



HAL
open science

Impact des fluctuations de l'humidité relative de l'air sur la survie de *Listeria monocytogenes* : application à l'amélioration de l'hygiène dans les ateliers de production alimentaire

Fiona Zoz

► To cite this version:

Fiona Zoz. Impact des fluctuations de l'humidité relative de l'air sur la survie de *Listeria monocytogenes* : application à l'amélioration de l'hygiène dans les ateliers de production alimentaire. Microbiologie et Parasitologie. Université de Bourgogne, 2016. Français. NNT : 2016DIJOS064 . tel-01745975

HAL Id: tel-01745975

<https://theses.hal.science/tel-01745975>

Submitted on 28 Mar 2018

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

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



UNIVERSITÉ BOURGOGNE-FRANCHE COMTÉ

Ecole doctorale Environnement-Santé

THÈSE

Pour obtenir le grade de **Docteur de l'Université de Bourgogne-Franche Comté**

Discipline : Science de l'Alimentation – Spécialité : Microbiologie

Par Fiona Zoz

Soutenue le 13 décembre 2016

**Impact des fluctuations de l'humidité relative de l'air sur la survie de
Listeria monocytogenes : application à l'amélioration de l'hygiène dans les
ateliers de production alimentaire**

Directeur de thèse : Pr Laurent Beney

Co-encadrants : Dr Cosette Grandvalet et Dr Stéphane Guyot

Pr L. COROLLER
Dr N. OULAHAL
Pr N. LEBLOND-BOURGET
Pr L. BENEY
Dr C. GRANDVALET
Dr S. GUYOT

LUBEM, Quimper
UCBL, Bourg en Bresse
Université de Lorraine, Nancy
AgroSup, Dijon
AgroSup, Dijon
AgroSup, Dijon

Rapporteur
Rapporteur
Présidente du jury
Directeur de thèse
Co-encadrante de thèse
Co-encadrant de thèse



Remerciements

Ce travail a été réalisé au sein de l'Unité Mixte de Recherche de Procédés Alimentaires et Microbiologiques, sous la direction du Pr. Laurent Beney et co-encadré par le Dr. Cosette Grandvalet et le Dr. Stéphane Guyot.

Je tiens tout d'abord à remercier le Pr. Louis Coroller et le Dr. Nadia Oulahal d'avoir accepté d'être mes rapporteurs de thèse. Merci au Pr. Nathalie Leblond-Bourget d'avoir accepté d'être présidente du jury et examinatrice de ce travail de thèse.

Je tiens à remercier le Pr. Patrick Gervais, directeur de l'UMR PAM, de m'avoir accueilli au sein de l'Unité de recherche pour réaliser cette thèse.

Un grand merci au Pr. Laurent Beney en tant que Directeur de thèse pour son aide, ses précieux conseils, sa disponibilité et ses encouragements malgré mes lacunes en génie des procédés.

Merci également au Dr. Cosette Grandvalet et au Dr. Stéphane Guyot pour leur disponibilité, leur soutien, leurs conseils et leurs qualités humaines.

Je remercie les membres de mon comité de thèse, Michel Hébraud, Laurent Gal et Pascal Piveteau pour leurs conseils pertinents et avisés pendant ces réunions annuels.

Merci à l'Agence Nationale de la Recherche d'avoir financé cette thèse.

Un remerciement tout particulier à tous les partenaires du projet EcoSec : Olivier Firmesse, Danielle Chassaing, Laurent Guillier, Anaïs Overney, Michel Hébraud, Julia Esbelin, Onrawee Laguerre, Denis Flick, Evelyne Derens, Logan Lecoq, Jacques Guilpart, Adam Tchaikowski et Yves Gasnier. J'espère n'avoir oublié personne. Merci pour tous ces moments passés ensemble toujours dans la bonne humeur que ce soit pendant les séminaires, les réunions et les promenades sur les volcans d'Auvergne. Ce fût pour moi une expérience très enrichissante autant professionnellement qu'humainement et je les en remercie. Bien sûr, une énorme pensée et

un grand merci au Dr. Brigitte Carpentier, Directrice de recherche à l'Anses de Maison Alfort, sans qui ce projet n'aurait pu voir le jour.

Je remercie particulièrement le Pr. Eric Lesniewska, du laboratoire Interdisciplinaire Carnot de Bourgogne (ICB), et Cédric Thomas pour qui la Microscopie à Force Atomique n'a plus de secret et sans qui les manipulations n'auraient pu se faire. Merci pour leur accueil et leur sympathie ainsi que le temps qu'ils m'ont consacré, leur aide, leur contribution aux manip et à l'analyse des résultats.

Je souhaite remercier toute l'équipe du laboratoire, professeurs et maîtres de conférence, pour leur accueil, leur aide et leurs conseils : Jean-Marie, Hélène, Mélanie, Pascale, Karine, Alex G, Sylvie, Christine, sans oublier les anecdotes de Saliha pendant le repas de midi ô combien enrichissante et permettant de soulever de grands débats. Merci à Florence pour sa capacité à gérer avec succès les problèmes administratifs du quotidien ô combien indispensable au laboratoire.

Un grand merci aux thésards du laboratoire : Aurore, Bao, Dat, Antonio et aux anciens rencontrés pendant ma première année de thèse : Pauline, Julia, Alex C. Merci tout particulièrement à Seb, Lucie, Alex, Cécile, Adeline, Richtier pour tous ces moments de rigolades, de courses (oui c'est grâce à vous que je m'y suis mise !!!) et qui ont rendu ces années de thèse vraiment agréables.

Merci à mes supers colocataires de bureau, Cyril, Chloé et Emilie, pour nos fabuleuses discussions du vendredi et ces moments de rigolades ! Merci à Cyril pour ces explications statistiques toujours très "claires" et sa manie de toujours vouloir tout modéliser. Merci à Chloé pour sa bonne humeur à toute épreuve et sa capacité à lancer de grands débats sur tout et n'importe quoi ! Et un merci tout particulier à Emilie qui a été là depuis le début. On aura tout vécu ensemble pendant nos thèses (les guêpes, les congrès, les manip seules au P2...). Tellement de choses à dire mais merci d'avoir été là, ça n'aurait pas été pareil sans toi !

Enfin, je voudrais remercier mes proches. Merci à ma famille et mes amis, particulièrement Audrey, Justine, Claire, Marion, Lilian, Seb et ceux que je ne cite pas pour leurs encouragements et leur soutien. Enfin, un énorme merci à Xavier. Merci pour ton soutien sans faille, ta patience et ta présence indispensable.

Résumé

Les fluctuations hydriques influencent l'activité et la viabilité des microorganismes. L'humidité relative de l'air est ainsi un paramètre potentiellement efficace pour maîtriser le développement et la persistance de microorganismes pathogènes. Cependant, l'efficacité de ce paramètre reste peu connue par rapport à d'autres facteurs environnementaux comme le pH ou la température. Le séchage est l'étape finale des procédures de nettoyage et de désinfection en industrie agroalimentaire. Cependant, il est aujourd'hui utilisé de façon empirique alors qu'il pourrait permettre d'améliorer la décontamination des surfaces dans les ateliers et diminuer la persistance des microorganismes. Malgré les procédures de nettoyage et de désinfection, la bactérie *Listeria monocytogenes* est fréquemment retrouvée dans l'industrie agroalimentaire et y persiste pendant de longues périodes. Evaluer et comprendre l'impact des fluctuations hydriques sur la survie de *L. monocytogenes* afin d'en optimiser la destruction sur une surface, constituent ainsi les principaux objectifs de cette thèse.

Dans un premier temps, 30 souches de *L. monocytogenes* isolées de différents environnements de transformation des aliments et présentant différents sérotypes et niveaux de virulence ont été exposées à un stress hyperosmotique et à un séchage. Cette approche a permis d'analyser les différences de résistance entre les souches et de sélectionner quatre souches présentant différents profils de résistance pour poursuivre les travaux.

Afin de définir les conditions de fluctuations hydriques les plus létales pour les souches de *L. monocytogenes*, différents paramètres ont été étudiés tels que la vitesse de déshydratation, le niveau d'humidité relative, la vitesse de réhydratation, l'application de cycles successifs de déshydratation-réhydratation et le milieu de séchage.

Enfin, les mécanismes cellulaires induisant la mort de *L. monocytogenes* lors des fluctuations hydriques ont été explorés par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier, microscopie à force atomique, cytométrie en flux et par séchage en anaérobiose. Ces différentes méthodes ont permis de révéler qu'un stress mécanique et structural sont majoritairement responsables de la mort de *L. monocytogenes*.

L'ensemble de ce travail démontre que la maîtrise du niveau et des variations de l'humidité relative de l'air est un moyen efficace pour détruire *L. monocytogenes* et offre de réelles perspectives d'application pour améliorer l'hygiène des ateliers de production alimentaire.

Mots clés : *Listeria monocytogenes*, humidité relative, réhydratation, stress oxydatif, stress osmotique, contraction cellulaire, surface, industrie agroalimentaire

Abstract

Environmental hydration fluctuations influence microorganism viability and activity. The air relative humidity (RH) is a potentially effective parameter to control the development and the persistence of pathogenic microorganisms. However, efficiency of this parameter remains not well characterized compared to others environmental factors such as pH or temperature. Drying is the final step of cleaning and disinfection processes used in the food industry. However, if this process is empirically used, it could also be used to improve the decontamination of surfaces in premises and reduce the persistence of microorganisms. Despite cleaning and disinfection, *Listeria monocytogenes* is commonly found in the food industry and persists during long periods. Thus, the main objective of this thesis is to evaluate and understand the impact of hydric fluctuations on *L. monocytogenes* survival to optimize its destruction on a surface.

First, thirty *L. monocytogenes* strains, isolated from different food processing environment and belonging to different serotypes and levels of virulence, were exposed to hyperosmotic stress and drying process. Differences in resistances among the strains were analyzed and four strains with different resistance to hydric stress were selected to continue this study.

To define the most lethal hydric fluctuation conditions for *L. monocytogenes* strains, various parameters, such as the dehydration kinetic, relative humidity level, the rehydration kinetic, the application of successive dehydration and rehydration cycles and drying medium, have been studied.

Finally, cellular mechanisms inducing the cell death during hydric fluctuations were investigated by Fourier transform infrared spectroscopy, atomic force microscopy, and flow cytometry and anaerobic drying. These different methods revealed that mechanical and structural stresses are primarily responsible for the death of *L. monocytogenes*.

This work demonstrates that the control of RH level and variation is an effective means for the destruction of *L. monocytogenes* and offers real perspectives to improve hygiene in food production premises.

