementation of FB122 spores (Fig. 1B). This hypothesis relies on both the selectivity of the SpoVA and SpoVV DPA pumps and the kinetics of DPA photochemistry under UVc. Dual channel selection was expected to be the main factor explaining this difference *in vivo* versus *in vitro*.

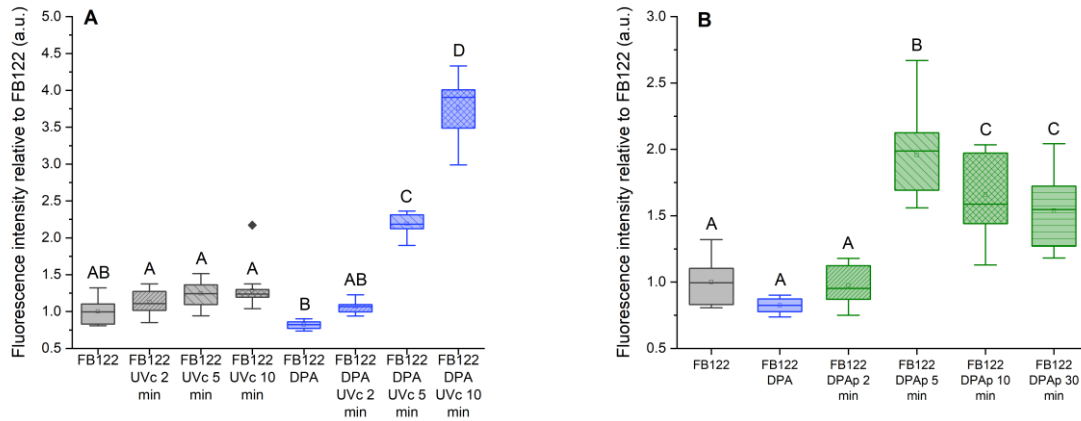


Figure 1: Box plots representing fluorescence intensity measurement of FB122 spores supplemented with DPA. A: Fluorescence intensity measurement of FB122 and FB122 spores supplemented with DPA after exposition to UVc. B: Fluorescence intensity measurement of FB122 spores supplemented with DPAP. Different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

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

The incorporation of DPA during sporulation did not result in a change in mean fluorescence lifetimes (Fig. 2C), only a widening of their distribution (Fig. 2A and 2B), probably because DPA is only very weakly fluorescent. DPA did not significantly contribute to the fluorescence signal that is mostly generated by coat proteins. Previous work has shown that the average fluorescence lifetime of spores is a function of the UVc irradiation time, due to DPAP generation¹¹. Moreover, the mean lifetime of global DPAP produced is much longer than that of coat proteins (about 1.5 ns). Indeed, the creation of DPAP directly inside the spores by

means of UVc exposition lengthened the average fluorescence lifetime of the FB122 spores initially supplemented with DPA, whereas FB122 spores not supplemented did not present a significant fluorescence lifetime variation when exposed to UVc (Fig. 2C). This observation confirmed the hypothesis that the presence of DPA is the main factor of change in fluorescence lifetimes inside bacterial spores upon UVc irradiation.

A clear difference appeared regarding the phasor plot representations and mean values of fluorescence lifetimes between the FB122 spores supplemented with DPA and exposed to UVc (FB122_{UVc X_{min}}) and the FB122 spores supplemented with DPAP (FB122_{DPAP X_{min}}). When DPA was irradiated *in vivo*, directly inside the spore core, fluorescence lifetimes increased significantly with UVc exposure time, from 1.62 ± 0.14 ns to 2.19 ± 0.3 ns (Fig. 2A and 2C). This lengthening of fluorescence lifetimes can be explained by DPAP production; the observed lifetimes were similar to those observed in the PS533 strain (wild type) reported in a previous work¹¹. However, when DPAP were produced by increasing *in vitro* irradiations of DPA and added during the sporulation of FB122 spores, the fluorescence lifetime distribution seemed to change very little (Fig. 2B), remaining at a low mean value of 1.6 ns, similar to the mean fluorescence lifetime value of FB122 spores supplemented with DPA (Fig. 2C). This indicates that the fluorophores incorporated in FB122 spores were different from those obtained by *in vivo* irradiation of the spores and even different from the DPAP obtained *in vitro*. This difference is consistent with the hypothesis of a selective incorporation of certain DPAP by the spore during sporulation.

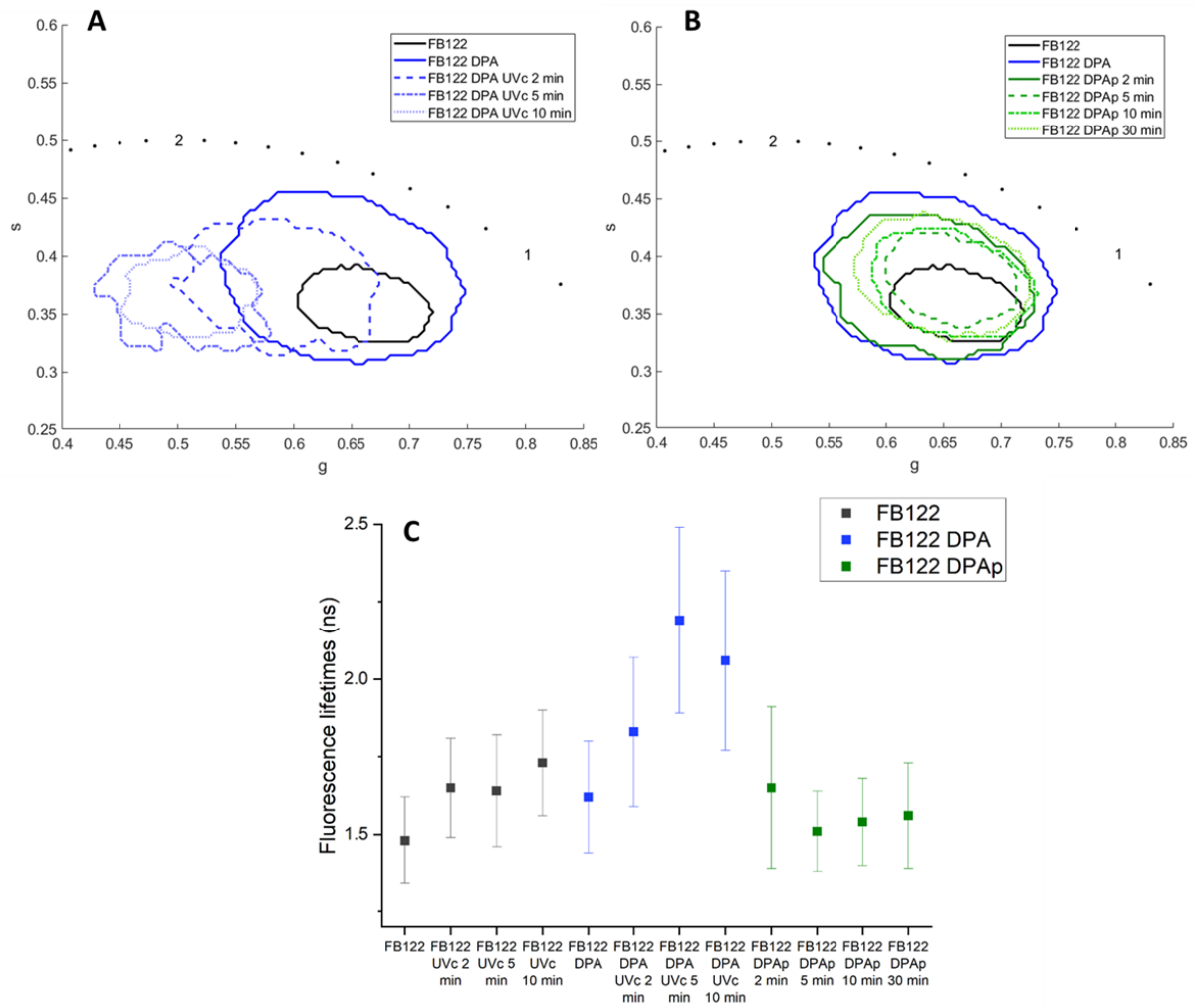


Figure 2: A: Outlines of phasor plot representation for FB122 spores supplemented with DPA before and after UVc treatment. FB122 without DPA is the control condition. B: Outlines of phasor plot representation for FB122 spores supplemented with DPAP. FB122 without DPA and FB122 supplemented with DPA are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

A previous study has reported that a part of DPA exposed to UVc remains in a non-fluorescent, unstable form that could become fluorescent DPAP or return to stable DPA after de-excitation¹¹. It is therefore possible that the increase in fluorescence intensity observed in FB122 spores supplemented with DPAP was due to an uptake by the forespore of this unstable DPA form that may become stable fluorescent DPAP once inside the spore. Fig. 3 summarizes the different ways in which the FB122 forespore might concentrate DPAP in its protoplast, including this last hypothesis.

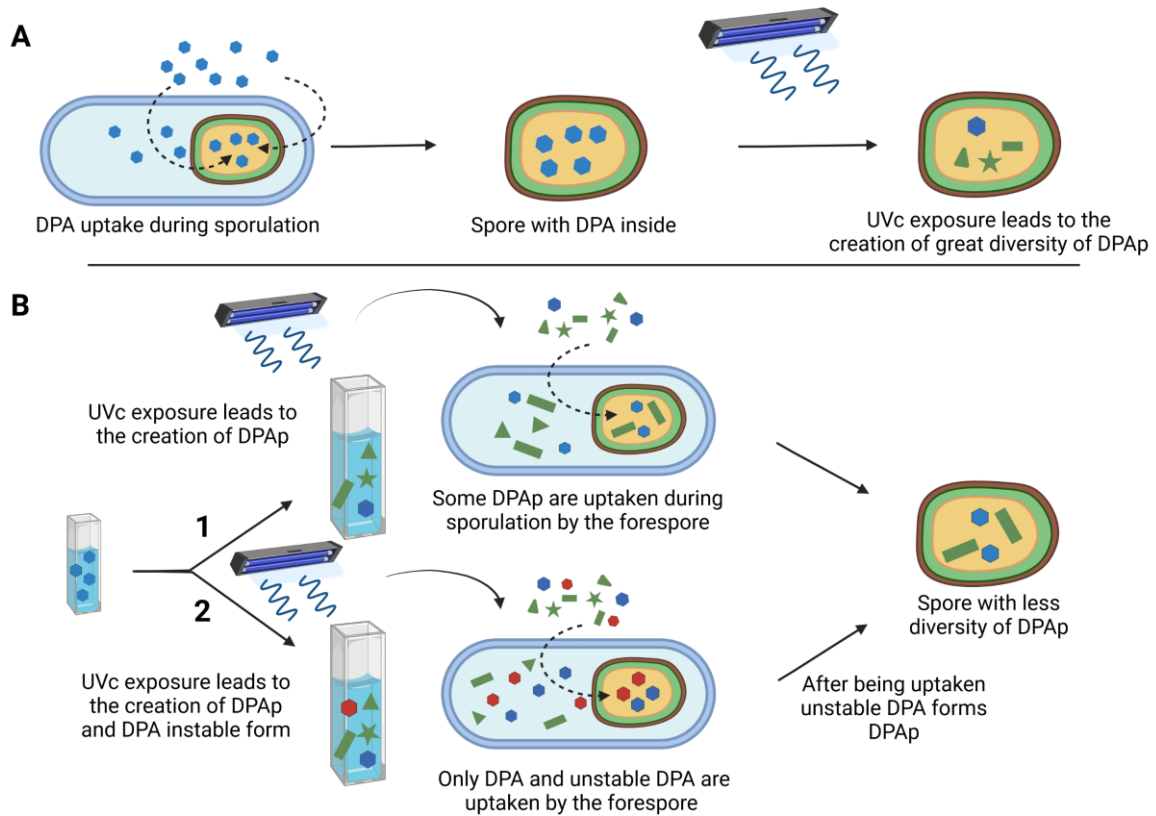


Figure 3: Schematic representation of possible ways to introduce DPAP inside the FB122 forespore during sporulation. DPA: Blue; DPAP: Green shapes with various forms representing various DPAP, DPA instable forms: Red. A Introduction of DPA inside FB122, followed by UVc exposure to create DPAP inside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

Experiments were performed to determine which of the two hypothetical pathways shown in Fig. 3B was most likely to explain the difference in fluorescence intensity and lifetimes reported above. DPA was exposed to UVc for 5, 10 and 30 min and then introduced into the sporulation medium as before. To distinguish whether unstable forms of DPA play an important role in the creation of DPAP inside the core, this irradiated DPA was not added to the sporulation medium until 24 h after the UVc exposure. The time lapse between the irradiation of the DPA and its addition to the sporulation medium allows the unstable form of DPA to stabilize into either DPA or DPAP¹¹, guaranteeing that the forespore will thus not incorporate unstable DPA, which has had time to stabilize into DPA or DPAP. Results of fluorescence intensity and

fluorescence lifetime measurements are presented in Fig. 4.

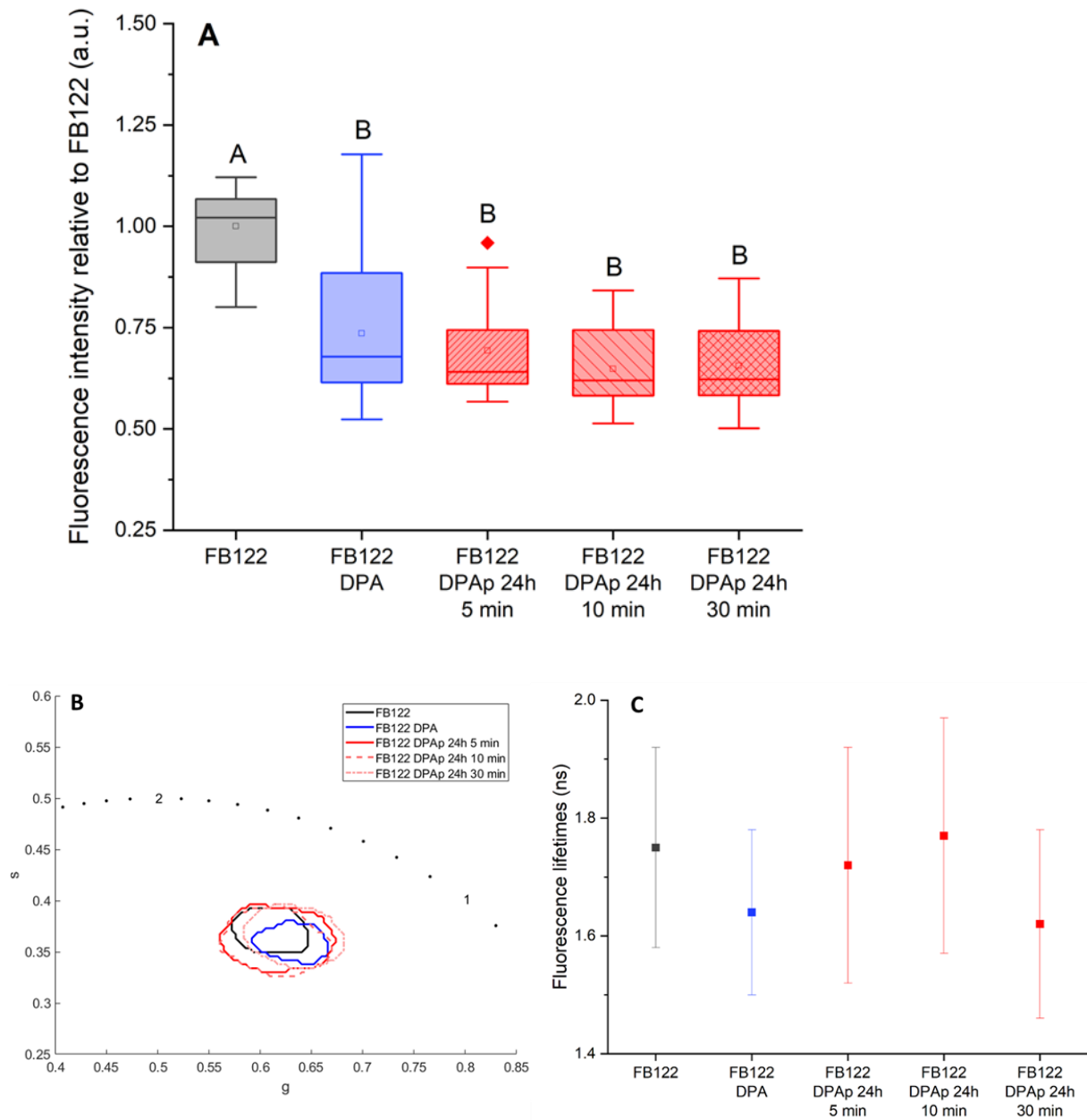


Figure 4: Fluorescence intensity (A) and lifetime (B) measurements of FB122 spores supplemented with 24 hours stabilized UVC irradiated DPA. . Different letters represent significant differences (Tukey $p < 0.05$). (C) Phasor plot representation of mean fluorescence lifetimes for each condition (N =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

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

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

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

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

3.2. Biological effects of DPA photoproducts

As very little is known about DPA photoproduct molecules, there is a corresponding lack of knowledge concerning their potential biological effects. These DPAP may be involved in the damage observed on spores after UVc exposure, including the creation of a specific DNA lesion call SP. On the contrary, DPAP may absorb more UVc radiation and bring about an increase in UVc resistance. Two DPAP have recently been identified and the presence of one of them has been shown to contribute to DNA degradation through CPD formation during UVc exposure⁹. SPs are specific DNA lesions found on spores after exposure to UVc. This DNA lesion is a dimerization of two adjacent thymines on the same DNA strand, leading to DNA embrittlement²⁶⁻²⁸. To our knowledge, no other negative or beneficial effect of DPAP on spore survival has ever been reported. In order to assess the possible effects of DPAP on spore germination, FB122 spores enriched with DPAP (FB122 DPAP_{Xmin}) were compared to FB122 spores enriched with DPA (FB122 DPA) (Fig. 5). An initial concentration of 10⁷ spores/ml was diluted and spread on LB agar medium to carry out plate counting for each sample. The proportions of germinated spores are represented in percentage values where 100% is equal to the initial spore concentration (10⁷ spores/ml). First, we note that around 50% of FB122 spores supplemented with DPA were able to germinate on LB agar without adding DPA in the medium as a germinant, unlike non-supplemented FB122 spores. The absence of the SleB enzyme explains the fact that the mutant spores had such a low germination rate. SleB is one of the two cortex lytic enzymes (CLE), along with the CwIJ enzyme, which are found on the spore cortex and whose role it is to digest a part of the cortex during germination. These enzymes allow the spore to continue on to the last phase of germination and then to outgrowth²⁹. Surprisingly, spores supplemented with UVc irradiated DPA presented higher germination rates than spores supplemented with non-UVc exposed DPA. This finding was observed even in the case of slight UVc exposure.

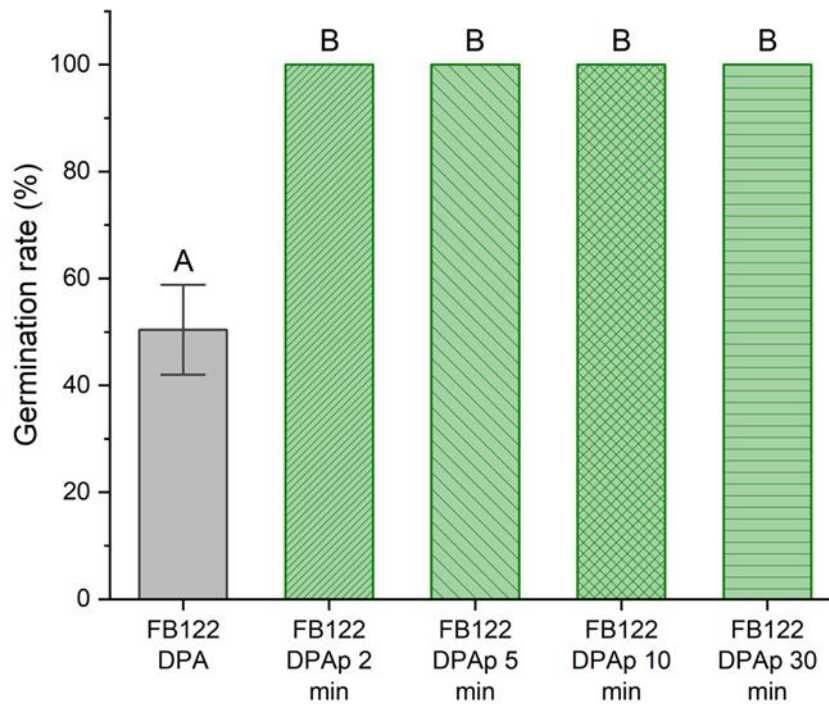


Figure 5: Histograms representing germination rate relative to the FB122 strain in a media supplemented with DPA. Different letters represent significant differences (Tukey $p < 0.05$).

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

For more details on the effect of DPAP on spore physiology, germination and outgrowth, FB122 spores supplemented with UVc treated DPA were observed over 5h and compared to FB122 supplemented with DPA without UVc treatment (Fig. 6). Classical growth curves, obtained by measuring cell culture absorbance at 620 nm, were observed for each condition. Germination

delay, lag phase, exponential phase and stationary phase are reported (Fig. 6A). The longer DPA was exposed to UVc, the faster the stationary phase was reached. To better understand the impact of DPAP on spore development, 3 parameters were observed during growth: germination delay, growth speed and duration of lag phase before exponential growth (Fig. 6B). Germination delay is a component of the total lag time observed in the beginning of the growth curves. This total lag time is probably composed of multiple lag times associated with different stages of germination and outgrowth³⁰. Studies are generally limited to observations of germination delay. Here, germination delay corresponding to the germination lag time (time before germination) was distinguished from the lag time associated with outgrowth (time between germination and outgrowth).

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

explain the reduction of the lag period before the phase of exponential growth.

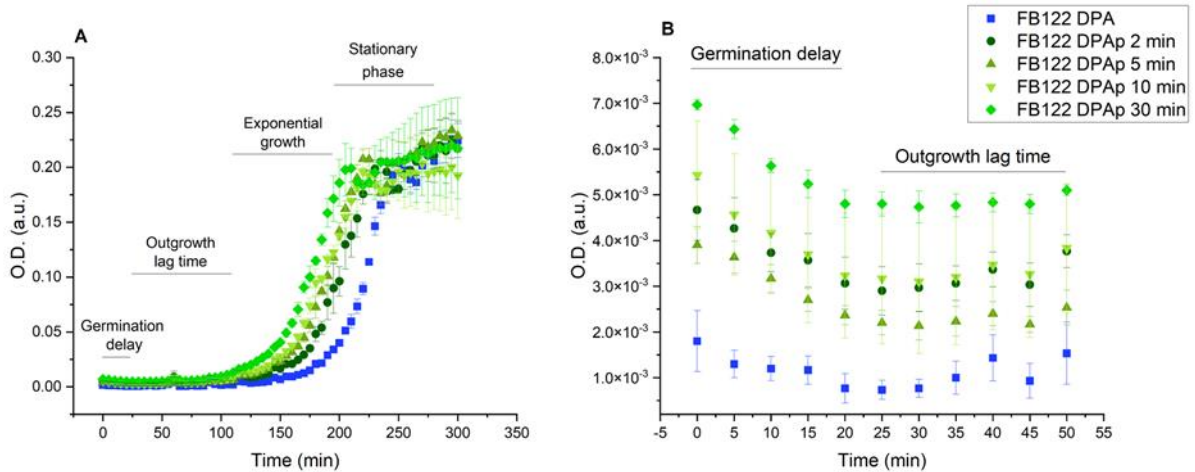


Figure 6: FB122 supplemented with DPA: germination and growth parameters. A: Mean growth curves from FB122 supplemented with DPA (■); FB122 supplemented with DPAP, coming from DPA previously exposed to UVC 2 min (●); 5 min (▲); 10 min (▼) and 30 min (◇). B: Zoom on the first hour of the growth curve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

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

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

3.3. Photoprotection effect

Some of the recently identified DPAP seem to enhance CPD formation on the bacterial DNA strand during UVC exposure^{9,10}. To determine whether DPAP uptake by the forespore had similar properties, UVC resistance was investigated in FB122 spores supplemented with DPA and DPAP (Fig. 7). In the case of FB122 supplemented with DPA, a destruction rate of 1.4 log (*i.e.* inactivation of 96% of the initial population) was observed when exposed to UVC at a dose of 30 J/m². Interestingly, this rate drops significantly in FB122 spores supplemented with DPAP. When DPAP were produced by 2 min DPA exposition before uptake by the forespore (FB122 DPAP_{2min}), an inactivation of about 1 log was observed. For FB122 spores

supplemented with DPAP produced by at least 5 min UVc exposition, there was an even weaker inactivation of about 0.3 log (or 50% of the initial population).

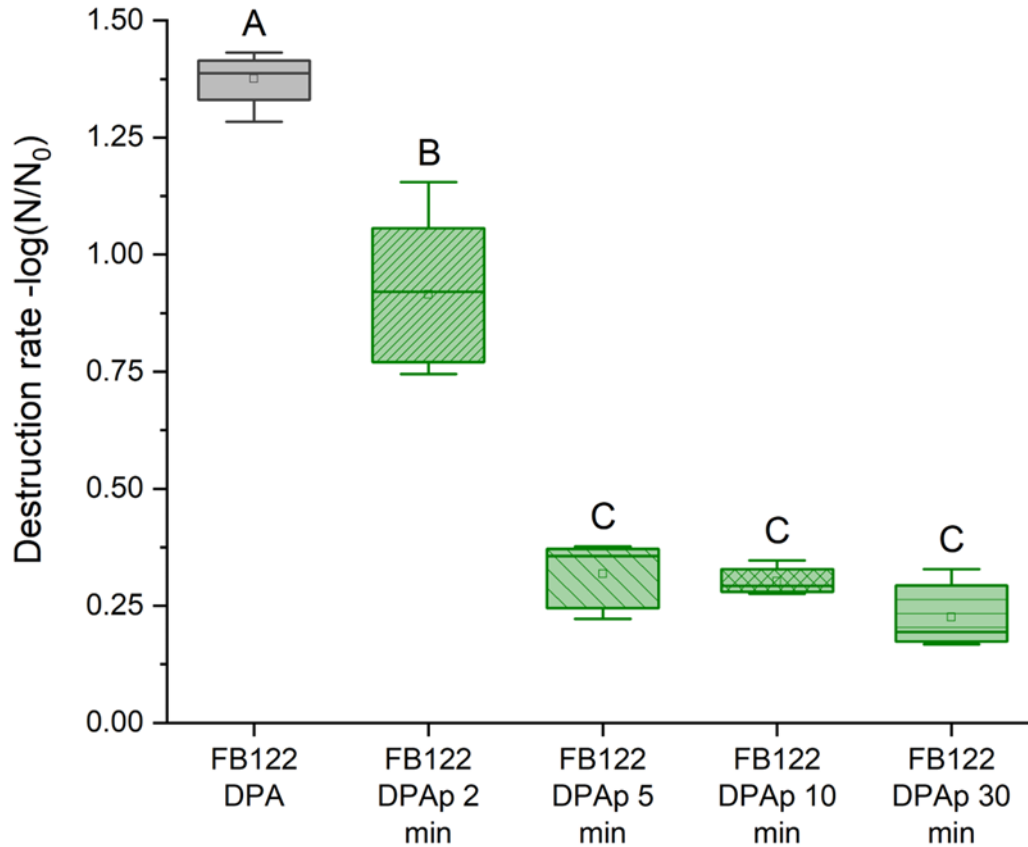


Figure 7: Box plot representing FB122 spores (complemented or not with DPAP) inactivation rate after 30J/m² UVc treatment (X min). Different letter means significant difference (Tukey test $p < 0.05$).

These results show that the uptake of DPAP enhances resistance to UVc stress. This effect seems dependent on the UVc irradiation time used to create DPAP from DPA. The observed photoprotection may be due to some DPAP forms produced during the previous *in vitro* exposure and selected by the forespore. These photoprotective DPAP are probably naturally present after direct UVc exposure of bacterial spores but in this latter case, their protective effect is probably diluted by the overall deleterious effect of the UVc.

The results reported in section 3.1 revealed an increase in spore fluorescence intensity after UVc exposure, attributed to the generation of fluorescent DPAP forms. This intensity increase, related to the duration of the UVc treatment, appears to be correlated to UVc resistance (Fig.

1 and Fig. 7). In consequence, fluorescent DPAP and photoprotective DPAP could be one and the same. Their protective properties may arise from the absorption of part of the UV radiation without the release of energy into DNA reactive molecules, as happens in DPA³¹. This is the first time to our knowledge that certain DPAP are reported to have a direct, positive impact on spore resistance to any kind of stress. Previous studies have been focused only on the impact of DPA on spore resistance properties^{6,31-33}, and only one study demonstrated that some DPAP can have a photosensitizer effect⁹. The results presented here reveal that certain DPAP may attenuate the negative effects observed on spores that undergo UVc radiation. Nevertheless, it is unlikely that these photoprotective DPAP are the only DPAP form that is produced *in vivo*, inside the spore core, in the case of direct UVc exposure on spores. The difference in fluorescence lifetime between DPAP produced by *in vivo* versus *in vitro* UVc exposition suggests that different forms co-exist, some of which may be not protective (Fig. 2).

4. Conclusions

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

References

1. Murrell, W. G. The Biochemistry of the Bacterial Endospore. *Adv. Microb. Physiol.* 1, 133-251 (1967).
2. Errington, J. Bacillus subtilis sporulation: Regulation of gene expression and control of morphogenesis. *Microbiol. Rev.* 57, 1-33 (1993).