Keywords: *Listeria monocytogenes*, relative humidity, rehydration, oxidative stress, osmotic stress, cellular contraction, surface, food industry

Table des matières

Introduction générale	1
Synthèse bibliographique	5
Chapitre 1 : <i>Listeria monocytogenes</i> dans l'industrie agroalimentaire et les aliments	6
1. Genre <i>Listeria</i> et caractéristiques microbiologiques et biochimiques de <i>Listeria monocytogenes</i> ...	6
2. Enveloppe cellulaire de <i>L. monocytogenes</i>	8
2.1) Composition de la paroi cellulaire	9
2.2) Composition de la membrane plasmique	11
3. Niche écologique de <i>L. monocytogenes</i>	12
4. Infection intracellulaire	13
4.1) Cycle infectieux	13
4.2) PrfA : Régulateur de transcription des gènes de virulence	15
5. Epidémiologie de la listériose humaine.....	16
6. Fréquence de <i>L. monocytogenes</i> dans les aliments et industries agroalimentaires.....	19
7. Persistance de <i>L. monocytogenes</i> dans l'industrie agroalimentaire	23
7.1) Définition de la persistance	23
7.2) Adhésion initiale de <i>L. monocytogenes</i> aux surfaces	24
7.3) Formation de biofilms	25
7.4) Tolérance et résistance aux agents désinfectants	27
7.5) Sites refuges	28
8. Stratégies de lutte anti- <i>Listeria</i>	28
8.1) Réglementations.....	29
8.2) Réduction de l'arrivée de <i>L. monocytogenes</i> dans les environnements de transformation des aliments	30
8.3) Procédure de nettoyage et de désinfection	30
8.4) Nouvelles stratégies de lutte.....	32
Chapitre 2 : Impact des fluctuations hydriques sur les microorganismes	36
1. L'eau, molécule essentielle à la structure et à l'activité cellulaire.....	36
1.1) Définition de l'activité de l'eau (a_w) et de l'humidité relative (HR) de l'air.....	36
1.2) L'eau, un solvant pour les cellules biologiques	38

1.3) L'eau et son rôle structurant pour les biomolécules.....	39
2. Effet du séchage sur les microorganismes.....	41
2.1) Séchage : généralités.....	41
2.2) Séchage et stress osmotique cellulaire.....	42
2.3) Séchage et stress oxydatif cellulaire.....	47
3. Facteurs influençant la survie cellulaire aux fluctuations d'humidité relative.....	48
3.1) Pré-adaptation des cellules.....	48
3.2) Utilisation d'agents protecteurs.....	49
3.3) Impact de la réhydratation sur la survie cellulaire.....	50
4. Mécanismes d'adaptation des bactéries au séchage.....	50
4.1) Mécanismes généraux d'adaptation des bactéries à la dessiccation.....	51
4.2) Cas de la bactérie <i>L. monocytogenes</i>	54
5. Mécanismes de résistance au stress de <i>L. monocytogenes</i>	58
5.1) Facteurs transcriptionnels spécifiques de la réponse générale au stress.....	58
5.2) Réponse au stress osmotique.....	60
5.3) Réponse au stress oxydatif.....	66
5.4) Protection croisée.....	69
<i>Résultats et discussion</i>	74
Chapitre 1 : Résistance des souches de <i>Listeria monocytogenes</i> au stress hydrique.....	76
1. Introduction.....	76
2. Diversité de la résistance des souches de <i>L. monocytogenes</i> à un stress hyperosmotique.....	77
2.1) Objectif.....	77
2.2) Matériel et méthodes.....	77
2.3) Résultats.....	82
3. Diversité de résistance des souches de <i>L. monocytogenes</i> au séchage.....	84
3.1) Introduction.....	84
3.2) Article " <i>Listeria monocytogenes</i> ability to survive desiccation: influence of serotype, origin, virulence and genotype".....	85
3.3) Principaux résultats et conclusion de l'article.....	106
4. Discussion et sélection des souches.....	107
Chapitre 2 : Influence des fluctuations de l'humidité relative de l'air sur la survie de <i>Listeria monocytogenes</i>.....	112

1. Introduction	112
2. Impact du milieu de séchage et de réhydratation sur la survie de <i>L. monocytogenes</i>	112
2.1) Introduction	112
2.2) Matériel et méthodes	113
2.3) Résultats	115
3. Influence des fluctuations hydriques sur la survie de <i>L. monocytogenes</i>	118
3.1) Introduction	118
3.2) Article " <i>Control of air relative humidity as a potential means to improve hygiene on surfaces: a preliminary approach with Listeria monocytogenes</i> "	119
3.3) Principaux résultats et conclusion de l'article	132
4. Discussion	132
Chapitre 3 : Exploration des modifications cellulaires de <i>Listeria monocytogenes</i> face aux fluctuations hydriques.....	136
1. Introduction	136
2. Matériel et méthodes	137
2.1) Déshydratation en milieu aérien en absence d'oxygène	137
2.2) Estimation de l'intégrité membranaire par cytométrie en flux.....	137
2.3) Analyse structurale de <i>L. monocytogenes</i> après séchage par spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (IRTF).....	139
2.4) Analyse morphologique de <i>L. monocytogenes</i> par Microscopie à Force Atomique (MFA)..	142
3. Résultats	146
3.1) Impact du séchage et de la vitesse de réhydratation sur la perméabilisation membranaire ...	146
3.2) Impact de l'oxydation sur la survie de <i>L. monocytogenes</i> pendant la déshydratation	150
3.3) Exploration par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier des structures cellulaires de <i>L. monocytogenes</i> au cours du séchage	152
3.4) Observation de la morphologie de <i>L. monocytogenes</i> par Microscopie à Force Atomique au cours du séchage.....	158
4. Discussion	167
<i>Discussion générale</i>	170
<i>Conclusion et Perspectives</i>	180
<i>Références bibliographiques</i>	184
<i>Annexes</i>	212

Liste des symboles et abréviations

Organismes

AFISE	Association française des industries de la détergence, de l'entretien et des produits d'hygiène industrielle
ANR	Agence Nationale de la Recherche
Anses	Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail
CNRL	Centre National de Référence des <i>Listeria</i>
DGAL	Direction Générale de l'Alimentation
DGCCRF	Direction Générale de la Consommation, de la Concurrence et de la Répression des Fraudes
DGS	Direction Générale de la Santé
EFSA	Autorité de sécurité alimentaire européenne
INRA	Institut National de Recherche Agronomique
InVs	Institut de Veille sanitaire
IRSTEA	Institut national de Recherche en Science et Technologie pour l'Environnement et l'Agriculture
LNR	Laboratoire National de Référence
INRS	Institut National de Recherche et de Sécurité

Nomenclature et abréviations

ADI	Arginine déiminase
ADN	Acide désoxyribonucléique
AFLP	<i>Amplification Fragment Length Polymorphism</i>
MFA	Microscopie à Force Atomique
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ARNr	ARN ribosomique
ATP	Adénosine triphosphate
a_w	Activité de l'eau
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
CO ₂	Dioxyde de carbone
Csp	<i>Cold shock protein</i>

DO	Densité Optique
<i>E</i>	Module d'Young ou d'élasticité (Pa)
ERO	Espèce Réactive de l'Oxygène
GAD	Glutamate décarboxylase
<i>h</i>	Coefficient de convection ($m^2 \cdot s^{-1}$)
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène
HACCP	<i>Hazard Analysis Critical Point</i> –Analyse des dangers-points critiques pour leur maîtrise
HR	Humidité Relative
HSP	<i>Heat Shock Protein</i>
IRTF	Infrarouge à Transformée de Fourier
<i>K</i>	Constante de raideur (N/m)
LRR	<i>Leucine Rich Repeat</i>
<i>m</i>	Vitesse de séchage ($g \cdot s^{-1}$)
MLST	<i>Multilocus Sequence Typing</i>
MWB	<i>Modified Welshimer's Broth</i>
O ₂ [°]	Anion superoxyde
OH [°]	Radical hydroxyle
<i>p</i>	Pression de vapeur d'eau d'un produit
<i>P</i>	Pression hydrostatique (Pa)
<i>p</i> ₀	Pression de vapeur d'eau saturante
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i>
PCR-RFLP	<i>Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length</i>
PFGE	<i>Pulsed-Field Gel Electrophoresis</i>
<i>R</i>	Constante des gaz parfaits, ($J^{-1} \cdot mol^{-1} \cdot K^{-1}$)
RAPD	<i>Random Amplified Polymorphic DNA</i>
<i>S</i>	Surface
Sap	<i>Salt Acclimatation Protein</i>
SOD	Superoxyde dismutase
sRNA :	<i>small RNA</i>
Ssp	<i>Salt Shock Protein</i>
<i>T</i>	Température (K)

TSA	<i>Tryptic Soy Agar</i>
TSB	<i>Tryptic Soy Broth</i>
UFC	Unité Formant Colonie
\bar{V}_w	Volume molaire partiel de l'eau ($\text{m}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$)
ZnSe	Sélénure de zinc

Lettres grecques

μ_w^0	Potentiel chimique de l'eau pure ($\text{J} \cdot \text{mol}^{-1}$)
μ_w	Potentiel chimique de l'eau dans la solution ($\text{J} \cdot \text{mol}^{-1}$)
π	Pression osmotique (Pa)
Ψ	Potentiel hydrique (Pa)
Ψ_s	Potentiel de pression osmotique (Pa)
Ψ_p	Potentiel de pression hydrostatique (Pa)
ν	Coefficient de Poisson

Liste des tableaux

Tableau 1 : Liste des gènes dont l'expression est contrôlée par PrfA et leurs différentes fonctions (D'après Freitag <i>et al.</i> , 2009).....	15
Tableau 2 : Epidémies internationales de listériose de 1981 à 2013 (liste non exhaustive).....	18
Tableau 3 : Fréquence de présence de <i>L. monocytogenes</i> dans différentes catégories d'aliments et d'environnements de transformation des aliments.....	21
Tableau 4 : Type de désinfectants pouvant être utilisés en industrie agroalimentaire (Héry <i>et al.</i> , 2003).....	32
Tableau 5 : Valeurs d' a_w de différents produits alimentaires limitant la croissance de microorganismes (D'après Brown, 1976).....	37
Tableau 6 : Facteurs de transcription impliqués dans la régulation de la réponse au stress de <i>L. monocytogenes</i>	60
Tableau 7 : Principaux mécanismes et protéines connus dans la réponse adaptative de <i>L. monocytogenes</i> au stress osmotique, oxydatif, à l'acidité, au froid et à la chaleur (D'après Soni <i>et al.</i> , 2011).....	70
Tableau 8 : Souches de <i>Listeria monocytogenes</i> utilisées dans cette étude.	78
Tableau 9 : Masse de glycérol utilisée pour préparer les solutions à a_w contrôlées.....	80
Tableau 10 : Fréquences infrarouges caractéristiques des groupements moléculaires présents chez les bactéries (liste non exhaustive) (D'après Davis and Mauer, 2010).....	141
Tableau 11 : Caractéristiques morphologiques d'une suspension de <i>L. monocytogenes</i> EGD-e exposée à 99%, 75%, 68%, 43% et 11% d'HR pendant 3 h mesurées par analyse des images obtenues en microscopie à force atomique. La dimension, le volume, la surface et le module d'élasticité ont été obtenus par analyse de bactéries issues de trois cultures indépendantes. Les profils de surface représentent la surface des bactéries vue en coupe transversale. Chaque couleur représente la surface d'une bactérie.....	161

Liste des figures

- Figure 1 : Arbre phylogénétique montrant la relation entre les espèces de *Listeria* et d'autres bactéries à Gram positif possédant un bas contenu en G+C. Cet arbre est basé sur la comparaison de séquences de l'ARNr 23S (méthode de Neighbor-Joining). Les chiffres entre parenthèse correspondent aux numéros d'accèsion de la séquence nucléotidique. Les valeurs au dessus et en dessous des lignes horizontales (exprimés en pourcentage) indiquent la robustesse des branches correspondantes déterminée par une analyse bootstrap après 100 ré-échantillonnages. La barre d'échelle représente le nombre de changement par nucléotide (Sallen *et al.*, 1996).....7
- Figure 2 : Structure du peptidoglycane de *L. monocytogenes* composée du N-acétyl-glucosamine (NAG), N-acétyl-muramique (NAM) et des aminoacides L-alanine (L-Ala), D-glutamine (D-Glu), acide D-méso-diaminopimélique (L-DA) et D-Alanine (D-Ala) faisant le lien entre les chaînes glycosidiques. I représente le pont inter-peptidique reliant les disaccharides entre eux (Fielder, 1988).....9
- Figure 3 : Représentation de la composition des acides téichoïques sur les différents sérotypes de *L. monocytogenes* (Promadej *et al.*, 1999).....10
- Figure 4 : Schéma représentant l'enveloppe cellulaire des bactéries à Gram positif.12
- Figure 5 : Les étapes du cycle infectieux de *L. monocytogenes* (Freitag *et al.*, 2009).14
- Figure 6 : Incidence de la listériose en France par millions d'habitants entre 1999 et 2014 (Source InVs).....17
- Figure 7 : Evolution d'une suspension cellulaire en milieu liquide lors d'une déshydratation. La paroi cellulaire est représentée par un trait rouge et la membrane des cellules par un trait bleu.38
- Figure 8 : Reconstitution en trois dimensions du cytoplasme d'une cellule de *Dictyostelium discoideum*. Le cytoplasme est composé de filaments d'actine (en orange), de ribosomes et d'autres molécules (bleu clair) et est entouré d'une membrane (bleu foncé) (Ellis et Minton, 2003).....39
- Figure 9 : Molécules d'eau impliquées dans la structure secondaire des motifs riches en leucine (LRR) de la protéine InIB de *L. monocytogenes*. Les molécules d'eau sont représentées par les sphères rouges (Marino *et al.*, 1999).40

Figure 10 : Organisation des phospholipides en phase ordonnée (A) notée (L_{β}) et en phase désordonnée (B) notée (L_{α}) (Beney et Gervais, 2001).	41
Figure 11 : Représentation schématique des phénomènes physico-chimiques et des stress cellulaires se produisant pendant le séchage d'une suspension cellulaire.	42
Figure 12 : Représentation schématique des mécanismes impliqués au niveau de la membrane plasmique chez la levure <i>S. cerevisiae</i> pendant un cycle de déshydratation et de réhydratation instantanée (A) et progressive (B) (D'après Dupont <i>et al.</i> , 2010).....	46
Figure 13 : Différentes espèces réactives de l'oxygène (ERO) impliquées dans le stress oxydatif (Ziegelhoffer et Donohue, 2009).....	47
Figure 14 : Survie d'une suspension de <i>L. monocytogenes</i> LO28 cultivée en TSB sur des feuilles de persil (a) et sur des microplaques en polystyrène (b) sous faible humidité relative (60% HR \pm 13) dans une solution saline (0,9% NaCl) (ronds noirs) additionnée de 1, (carrés), 2,5 (losanges), 5 (triangles), 25 (ronds blancs) ou, 250 mmol. L ⁻¹ (croix) de glycine bêtaïne pendant 4 jours. L'axe des ordonnées correspond aux cellules cultivables récoltées dans un tampon phosphate et énumérées après étalement des cellules sur milieu TSA gélosé (Dreux <i>et al.</i> , 2008).....	55
Figure 15 : Survie de <i>L. monocytogenes</i> dans diverses matrices grasses. Les cellules ont été précultivées en TSB-glucose, resuspendues en TSB-glucose contenant de l'huile de colza non saturée (5 et 10%) (a) ou de la graisse de porc (20 et 60%) (b). La suspension cellulaire a été maintenue sur acier inoxydable à 43% HR à 15 °C pendant 20 jours et la survie bactérienne a été évaluée par mesure de la cultivabilité des cellules au cours du temps. Δ log UFC/mL correspond à la perte de cultivabilité des cellules, exprimée en log, obtenue après chaque traitement (Hingston <i>et al.</i> , 2013).....	56
Figure 16 : Schéma de la voie de biosynthèse des acides gras à chaînes ramifiées de <i>L. monocytogenes</i> . BCAT est la <i>branched-chain amino acid transaminase</i> ; Bkd, la <i>branched-chain α-keto acid dehydrogenase</i> ; FabH, la <i>β-ketoacyl-ACP synthase III</i> ; FadD, la <i>acyl-CoA synthetase</i> ; FabF, la <i>β-ketoacyl ACP synthase II</i> (Zhu <i>et al.</i> , 2005).....	57
Figure 17 : Principaux transporteurs de solutés compatibles impliqués dans la résistance au stress osmotique chez <i>L. monocytogenes</i> (Sleator et Hill, 2010).	63
Figure 18 : Représentation schématique des principaux systèmes impliqués dans la réponse au stress osmotique chez <i>L. monocytogenes</i> (D'après Soni <i>et al.</i> , 2011; Melo <i>et al.</i> , 2015).....	66
Figure 19 : Régulation de l'activité de la MnSOD par la phosphatase Stp chez <i>L. monocytogenes</i> (Archambaud <i>et al.</i> , 2006).....	67

Figure 20 : Perte de cultivabilité des 30 souches de <i>L. monocytogenes</i> exposées à un stress hyperosmotique avec une solution glycérolée à une a_w de 0,480 pendant 1 h. Les barres d'erreurs correspondent aux écarts-types calculés à partir de 3 répétitions indépendantes. Les pertes de cultivabilité possédant des lettres différentes sous chaque barres sont significativement différentes (Tukey HSD; $p < 0,05$).....	83
Figure 21 : Lien entre la perte de cultivabilité des souches de <i>L. monocytogenes</i> au séchage (75% d'HR, 3 h à 25 °C) et au stress hyperosmotique (a_w de 0,480, 1 h à 25 °C). Le trait rouge est une droite où $y=x$	110
Figure 22 : Enceinte de séchage utilisée pour l'étude.	114
Figure 23 : Perte de cultivabilité d'une suspension de <i>L. monocytogenes</i> EGD-e séchée dans différentes solutions (3% NaCl, 0,9% NaCl, 0,1% NaCl, 0,01% NaCl, PBS, eau distillé et eau du réseau de ville) à 75% d'HR pendant 3 h à 25 °C et réhydratée soit avec du PBS, de l'eau distillée ou avec la même solution que la solution de séchage. Les barres d'erreurs correspondent aux écarts-types calculés à partir de 4 répétitions indépendantes. Les pertes de cultivabilité possédant des lettres différentes sous chaque barres sont significativement différentes (Tukey HSD; $p < 0,05$).....	116
Figure 24 : Intensité de fluorescence obtenue en cytométrie en flux lors du passage des bactéries vivantes ou mortes marquées à l'IP. Les pourcentages des parties V7-L et V7-R expriment le pourcentage de bactéries non marquées à l'IP (bactéries vivantes) et marquées à l'IP (bactéries mortes) respectivement. Le seuil rouge permet de séparer la population de bactéries vivantes et de bactéries mortes.	138
Figure 25 : Spectre brut caractéristique obtenu sur <i>L. monocytogenes</i> pour un balayage d'une fréquence de 900 cm^{-1} à 4000 cm^{-1} . Les bandes orange, bleu et verte représentent respectivement la zone de fréquence des lipides membranaires, des protéines et des composants pariétaux.	140
Figure 26 : Principe de la transmission en IRTF. I source(x) est l'intensité globale émise par le faisceau infrarouge et $I(x)$ est l'intensité transmise par l'échantillon.	141
Figure 27 : Schéma représentant les différents constituants de la Microscopie à Force Atomique (Bruker - Veeco Instruments, Santa Barbara, CA).....	143
Figure 28 : Schéma d'une image en mode Force Volume.....	145
Figure 29 : Modèle de Hertz.....	145

Figure 30 : Pourcentage de bactéries non cultivables des souches de *L. monocytogenes* CCL500, EGD-e, CCL128, et LO28 séchées dans du PBS à 75%, 68% et 43% d'HR pendant 3 h à 25 °C après une réhydratation progressive (RP) ou une réhydratation instantanée (RI). Les barres d'erreurs correspondent aux écarts-types calculés à partir de minimum 4 répétitions indépendantes. Les pourcentages de bactéries non cultivables possédant des lettres différentes sont significativement différents pour chaque condition d'HR (Tukey HSD; $p < 0,05$).147

Figure 31 : Pourcentage de bactéries perméabilisées des souches de *L. monocytogenes* CCL500, EGD-e, CCL128 et LO28 séchées dans du PBS à 75%, 68% et 43% d'HR pendant 3 h à 25 °C après une réhydratation progressive (RP) ou une réhydratation instantanée (RI). Les barres d'erreur correspondent aux écarts-types calculés à partir de minimum 4 répétitions indépendantes. Les pourcentages de bactéries perméabilisées possédant des lettres différentes sont significativement différents pour chaque condition d'HR (Tukey HSD; $p < 0,05$).148