3. Li, Y. *et al.* Role of a SpoVA Protein in Dipicolinic Acid Uptake into Developing Spores of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 194, 1875–1884 (2012).
4. Ramírez-Guadiana, F. H. *et al.* A two-step transport pathway allows the mother cell to nurture the developing spore in *Bacillus subtilis*. *PLoS Genet.* 13, 1–18 (2017).
5. Paidhungat, M., Ragkousi, K. & Setlow, P. Genetic requirements for induction of germination of spores of *Bacillus subtilis* by Ca²⁺-dipicolinate. *J. Bacteriol.* 183, 4886–4893 (2001).
6. Slieman, T. A. & Nicholson, W. L. Role of Dipicolinic Acid in Survival of *Bacillus subtilis* Spores Exposed to Artificial and Solar UV Radiation. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 1274–1279 (2001).
7. Cortesão, M. *et al.* *Bacillus subtilis* spore resistance to simulated mars surface conditions. *Front. Microbiol.* 10, 1–16 (2019).
8. Paidhungat, M., Setlow, B., Driks, A. & Setlow, P. Characterization of spores of *Bacillus subtilis* which lack dipicolinic acid. *J. Bacteriol.* 182, 5505–5512 (2000).
9. Nardi, G., Lineros-Rosa, M., Palumbo, F., Miranda, M. A. & Lhiaubet-Vallet, V. Spectroscopic characterization of dipicolinic acid and its photoproducts as thymine photosensitizers. *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 245, 118898 (2021).
10. Desnoux, C., Guillaume, D. & Clivio, P. Spore photoproduct: A key to bacterial eternal life. *Chem. Rev.* 110, 1213–1232 (2010).
11. Pacheco, M., Dikec, J., Winckler, P., Coelho, C. & Perrier-Cornet, J. M. Spectroscopic and microscopic characterization of dipicolinic acid and its salt photoproducts – A UVc effect study on DPA in solution and in bacterial spores. *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 280, 121502 (2022).
12. Alimova, A. *et al.* Native fluorescence and excitation spectroscopic changes in *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus* bacteria subjected to conditions of starvation. *Appl. Opt.* 42, 4080 (2003).
13. Noell, A. C. *et al.* Spectroscopy and viability of *Bacillus subtilis* spores after ultraviolet irradiation: Implications for the detection of potential bacterial life on Europa. *Astrobiology* 15, 20–31 (2015).
14. Elegbeleye, J. A., Gervilla, R., Roig-Sagues, A. X. & Buys, E. M. Ultraviolet-C inactivation and hydrophobicity of *Bacillus subtilis* and *Bacillus velezensis* spores isolated from extended shelf-life milk. *Int. J. Food Microbiol.* 349, 109231 (2021).
15. Kong, L., Setlow, P. & Li, Y. Q. Analysis of the Raman spectra of Ca²⁺-dipicolinic acid alone and in the bacterial spore core in both aqueous and dehydrated environments. *Analyst* 137, 3683–3689 (2012).
16. Santos, A. L. *et al.* Wavelength dependence of biological damage induced by UV radiation on bacteria. *Arch. Microbiol.* 195, 63–74 (2013).
17. Santos, A. L. *et al.* Effects of UV radiation on the lipids and proteins of bacteria studied by mid-infrared spectroscopy. *Environ. Sci. Technol.* 47, 6306–6315 (2013).
18. Slieman, T. A. & Nicholson, W. L. Artificial and solar UV radiation induces strand breaks and cyclobutane pyrimidine dimers in *Bacillus subtilis* spore DNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 199–205 (2000).
19. Reidmiller, J. S., Baldeck, J. D., Rutherford, G. C. & Marquis, R. E. Characterization of UV-peroxide killing of bacterial spores. *J. Food Prot.* 66, 1233–1240 (2003).
20. Hindle, A. A. & Hall, E. A. H. Dipicolinic acid (DPA) assay revisited and appraised for spore detection. *Analyst* 124, 1599–1604 (1999).
21. Leray, A., Padilla-Parra, S., Roul, J., Hélot, L. & Tramier, M. 827Spatio-Temporal Quantification of FRET in Living Cells by Fast Time-Domain FLIM: A Comparative Study of Non-Fitting Methods. *PLoS One* 8, (2013).
22. Magge, A. *et al.* Role of dipicolinic acid in the germination, stability, and viability of spores of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 190, 4798–4807 (2008).
23. Taylor, W. *et al.* DNA damage kills bacterial spores and cells exposed to 222-Nanometer UV radiation. *Appl. Environ. Microbiol.* 86, 1–14 (2020).
24. Nudelman, R., Bronk, B. V. & Efrima, S. Fluorescence emission derived from dipicolinic acid, its sodium, and its calcium salts. *Appl. Spectrosc.* 54, 445–449 (2000).
25. Bronk, B. V., Shoaibi, A., Nudelman, R. & Akinyemi, A. N. Physical perturbation for fluorescent

characterization of microorganism particles. *Chem. Biol. Sens.* 4036, 169 (2000).

26. Setlow, P. & Li, L. Photochemistry and Photobiology of the Spore Photoproduct: A 50-Year Journey. *Photochem. Photobiol.* 91, 1263–1290 (2015).

27. Yang, L. & Li, L. Spore photoproduct lyase: The known, the controversial, and the unknown. *J. Biol. Chem.* 290, 4003–4009 (2015).

28. Setlow, B. & Setlow, P. Dipicolinic acid greatly enhances production of spore photoproduct in bacterial spores upon UV irradiation. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 640–643 (1993).

29. Setlow, P. Germination of spores of Bacillus species: What we know and do not know. *J. Bacteriol.* 196, 1297–1305 (2014).

30. Stringer, S. C., Webb, M. D. & Peck, M. W. Lag time variability in individual spores of Clostridium botulinum. *Food Microbiol.* 28, 228–235 (2011).

31. Douki, T., Setlow, B. & Setlow, P. Photosensitization of DNA by dipicolinic acid, a major component of spores of Bacillus species. *Photochem. Photobiol. Sci.* 4, 591–597 (2005).

32. Setlow, P. Spore Resistance Properties. *Microbiol. Spectr.* 2, (2016).

33. Slieman, T. A. & Nicholson, W. L. Role of Dipicolinic Acid in Survival of Bacillus subtilis Spores Exposed to Artificial and Solar UV Radiation. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 1274–1279 (2001).

Supplementary information

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

J. Dikec¹, M. Pacheco¹, M. Lavaud^{1,2}, P. Winckler^{1,2}, JM Perrier-Cornet^{1,2,*}.

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

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

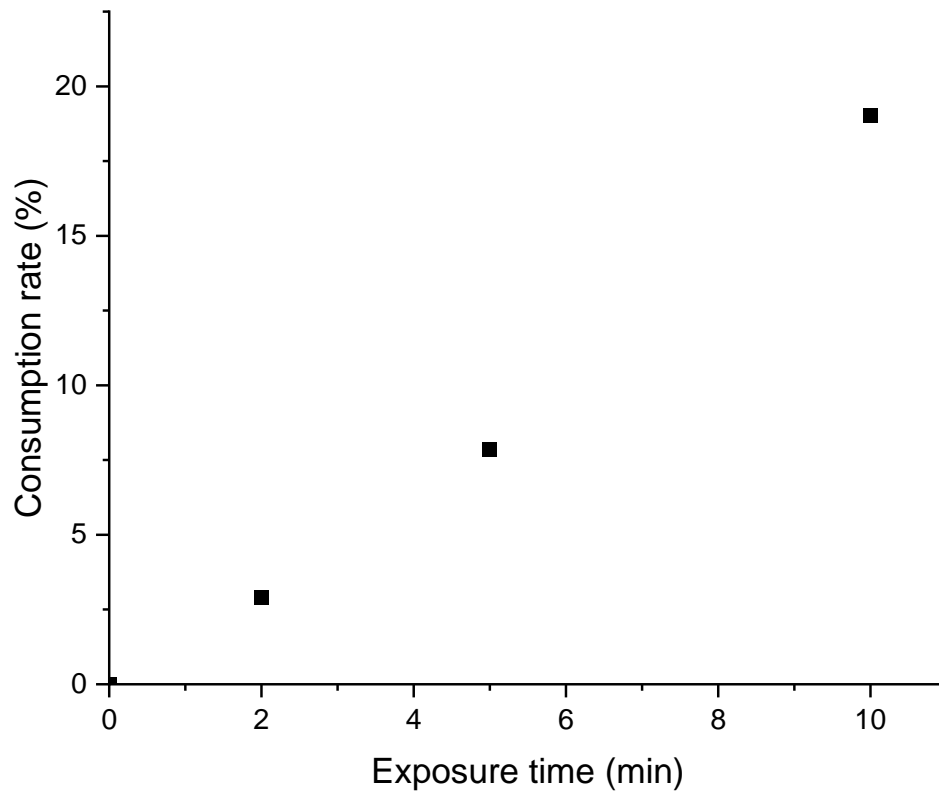


Figure S1: In vivo consumption of DPA in spores undergoing UVc exposure, monitored by terbium DPA assay.

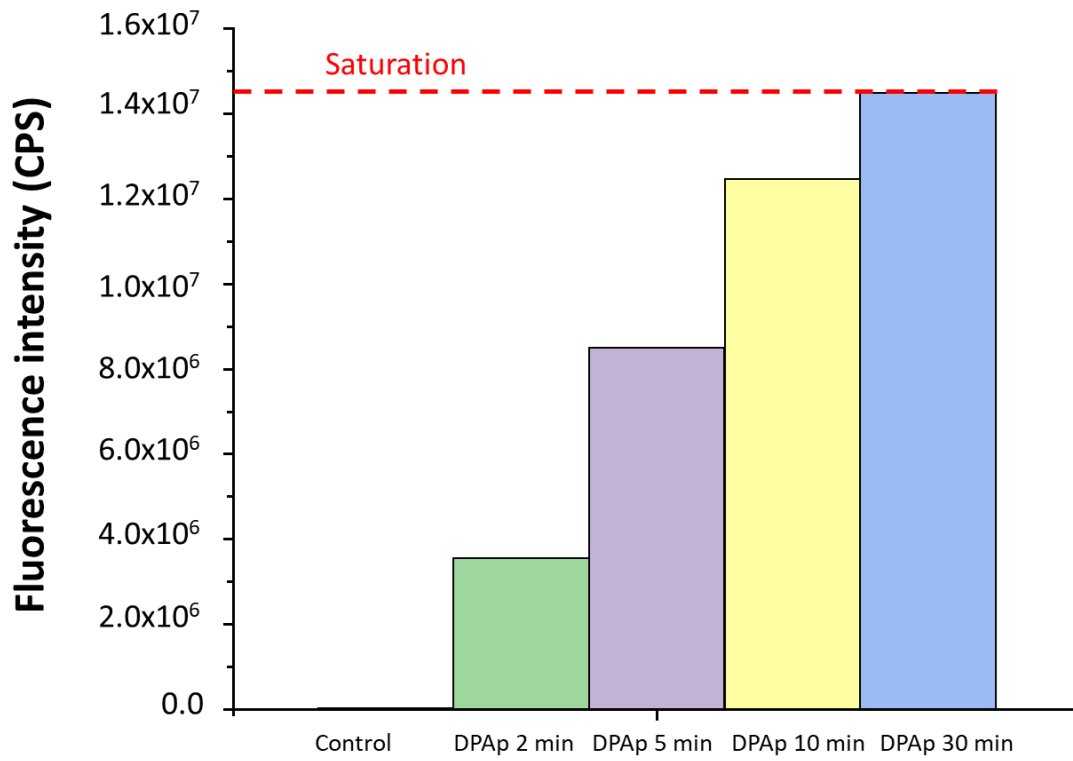


Figure S2: Influence of UVC exposure time on the fluorescence intensity of DPA solutions used to supplement FB122 spores.

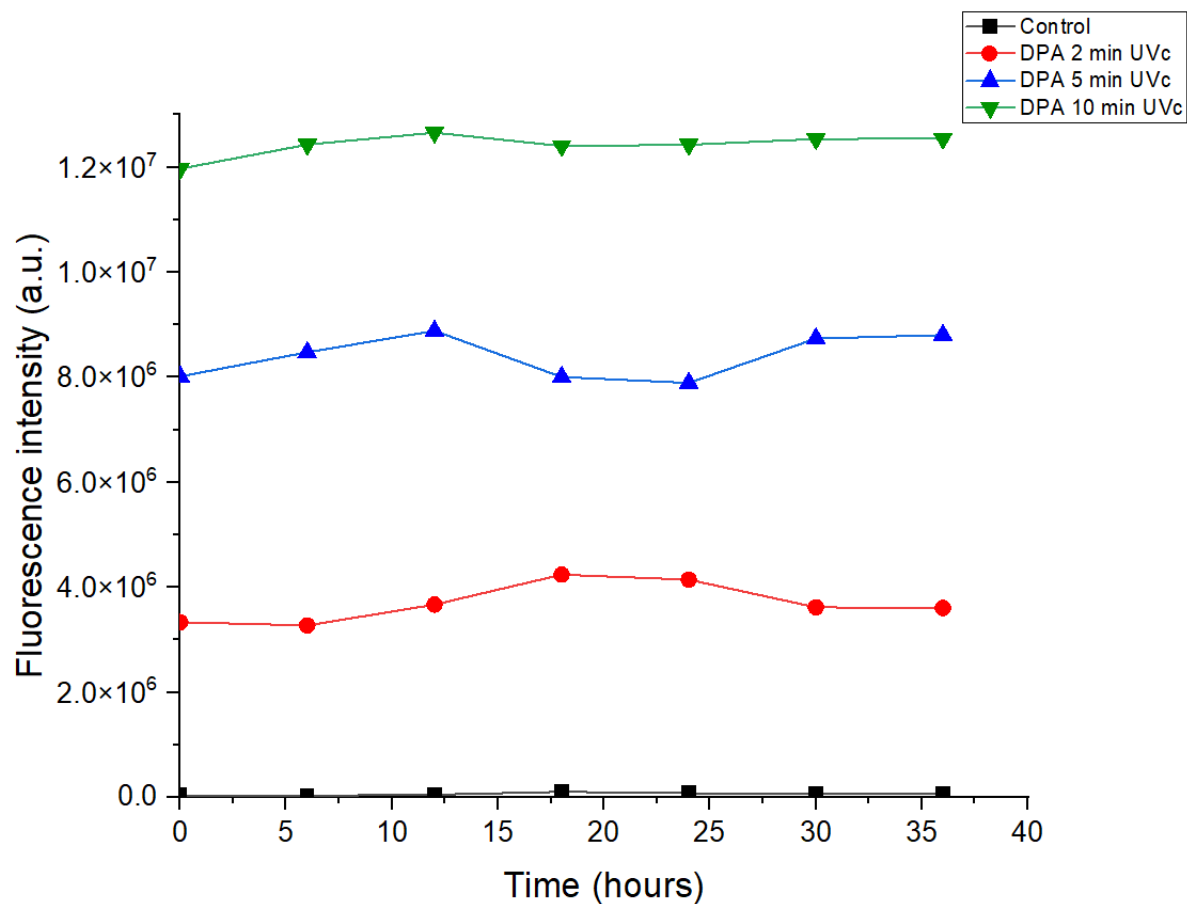


Figure S3: Fluorescence intensity of DPA solutions monitored after 2 min (red), 5 min (blue) or 10 min (green) UVc exposure and unexposed control DPA solution (black). The DPA solution exposed to UVc for 30 min was not shown because the fluorescence intensity measurements exceeded the saturation limit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

VI. Conclusions et perspectives

1. Mise en place un protocole couplant les deux techniques de fluorescence stationnaire et résolue dans le temps

Le couplage des deux techniques est opérationnel et nécessite peu de moyens pour être mis en place. L'utilisation de ces techniques pour la caractérisation de composés fluorescents ou pour l'investigation de matrices d'intérêt peut être envisagée. L'application sur des milieux biologiques d'intérêt dans le domaine agroalimentaire, les spores bactériennes et le vin, a été possible. Cependant, l'emploi de cette méthode n'est pas restreint à ces deux milieux. Il est envisageable d'exploiter cette méthodologie vers d'autres matrices et pas seulement dans le domaine de l'agroalimentaire. Ces techniques de caractérisation peuvent être utilisées peu importe le domaine, et les avantages apportés par notre méthode ne sont pas négligeables, que ce soit un faible temps d'acquisitions ou un faible coût global des analyses. Cependant, elles se limitent uniquement à la présence de composés fluorescents.