Figure 32 : Perte de cultivabilité de la souche de *L. monocytogenes* EGD-e séchée dans du PBS non dégazé et dégazé à 99%, 75%, 68%, 43% et 11% d'HR pendant 3 h et 16 h à 25 °C en présence d'oxygène (aérobie) et en absence d'oxygène (anaérobie) sous gaz $N_2H_2CO_2$ [85%, 5%, 10%]. Les barres d'erreur correspondent aux écarts-types calculés à partir de 3 répétitions indépendantes. Les pertes de cultivabilité bactérienne possédant des lettres différentes sont significativement différentes pour une condition d'HR et un temps de séchage donné (Tukey HSD; $p < 0,05$). ND (Non Détectable) représente la perte de cultivabilité sous la limite de détection de la méthode de dénombrement des cellules sur milieu gélosé (---).....151

Figure 33 : Schéma des différentes structures bactériennes (membrane plasmique, protéines et paroi cellulaire) analysées en spectroscopie IRTF dans cette étude.152

Figure 34 : Nombre d'ondes des νCH_2 symétriques des phospholipides membranaires analysée en spectroscopie IRTF sur la souche de *L. monocytogenes* EGD-e exposée à 75%, 68% et 43% d'HR pendant 3 h et 16 h à 25 °C sur des pastilles de ZnSe. Les fréquences possédant des lettres différentes sont significativement différentes (Tukey HSD; $p < 0,05$).154

Figure 35 : Dérivés secondes des spectres de la structure secondaire des protéines de la bande amide I analysés en spectroscopie à IRTF de *L. monocytogenes* EGD-e non déshydratée (a) et séchée (b) à 75%, 68% et 43% pendant 3 h et 16 h à 25 °C sur une pastille de ZnSe. Les spectres ont été normalisés avec la bande de la tyrosine (1515 cm^{-1}). Les spectres correspondent à un spectre modèle choisi pour chaque condition.155

Figure 36 : Nombre d'onde des liaisons C-O-C et P-O-C symétriques du peptidoglycane de la paroi bactérienne analysée en spectroscopie à IRTF sur la souche de *L. monocytogenes* EGD-e exposée à 75%, 68% et 43% d'HR pendant 3 h à 25 °C sur des pastilles de ZnSe. La lettre *n*

représente le nombre de spectres analysés pour évaluer la fréquence moyenne des liaisons C-O-C et P-O-C.157

Figure 37 : Observation d'une suspension de *L. monocytogenes* EGD-e exposée à 99% (a), 75% (b), 68% (c), 43% (d) et 11% (e) d'HR pendant 3 h à 25 °C sur lamelle de poly-D-lysine en microscopie à force atomique. Les échelles à droite des images représentent la hauteur de l'image en trois dimensions. Pour chaque HR, l'image en haut à droite a une échelle de 10 µm, les images au centre et en bas à droite ont une échelle de 5 µm et les images à gauche ont une échelle de 2 µm.159

Figure 38 : Variation du volume cellulaire de *L. monocytogenes* EGD-e lors d'un séchage d'une suspension cellulaire pendant 3 h à 25 °C sous différentes conditions d'humidité relative (99%, 75%, 68%, 43% et 11%).162

Figure 39 : Variation du module d'élasticité (Module d'Young) obtenus chez *L. monocytogenes* EGD-e séchée 3 h à 25 °C à différentes HR.163

Figure 40 : (a) Observation d'une suspension de *L. monocytogenes* EGD-e séchée à 11% d'HR pendant 3 h à 25 °C et réhydratée instantanément sur lamelle de poly-D-lysine en microscopie à force atomique. Les échelles à droite des images représentent la hauteur de l'image en trois dimensions. La flèche blanche présente une bactérie lysée (b) Caractéristiques morphologiques des bactéries séchées à 11% d'HR et réhydratées instantanément mesurées par analyse des images obtenues en microscopie. La dimension bactérienne et le volume cellulaire moyen ont été obtenus par analyse de bactéries issues de trois cultures indépendantes.165

Figure 41 : (a) Observation d'une suspension de *L. monocytogenes* EGD-e séchée à 68% d'HR pendant 3 h à 25 °C et réhydratée instantanément sur lamelle de poly-D-lysine en microscopie à force atomique. Les échelles à droite des images représentent la hauteur de l'image en trois dimensions. (b) Caractéristiques morphologiques des bactéries séchées à 68% d'HR et réhydratées instantanément mesurées par analyse des images obtenues en microscopie. La dimension bactérienne et le volume cellulaire moyen a été obtenus par analyse de bactéries issues de trois cultures indépendantes.166

Figure 42 : Schéma des différentes hypothèses de la mort de *L. monocytogenes* au cours de la déshydratation et de la réhydratation.168

Introduction
générale

Le nettoyage et la désinfection sont parmi les mesures les plus importantes pour contrôler l'hygiène dans les industries agroalimentaires. Cependant, ces mesures engendrent un coût élevé dû à l'utilisation de grandes quantités d'eau, de détergents et de désinfectants. Ces procédures rejettent quotidiennement d'énormes volumes d'eaux usées avec une haute charge d'agents nettoyants et de biocides. Selon l'association française des industries de la détergence, de l'entretien et des produits d'hygiène industrielle (AFISE), 11 000 tonnes de biocides sont utilisés chaque année dans l'industrie agroalimentaire en France. Malgré une mise en disponibilité sur le marché réglementée par les autorités publiques, les procédures de nettoyage et de désinfection restent peu respectueuses de l'environnement. De plus, certains produits chimiques utilisés peuvent provoquer des irritations oculaires, cutanées et respiratoires et avoir des effets néfastes sur la santé des opérateurs (Héry *et al.*, 2003). Il est donc urgent de diminuer la consommation d'eau et de biocides en développant des stratégies de nettoyage et de désinfection plus respectueuses de l'environnement.

Le séchage des ateliers fait partie de l'une des étapes finales de nettoyage et de désinfection afin d'éviter l'eau stagnante, les contaminations par aérosol et la condensation de l'eau dans les zones à basse température. Il permet également aux opérateurs de travailler dans des conditions acceptables. Cependant il est très couteux en énergie et est utilisé de façon empirique. Dans les faits, le séchage est principalement utilisé de façon très maîtrisée dans les industries cherchant à conserver les microorganismes comme les ferments et les probiotiques. Des conditions optimales de cinétiques de séchage, de températures, d'ajouts de protectants sont employés afin de maximiser la survie cellulaire (Morgan *et al.*, 2006). En dehors de ces applications, le séchage, connu pour avoir des effets délétères sur les cellules, n'a pas été étudié dans le but de détruire une flore pathogène.

La bactérie *Listeria monocytogenes* est l'une des principales cibles des procédures de nettoyage et de désinfection. Cette bactérie, pathogène pour l'Homme, est responsable de la listériose engendrant un taux de mortalité de 20 à 30%. *L. monocytogenes* est présente dans de nombreux environnements, a la capacité de contaminer des aliments variés (viandes, poissons, lait et légumes) et de persister des mois voire des années dans les ateliers des industries agroalimentaires (Carpentier et Cerf, 2011). Selon l'autorité de sécurité alimentaire européenne (EFSA), depuis 2008, les cas de listériose augmentent chaque année en Europe et ont encore augmenté de 16% en 2014 par rapport à l'année précédente

(<http://www.efsa.europa.eu/fr/press/news/151217>). A côté de ce problème majeur de santé publique, *L. monocytogenes* est également responsable de nombreux rappels de produits contaminés induisant des pertes économiques considérables pour les industries agroalimentaires.

Cette thèse s'inscrit dans le cadre du projet EcoSec financé par l'Agence Nationale de la Recherche (ANR) dont l'objectif principal est de réduire l'impact environnemental des opérations d'hygiène dans les ateliers agroalimentaires par une utilisation optimale de la déshumidification de l'air. Ce projet interdisciplinaire est réalisé en collaboration avec trois laboratoires de microbiologie (ANSES, INRA et UMR PAM), un laboratoire spécialisé dans les procédés frigorifiques (IRSTEA) et trois entreprises privées (Labeyrie, Dessica et MF conseil). Les principaux axes d'étude consistent à définir les conditions optimales de séchage de l'air d'un atelier, promouvoir l'utilisation de produits de nettoyage et de désinfection plus respectueux de l'environnement et d'étudier la possibilité de réduire la fréquence de désinfection lorsque les opérations d'hygiène sont suivies d'un séchage afin de réduire le volume d'eau et la quantité de biocide utilisés.

La contribution de l'UMR PAM à travers ces travaux de thèse a eu pour objectif d'étudier la survie de *L. monocytogenes* pendant des fluctuations de l'humidité relative (HR), de définir les conditions optimales d'HR entraînant le plus de mortalité bactérienne et de comprendre les mécanismes cellulaires impliqués dans la survie ou la mort de cette bactérie exposée à ces perturbations.

La première partie de ce mémoire de thèse comprend une étude bibliographique présentant la bactérie pathogène *L. monocytogenes* à l'origine de troubles majeurs de santé public et de contaminations récurrentes dans les industries agroalimentaires. Sont ensuite détaillés, l'impact des procédés de séchage sur les microorganismes ainsi que les réponses induites par ces microorganismes et *L. monocytogenes* pour répondre à ce stress.

La deuxième partie présente et discute l'ensemble des résultats obtenus au cours de ce travail de thèse. Le premier chapitre est orienté sur les différences de résistance au stress hydrique de 30 isolats de *L. monocytogenes*. Pour cela les 30 souches ont été exposées à un stress hyperosmotique en présence de glycérol et à un séchage aérien. Cette étude a permis de poursuivre les travaux sur 4 souches présentant différents niveaux de résistance au stress

hydrique (niveaux de résistance : élevé, intermédiaire et sensible) sélectionnées par l'ensemble des partenaires du projet EcoSec.

Le second chapitre concerne l'optimisation des conditions de séchage appliquées sur les différentes souches afin de définir les conditions les plus létales pour *L. monocytogenes*. Pour cela, différents paramètres tels que la vitesse de déshydratation, le niveau d'humidité relative, la vitesse de réhydratation, l'application de cycles successifs de déshydratation et réhydratation et le substrat de séchage ont été étudiés.

Le troisième et dernier chapitre est consacré à l'étude des mécanismes cellulaires induisant la mort cellulaire lors des fluctuations hydriques de l'environnement. Pour cela, l'impact de l'oxydation et de la perméabilisation membranaire ont été explorés par réalisation du séchage en conditions d'anaérobiose et par analyse des bactéries en cytométrie en flux. Ensuite, la spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (IRTF) et la Microscopie à Force Atomique (MFA) ont été utilisées afin d'analyser la structure cellulaire et la morphologie des bactéries à l'état sec.

Enfin, la discussion et la conclusion générale reprennent les différents points étudiés dans ce travail de recherche et dégagent les futures perspectives qui pourront permettre d'optimiser les procédures de nettoyage et de désinfection dans les industries agroalimentaires à l'aide d'un séchage maîtrisé.

*Synthèse
bibliographique*

Chapitre 1 : *Listeria monocytogenes* dans l'industrie agroalimentaire et les aliments

L. monocytogenes est une bactérie pathogène d'origine alimentaire pouvant causer la listériose et est responsable de nombreuses épidémies à travers le monde. Cette bactérie se retrouve dans de nombreux environnements et est fréquemment présente dans les industries agroalimentaires où elle a la capacité de persister pendant de nombreuses années entraînant la contamination de nombreux aliments.

1. Genre *Listeria* et caractéristiques microbiologiques et biochimiques de *Listeria monocytogenes*

Le genre *Listeria* a longtemps été classé dans la famille des *Corynebacteriaceae* mais l'analyse des ARNr 16S et 23S a permis d'établir la position du genre *Listeria* parmi les autres bactéries à Gram positif. Son ADN présente un faible pourcentage en G+C (entre 36 et 42%) le rapprochant plus du genre *Bacillus* et *Staphylococcus* que de *Lactobacillus* et *Streptococcus* (Figure 1) (Jones, 1988; Rocourt, 1988; Sallen *et al.*, 1996).

Le genre *Listeria* appartient à l'embranchement des *Firmicutes*, à la classe des *Bacilli*, à l'ordre des *Bacillales* et à la famille des *Listeriaceae*. Il comporte 17 espèces incluant *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri*, *L. ivanovii*, *L. grayi* et *L. marthii*, *L. rocourtia*, *L. fleischmannii* dont *L. weihenstephanensis*, *L. floridensis*, *L. aquatica*, *L. cornellensis*, *L. riparia* et *L. grandensis*, *L. booriae*, *L. newyorkensis* très récemment identifiées (Graves *et al.*, 2010; Leclercq *et al.*, 2010; Bertsch *et al.*, 2013; Halter *et al.*, 2013; den Bakker *et al.*, 2014; Weller *et al.*, 2015).

Parmi ces espèces seulement deux sont pathogènes : (i) *L. monocytogenes* pouvant infecter l'Homme et les animaux et, (ii) *L. ivanovii* pathogène pour les animaux et rarement pour l'Homme malgré quelques cas décrits (Snapir *et al.*, 2006; Guillet *et al.*, 2010).

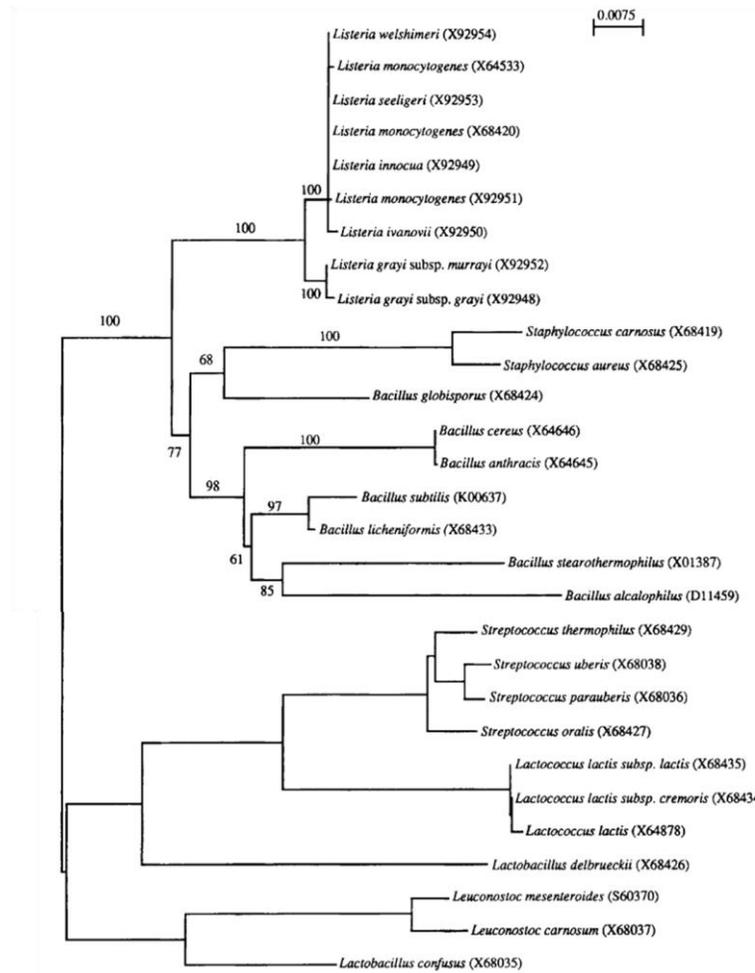


Figure 1 : Arbre phylogénétique montrant la relation entre les espèces de *Listeria* et d'autres bactéries à Gram positif possédant un bas contenu en G+C. Cet arbre est basé sur la comparaison de séquences de l'ARNr 23S (méthode de Neighbor-Joining). Les chiffres entre parenthèse correspondent aux numéros d'accèsion de la séquence nucléotidique. Les valeurs au dessus et en dessous des lignes horizontales (exprimés en pourcentage) indiquent la robustesse des branches correspondantes déterminée par une analyse bootstrap après 100 ré-échantillonnages. La barre d'échelle représente le nombre de changement par nucléotide (Sallen *et al.*, 1996).

L. monocytogenes est un petit bacille mesurant entre 0,5 et 2 μm de longueur et 0,5 μm de diamètre, à Gram positif, isolé ou sous forme de chaînette. La bactérie est dépourvue de capsule et ne sporule pas. Elle est mobile grâce à la présence de flagelles péritriches lorsqu'elle est cultivée entre 20 °C et 25 °C mais elle est immobile à la température infectieuse de 37 °C. Elle est aéro-anaérobie facultative, catalase positive, oxydase négative et à la capacité d'hydrolyser l'esculine. Elle fermente également le glucose sans production de gaz. Les souches de *L. monocytogenes* sont toujours D-xylose négative, produisent des lécithinases, sont β -

hémolytiques et L-rhamnose positives contrairement à certaines autres espèces du genre *Listeria*. Elle résiste aux environnements hostiles, pouvant survivre et se multiplier à de hautes concentrations en sel ($[NaCl] > 10\%$) (McClure *et al.*, 1989), croître à pH bas (entre 4,0 et 4,3) (O'Driscoll *et al.*, 1996) et à une large gamme de températures (2 °C à 45 °C) (Gandhi et Chikindas, 2007).

Pour différencier les souches de *L. monocytogenes*, différentes méthodes ont été utilisées. La méthode la plus ancienne est le sérotypage basé sur la détection de 14 antigènes somatiques (O) et de 4 antigènes flagellaires (H) présents sur la surface bactérienne. La détection d'une combinaison d'antigènes par agglutination à l'aide de sérum d'anticorps spécifiques a permis de détecter 13 sérovars chez *L. monocytogenes* (1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e et 7) (Rocourt et Seeliger, 1985).

Cependant cette méthode n'est pas systématiquement effectuée dans les laboratoires cliniques et a été remplacée par des méthodes moléculaires plus sensibles et spécifiques telles que l'électrophorèse en champ pulsé ou *Pulsed-Field Gel Electrophoresis* (PFGE) permettant d'obtenir des pulsotypes de souches. Le ribotypage, la technique MLST (*Multilocus Sequence Typing*) ainsi que des techniques basées sur la réaction de polymérisation en chaîne (PCR-RFLP, AFLP, RAPD...) sont aussi largement employées. Ainsi, les sérovars ont été remplacés par des génosérogroupe déterminés par PCR : IIa (sérovars 1/2a et 3a), IIb (sérovars 1/2b et 3b), IIc (sérovars 1/2c et 3c), IVb (sérovars 4b, 4d et 4e) et L (autres sérovars).

Ces méthodes moléculaires ont permis de regrouper les souches de *L. monocytogenes* en 3 lignées génétiques différentes : Lignée I comprenant les sérotypes 1/2b, 3b, 4b, 4d, 4e, la Lignée II contenant les sérotypes 1/2a, 1/2c, 3a, 3c et la Lignée III contenant les sérotypes 4a et 4c et certaines souches appartenant au sérotype 4b (Liu, 2006). La Lignée IV a été récemment reclassifiée à partir de la Lignée III et est composée d'un groupe de souches distinctes possédant des différences phylogénétiquement marquées par rapport aux autres lignées (Lomonaco *et al.*, 2015).

2. Enveloppe cellulaire de *L. monocytogenes*

L'enveloppe cellulaire de *L. monocytogenes* est caractéristique de toutes les bactéries à Gram positif. Elle est constituée d'une paroi cellulaire composée principalement de

peptidoglycane (appelé aussi muréine) en contact direct avec le milieu extérieur assurant l'intégrité de la bactérie et d'une membrane plasmique composée majoritairement de phospholipides et entourée par la paroi.

2.1) Composition de la paroi cellulaire

2.1.1) Le peptidoglycane

La paroi de *L. monocytogenes* est composée de 30 à 40% de peptidoglycane (Fielder, 1988). Le peptidoglycane est un polymère alternant deux saccharides : le N-acétyl-glucosamine (NAG) et le N-acétyl-muramique (NAM) liés par des liaisons osidiques de type $\beta(1\rightarrow4)$. Les deux polysaccharides sont reliés par des liaisons peptiques au niveau du NAM pour former une longue chaîne glycosidique. Le groupe carboxyle du NAM est également lié à des aminoacides qui font le lien entre les chaînes glycosidiques qui sont la L-alanine, D-alanine, D-glutamine et l'acide méso-diaminopimélique impliqué dans la réticulation du peptidoglycane (Figure 2).

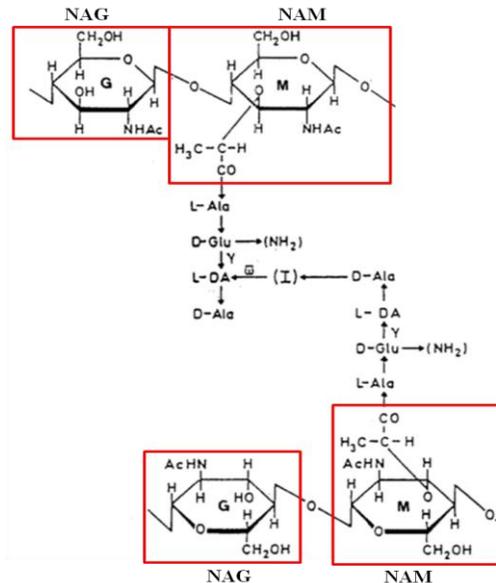


Figure 2 : Structure du peptidoglycane de *L. monocytogenes* composée du N-acétyl-glucosamine (NAG), N-acétyl-muramique (NAM) et des aminoacides L-alanine (L-Ala), D-glutamine (D-Glu), acide D-méso-diaminopimélique (L-DA) et D-Alanine (D-Ala) faisant le lien entre les chaînes glycosidiques. I représente le pont inter-peptidique reliant les disaccharides entre eux (Fielder, 1988).