2. Suivis des changements des composés fluorescents dans le vin à la suite de la fermentation malolactique

Le couplage des techniques de fluorescence stationnaire et résolue dans le temps pour suivre les changements des composés fluorescents dans le vin lors de la fermentation malolactique a été utilisé et a permis plusieurs études. Notre principale étude a permis de caractériser une composante PARAFAC (C4, EX/EM : 315/440 nm) susceptible de discriminer les vins ayant effectué ou non leur FML. Les changements dus à la FML ont pu être observés grâce à l'implémentation de la représentation phasor plot avec une augmentation de la coordonnée « g » et une diminution de « s » après réalisation de la FML. Ces déplacements des temps de vie de fluorescence ont pu être attribués aux changements induits par les acides organiques et phénoliques. Ces résultats pourront être utilisés postérieurement pour améliorer la traçabilité des procédés fermentaires.

Outre la FML, les acides organiques et phénoliques sont intéressants pour leur forte influence sur les propriétés organoleptiques des vins. Une perspective attrayante et encore non développée, serait d'utiliser notre méthodologie pour corrélérer des changements de ces composés avec des propriétés sensorielles et ainsi développer un outil assurant la qualité organoleptique des vins au cours de différents procédés fermentaires.

Les résultats complémentaires présentés dans ce manuscrit ont permis de conforter nos observations sur la discrimination de la FML par la composante PARAFAC C4. Nous avons

focalisé une partie de cette étude sur l'effet de la souche bactérienne utilisée pour réaliser la FML chez différents moûts et en différentes conditions (biofilm et planctonique) : aucun effet n'a pu être démontré avec l'échantillonnage à notre disposition. Soit l'impact des différentes souches est négligeable, soit il est concevable que les échantillons à notre disposition n'étaient pas parfaitement adaptés et que l'utilisation de vins finis au lieu des moûts aurait été préférable au regard de nos précédentes expériences. Cependant, cette étude a permis de mettre en évidence le fait que l'impact de traitement utilisé sur les vignes peut être visualisé par temps de vie de fluorescence et plus particulièrement à l'aide de la représentation phasor plot. Ces premiers résultats laissent entrevoir une perspective d'étude à haut potentiel de valorisation. Une étude non présentée dans ce manuscrit n'a pas démontré d'effet dû au terroir sur un échantillonnage de divers vins provenant de trois terroirs différents. Là encore, soit l'impact du terroir est négligeable, soit l'échantillonnage n'était adapté et une plus grande quantité et diversité de terroirs serait peut-être nécessaire pour discriminer entre les différents terroirs. Il serait intéressant de vérifier nos conjectures avec un nouveau plan expérimental.

3. Caractérisation des photoproduits du DPA et du CaDPA et évaluation de leurs effets sur la spore bactérienne

Une caractérisation des photoproduits du DPA et du CaDPA a été réalisée. Cette étude a permis de supposer la formation de nombreuses formes de DPAP encore non identifiées, avec notamment de nombreuses formes intermédiaires, alors que peu de structures ont déjà été déterminées dans de précédentes publications. Pour confirmer nos hypothèses et affiner cette caractérisation, il serait nécessaire de réaliser des séparations des différents photoproduits pour ainsi les identifier à l'aide de techniques spécifiques, telles que la RMN et la spectrométrie infra rouge. Des essais ont été réalisés en chromatographie flash pour séparer les différents photoproduits, mais les protocoles mis en place n'ont pas été concluants et nécessiteraient plus d'investigations. Une identification des photoproduits *in vivo* serait remarquable et permettrait de compléter notre étude. Des acquisitions de spectres de masses de solutions purifiées de photoproduits extraites des spores seraient envisageables.

L'état d'hydratation du DPA semble influencer la production des différents photoproduits, avec notamment l'état liquide qui induirait un nombre plus important de photoproduits que l'état sec. Identifier les différents photoproduits en fonction de l'état d'hydratation est capital du fait que le protoplasme de la spore bactérienne est censé être plus sec que liquide. Lors d'un

projet au sein du synchrotron SOLEIL (CNRS – CEA – Paris-Saclay) nous avons pu investiguer l'effet de l'état d'hydratation sur la production des photoproduits (UVc et UVb), sur des solutions simples de DPA/CaDPA et différentes spores bactériennes. Nous avons pu étudier cet effet via différentes techniques, telles que la spectroscopie et la microscopie IR, le RAMAN et l'O-PTIR. Les résultats de cette étude sont en cours de rédaction pour une publication scientifique.

Au-delà de la proposition de structure de différents photoproduits, ce travail a mis en évidence l'instabilité des photoproduits induits par irradiation aux UVc (254 nm). En effet, après un temps d'attente de 24 heures, la quantité de photoproduit n'est plus identique à celle mesurée juste après irradiation. Suite à l'irradiation UVc, le DPA se distingue en DPAP et en une forme instable, nommé DPA*. Après un certain temps, le DPA* se différencie en DPAP et une partie retourne sous forme de DPA.

Pour conclure cette partie, nous avons investigué l'effet des photoproduits sur la spore bactérienne. Grâce à l'implémentation d'une nouvelle méthode pour incorporer des photoproduits dans les spores bactériennes nous avons pu mettre en évidence l'amélioration du taux de germination des spores supplémentés en DPAP, ainsi que la réduction du délai de croissance. De plus, ces spores supplémentées présentaient une résistance aux UVc accrue. Cette nouvelle méthode d'enrichissement de spores initialement dépourvues de DPA, avec des solutions de DPA irradié aux UVc, met en lumière la possibilité d'introduction des DPA* dans les spores, DPA* qui serait responsable ensuite de la présence des DPAP à l'intérieur de la spore. Cela renforce notre hypothèse de la présence d'une forme instable de DPA.

4. Evaluation des changements d'émission de fluorescence des photoproduits du DPA et du CaDPA en fonction du pH et de l' a_w

Dans le but de développer une méthode de caractérisation des paramètres intracellulaire de la spore bactérienne, une étude *in vitro* de l'évolution de l'émission de fluorescence des photoproduits en fonction du pH et de l' a_w a été réalisée. Ce travail a permis de démontrer qu'il était possible de distinguer les temps de vie de fluorescence des photoproduits du DPA et du CaDPA en fonction de différentes gammes de pH et d' a_w . L'augmentation des valeurs de pH induit une augmentation des temps de vie de fluorescence, et cette augmentation se traduit par une discrimination des DPAP et CaDPAP en plusieurs groupes distincts, correspondant à une évolution de leur forme, de la plus protonée à la plus déprotonée. De la même manière une

augmentation de l' a_w induit une augmentation des temps de vie de fluorescence.

Pour pouvoir transposer nos résultats précédents vers une application *in vivo*, une étude préliminaire a été réalisée sur diverses souches de spores bactériennes en variant le pH et l' a_w du milieu de culture. Ces résultats n'ont pas été concluants, les paramètres intracellulaires de la spore n'ayant pas été assez modifiés avec les gammes de variations de pH et d' a_w utilisées. Par ailleurs, les changements d' a_w altèrent la structure de la spore. En conséquence, la suite de ces travaux devra être focalisée sur le développement d'une méthode donnant lieu à une altération des valeurs de pH et d' a_w intracellulaire des spores tout en permettant une visualisation des photoproduits.

VII. Références

- Agatonovic-Kustrin, S., Hettiarachchi, C. G., Morton, D. W., & Razic, S. (2015). Analysis of phenolics in wine by high performance thin-layer chromatography with gradient elution and high resolution plate imaging. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *102*, 93-99. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2014.08.031>
- Airado-Rodríguez, D., Durán-Merás, I., Galeano-Díaz, T., & Wold, J. P. (2011). Front-face fluorescence spectroscopy : A new tool for control in the wine industry. *Journal of Food Composition and Analysis*, *24*(2), 257-264. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2010.10.005>
- Airado-Rodríguez, D., Galeano-Díaz, T., Durán-Merás, I., & Wold, J. P. (2009). Usefulness of Fluorescence Excitation–Emission Matrices in Combination with PARAFAC, as Fingerprints of Red Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *57*(5), 1711-1720. <https://doi.org/10.1021/jf8033623>
- Albergaria, H., & Arneborg, N. (2016). Dominance of *Saccharomyces cerevisiae* in alcoholic fermentation processes : Role of physiological fitness and microbial interactions. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *100*(5), 2035-2046. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-7255-0>
- Alimova, A., Katz, A., Savage, H. E., Shah, M., Minko, G., Will, D. V., Rosen, R. B., McCormick, S. A., & Alfano, R. R. (2003). Native fluorescence and excitation spectroscopic changes in *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus* bacteria subjected to conditions of starvation. *Applied Optics*, *42*(19), 4080. <https://doi.org/10.1364/AO.42.004080>
- Ansanay, V., Dequin, S., Blondin, B., & Barre, P. (1993). Cloning, sequence and expression of the gene encoding the malolactic enzyme from *Lactococcus lactis*. *FEBS Letters*, *332*(1-2), 74-80. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(93\)80488-G](https://doi.org/10.1016/0014-5793(93)80488-G)
- Aronson, A. I., & Fitz-James, P. (1976). Structure and morphogenesis of the bacterial spore coat. *Bacteriological Reviews*, *40*(2), 360-402. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC413961/>
- Atrih, A., Zöllner, P., Allmaier, G., & Foster, S. J. (1996). Structural analysis of *Bacillus subtilis* 168 endospore peptidoglycan and its role during differentiation. *Journal of Bacteriology*, *178*(21), 6173-6183. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC178487/>
- Avignone-Rossa, C., Arcas, J., & Mignone, C. (1992). *Bacillus thuringiensis* growth, sporulation and δ -endotoxin production in oxygen limited and non-limited cultures. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, *8*(3), 301-304. <https://doi.org/10.1007/BF01201884>
- Ayala, N., Zamora, A., Rinnan, Å., Saldo, J., & Castillo, M. (2020). The effect of heat treatment on the front-face fluorescence spectrum of tryptophan in skim milk. *Journal of Food Composition and Analysis*, *92*, 103569. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2020.103569>
- Azcarate, S. M., de Araújo Gomes, A., Alcaraz, M. R., Ugulino de Araújo, M. C., Camiña, J. M., & Goicoechea, H. C. (2015). Modeling excitation–emission fluorescence matrices with pattern recognition algorithms for classification of Argentine white wines according grape variety. *Food Chemistry*, *184*, 214-219. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.03.081>

- Baiano, A., Terracone, C., Longobardi, F., Ventrella, A., Agostiano, A., & Del Nobile, M. A. (2012). Effects of different vinification technologies on physical and chemical characteristics of Sauvignon blanc wines. *Food Chemistry*, *135*(4), 2694-2701. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.07.075>
- Bannwarth, M., Corrêa, I. R., Sztretye, M., Pouvreau, S., Fellay, C., Aebischer, A., Royer, L., Ríos, E., & Johnsson, K. (2009). Indo-1 Derivatives for Local Calcium Sensing. *ACS Chemical Biology*, *4*(3), 179-190. <https://doi.org/10.1021/cb800258g>
- Barbe, J.-C., de Revel, G., Joyeux, A., Lonvaud-Funel, A., & Bertrand, A. (2000). Role of Carbonyl Compounds in SO₂ Binding Phenomena in Musts and Wines from Botrytized Grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *48*(8), 3413-3419. <https://doi.org/10.1021/jf991359d>
- 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 aw. *Food Microbiology*, *32*(1), 79-86. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.04.011>
- Bartowsky, E. J. (2005). *Oenococcus oeni* and malolactic fermentation – moving into the molecular arena. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, *11*(2), 174-187. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2005.tb00286.x>
- Basalekou, M., Kyrleou, M., Pappas, C., Tarantilis, P., Kotseridis, Y., & Kallithraka, S. (2019). Proanthocyanidin content as an astringency estimation tool and maturation index in red and white winemaking technology. *Food Chemistry*, *299*, 125135. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125135>
- Bastard, A. (2015). *Interactions micro-organismes—Bois et impact sur les propriétés physico-chimiques du vin : Fermentation malolactique par le biofilm de Oenococcus oeni*. 174.
- 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. (2007). Properties of *Bacillus anthracis* spores prepared under various environmental conditions. *Archives of Microbiology*, *189*(1), 71-79. <https://doi.org/10.1007/s00203-007-0295-9>
- Beaman, T. C., Koshikawa, T., Pankratz, H. S., & Gerhardt, P. (1984). Dehydration partitioned within core protoplast accounts for heat resistance of bacterial spores. *FEMS Microbiology Letters*, *24*(1), 47-51. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1984.tb01242.x>
- Beaman, T. C., Pankratz, H. S., & Gerhardt, P. (1972). Ultrastructure of the Exosporium and Underlying Inclusions in Spores of *Bacillus megaterium* Strains1. *Journal of Bacteriology*, *109*(3), 1198-1209. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC247344/>
- Beltran, G., Torija, M. J., Novo, M., Ferrer, N., Poblet, M., Guillamón, J. M., Rozès, N., & Mas, A. (2002). Analysis of yeast populations during alcoholic fermentation : A six year follow-up study. *Systematic and Applied Microbiology*, *25*(2), 287-293. <https://doi.org/10.1078/0723-2020-00097>

- Bender, G. R., & Marquis, R. E. (1985). Spore heat resistance and specific mineralization. *Applied and Environmental Microbiology*, *50*(6), 1414-1421. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC238773/>
- Berente, B., De la Calle García, D., Reichenbacher, M., & Danzer, K. (2000). Method development for the determination of anthocyanins in red wines by high-performance liquid chromatography and classification of German red wines by means of multivariate statistical methods. *Journal of Chromatography A*, *871*(1-2), 95-103. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(99\)01272-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(99)01272-8)
- Berezin, M. Y., & Achilefu, S. (2010). Fluorescence Lifetime Measurements and Biological Imaging. *Chemical Reviews*, *110*(5), 2641-2684. <https://doi.org/10.1021/cr900343z>
- Blateyron, L., & Sablayrolles, J. M. (2001). Stuck and slow fermentations in enology : Statistical study of causes and effectiveness of combined additions of oxygen and diammonium phosphate. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, *91*(2), 184-189. [https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(01\)80063-3](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(01)80063-3)
- Boselli, E., Minardi, M., Giomo, A., & Frega, N. G. (2006). Phenolic composition and quality of white d.o.c. Wines from Marche (Italy). *Analytica Chimica Acta*, *563*(1-2), 93-100. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2005.10.024>
- Bouix, M., & Ghorbal, S. (2015). Rapid assessment of *Oenococcus oeni* activity by measuring intracellular pH and membrane potential by flow cytometry, and its application to the more effective control of malolactic fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, *193*, 139-146. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.10.019>
- Boulton, R. (2001). *The Copigmentation of Anthocyanins and Its Role in the Color of Red Wine: A Critical Review*. 21.
- Breniaux, M. (2018). *Étude de la tolérance à l'acidité et aux polyphénols chez Oenococcus oeni, de la caractérisation des effets à l'identification des mécanismes de réponse aux stress*. 254.
- Bronk, B. V., Shoaibi, A., Nudelman, R., & Akinyemi, A. N. (2000). *Physical perturbation for fluorescent characterization of microorganism particles* (P. J. Gardner, Éd.; p. 169). <https://doi.org/10.1117/12.394077>
- Brouillard, R., & Delaporte, B. (1977). Chemistry of anthocyanin pigments. 2. Kinetic and thermodynamic study of proton transfer, hydration, and tautomeric reactions of malvidin 3-glucoside. *Journal of the American Chemical Society*, *99*(26), 8461-8468. <https://doi.org/10.1021/ja00468a015>
- Cable, M. L., Kirby, J. P., Sorasaene, K., Gray, H. B., & Ponce, A. (2007). Bacterial Spore Detection by [Tb³⁺ (macrocycle)(dipicolinate)] Luminescence. *Journal of the American Chemical Society*, *129*(6), 1474-1475. <https://doi.org/10.1021/ja061831t>
- Cabrera-Bañegil, M., Hurtado-Sánchez, M. del C., Galeano-Díaz, T., & Durán-Merás, I. (2017). Front-face fluorescence spectroscopy combined with second-order multivariate algorithms for the quantification of polyphenols in red wine samples. *Food Chemistry*, *220*, 168-176. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.152>
- Carando, S., Teissedre, P. L., Waffo-Téguo, P., Cabanis, J. C., Deffieux, G., & Mérillon, J. M. (1999). High-performance liquid chromatography coupled with fluorescence detection