2.1.2) Les acides téichoïques et acides lipotéichoïques

Les acides téichoïques et lipotéichoïques représentent à eux seuls 50 à 60% de la paroi cellulaire de *L. monocytogenes* (Pucciarelli *et al.*, 2007). Les acides téichoïques sont des polymères de ribitol-phosphate liés de façon covalente au peptidoglycane (Fielder, 1988). La différence de structure des acides téichoïques varie selon les souches et leur confère les propriétés antigéniques à chacune d'elles. La diversité des acides téichoïques se traduit notamment par des substitutions glycosidiques sur la sous unité ribitol-phosphate (Figure 3).

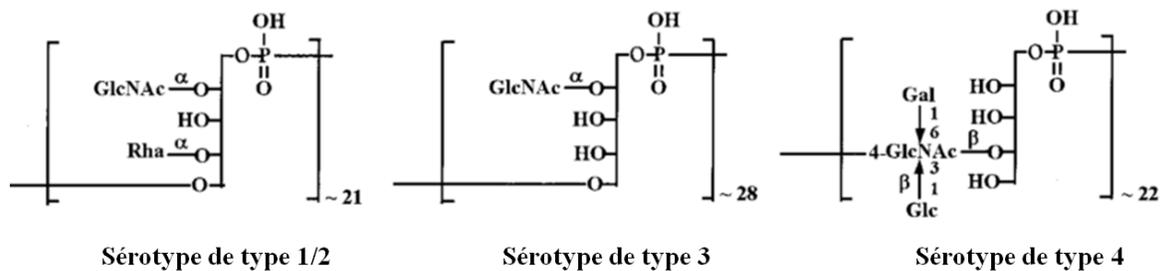


Figure 3 : Représentation de la composition des acides téichoïques sur les différents sérotypes de *L. monocytogenes* (Promadej *et al.*, 1999).

Les acides téichoïques des souches de sérotype 1/2 (1/2a, 1/2b, 1/2c) et 3 (3a, 3b, 3c) sont composés de ribitol-phosphate avec du N-acétyl-glucosamine et du rhamnose uniquement sur les souches de sérotype de type 1/2. Les souches de sérotype de type 4 ont des sous unités de ribitol-phosphate composées de N-acétyl-glucosamine et selon le sérotype la souche (4a, 4b, 4c...) porte du galactose et/ou du glucose. Seul le sérotype de type 4b porte du galactose et du glucose sur le N-acétyl-glucosamine des acides téichoïques (Promadej *et al.*, 1999).

Les acides lipotéichoïques sont des polymères de glycérophosphates substitués avec des résidus d'acides gras, d'alanine ou de galactose (Fielder, 1988). Les acides lipotéichoïques sont composés d'une région hydrophile et d'une région hydrophobe ancrée de façon non covalente au niveau de la membrane plasmique par un glycolipide (Neuhaus et Baddiley, 2003).

En plus de ces différents composants, la paroi cellulaire de *L. monocytogenes* est composée de nombreuses protéines de surfaces ancrées de façon covalente ou non covalente au peptidoglycane pouvant jouer un rôle dans la pathogénicité bactérienne, la mobilité et assurant un équilibre physiologique cellulaire (Bierne et Cossart, 2007).

2.2) Composition de la membrane plasmique

La membrane plasmique est une barrière sélective semi perméable. Elle assure un rôle de transport et d'échange entre le milieu intracellulaire et extracellulaire et permet la sécrétion de diverses protéines.

La membrane de *L. monocytogenes* est constituée principalement de protéines (55 à 60%), de lipides (30 à 35%) et de carbohydrates (1,3 à 2,3%) tels que du glucose, galactose, ribose et arabinose (Ghosh et Carroll, 1968). La membrane forme une bicouche de phospholipides dont les pôles hydrophobes sont face à face. En effet, chez *L. monocytogenes*, 80 à 85% des lipides membranaires sont des phospholipides et 15 à 20% des lipides sont des lipides neutres (très hydrophobes et apolaires) (Ghosh et Carroll, 1968).

Les phospholipides de la membrane sont à 60% du phosphatidylglycérol (PG), 12% du diphosphatidylglycérol (DPG) et 9% de phosphoglycolipides (PGL). D'autres phospholipides tels que la phosphatidylsérine, le phosphatidylinositol, et le bisphosphatidylglycérol-phosphate peuvent être présents mais représentent une minorité des phospholipides membranaires (Verheul *et al.*, 1997).

La membrane est composée d'acides gras ramifiés (entre 95 et 97%) sous forme iso ou antéiso et principalement des a-C_{15:0}, a-C_{17:0} et i-C_{15:0} à 37 °C dont le profil change en fonction de la température (Annous *et al.*, 1997). Un acide gras iso possède un groupement méthyle sur l'avant dernier carbone de la chaîne, tandis qu'un acide gras antéiso possède un groupement méthyle sur l'antépénultième.

Un schéma représentant une vue d'ensemble de l'enveloppe cellulaire des bactéries à Gram positif est présenté Figure 4.

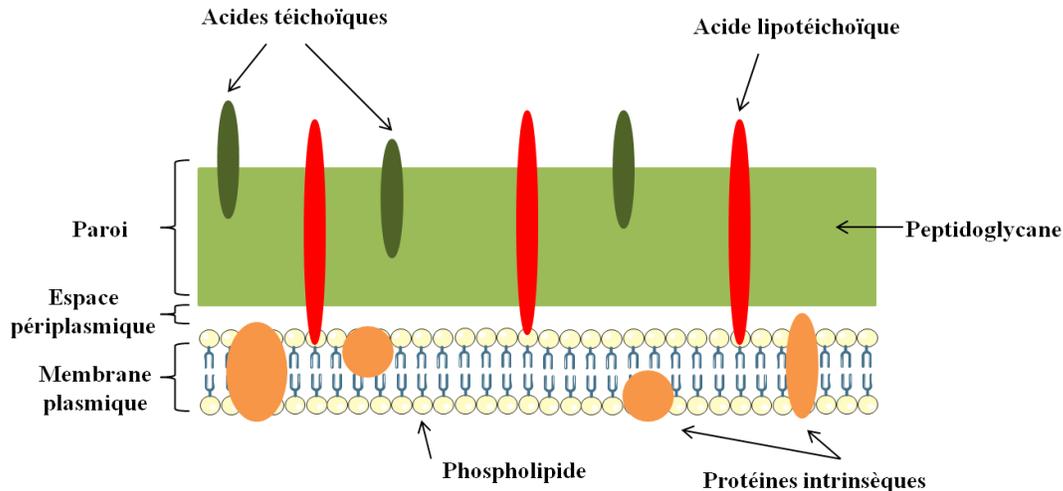


Figure 4 : Schéma représentant l'enveloppe cellulaire des bactéries à Gram positif.

3. Niche écologique de *L. monocytogenes*

L. monocytogenes est une bactérie ubiquitaire, saprophyte et tellurique. Elle a été isolée dans de nombreux environnements tels que le sol, l'eau et la végétation. Des souches ont été isolées de divers échantillons de sol issus de champs en friches non cultivés, de sols cultivés et de sols de forêts ainsi que d'échantillons de boue (Weis et Seeliger, 1975). *L. monocytogenes* a aussi été isolée à partir d'échantillons d'eau issus de lac et de rivière et a été identifiée de manière prépondérante dans des échantillons d'eaux usées et de boues d'épuration. Un problème de santé publique majeur pourrait survenir, ces boues servant à l'épandage sur des terres agricoles (Watkins et Sleath, 1981; Ivanek *et al.*, 2006). L'ensilage est une méthode de conservation de fourrage fermenté à haute humidité passant par la fermentation lactique anaérobie de végétaux et est destiné à l'alimentation des ruminants. Lorsque l'ensilage est de bonne qualité, il possède une fermentation très active et produit de l'acide lactique pouvant réduire la valeur du pH en dessous de 4,2, valeur inhibant la survie de *L. monocytogenes*. Si la fermentation de l'ensilage est insuffisante, il contient encore de l'oxygène, la valeur du pH est plus élevée et *L. monocytogenes* y est fréquemment isolée (Fenlon, 1985).

La présence de *L. monocytogenes* dans la nature, notamment par une contamination des sols et des cultures suite à l'utilisation de fumiers et d'ensilage, fait des fermes d'élevages et agricoles de véritables réservoirs naturels de cette bactérie. Les exploitations agricoles peuvent ainsi être une source primaire de la contamination des environnements de transformation des

aliments (Nightingale *et al.*, 2004). En effet, *L. monocytogenes* a été isolée dans de nombreuses industries agroalimentaires et a aussi été retrouvée dans des environnements domestiques (réfrigérateurs, torchons, serviettes de cuisine) (Cox *et al.*, 1989). *L. monocytogenes* a un cycle de vie parasitaire et se multiplie à l'intérieur d'hôtes en infectant de nombreuses espèces animales, particulièrement les mammifères (volailles, bovins, chèvres moutons, cochons), les oiseaux et les poissons (Iida *et al.*, 1998; Nightingale *et al.*, 2004; Okutani *et al.*, 2004). Ces animaux ainsi que l'homme peuvent être porteurs sains de cette bactérie (Iida *et al.*, 1998) c'est-à-dire héberger naturellement cette bactérie dans l'intestin sans développer aucun symptôme de la maladie et contaminer par la même occasion l'environnement par leurs fèces. Le portage fécal de *L. monocytogenes* chez l'Homme est estimé entre 2 et 10% (Schlech, 2000). Dans d'autres cas, elle peut causer par ingestion d'aliments contaminés une maladie sévère nommée la listériose chez l'Homme et les animaux.

4. Infection intracellulaire

Lors de son infection, *L. monocytogenes* se multiplie à l'intérieur des cellules et échappe au système immunitaire de l'hôte grâce à la présence de nombreux facteurs de virulence.

4.1) Cycle infectieux

L. monocytogenes a la capacité de pénétrer et de se multiplier dans de nombreux types de cellules eucaryotes : (i) les cellules phagocytaires comme les macrophages dont elle parvient à échapper au processus d'élimination des pathogènes, (ii) les cellules non phagocytaires comme les cellules épithéliales, endothéliales, les entérocytes, les fibroblastes et les hépatocytes (Suárez *et al.*, 2001; Seveau *et al.*, 2007).