- for the determination of trans-astringin in wine. *Journal of Chromatography A*, *849*(2), 617-620. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(99\)00595-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(99)00595-6)
- Carreté, R., Vidal, M. T., Bordons, A., & Constanti, M. (2002). Inhibitory effect of sulfur dioxide and other stress compounds in wine on the ATPase activity of *Oenococcus oeni*. *FEMS Microbiology Letters*, *211*(2), 155-159. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2002.tb11218.x>
- Castaldo, Narváez, Izzo, Graziani, Gaspari, Minno, & Ritieni. (2019). Red Wine Consumption and Cardiovascular Health. *Molecules*, *24*(19), 3626. <https://doi.org/10.3390/molecules24193626>
- Castillo-Muñoz, N., Gómez-Alonso, S., García-Romero, E., & Hermosín-Gutiérrez, I. (2007). Flavonol Profiles of *Vitis vinifera* Red Grapes and Their Single-Cultivar Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *55*(3), 992-1002. <https://doi.org/10.1021/jf062800k>
- Cazemier, A. E., Wagenaars, S. F. M., & ter Steeg, P. F. (2001). Effect of sporulation and recovery medium on the heat resistance and amount of injury of spores from spoilage bacilli. *Journal of Applied Microbiology*, *90*(5), 761-770. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01302.x>
- Chidi, B. S., Rossouw, D., Buica, A. S., & Bauer, F. F. (2015). Determining the Impact of Industrial Wine Yeast Strains on Organic Acid Production Under White and Red Wine-like Fermentation Conditions. *South African Journal of Enology and Viticulture*, *36*(3). <https://doi.org/10.21548/36-3-965>
- Chira, K., Pacella, N., Jourdes, M., & Teissedre, P.-L. (2011). Chemical and sensory evaluation of Bordeaux wines (Cabernet-Sauvignon and Merlot) and correlation with wine age. *Food Chemistry*, *126*(4), 1971-1977. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.12.056>
- Coelho, C., Aron, A., Roullier-Gall, C., Gonsior, M., Schmitt-Kopplin, P., & Gougeon, R. D. (2015). Fluorescence Fingerprinting of Bottled White Wines Can Reveal Memories Related to Sulfur Dioxide Treatments of the Must. *Analytical Chemistry*, *87*(16), 8132-8137. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b00388>.
- Conde, C., Silva, P., Fontes, N., Dias, A. C. P., Tavares, R. M., Sousa, M. J., Agasse, A., Delrot, S., & Gerós, H. (2007). *Biochemical Changes throughout Grape Berry Development and Fruit and Wine Quality*. 22.
- Coombe, B. G. (1987). *Distribution of Solutes within the Developing Grape Berry in Relation to Its Morphology*. *38*(2), 8.
- 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*(21), 6778-6787. <https://doi.org/10.1128/jb.179.21.6778-6787.1997>
- Cowan, A. E., Olivastro, E. M., Koppel, D. E., Loshon, C. A., Setlow, B., & Setlow, P. (2004). Lipids in the inner membrane of dormant spores of *Bacillus* species are largely immobile. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *101*(20), 7733-7738. <https://doi.org/10.1073/pnas.0306859101>

- Crans, D. C., Yang, L., Jakusch, T., & Kiss, T. (2000). Aqueous Chemistry of Ammonium (Dipicolinato)oxovanadate(V): The First Organic Vanadium(V) Insulin-Mimetic Compound. *Inorganic Chemistry*, *39*(20), 4409-4416. <https://doi.org/10.1021/ic9908367>
- Davis, C. R., Wibowo, D., & Eschenbruch, R. (1985). *Practical Implications of Malolactic Fermentation: A Review*. *36*(4), 12.
- Davis, C. R., Wibowo, D. J., Lee, T. H., & Fleet, G. H. (1986). Growth and Metabolism of Lactic Acid Bacteria during and after Malolactic Fermentation of Wines at Different pH. *Applied and Environmental Microbiology*, *51*(3), 539-545. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC238915/>
- de Hoon, M. J. L., Eichenberger, P., & Vitkup, D. (2010). Hierarchical Evolution of the Bacterial Sporulation Network. *Current Biology*, *20*(17), R735-R745. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2010.06.031>
- Desnous, C., Guillaume, D., & Clivio, P. (2010). Spore Photoproduct: A Key to Bacterial Eternal Life. *Chemical Reviews*, *110*(3), 1213-1232. <https://doi.org/10.1021/cr0781972>
- Deytieux, C., Mussard, L., Biron, M.-J., & Salmon, J.-M. (2005). Fine measurement of ergosterol requirements for growth of *Saccharomyces cerevisiae* during alcoholic fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *68*(2), 266-271. <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1872-3>
- Diomandé, S. E., Nguyen-The, C., Guinebretière, M.-H., Broussolle, V., & Brillard, J. (2015). Role of fatty acids in *Bacillus* environmental adaptation. *Frontiers in Microbiology*, *6*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00813>
- Divol, B., du Toit, M., & Duckitt, E. (2012). Surviving in the presence of sulphur dioxide: Strategies developed by wine yeasts. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *95*(3), 601-613. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4186-x>
- Douki, T., Setlow, B., & Setlow, P. (2005). Photosensitization of DNA by dipicolinic acid, a major component of spores of *Bacillus* species. *Photochemical & Photobiological Sciences*, *4*(8), 591. <https://doi.org/10.1039/b503771a>
- Dreeskamp, H., Koch, E., & Zander, M. (1975). Fluorescence of bromoperylenes and the requirements of heavy-atom quenching. *Chemical Physics Letters*, *31*(2), 251-253. [https://doi.org/10.1016/0009-2614\(75\)85014-7](https://doi.org/10.1016/0009-2614(75)85014-7)
- Dufour, É., Letort, A., Laguet, A., Lebecque, A., & Serra, J. N. (2006). Investigation of variety, typicality and vintage of French and German wines using front-face fluorescence spectroscopy. *Analytica Chimica Acta*, *563*(1-2), 292-299. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2005.11.005>
- Elcoroaristizabal, S., Callejon, R. M., Amigo, J. M., Ocana-Gonzalez, J. A., Morales, M. L., & Ubeda, C. (2016). Fluorescence excitation-emission matrix spectroscopy as a tool for determining quality of sparkling wines. *Food Chem*, *206*, 284-290. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.03.037>
- Emilio, B., Katia, C., & Zelindro, C. P. (2017). Total polyphenols contents in different grapevine varieties in highlands of southern brazil. *BIO Web of Conferences*, *5*.

- Errington, J. (1993). *Bacillus subtilis* sporulation : Regulation of gene expression and control of morphogenesis. *Microbiological Reviews*, *57*(1), 1-33. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC372899/>
- Errington, J. (2003). Regulation of endospore formation in *Bacillus subtilis*. *Nature Reviews Microbiology*, *1*(2), 117-126. <https://doi.org/10.1038/nrmicro750>
- Fang, T., & Dalmasso, J. (1993). Antimicrobial activity of sulfur dioxide to certain lactic acid bacteria isolated from wines. *Zhonghua Minguo wei sheng wu ji mian yi xue za zhi = Chinese journal of microbiology and immunology*, *26*, 116-131.
- Fernández-Mar, M. I., Mateos, R., García-Parrilla, M. C., Puertas, B., & Cantos-Villar, E. (2012). Bioactive compounds in wine : Resveratrol, hydroxytyrosol and melatonin: A review. *Food Chemistry*, *130*(4), 797-813. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.08.023>
- Ferreira-Lima, N., Vallverdú-Queralt, A., Meudec, E., Pinasseau, L., Verbaere, A., Bordignon-Luiz, M. T., Le Guernevé, C., Cheynier, V., & Sommerer, N. (2018). Quantification of hydroxycinnamic derivatives in wines by UHPLC-MRM-MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *410*(15), 3483-3490. <https://doi.org/10.1007/s00216-017-0759-y>
- Fontes, N., Gerós, H., & Delrot, S. (2011). Grape Berry Vacuole: A Complex and Heterogeneous Membrane System Specialized in the Accumulation of Solutes. *American Journal of Enology and Viticulture*, *62*(3), 270-278. <https://doi.org/10.5344/ajev.2011.10125>
- Fornairon-Bonnefond, C., Aguera, E., Deytieux, C., Sablayrolles, J.-M., & Salmon, J.-M. (2003). Impact of oxygen addition during enological fermentation on sterol contents in yeast lees and their reactivity towards oxygen. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, *95*(5), 496-503. [https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(03\)80051-8](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(03)80051-8)
- Fornairon-Bonnefond, C., Demaretz, V., Rosenfeld, E., & Salmon, J.-M. (2002). Oxygen addition and sterol synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* during enological fermentation. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, *93*(2), 176-182. [https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(02\)80011-1](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(02)80011-1)
- Freedman, B. J. (1980). Sulphur dioxide in foods and beverages : Its use as a preservative and its effect on asthma. *British Journal of Diseases of the Chest*, *74*, 128-134. [https://doi.org/10.1016/0007-0971\(80\)90023-6](https://doi.org/10.1016/0007-0971(80)90023-6)
- Fujita, M., & Losick, R. (2005). Evidence that entry into sporulation in *Bacillus subtilis* is governed by a gradual increase in the level and activity of the master regulator Spo0A. *Genes & Development*, *19*(18), 2236-2244. <https://doi.org/10.1101/gad.1335705>
- Gammacurta, M., Marchand, S., Moine, V., & de Revel, G. (2017). Influence of different yeast/lactic acid bacteria combinations on the aromatic profile of red Bordeaux wine : Influence of yeast/lactic acid bacteria combinations on the aromatic profile of red wine. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *97*(12), 4046-4057. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8272>
- Garrido, J., & Borges, F. (2013). Wine and grape polyphenols—A chemical perspective. *Food Research International*, *54*(2), 1844-1858. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.08.002>

- Gauvry, E., Mathot, A.-G., Leguérinel, I., Couvert, O., Postollec, F., Broussolle, V., & Coroller, L. (2017). Knowledge of the physiology of spore-forming bacteria can explain the origin of spores in the food environment. *Research in Microbiology*, *168*(4), 369-378. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2016.10.006>
- Gerhardt, P., & Marquis, R. E. (1989). Spore Thermoresistance Mechanisms. *Slepecky, R.A. and Setlow, P., Eds., Regulation of Prokaryotic Development, American Society for Microbiology, Washington DC*, 43-63.
- González-Pastor, J. E. (2011). Cannibalism : A social behavior in sporulating *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiology Reviews*, *35*(3), 415-424. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2010.00253.x>
- González-Sáiz, J. M., Esteban-Díez, I., Rodríguez-Tecedor, S., Pérez-del-Notario, N., Arenzana-Rámila, I., & Pizarro, C. (2014). Modulation of the phenolic composition and colour of red wines subjected to accelerated ageing by controlling process variables. *Food Chemistry*, *165*, 271-281. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.05.016>
- Gorena, T., Saez, V., Mardones, C., Vergara, C., Winterhalter, P., & von Baer, D. (2014). Influence of post-pruning storage on stilbenoid levels in *Vitis vinifera* L. canes. *Food Chemistry*, *155*, 256-263. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.01.073>
- Griffiths, K. K., & Setlow, P. (2009). Effects of modification of membrane lipid composition on *Bacillus subtilis* sporulation and spore properties. *Journal of Applied Microbiology*, *106*(6), 2064-2078. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04176.x>
- Grossman, A. D., & Losick, R. (1988). Extracellular control of spore formation in *Bacillus subtilis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *85*(12), 4369-4373. <https://doi.org/10.1073/pnas.85.12.4369>
- Gutiérrez, A., Chiva, R., Sancho, M., Beltran, G., Arroyo-López, F. N., & Guillamon, J. M. (2012). Nitrogen requirements of commercial wine yeast strains during fermentation of a synthetic grape must. *Food Microbiology*, *31*(1), 25-32. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.02.012>
- Gutiérrez-Escobar, R., Aliaño-González, M. J., & Cantos-Villar, E. (2021). Wine Polyphenol Content and Its Influence on Wine Quality and Properties : A Review. *Molecules*, *26*(3), 718. <https://doi.org/10.3390/molecules26030718>
- Guzzo, J., Jobin, M.-P., & DiviÃs, C. (1998). Increase of sulfite tolerance in *Oenococcus oeni* by means of acidic adaptation. *FEMS Microbiology Letters*, *160*(1), 43-47. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1998.tb12888.x>
- Hachisuka, Y., Kozuka, S., & Tsujikawa, M. (1984). Exosporia and Appendages of Spores of *Bacillus* Species. *Microbiology and Immunology*, *28*(5), 619-624. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.1984.tb00714.x>
- Hameka, H. F., Jensen, J. O., Jensen, J. L., Merrow, C. N., & Vlahacos, C. P. (1996). Theoretical studies of the fluorescence of dipicolinic acid and its anion. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM*, *365*(2-3), 131-141. [https://doi.org/10.1016/0166-1280\(96\)04487-9](https://doi.org/10.1016/0166-1280(96)04487-9)

- Heard, G. M., & Fleet, G. H. (1988). The effects of temperature and pH on the growth of yeast species during the fermentation of grape juice. *Journal of Applied Bacteriology*, *65*(1), 23-28. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1988.tb04312.x>
- Henriques, A. O., & Moran, Jr., C. P. (2007). Structure, Assembly, and Function of the Spore Surface Layers. *Annual Review of Microbiology*, *61*(1), 555-588. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.61.080706.093224>
- Hernández, M. J., García-Moreno, M. V., Durán, E., Guillén, D., & Barroso, C. G. (2006). Validation of two analytical methods for the determination of ochratoxin A by reversed-phased high-performance liquid chromatography coupled to fluorescence detection in musts and sweet wines from Andalusia. *Analytica Chimica Acta*, *566*(1), 117-121. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2006.02.002>
- Hernandez-Orte, P., Cersosimo, M., Loscos, N., Cacho, J., Garcia-Moruno, E., & Ferreira, V. (2009). Aroma development from non-floral grape precursors by wine lactic acid bacteria. *Food Research International*, *42*(7), 773-781. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.02.023>
- Higgins, D., & Dworkin, J. (2012). Recent progress in *Bacillus subtilis* sporulation. *FEMS Microbiology Reviews*, *36*(1), 131-148. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00310.x>
- Hindle, A. A., & Hall, E. A. H. (1999). Dipicolinic acid (DPA) assay revisited and appraised for spore detection. *The Analyst*, *124*(11), 1599-1604. <https://doi.org/10.1039/a906846e>
- Hoch, J. A. (1976). Genetics of Bacterial Sporulation. In *Advances in Genetics* (Vol. 18, p. 69-98). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0065-2660\(08\)60437-X](https://doi.org/10.1016/S0065-2660(08)60437-X)
- Hoch, J. A. (1993). Regulation of the phosphorelay and the initiation of sporulation in *Bacillus subtilis*. *Annual Review of Microbiology*, *47*(1), 441-465. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.47.100193.002301>
- Hornedo-Ortega, R., González-Centeno, M. R., Chira, K., Jourdes, M., & Teissedre, P.-L. (2021). Phenolic Compounds of Grapes and Wines: Key Compounds and Implications in Sensory Perception. In F. Cosme, F. M. Nunes, & L. Filipe-Ribeiro (Éds.), *Chemistry and Biochemistry of Winemaking, Wine Stabilization and Aging*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.93127>
- Houillé, B., Besseau, S., Courdavault, V., Oudin, A., Glévarec, G., Delanoue, G., Guérin, L., Simkin, A. J., Papon, N., Clastre, M., Giglioli-Guivarc'h, N., & Lanoue, A. (2015). Biosynthetic Origin of *E*-Resveratrol Accumulation in Grape Canes during Postharvest Storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *63*(5), 1631-1638. <https://doi.org/10.1021/jf505316a>
- Huang, S., Chen, D., Pelczar, P. L., Vepachedu, V. R., Setlow, P., & Li, Y. (2007). Levels of Ca²⁺-Dipicolinic Acid in Individual *Bacillus* Spores Determined Using Microfluidic Raman Tweezers. *Journal of Bacteriology*, *189*(13), 4681-4687. <https://doi.org/10.1128/JB.00282-07>
- Igura, N., Kamimura, Y., Islam, M. S., Shimoda, M., & Hayakawa, I. (2003). Effects of Minerals on Resistance of *Bacillus subtilis* Spores to Heat and Hydrostatic Pressure. *Applied and*

- Environmental Microbiology*, *69*(10), 6307-6310.
<https://doi.org/10.1128/AEM.69.10.6307-6310.2003>
- Imamura, D., Kuwana, R., Takamatsu, H., & Watabe, K. (2010). Localization of Proteins to Different Layers and Regions of *Bacillus subtilis* Spore Coats. *Journal of Bacteriology*, *192*(2), 518-524. <https://doi.org/10.1128/JB.01103-09>
- Izquierdo Cañas, P. M., García Romero, E., Gómez Alonso, S., & Palop Herreros, M. L. L. (2008). Changes in the aromatic composition of Tempranillo wines during spontaneous malolactic fermentation. *Journal of Food Composition and Analysis*, *21*(8), 724-730. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2007.12.005>
- Jackowetz, J. N., & Mira de Orduña, R. (2012). Metabolism of SO₂ binding compounds by *Oenococcus oeni* during and after malolactic fermentation in white wine. *International Journal of Food Microbiology*, *155*(3), 153-157. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.01.025>
- Jackson, R. S. (2008). Grapevine Structure and Function. In *Wine Science* (p. 50-107). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-012373646-8.50006-8>
- Jeffery, D. W., Parker, M., & Smith, P. A. (2008). Flavonol composition of Australian red and white wines determined by high-performance liquid chromatography. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, ???-??? <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2008.00017.x>
- Kallithraka, S., Salacha, M. I., & Tzourou, I. (2009). Changes in phenolic composition and antioxidant activity of white wine during bottle storage: Accelerated browning test versus bottle storage. *Food Chemistry*, *113*(2), 500-505. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.07.083>
- Karoui, R., Martin, B., & Dufour, É. (2005). *Potentiality of front-face fluorescence spectroscopy to determine the geographic origin of milks from the Haute-Loire department (France)*. 14.
- Katalinić, V., Milos, M., Modun, D., Musić, I., & Boban, M. (2004). Antioxidant effectiveness of selected wines in comparison with (+)-catechin. *Food Chemistry*, *86*(4), 593-600. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2003.10.007>
- Kennedy, J. A., Saucier, C., & Glories, Y. (2006). *Grape and Wine Phenolics: History and Perspective*. 10.
- Kim, H., Hahn, M., Grabowski, P., McPherson, D. C., Otte, M. M., Wang, R., Ferguson, C. C., Eichenberger, P., & Driks, A. (2006). The *Bacillus subtilis* spore coat protein interaction network: Spore coat interaction network. *Molecular Microbiology*, *59*(2), 487-502. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04968.x>
- Kliwer, W. M. (1966). Sugars and Organic Acids of *Vitis vinifera*. *Plant Physiology*, *41*(6), 923-931. <https://doi.org/10.1104/pp.41.6.923>
- Kliwer, W. M., Lider, L. A., & Schultz, H. B. (1967). Influence of Artificial Shading of Vineyards on the Concentration of Sugar and Organic Acid in Grapes. *American Journal of Enology and Viticulture*, *18*(2), 78. <http://www.ajevonline.org/content/18/2/78.abstract>

- Kong, L., Setlow, P., & Li, Y. (2012). Analysis of the Raman spectra of Ca²⁺-dipicolinic acid alone and in the bacterial spore core in both aqueous and dehydrated environments. *The Analyst*, *137*(16), 3683. <https://doi.org/10.1039/c2an35468c>
- Kourkoutas, Y., Bekatorou, A., Banat, I. M., Marchant, R., & Koutinas, A. A. (2004). Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: A review. *Food Microbiology*, *21*(4), 377-397. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2003.10.005>
- Kozuka, S., & Tochikubo, K. (1985). Properties and Origin of Filamentous Appendages on Spores of *Bacillus cereus*. *Microbiology and Immunology*, *29*(1), 21-37. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.1985.tb00799.x>
- Kučerová, J., & Široký, J. (2014). Study of changes organic acids in red wines during malolactic fermentation. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, *59*(5), 145-150. <https://doi.org/10.11118/actaun201159050145>
- Lakowicz, J. R. (1983). *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Springer US. <https://doi.org/10.1007/978-1-4615-7658-7>
- Lakowicz, J. R. (Éd.). (2006). *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Springer US. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-46312-4>
- Lakowicz, J. R., & Balter, A. (1982). DIRECT RECORDING OF THE INITIALLY EXCITED AND THE SOLVENT RELAXED FLUORESCENCE EMISSION SPECTRA OF TRYPTOPHAN BY PHASE SENSITIVE DETECTION OF FLUORESCENCE. *Photochemistry and Photobiology*, *36*(2), 125-132. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1982.tb04353.x>
- Lakowicz, J. R., Bevan, D. R., Maliwal, B. P., Cherek, H., & Balter, A. (1983). Synthesis and characterization of a fluorescence probe of the transition and dynamic properties of membranes. *Biochemistry*, *22*(25), 5714-5722. <https://doi.org/10.1021/bi00294a006>
- Lakowicz, J. R., & Masters, B. R. (2008). Principles of Fluorescence Spectroscopy, Third Edition. *Journal of Biomedical Optics*, *13*(2), 029901. <https://doi.org/10.1117/1.2904580>
- Lambert, C., Richard, T., Renouf, E., Bisson, J., Waffo-Téguo, P., Bordenave, L., Ollat, N., Mérillon, J.-M., & Cluzet, S. (2013). Comparative Analyses of Stilbenoids in Canes of Major *Vitis vinifera* L. Cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *61*(47), 11392-11399. <https://doi.org/10.1021/jf403716y>
- Lamikanra, O., Inyang, I. D., & Leong, S. (1995). Distribution and Effect of Grape Maturity on Organic Acid Content of Red Muscadine Grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *43*(12), 3026-3028. <https://doi.org/10.1021/jf00060a007>
- Lasik, M. (2013). The application of malolactic fermentation process to create good-quality grape wine produced in cool-climate countries: A review. *European Food Research and Technology*, *237*(6), 843-850. <https://doi.org/10.1007/s00217-013-2083-x>
- Leggett, M. J., McDonnell, G., Denyer, S. P., Setlow, P., & Maillard, J.-Y. (2012). Bacterial spore structures and their protective role in biocide resistance: Spore structure and biocide resistance. *Journal of Applied Microbiology*, *113*(3), 485-498. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05336.x>

- Lena do Nascimento Silva, F., Schmidt, E. M., Messias, C. L., Eberlin, M. N., & Helena Frankland Sawaya, A. C. (2015). Quantitation of organic acids in wine and grapes by direct infusion electrospray ionization mass spectrometry. *Analytical Methods*, 7(1), 53-62. <https://doi.org/10.1039/C4AY00114A>
- Lewis, J. C. (1967). Determination of dipicolinic acid in bacterial spores by ultraviolet spectrometry of the calcium chelate. *Analytical Biochemistry*, 19(2), 327-337. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(67\)90168-6](https://doi.org/10.1016/0003-2697(67)90168-6)
- Lindsay, J. A., Beaman, T. C., & Gerhardt, P. (1985). Protoplast water content of bacterial spores determined by buoyant density sedimentation. *Journal of Bacteriology*, 163(2), 735-737. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC219183/>
- Liu, H.-F., Wu, B.-H., Fan, P.-G., Li, S.-H., & Li, L.-S. (2006). Sugar and acid concentrations in 98 grape cultivars analyzed by principal component analysis. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86(10), 1526-1536. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2541>
- Loison, P., Hosny, N. A., Gervais, P., Champion, D., Kuimova, M. K., & Perrier-Cornet, J.-M. (2013). Direct investigation of viscosity of an atypical inner membrane of *Bacillus* spores: A molecular rotor/FLIM study. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1828(11), 2436-2443. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2013.06.028>
- Lonvaud-Funel, A., & de Saad, A. M. S. (1982). Purification and Properties of a Malolactic Enzyme from a Strain of *Leuconostoc mesenteroides* Isolated from Grapes. *Applied and Environmental Microbiology*, 43(2), 357-361. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC241831/>
- López, D., Vlamakis, H., Losick, R., & Kolter, R. (2009). Cannibalism enhances biofilm development in *Bacillus subtilis*: Cannibalism and biofilm matrix. *Molecular Microbiology*, 74(3), 609-618. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06882.x>
- López, I., Tenorio, C., Zarazaga, M., Dizy, M., Torres, C., & Ruiz-Larrea, F. (2007). Evidence of mixed wild populations of *Oenococcus oeni* strains during wine spontaneous malolactic fermentations. *European Food Research and Technology*, 226(1-2), 215-223. <https://doi.org/10.1007/s00217-006-0529-0>
- Loubiere, P., Salou, P., Leroy, M. J., Lindley, N. D., & Pareilleux, A. (1992). Electrogenic malate uptake and improved growth energetics of the malolactic bacterium *Leuconostoc oenos* grown on glucose-malate mixtures. *Journal of Bacteriology*, 174(16), 5302-5308. <https://doi.org/10.1128/jb.174.16.5302-5308.1992>
- Ma, W., Guo, A., Zhang, Y., Wang, H., Liu, Y., & Li, H. (2014). A review on astringency and bitterness perception of tannins in wine. *Trends in Food Science & Technology*, 40(1), 6-19. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.08.001>
- Magill, N. G., Cowan, A. E., Koppel, D. E., & Setlow, P. (1994). The internal pH of the forespore compartment of *Bacillus megaterium* decreases by about 1 pH unit during sporulation. *Journal of Bacteriology*, 176(8), 2252-2258. <https://doi.org/10.1128/jb.176.8.2252-2258.1994>
- Maicas, S. (2001). The use of alternative technologies to develop malolactic fermentation in wine. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56(1-2), 35-39. <https://doi.org/10.1007/s002530100662>

- Maicas, S., Gil, J.-V., Pardo, I., & Ferrer, S. (1999). Improvement of volatile composition of wines by controlled addition of malolactic bacteria. *Food Research International*, *32*(7), 491-496. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(99\)00122-2](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(99)00122-2)
- Makris, D. P., Kallithraka, S., & Kefalas, P. (2006). Flavonols in grapes, grape products and wines: Burden, profile and influential parameters. *Journal of Food Composition and Analysis*, *19*(5), 396-404. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2005.10.003>
- Marchal, A., Marullo, P., Moine, V., & Dubourdieu, D. (2011). Influence of Yeast Macromolecules on Sweetness in Dry Wines: Role of the *Saccharomyces cerevisiae* Protein Hsp12. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *59*(5), 2004-2010. <https://doi.org/10.1021/jf103710x>
- Marullo, P., Bely, M., Masneufpomarede, I., Aigle, M., & Dubourdieu, D. (2004). Inheritable nature of enological quantitative traits is demonstrated by meiotic segregation of industrial wine yeast strains. *FEMS Yeast Research*, *4*(7), 711-719. <https://doi.org/10.1016/j.femsyr.2004.01.006>
- Masneuf-Pomarède, I., Mansour, C., Murat, M., Tominaga, T., & Dubourdieu, D. (2006). Influence of fermentation temperature on volatile thiols concentrations in Sauvignon blanc wines. *International Journal of Food Microbiology*, S016816050600050X. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.01.001>
- Mato, I., Suárez-Luque, S., & Huidobro, J. F. (2005). A review of the analytical methods to determine organic acids in grape juices and wines. *Food Research International*, *38*(10), 1175-1188. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2005.04.007>
- Matz, L. L., Beaman, T. C., & Gerhardt, P. (1970). Chemical Composition of Exosporium from Spores of *Bacillus cereus*. *Journal of Bacteriology*, *101*(1), 196-201. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC250470/>
- McDonald, M. S., Hughes, M., Burns, J., Lean, M. E. J., Matthews, D., & Crozier, A. (1998). Survey of the Free and Conjugated Myricetin and Quercetin Content of Red Wines of Different Geographical Origins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *46*(2), 368-375. <https://doi.org/10.1021/jf970677e>
- McKenney, P. T., Driks, A., & Eichenberger, P. (2013). The *Bacillus subtilis* endospore: Assembly and functions of the multilayered coat. *Nature Reviews Microbiology*, *11*(1), 33-44. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2921>
- McKenney, P. T., Driks, A., Eskandarian, H. A., Grabowski, P., Guberman, J., Wang, K. H., Gitai, Z., & Eichenberger, P. (2010). A Distance-Weighted Interaction Map Reveals a Previously Uncharacterized Layer of the *Bacillus subtilis* Spore Coat. *Current Biology*, *20*(10), 934-938. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2010.03.060>
- Meador-Parton, J., & Popham, D. L. (2000). Structural Analysis of *Bacillus subtilis* Spore Peptidoglycan during Sporulation. *Journal of Bacteriology*, *182*(16), 4491-4499. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC94620/>
- Melly, E., Genest, P. C., Gilmore, M. E., Little, S., Popham, D. L., Driks, A., & Setlow, P. (2002). Analysis of the properties of spores of *Bacillus subtilis* prepared at different temperatures. *Journal of Applied Microbiology*, *92*(6), 1105-1115. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2002.01644.x>