De nombreux facteurs de virulence sont impliqués dans le cycle infectieux permettant à la bactérie de se multiplier, de se disséminer et d'échapper au système immunitaire de l'hôte (Freitag *et al.*, 2009). La propagation de *L. monocytogenes* à l'intérieur des cellules hôtes se déroule en plusieurs étapes (Figure 5).

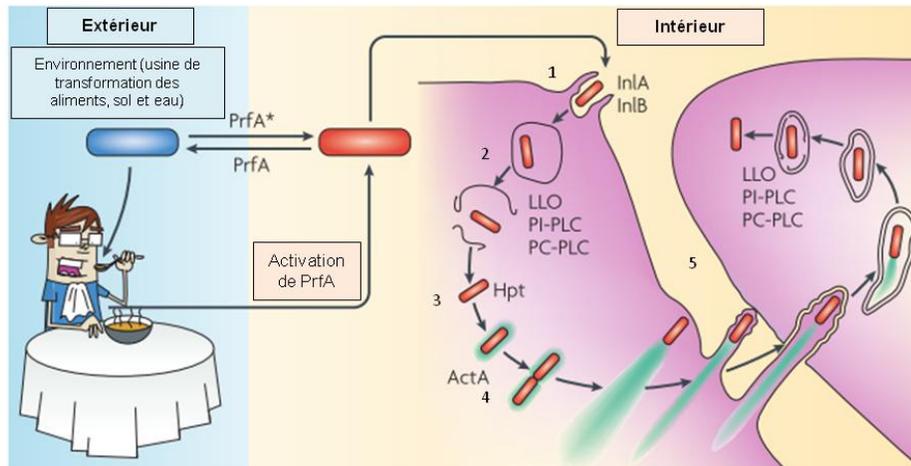


Figure 5 : Les étapes du cycle infectieux de *L. monocytogenes* (Freitag *et al.*, 2009).

(1) Pour pénétrer à l'intérieur des cellules non phagocytaires, l'internaline A (InlA) et l'internaline B (InlB), protéines de surface bactériennes interagissent avec un récepteur de la cellule hôte. InlA est nécessaire à l'entrée de la bactérie au niveau des cellules intestinales et se lie avec le récepteur glycoprotéique E-cadhérine présent à la surface de ces cellules (Mengaud *et al.*, 1996). InlB permet l'entrée de la bactérie dans les hépatocytes et dans certaines lignées de cellules fibroblastiques et épithéliales et se lie avec le récepteur de facteur de croissance des hépatocytes (HGF), nommé Met (Shen *et al.*, 2000).

(2) Une fois la bactérie internalisée dans le phagosome, elle détruit la membrane par sécrétion d'une cytolysine nommée la listériolysine O (LLO) qui forme des pores au niveau de la membrane phagosomale. De même, deux phospholipases C (PI-PLC et PC-PLC) hydrolysent les phospholipides membranaires permettant à la bactérie de regagner le cytoplasme intracellulaire.

(3) Dans le cytosol, la bactérie se multiplie et assimile de nombreux nutriments tels que des peptides, des acides lipoiques et des sucres grâce à la présence de son transporteur hexose phosphate (Hpt).

(4) La bactérie se déplace à l'intérieur de la cellule grâce à la protéine de surface ActA qui polymérise l'actine et la rassemble à un pôle de la cellule bactérienne formant une queue d'actine. Ceci lui permet de se déplacer dans le cytoplasme et de se transférer d'une cellule à une autre.

(5) La bactérie pénètre dans les cellules adjacentes et s'internalise de nouveau. Elle lyse sa double membrane (phagosomale et membranaire) grâce à la LLO et aux deux phospholipases et se propage de cellules en cellules.

4.2) PrfA : Régulateur de transcription des gènes de virulence

PrfA est le régulateur de la transcription des principaux facteurs de virulence de *L. monocytogenes*. Il régule directement l'expression de 10 gènes essentiels à l'infection de la cellule hôte (Tableau 1).

Tableau 1 : Liste des gènes dont l'expression est contrôlée par PrfA et leurs différentes fonctions (D'après Freitag *et al.*, 2009).

Nom du gène	Protéine produite	Fonction
<i>inlA</i>	Internaline A (InlA)	Participe à l'invasion de la cellule hôte
<i>inlB</i>	Internaline B (InlB)	Participe à l'invasion de la cellule hôte
<i>inlC</i>	Internaline C (InlC)	Contribue à la virulence bactérienne, rôle exact inconnu
<i>plcA</i>	Phosphatidylinositol-phospholipase C (PI-PLC)	Rôle dans la lyse du phagosome
<i>plcB</i>	Phosphatidylcholine-phospholipase C (PC-PLC)	Rôle dans la lyse du phagosome
<i>hly</i>	Listériolysine O (LLO)	Cytolysine formant des pores permettant la lyse du phagosome
<i>mpl</i>	Mpl	Métalloprotéase permettant la maturation du précurseur de PC-PLC
<i>actA</i>	Protéine induisant l'assemblage de l'actine (ActA)	Permet la mobilité intracellulaire bactérienne par la formation d'une queue d'actine bactérienne
<i>hpt</i>	Transporteur d'hexose phosphate (Hpt)	Permet la croissance intracellulaire
<i>prfA</i>	Facteur de régulation (PrfA)	Permet l'expression des facteurs de virulence

Différentes études transcriptomiques ont montré que PrfA pouvait hypothétiquement réguler indirectement l'expression de 145 gènes codant des protéines de diverses fonctions chez *L. monocytogenes* (Scotti *et al.*, 2007). Il peut aussi réguler l'expression de gènes contribuant à la résistances aux sels biliaries et à la colonisation bactérienne dans le tractus gastro-intestinal (Dussurget *et al.*, 2002; Begley *et al.*, 2005). Freitag *et al.* (1993) ont démontré que des mutants

de *L. monocytogenes* ne possédant pas de facteur PrfA fonctionnel sont incapables de se multiplier dans un macrophage et sont 100 000 fois moins virulents lors d'une infection chez la souris.

5. Epidémiologie de la listériose humaine

Depuis 1998, en France, la listériose est devenue une maladie à déclaration obligatoire et est soumise à une surveillance continue due à la sévérité de la maladie. Lorsque des isolats de *L. monocytogenes* sont détectés par des laboratoires d'analyses publics ou privés, ces isolats sont centralisés soit au Centre National de Référence des *Listeria* (CNRL, Institut Pasteur, Paris) qui réalise l'identification et la caractérisation microbiologique (génosérogroupe PCR et pulsotype) des souches isolées chez l'Homme, soit au Laboratoire National de Référence des *L. monocytogenes* (LNR, Anses, Maisons-Alfort) qui centralise les souches d'origine alimentaire et environnementale.

Lorsqu'un cas de listériose est déclaré, quelle que soit la forme clinique, le questionnaire de déclaration obligatoire est envoyé à l'Institut de Veille Sanitaire (InVs) et la souche est envoyée au CNRL pour être caractérisée. De nombreux échanges se font entre ces deux organismes permettant d'améliorer la surveillance microbiologique et d'identifier des cas non signalés. Si le CNRL détecte dans une période de moins de 6 semaines au moins 3 cas humains dont les souches présentent les mêmes caractéristiques microbiologiques, il en informe les membres de la «Cellule *Listeria*» comprenant des représentants de la Direction générale de la Santé (DGS), de l'InVs, du CNRL, de l'Anses, de la Direction générale de l'alimentation (DGAL) et de la Direction générale de la consommation, de la concurrence et de la répression des fraudes (DGCCRF) qui sont chargés de la coordination des investigations et des actions à mettre en place pour neutraliser ou éviter une éventuelle épidémie (Goulet *et al.*, 2012).

La listériose est une maladie rare mais son taux de mortalité est élevé et son taux d'hospitalisation supérieur à 92%. En France, c'est entre 1987 et 1997 qu'une diminution d'incidence de listériose de 68% a été observée. Cette diminution a été mise en corrélation avec la mise en place de mesures de prévention et de contrôle des aliments par les industries agroalimentaires qui ont fortement réduit la distribution d'aliments contaminés par *L.*

monocytogenes. En effet, l'incidence de listériose passe d'une incidence de 14,7 cas par millions d'habitants en 1986 à 5,4 cas par millions d'habitants en 1997 (Goulet *et al.*, 2001). Une diminution de l'incidence est observée jusqu'en 2001 avec une période de stabilisation jusqu'en 2005 et une augmentation du nombre de cas en 2007. Depuis 2007, l'incidence est stable autour de 5 cas par millions d'habitants par an et augmente légèrement en 2013 (Figure 6).



Figure 6 : Incidence de la listériose en France par millions d'habitants entre 1999 et 2014 (Source InVs).

La majorité des cas de listériose sont des cas sporadiques, c'est-à-dire atteignant un individu de façon isolé, mais on recense tout de même des épidémies à travers le monde où les principaux produits incriminés sont la charcuterie, le lait, les produits laitiers, les poissons, les crustacés, les fruits et les légumes consommés crus ainsi que tous les aliments ne nécessitant pas de cuisson avant d'être consommés (Tableau 2).

Tableau 2 : Epidémies internationales de listériose de 1981 à 2013 (liste non exhaustive).