- Mendes-Ferreira, A., Barbosa, C., Falco, V., Leão, C., & Mendes-Faia, A. (2009). The production of hydrogen sulphide and other aroma compounds by wine strains of *Saccharomyces cerevisiae* in synthetic media with different nitrogen concentrations. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, *36*(4), 571-583. <https://doi.org/10.1007/s10295-009-0527-x>
- Méndez, M. B., Orsaria, L. M., Philippe, V., Pedrido, M. E., & Grau, R. R. (2004). Novel Roles of the Master Transcription Factors Spo0A and σ^B for Survival and Sporulation of *Bacillus subtilis* at Low Growth Temperature. *Journal of Bacteriology*, *186*(4), 989-1000. <https://doi.org/10.1128/JB.186.4.989-1000.2004>
- Molina, A. M., Swiegers, J. H., Varela, C., Pretorius, I. S., & Agosin, E. (2007). Influence of wine fermentation temperature on the synthesis of yeast-derived volatile aroma compounds. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *77*(3), 675-687. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-1194-3>
- Moreno-Arribas, M. V., & Polo, M. C. (Éds.). (2009). *Wine Chemistry and Biochemistry*. Springer New York. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-74118-5>
- Morlot, C., Uehara, T., Marquis, K. A., Bernhardt, T. G., & Rudner, D. Z. (2010). A highly coordinated cell wall degradation machine governs spore morphogenesis in *Bacillus subtilis*. *Genes & Development*, *24*(4), 411-422. <https://doi.org/10.1101/gad.1878110>
- Mortimer, R., & Polsinelli, M. (1999). On the origins of wine yeast. *Research in Microbiology*, *150*(3), 199-204. [https://doi.org/10.1016/S0923-2508\(99\)80036-9](https://doi.org/10.1016/S0923-2508(99)80036-9)
- Murphy, K. R., Stedmon, C. A., Graeber, D., & Bro, R. (2013). Fluorescence spectroscopy and multi-way techniques. *PARAFAC. Analytical Methods*, *5*(23), 6557-6566. <https://doi.org/10.1039/C3AY41160E>
- Nakashio, S., & Gerhardt, P. (1985). Protoplast dehydration correlated with heat resistance of bacterial spores. *Journal of Bacteriology*, *162*(2), 571-578. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC218886/>
- Naouri, P., Chagnaud, P., Arnaud, A., & Galzy, P. (1990). Purification and properties of a malolactic enzyme from *Leuconostoc oenos* ATCC 23278. *Journal of Basic Microbiology*, *30*(8), 577-585. <https://doi.org/10.1002/jobm.3620300813>
- Nardi, G., Lineros-Rosa, M., Palumbo, F., Miranda, M. A., & Lhiaubet-Vallet, V. (2021). Spectroscopic characterization of dipicolinic acid and its photoproducts as thymine photosensitizers. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, *245*, 118898. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2020.118898>
- Nguyen Thi Minh, H., Durand, A., Loison, P., Perrier-Cornet, J.-M., & Gervais, P. (2011). Effect of sporulation conditions on the resistance of *Bacillus subtilis* spores to heat and high pressure. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *90*(4), 1409-1417. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3183-9>
- Nguyen Thi Minh, H., Perrier-Cornet, J.-M., & Gervais, P. (2008). Effect of the osmotic conditions during sporulation on the subsequent resistance of bacterial spores. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *80*(1), 107. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1519-x>

- Nicholson, W. L., Munakata, N., Horneck, G., Melosh, H. J., & Setlow, P. (2000). Resistance of *Bacillus* Endospores to Extreme Terrestrial and Extraterrestrial Environments. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *64*(3), 548-572. <https://doi.org/10.1128/MMBR.64.3.548-572.2000>
- Noell, A. C., Ely, T., Bolser, D. K., Darrach, H., Hodyss, R., Johnson, P. V., Hein, J. D., & Ponce, A. (2015). Spectroscopy and Viability of *Bacillus subtilis* Spores after Ultraviolet Irradiation: Implications for the Detection of Potential Bacterial Life on Europa. *Astrobiology*, *15*(1), 20-31. <https://doi.org/10.1089/ast.2014.1169>
- Nudelman, R., Bronk, B. V., & Efrima, S. (2000). Fluorescence Emission Derived from Dipicolinic Acid, its Sodium, and its Calcium Salts. *Applied Spectroscopy*, *54*(3), 445-449. <https://doi.org/10.1366/0003702001949564>
- Osborne, J. P., Dube Morneau, A., & Mira de Orduna, R. (2006). Degradation of free and sulfur-dioxide-bound acetaldehyde by malolactic lactic acid bacteria in white wine. *Journal of Applied Microbiology*, *101*(2), 474-479. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.02947.x>
- Osborne, J. P., Mira de Orduña, R., Pilone, G. J., & Liu, S.-Q. (2000). Acetaldehyde metabolism by wine lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, *191*(1), 51-55. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2000.tb09318.x>
- Paidhungat, M., Setlow, B., Driks, A., & Setlow, P. (2000). Characterization of Spores of *Bacillus subtilis* Which Lack Dipicolinic Acid. *Journal of Bacteriology*, *182*(19), 5505-5512. <https://doi.org/10.1128/JB.182.19.5505-5512.2000>
- Paidhungat, M., & Setlow, P. (2001). Localization of a Germinant Receptor Protein (GerBA) to the Inner Membrane of *Bacillus subtilis* Spores. *Journal of Bacteriology*, *183*(13), 3982-3990. <https://doi.org/10.1128/JB.183.13.3982-3990.2001>
- Palma, M., & Barroso, C. G. (2002). Ultrasound-assisted extraction and determination of tartaric and malic acids from grapes and winemaking by-products. *Analytica Chimica Acta*, *458*(1), 119-130. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(01\)01527-6](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(01)01527-6)
- Pandey, N. K., & Aronson, A. I. (1979). Properties of the *Bacillus subtilis* spore coat. *Journal of Bacteriology*, *137*(3), 1208-1218. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC218303/>
- Parker, G. F., Daniel, R. A., & Errington, J. (1996). Timing and genetic regulation of commitment to sporulation in *Bacillus subtilis*. *Microbiology*, *142*(12), 3445-3452. <https://doi.org/10.1099/13500872-142-12-3445>
- Patel, S., & Shibamoto, T. (2002). Effect of Different Strains of *Saccharomyces cerevisiae* on Production of Volatiles in Napa Gamay Wine and Petite Sirah Wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *50*(20), 5649-5653. <https://doi.org/10.1021/jf020337f>
- Patynowski, R. J., Jiranek, V., & Markides, A. J. (2002). Yeast viability during fermentation and sur lie ageing of a defined medium and subsequent growth of *Oenococcus oeni*. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, *8*(1), 62-69. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2002.tb00212.x>
- Pawlus, A. D., Sahli, R., Bisson, J., Rivière, C., Delaunay, J.-C., Richard, T., Gomès, E., Bordenave, L., Waffo-Téguo, P., & Mérillon, J.-M. (2013). Stilbenoid Profiles of Canes

- from *Vitis* and *Muscadinia* Species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *61*(3), 501-511. <https://doi.org/10.1021/jf303843z>
- Piggot, P. J., & Hilbert, D. W. (2004). Sporulation of *Bacillus subtilis*. *Current Opinion in Microbiology*, *7*(6), 579-586. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2004.10.001>
- Piñeiro, Z., Guerrero, R. F., Fernández-Marin, M. I., Cantos-Villar, E., & Palma, M. (2013). Ultrasound-Assisted Extraction of Stilbenoids from Grape Stems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *61*(51), 12549-12556. <https://doi.org/10.1021/jf4030129>
- Planchon, S., Dargaignaratz, C., Levy, C., Ginies, C., Broussolle, V., & Carlin, F. (2011). Spores of *Bacillus cereus* strain KBAB4 produced at 10°C and 30°C display variations in their properties. *Food Microbiology*, *28*(2), 291-297. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.07.015>
- Pogliano, J., Osborne, N., Sharp, M. D., Abanes-De Mello, A., Perez, A., Sun, Y.-L., & Pogliano, K. (1999). A vital stain for studying membrane dynamics in bacteria: A novel mechanism controlling septation during *Bacillus subtilis* sporulation. *Molecular Microbiology*, *31*(4), 1149-1159. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01255.x>
- Popham, D. L. (2002). Specialized peptidoglycan of the bacterial endospore: The inner wall of the lockbox. *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)*, *59*(3), 426-433. <https://doi.org/10.1007/s00018-002-8435-5>
- Popham, D. L., Helin, J., Costello, C. E., & Setlow, P. (1996). Muramic lactam in peptidoglycan of *Bacillus subtilis* spores is required for spore outgrowth but not for spore dehydration or heat resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *93*(26), 15405-15410. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.26.15405>
- Popham, D. L., Sengupta, S., & Setlow, P. (1995). Heat, hydrogen peroxide, and UV resistance of *Bacillus subtilis* spores with increased core water content and with or without major DNA-binding proteins. *Applied and Environmental Microbiology*, *61*(10), 3633-3638. <https://doi.org/10.1128/aem.61.10.3633-3638.1995>
- Popham, D. L., & Setlow, P. (1993). The cortical peptidoglycan from spores of *Bacillus megaterium* and *Bacillus subtilis* is not highly cross-linked. *Journal of Bacteriology*, *175*(9), 2767-2769. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC204583/>
- Rainieri, S., & Pretorius, I. S. (2000). *Selection and improvement of wine yeasts*. 18.
- Ramos, A., Lolkema, J. S., Konings, W. N., & Santos, H. (1995). Enzyme Basis for pH Regulation of Citrate and Pyruvate Metabolism by *Leuconostoc oenos*. *Applied and Environmental Microbiology*, *61*(4), 1303-1310. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1388408/>
- Ranaweera, R. K. R., Gilmore, A. M., Capone, D. L., Bastian, S. E. P., & Jeffery, D. W. (2021a). Spectrofluorometric analysis combined with machine learning for geographical and varietal authentication, and prediction of phenolic compound concentrations in red wine. *Food Chemistry*, *361*, 130149. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130149>.
- Ranaweera, R. K. R., Gilmore, A. M., Capone, D. L., Bastian, S. E. P., & Jeffery, D. W. (2021b). Authentication of the geographical origin of Australian Cabernet Sauvignon wines using spectrofluorometric and multi-element analyses with multivariate statistical

- modelling. *Food Chemistry*, *335*, 127592.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127592>
- Rankine, B. C. (1966). Decomposition of L-malic acid by wine yeasts. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *17*(7), 312-316. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740170707>
- Rasmussen, S. E., Frederiksen, H., Struntze Krogholm, K., & Poulsen, L. (2005). Dietary proanthocyanidins: Occurrence, dietary intake, bioavailability, and protection against cardiovascular disease. *Molecular Nutrition & Food Research*, *49*(2), 159-174. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200400082>
- Redmond, C., Baillie, L. W. J., Hibbs, S., Moir, A. J. G., & Moir, A. (2004). Identification of proteins in the exosporium of *Bacillus anthracis*. *Microbiology*, *150*(2), 355-363. <https://doi.org/10.1099/mic.0.26681-0>
- Remize, F., Sablayrolles, J. M., & Dequin, S. (2000). Re-assessment of the influence of yeast strain and environmental factors on glycerol production in wine. *Journal of Applied Microbiology*, *88*(3), 371-378. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.00964.x>
- Renouf, V., Claisse, O., & Lonvaud-Funel, A. (2007). Inventory and monitoring of wine microbial consortia. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *75*(1), 149-164. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0798-3>
- Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B., & Lonvaud, A. (Éds.). (2007). *The microbiology of wine and vinifications* (2. ed., rev.reprinted with corr). Wiley.
- Ríos-Reina, R., Azcarate, S. M., Camiña, J. M., & Goicoechea, H. C. (2020). Multi-level data fusion strategies for modeling three-way electrophoresis capillary and fluorescence arrays enhancing geographical and grape variety classification of wines. *Analytica Chimica Acta*, *1126*, 52-62. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2020.06.014>
- Rodriguez-Naranjo, M. I., Gil-Izquierdo, A., Troncoso, A. M., Cantos-Villar, E., & Garcia-Parrilla, M. C. (2011). Melatonin is synthesised by yeast during alcoholic fermentation in wines. *Food Chemistry*, *126*(4), 1608-1613. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.12.038>
- Romano, P., Suzzi, G., Turbanti, L., & Polsinelli, M. (1994). Acetaldehyde production in *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts. *FEMS Microbiology Letters*, *118*(3), 213-218. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1994.tb06830.x>
- Rosen, D. L., Sharpless, C., & McGown, L. B. (1997). Bacterial Spore Detection and Determination by Use of Terbium Dipicolinate Photoluminescence. *Analytical Chemistry*, *69*(6), 1082-1085. <https://doi.org/10.1021/ac960939w>
- Ruzal, S. M., López, C., Rivas, E., & Sánchez-Rivas, C. (1998). Osmotic Strength Blocks Sporulation at Stage II by Impeding Activation of Early Sigma Factors in *Bacillus subtilis*. *Current Microbiology*, *36*(2), 75-79. <https://doi.org/10.1007/s002849900282>
- Saad, R., Bouveresse, D. J.-R., Locquet, N., & Rutledge, D. N. (2016). Using pH variations to improve the discrimination of wines by 3D front face fluorescence spectroscopy associated to Independent Components Analysis. *Talanta*, *153*, 278-284. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.03.023>

- Sádecká, J., & Jakubíková, M. (2020). Varietal classification of white wines by fluorescence spectroscopy. *Journal of Food Science and Technology*, *57*(7), 2545-2553. <https://doi.org/10.1007/s13197-020-04291-y>
- Sagui, F. M., & Manca de Nadra, M. C. (1996). Organic acid metabolism under different glucose concentrations of *Leuconostoc oenos* from wine. *Journal of Applied Bacteriology*, *81*(4), 393-397. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1996.tb03524.x>
- Salema, M., Poolman, B., Lolkema, J. S., Dias, M. C. L., & Konings, W. N. (1994). Uniport of Monoanionic L-malate in Membrane Vesicles from *Leuconostoc Oenos*. *European Journal of Biochemistry*, *225*(1), 289-295. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1994.00289.x>
- Salmon, J.-M., Fornairon, C., & Barre, P. (1998). Determination of oxygen utilization pathways in an industrial strain of *Saccharomyces cerevisiae* during enological fermentation. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, *86*(2), 154-163. [https://doi.org/10.1016/S0922-338X\(98\)80054-8](https://doi.org/10.1016/S0922-338X(98)80054-8)
- Salou, P., Loubiere, P., & Pareilleux, A. (1994). Growth and energetics of *Leuconostoc oenos* during cometabolism of glucose with citrate or fructose. *Applied and Environmental Microbiology*, *60*(5), 1459-1466. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC201503/>
- Sanchez-Salas, J.-L., Setlow, B., Zhang, P., Li, Y., & Setlow, P. (2011). Maturation of Released Spores Is Necessary for Acquisition of Full Spore Heat Resistance during *Bacillus subtilis* Sporulation. *Applied and Environmental Microbiology*, *77*(19), 6746-6754. <https://doi.org/10.1128/AEM.05031-11>
- Sarasanandarajah, S., Kunnil, J., Bronk, B. V., & Reinisch, L. (2005). Two-dimensional multiwavelength fluorescence spectra of dipicolinic acid and calcium dipicolinate. *Applied Optics*, *44*(7), 1182. <https://doi.org/10.1364/AO.44.001182>
- Sarrafzadeh, M. H., & Navarro, J. M. (2006). The effect of oxygen on the sporulation, δ -endotoxin synthesis and toxicity of *Bacillus thuringiensis* H14. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *22*(3), 305-310. <https://doi.org/10.1007/s11274-005-9037-9>
- Sauvageot, F., & Vivier, P. (1997). Effects of Malolactic Fermentation on Sensory Properties of Four Burgundy Wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, *48*(2), 187. <http://www.ajevonline.org/content/48/2/187.abstract>
- Scutarușu, E. C., Teliban, I. V., Zamfir, C. I., Luchian, C. E., Colibaba, L. C., Niculaua, M., & Cotea, V. V. (2021). Effect of Different Winemaking Conditions on Organic Acids Compounds of White Wines. *Foods*, *10*(11), 2569. <https://doi.org/10.3390/foods10112569>
- Setlow, B., Magill, N., Febroriello, P., Nakhimovsky, L., Koppel, D. E., & Setlow, P. (1991). Condensation of the forespore nucleoid early in sporulation of *Bacillus* species. *Journal of Bacteriology*, *173*(19), 6270-6278. <https://doi.org/10.1128/jb.173.19.6270-6278.1991>
- Setlow, B., & Setlow, P. (1980). Measurements of the pH within dormant and germinated bacterial spores. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *77*(5), 2474-2476. <https://doi.org/10.1073/pnas.77.5.2474>

- Setlow, B., & Setlow, P. (1993). Binding of small, acid-soluble spore proteins to DNA plays a significant role in the resistance of *Bacillus subtilis* spores to hydrogen peroxide. *Applied and Environmental Microbiology*, *59*(10), 3418-3423. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC182468/>
- Setlow, B., & Setlow, P. (1995). Small, acid-soluble proteins bound to DNA protect *Bacillus subtilis* spores from killing by dry heat. *Applied and Environmental Microbiology*, *61*(7), 2787-2790. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC167553/>
- Setlow, B., Tautvydas, K. J., & Setlow, P. (1998). Small, Acid-Soluble Spore Proteins of the α/β Type Do Not Protect the DNA in *Bacillus subtilis* Spores against Base Alkylation. *Applied and Environmental Microbiology*, *64*(5), 1958-1962. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC106260/>
- Setlow, P. (2003). Spore germination. *Current Opinion in Microbiology*, *6*(6), 550-556. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2003.10.001>
- Setlow, P. (2005). *The bacterial spore: Nature's survival package*. *26*(2), 8.
- Setlow, P. (2006). Spores of *Bacillus subtilis*: Their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals. *Journal of Applied Microbiology*, *101*(3), 514-525. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02736.x>
- Setlow, P. (2007). I will survive: DNA protection in bacterial spores. *Trends in Microbiology*, *15*(4), 172-180. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2007.02.004>
- Setlow, P., & Johnson, E. A. (2007). Spores and their significance. In *Food microbiology: Fundamentals and frontiers* (Vol. 1-Edn. 3, p. 35-67). ASM Press; CABDirect. <https://www.cabdirect.org/globalhealth/abstract/20073097425>
- Sharafy, S., & Muszkat, K. A. (1971). Viscosity dependence of fluorescence quantum yields. *Journal of the American Chemical Society*, *93*(17), 4119-4125. <https://doi.org/10.1021/ja00746a004>
- Shuster, B., Khemmani, M., Abe, K., Huang, X., Nakaya, Y., Maryn, N., Buttar, S., Gonzalez, A. N., Driks, A., Sato, T., & Eichenberger, P. (2019). Contributions of crust proteins to spore surface properties in *Bacillus subtilis*: Crust morphology and spore hydrophobicity. *Molecular Microbiology*, *111*(3), 825-843. <https://doi.org/10.1111/mmi.14194>
- Sikorska, E., Wójcicki, K., Kozak, W., Gliszczyńska-Świąło, A., Khmelinskii, I., Górecki, T., Caponio, F., Paradiso, V. M., Summo, C., & Pasqualone, A. (2019). Front-Face Fluorescence Spectroscopy and Chemometrics for Quality Control of Cold-Pressed Rapeseed Oil During Storage. *Foods*, *8*(12), 665. <https://doi.org/10.3390/foods8120665>
- Silva, G. T. M., Thomas, S. S., Silva, C. P., Schlothauer, J. C., Baptista, M. S., Freitas, A. A., Bohne, C., & Quina, F. H. (2019). Triplet Excited States and Singlet Oxygen Production by Analogs of Red Wine Pyranoanthocyanins. *Photochemistry and Photobiology*, *95*(1), 176-182. <https://doi.org/10.1111/php.12973>
- Sonenshein, A. L. (2000). Control of sporulation initiation in *Bacillus subtilis*. *Current Opinion in Microbiology*, *3*(6), 561-566. [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(00\)00141-7](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(00)00141-7)
- Stark, T., Wollmann, N., Wenker, K., Lösch, S., Glabasnia, A., & Hofmann, T. (2010). Matrix-Calibrated LC-MS/MS Quantitation and Sensory Evaluation of Oak Ellagitannins and

- Their Transformation Products in Red Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(10), 6360-6369. <https://doi.org/10.1021/jf100884y>
- Stephens, C. (1998). Bacterial sporulation : A question of commitment? *Current Biology*, 8(2), R45-R48. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(98\)70031-4](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(98)70031-4)
- Stokes, G. G. (1852). On the Change of Refrangibility of Light. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, 142, 463-562. JSTOR. <https://www.jstor.org/stable/108550>
- Stokes, G. G. (1853). On the Change of Refrangibility of Light. No. II. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, 143, 385-396. JSTOR. <https://www.jstor.org/stable/108570>
- Strauch, M., Webb, V., Spiegelman, G., & Hoch, J. A. (1990). The SpoOA protein of *Bacillus subtilis* is a repressor of the *abrB* gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(5), 1801-1805. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.5.1801>
- Strickler, S. J., & Berg, R. A. (1962). Relationship between Absorption Intensity and Fluorescence Lifetime of Molecules. *The Journal of Chemical Physics*, 37(4), 814-822. <https://doi.org/10.1063/1.1733166>
- Sumitani, M., Nakashima, N., Yoshihara, K., & Nagakura, S. (1977). Temperature dependence of fluorescence lifetimes of trans-stilbene. *Chemical Physics Letters*, 51(1), 183-185. [https://doi.org/10.1016/0009-2614\(77\)85381-5](https://doi.org/10.1016/0009-2614(77)85381-5)
- Sunde, E. P., Setlow, P., Hederstedt, L., & Halle, B. (2009). The physical state of water in bacterial spores. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(46), 19334-19339. <https://doi.org/10.1073/pnas.0908712106>
- Swiegers, J. H., & Pretorius, I. S. (2007). Modulation of volatile sulfur compounds by wine yeast. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74(5), 954-960. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0828-1>
- Takumi, K., Kinouchi, T., & Kawata, T. (1979). Isolation and Partial Characterization of Exosporium from Spores of a Highly Sporogenic Mutant of *Clostridium botulinum* Type A. *Microbiology and Immunology*, 23(6), 443-454. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.1979.tb00484.x>
- Tang, T., Rajan, K. S., & Grecz, N. (1968). Mixed Chelates of Ca(II)-Pyridine-2,6-Dicarboxylate with Some Amino Acids Related to Bacterial Spores. *Biophysical Journal*, 8(12), 1458-1474. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1367448/>
- Teixeira, A., Eiras-Dias, J., Castellarin, S., & Gerós, H. (2013). Berry Phenolics of Grapevine under Challenging Environments. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(9), 18711-18739. <https://doi.org/10.3390/ijms140918711>
- Todd, S. J., Moir, A. J. G., Johnson, M. J., & Moir, A. (2003). Genes of *Bacillus cereus* and *Bacillus anthracis* Encoding Proteins of the Exosporium. *Journal of Bacteriology*, 185(11), 3373-3378. <https://doi.org/10.1128/JB.185.11.3373-3378.2003>
- Torija, M. J., Rozès, N., Poblet, M., Guillamón, J. M., & Mas, A. (2001). Yeast population dynamics in spontaneous fermentations: Comparison between two different wine-producing areas over a period of three years. *Antonie van Leeuwenhoek*, 79(3/4), 345-352. <https://doi.org/10.1023/A:1012027718701>

- Torrens, J., Urpí, P., Riu-Aumatell, M., Vichi, S., López-Tamames, E., & Buxaderas, S. (2008). Different commercial yeast strains affecting the volatile and sensory profile of cava base wine. *International Journal of Food Microbiology*, *124*(1), 48-57. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.02.023>
- Tourdot-Maréchal, R., Cavin, J.-F., Drici-Cachon, Z., & Diviès, C. (1993). Transport of malic acid in *Leuconostoc oenos* strains defective in malolactic fermentation: A model to evaluate the kinetic parameters. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *39*(4-5), 499-505. <https://doi.org/10.1007/BF00205040>
- Trigueiro, P., Pedetti, S., Rigaud, B., Balme, S., Janot, J.-M., Santos, I. M. G., & Jaber, M. (2018). Going through the wine fining: Intimate dialogue between organics and clays. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *166*, 79-88. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.02.060>
- Trivellin, N., Barbisan, D., Trivellin, N., Meneghesso, G., Meneghini, M., Zanoni, E., & Pastore, P. (2018). Study and Development of a Fluorescence Based Sensor System for Monitoring Oxygen in Wine Production: The WOW Project. *Sensors (Basel)*, *18*(4).
- Valeur, B. (2001). *Molecular Fluorescence: Principles and Applications* (1^{re} éd.). Wiley. <https://doi.org/10.1002/3527600248>
- Versari, A., Parpinello, G. P., & Cattaneo, M. (1999). *Leuconostoc oenos* and malolactic fermentation in wine: A review. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, *23*(6), 447-455. <https://doi.org/10.1038/sj.jim.2900733>
- Villiers, A., Vanhoenacker, G., Majek, P., & Sandra, P. (2004). Determination of anthocyanins in wine by direct injection liquid chromatography–diode array detection–mass spectrometry and classification of wines using discriminant analysis. *Journal of Chromatography A*, *1054*(1-2), 195-204. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(04\)01291-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(04)01291-9)
- Viñas, P., López-Erroz, C., Mariñán-Hernández, J. J., & Hernández-Córdoba, M. (2000). Determination of phenols in wines by liquid chromatography with photodiode array and fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, *871*(1-2), 85-93. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(99\)01087-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(99)01087-0)
- Visioli, F., Panaite, S.-A., & Tomé-Carneiro, J. (2020). Wine's Phenolic Compounds and Health: A Pythagorean View. *Molecules*, *25*(18), 4105. <https://doi.org/10.3390/molecules25184105>
- Vitrac, X., Monti, J.-P., Vercauteren, J., Deffieux, G., & Mérillon, J.-M. (2002). Direct liquid chromatographic analysis of resveratrol derivatives and flavanonols in wines with absorbance and fluorescence detection. *Analytica Chimica Acta*, *458*(1), 103-110. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(01\)01498-2](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(01)01498-2)
- Vyšniauskas, A. (2015). Unravelling the effect of temperature on viscosity-sensitive fluorescent molecular rotors. *Chemical Science*, *6*.
- Warth, A. D., & Strominger, J. L. (1969). Structure of the peptidoglycan of bacterial spores: Occurrence of the lactam of muramic acid*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *64*(2), 528-535. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC223376/>

- Warth, A. D., & Strominger, J. L. (1971). Structure of the peptidoglycan from vegetative cell walls of *Bacillus subtilis*. *Biochemistry*, *10*(24), 4349-4358. <https://doi.org/10.1021/bi00800a001>
- Warth, A. D., & Strominger, J. L. (1972). Structure of the peptidoglycan from spores of *Bacillus subtilis*. *Biochemistry*, *11*(8), 1389-1396. <https://doi.org/10.1021/bi00758a010>
- Waterhouse, A. L. (2002). Wine Phenolics. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *957*(1), 21-36. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2002.tb02903.x>
- Wibowo, D., Eschenbruch, R., Davis, C. R., Fleet, G. H., & Lee, T. H. (1985). Occurrence and Growth of Lactic Acid Bacteria in Wine: A Review. *American Journal of Enology and Viticulture*, *36*(4), 302. <http://www.ajevonline.org/content/36/4/302.abstract>
- Yéramian, N., Chaya, C., & Suárez Lepe, J. A. (2007). L(-)-Malic Acid Production by *Saccharomyces* spp. During the Alcoholic Fermentation of Wine (1). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *55*(3), 912-919. <https://doi.org/10.1021/jf061990w>
- Yi, X., Bond, C., Sarker, M. R., & Setlow, P. (2011). Efficient Inhibition of Germination of Coat-Deficient Bacterial Spores by Multivalent Metal Cations, Including Terbium (Tb³⁺). *Applied and Environmental Microbiology*, *77*(15), 5536-5539. <https://doi.org/10.1128/AEM.00577-11>
- Zhang, P., Thomas, S., Li, Y., & Setlow, P. (2012). Effects of Cortex Peptidoglycan Structure and Cortex Hydrolysis on the Kinetics of Ca²⁺-Dipicolinic Acid Release during *Bacillus subtilis* Spore Germination. *Journal of Bacteriology*, *194*(3), 646-652. <https://doi.org/10.1128/JB.06452-11>
- Zheng, Y.-J., Duan, Y.-T., Zhang, Y.-F., Pan, Q.-H., Li, J.-M., & Huang, W.-D. (2009). Determination of Organic Acids in Red Wine and Must on Only One RP-LC-Column Directly After Sample Dilution and Filtration. *Chromatographia*, *69*(11-12), 1391-1395. <https://doi.org/10.1365/s10337-009-1085-0>
- Zoecklein, B. W., Fugelsang, K. C., Gump, B. H., & Nury, F. S. (1999). *Wine Analysis and Production*. Springer US. <https://doi.org/10.1007/978-1-4757-6967-8>

Titre : Développement de techniques spectroscopiques multidimensionnelles et microscopiques afin de faciliter le suivi de la fluorescence native de biomolécules.

Mots clés : Temps de vie de fluorescence, MEEF, phasor plot, vins, spores bactériennes

Résumé : Il existe un besoin de développement d'outils de caractérisation rapide et fiables de milieux biologiques. Ce travail de thèse a pour but de développer une méthode se basant sur l'acquisition de matrices d'émission et d'excitation de fluorescence (MEEF) couplée avec l'utilisation de la mesure du temps de vie de fluorescence en spectroscopie et microscopie (FLIM). Ces techniques ont un fort potentiel du fait de leur rapidité, du faible volume d'échantillon nécessaire à l'analyse, d'une analyse non-destructrice de l'échantillon et d'un faible coût. Ce projet s'est focalisé sur deux milieux biologiques ayant un fort intérêt dans l'industrie agro-alimentaire : le vin et les spores bactériennes. D'une part, nous avons une boisson représentant un marché mondial de grande envergure, et d'autre part, un contaminant alimentaire responsable de diverses maladies. Le couplage de nos différentes techniques a permis de caractériser des sondes fluorescentes natives aux deux milieux biologiques et d'évaluer leurs caractéristiques en fonction de différents paramètres, tels que la fermentation malolactique ou des changements de pH et d'activité de l'eau. Cet outil s'est concentré sur diverses sondes natives, avec les acides organiques et phénoliques dans notre matrice vin, et l'acide dipicolinique pour la matrice spore bactérienne. Ce projet a permis de bâtir une base de données permettant le suivi *in-situ* de ces sondes fluorescentes dans leur environnement natif et donne lieu à la mise en place d'une nouvelle méthode de caractérisation des milieux biologiques.

Title : Development of multidimensional spectroscopic and microscopic techniques to facilitate the monitoring of native fluorescence of biomolecules.

Keywords : Fluorescence lifetimes, EEMF, phasor plot, wines, bacterial spores

Abstract : There is a need for the development of rapid and reliable characterization tools for biological media. The objective of this thesis is to develop a method based on the acquisition of excitation-emission matrices of fluorescence (EEMF) coupled with the use of fluorescence lifetime measurement in spectroscopy and microscopy (FLIM). These techniques have great potential due to their speed, low sample volume required for analysis, non-destructive sample analysis, and low cost. This project focused on two biological media of great interest to the food industry: wine and bacterial spores. On one hand, we have a beverage representing a large world market, and on the other hand, a food contaminant responsible for various diseases. The coupling of our different techniques allowed us to characterize fluorescent probes native to these two biological environments and to evaluate their changes according to different parameters, such as malolactic fermentation or changes in pH and water activity. This tool focused on different native probes, with organic and phenolic acids in our wine matrix, and dipicolinic acid for the bacterial spore matrix. This project has allowed the construction of a database allowing the *in-situ* monitoring of these fluorescent probes in their native environment and gives rise to the implementation of a new method of characterization of biological environments.