Pays	Année	Nombre de cas	Aliments incriminés	Références
Canada	1981	41	Coleslaw	(Schlech <i>et al.</i> , 1983)
Etats Unis	1983	49	Lait pasteurisé	(Fleming <i>et al.</i> , 1985)
Suisse	1983-1987	122	Vacherin Mont d'Or	(Swaminathan et Gerner-Smidt, 2007)
Royaume Uni	1987-1989	366	Pâté	(Swaminathan et Gerner-Smidt, 2007)
Danemark	1989	26	Bleu	(Swaminathan et Gerner-Smidt, 2007)
France	1992	279	Langue de porc en gelée	(Jacquet <i>et al.</i> , 1995)
Nouvelle-Zélande	1992	2	Moules fumées	(Brett <i>et al.</i> , 1998)
France	1993	38	Rillettes	(Goulet <i>et al.</i> , 1998)
Etats Unis	1994	45	Lait chocolaté	(Dalton <i>et al.</i> , 1997)
Suède	1995	9	Truite arc-en-ciel	(Ericsson <i>et al.</i> , 1997)
France	1995	36	Brie (Lait cru)	(De Buyser <i>et al.</i> , 2001)
France	1997	14	Fromage Pont Lévêque (Lait cru)	(De Buyser <i>et al.</i> , 2001)
Italie	1997	1566	Salade de thon et maïs	(Aureli <i>et al.</i> , 2000)
Finlande	1999	25	Beurre	(Lyytikäinen <i>et al.</i> , 2000)
France	1999	4	Époisses	(Tourdjman <i>et al.</i> , 2014a)
France	2000	10	Rillettes	(de Valk <i>et al.</i> , 2001)
France	2000	32	Langue de porc en gelée	(de Valk <i>et al.</i> , 2001)
Etats Unis	2000	13	Fromage mexicain	(MacDonald <i>et al.</i> , 2005)
Japon	2001	38	Fromage	(Makino <i>et al.</i> , 2005)
Etats Unis	2001	16	Tranches de dinde précuites	(Frye <i>et al.</i> , 2002)
France	2002	11	Saucisses à tartiner	(Tourdjman <i>et al.</i> , 2014a)
Etats Unis	2002	54	Charcuterie de dinde	(Gottlieb <i>et al.</i> , 2006)
Royaume Uni	2003	2	Sandwichs	(Shetty <i>et al.</i> , 2009)
France	2003	4	Mortadelle	(Tourdjman <i>et al.</i> , 2014a)
Etats Unis	2007	5	Lait pasteurisé	(Centers for Disease Control and Prevention, 2008)
Etat Unis	2011	146	Melons	(Centers for Disease Control and Prevention, 2011; Laksanalamai <i>et al.</i> , 2012)
France	2012	11	Brie au lait cru	(Tourdjman <i>et al.</i> , 2014b)
France	2013	10	Quenelles	(Tourdjman <i>et al.</i> , 2014a)

Les principales souches responsables de la listériose appartiennent à la Lignée I et II avec les sérotypes 1/2a, 1/2b et 4b responsables de nombreux cas sporadiques. Les sérotypes majoritairement isolés dans le cas d'épidémie sont les sérotypes 1/2a et 4b. Ces deux lignées sont souvent retrouvées dans les aliments et apparaissent largement distribuées dans les

environnements naturels et agricoles. Les souches appartenant à la Lignée III et IV sont quant à elles détectées bien moins fréquemment et sont plus souvent associées aux mammifères non primates et aux ruminants (Lomonaco *et al.*, 2015).

Encore aujourd'hui, des cas de listériose sont détectés chaque année et de nombreux rappels de produits contaminés par *L. monocytogenes* sont rapportés. De plus selon un communiqué de presse de l'Autorité Européenne de Sécurité des Aliments (EFSA) datant du 28 janvier 2015, dans l'Union Européenne, depuis 2012 une recrudescence de la listériose de 8,6% a été observée se traduisant notamment par des formes sévères de listériose (<http://www.efsa.europa.eu/fr/press/news/150128>). Ainsi, *L. monocytogenes* reste un problème majeur pour la santé publique et pour l'industrie agroalimentaire.

6. Fréquence de *L. monocytogenes* dans les aliments et industries agroalimentaires

L. monocytogenes se retrouve très fréquemment dans les ateliers des industries agroalimentaires pouvant par la suite contaminer les aliments. La bactérie contamine les ateliers *via* la matière première des aliments (viande, poisson, lait ou légumes). Une fréquence de *L. monocytogenes* autour de 20% a été observée dans les fermes bovines et 6% et 33% dans les fermes ovines et caprines (Nightingale *et al.*, 2004). Le phénomène est similaire dans l'environnement des piscicultures où *L. monocytogenes* présente une fréquence de 18,4%. pouvant être une source de contamination du produit final et des ateliers de transformation des aliments (Miettinen et Wirtanen, 2006).

L. monocytogenes est aussi retrouvée dans les aliments cuits à cause d'une contamination post-transformation de l'aliment associée à des souches résidant dans les sites de production industrielle. En effet, la contamination peut se produire à tout moment du cycle de production par le manipulateur ou par une contamination croisée de la matière première par l'environnement de transformation. De nombreuses études ont détecté la présence de *L. monocytogenes* sur différentes zones des ateliers agroalimentaires en contact direct ou non avec les aliments (les canalisations, le sol, les équipements de transformation comme par exemple les trancheuses à viande, les tapis roulants, les couteaux...) sur lesquelles elle peut persister (Cox *et al.*, 1989; Chasseignaux *et al.*, 2002; Parisi *et al.*, 2013). Les aliments ayant subi de nombreuses

transformations et manipulations semblent plus sensibles à la contamination tels que les produits composés d'un mélange de plusieurs légumes (Sant'Ana *et al.*, 2012) ou la viande hachée. Une étude a mis en évidence que la viande hachée et coupée présente une plus haute fréquence (37,5% et 39% respectivement) de contamination par *L. monocytogenes* par rapport aux viandes crues non transformées indiquant une contamination probablement survenue lors de la transformation de la viande (Kramarenko *et al.*, 2013).

De nombreux travaux visant à estimer la fréquence de *L. monocytogenes* dans différents produits alimentaires et dans l'environnement de transformation des aliments ont été réalisés (Tableau 3). Ces différentes études rapportent une fréquence de *L. monocytogenes* de 0% à 30% tous secteurs confondus et prouvent la capacité de *L. monocytogenes* à se propager de façon très étendue.

La majorité des sérotypes retrouvés sur les surfaces et les aliments sont les sérotypes 1/2a, 1/2b, 1/2c, 4a et 4b, aussi fréquemment responsable de cas de listériose (Kramarenko *et al.*, 2013). Les sérotypes 4b et 1/2a sont majoritairement retrouvés dans le lait et les produits laitiers (Silva *et al.*, 2003; Chambel *et al.*, 2007; Fox *et al.*, 2011; Montero *et al.*, 2015)

Tableau 3 : Fréquence de présence de *L. monocytogenes* dans différentes catégories d'aliments et d'environnements de transformation des aliments.

Pays	Produits alimentaires / échantillons	Fréquence de <i>L. monocytogenes</i>	Fréquence de <i>L. monocytogenes</i> par catégorie d'échantillons	Références
Italie	Saucisses fraîches et fermentées (525 échantillons)	28,2%	38,9% (saucisses fraîches), 15,2% (saucisses fermentées)	(De Cesare <i>et al.</i> , 2007)
Finlande	Surface des filets agricoles de piscicultures, équipements, eau, fonds marins, poissons (221 échantillons)	18,4%		(Miettinen et Wirtanen, 2006)
France	Surfaces d'environnement de transformation de poulet cru et de porc cru (sol, mur, égout) et d'équipements (table de travail, courroie de transport, couteaux) (497 échantillons)	23,7%	Pendant les opérations: 38,9% (environnement de poulet), 37% (environnement porc). Après nettoyage : 13,1% (environnement poulet), 2,5% (environnement porc)	(Chasseignaux <i>et al.</i> , 2002)
Estonie	Viandes, poissons, lait, pâtisseries, produits végétaux et culinaires, fruits, légumes (21574 échantillons)	2,6%	2,1% (produits basés sur légumes et fruits), 2,3% (pâtisseries), 18,7% (produits avec viande crue), 18,5% (salade mixte), 18,1% (lait cru), 8,8% (poissons crus)	(Kramarenko <i>et al.</i> , 2013)
Chili	Produits prêt à être consommés (850 échantillons)	25%	40% (fromage), 25% (fruits de mer), 55% (pâté), 13% (saucisses cuites), 25% (viande crue), 12% (poulet cru), 26% (poissons fumés), 2% (légumes frais), 29% (légumes congelés)	(Montero <i>et al.</i> , 2015)
Irlande	Fromage, lait cru, environnement de fabrication et environnement externe à la transformation (1591 échantillons)	15,7%		(Fox <i>et al.</i> , 2011)
Italie	Fromage (gorgonzola) (1656 échantillons)	2,1% (après emballage), 4,8% (à la fin de la durée de conservation)		(Manfreda <i>et al.</i> , 2005)
Brésil	Fromage frais, atelier de transformation du fromage (ustensiles, surface de contact avec le produit et équipements), environnements (plancher, canalisation, étagères en bois) (218 échantillons)	2,9%	16,7% (lait cru), 14,3% (sol de la salle de réfrigération des fromages)	(Silva <i>et al.</i> , 2003)
Brésil	Eau, saumure, produit semi fini, fromage frais emballé, surfaces en contact avec les aliments, surfaces isolées des aliments (sol, canalisation, mur et étagère) (219 échantillons)	13,3% et 9,6% selon l'industrie fromagère	51,6% et 21,6% (surfaces isolées des aliments selon l'industrie fromagère)	(Barancelli <i>et al.</i> , 2011)
Italie	Lait cru, fromage semi fini et fini, surface en contact avec le produit et surface isolée (547 échantillons)	20,6%	18,8% (canalisation du sol), 4,9% (surface en contact avec les aliments), 2,4% dans les aliments.	(Parisi <i>et al.</i> , 2013)
USA	Poisson cru, poisson en transformation, produit fini (poisson fumé), environnement (canalisation du sol, évier, plancher à basse température, et équipements) (531 échantillons)	17,8%	21,4% (environnement), 8,8% (poisson cru : saumon, poisson blanc, chevesne), 16,5% (poisson en cours de transformation), 11,5% (produit fini)	(Norton <i>et al.</i> , 2001)
Japon	Poisson cru prêt à être consommé et autres aliments (701 échantillons)	5,4%	12,1% (thon haché), 2,6% (bloc de thon), 5,7% (œuf de saumon), 9,1% (œuf de morue), 3% (saumon fumé), pas détecté dans fruit de mer séché, salade, sandwich, jambon et fromage.	(Miya <i>et al.</i> , 2010)

Italie	Produit avec fruits de mer prêt à être consommé réfrigéré (carpaccio de saumon salade de mer...) (38 échantillons)	23,6%	7,9% (concentration de <i>L. monocytogenes</i> > 100 UFC/g)	(Gambarin <i>et al.</i> , 2012)
Serbie	Poisson frais (réfrigéré), produit de la mer congelé, poisson salé, poisson traité thermiquement, conserves de poissons (470 échantillons)	1,92%		(Kuzmanović <i>et al.</i> , 2011)
Espagne	Saumon fumé et surimi (bâtonnet de crabe, jeune anguille) (250 échantillons)	2,4%	4,8% (saumon fumé), 0% (surimi)	(González <i>et al.</i> , 2013)
USA	Crabe cru, viande de crabe cuite, environnement de transformation crabe (1736 échantillons)	2%	4,5% (crabe cru), 0,2% (viande de crabe), 2,1% (environnement)	(Pagadala <i>et al.</i> , 2012)
Allemagne	Produit contenant du poulet prêt à être consommé (300 échantillons)	3%	1% (concentration de <i>L. monocytogenes</i> > 100 UFC/g) 2% (concentration de <i>L. monocytogenes</i> entre 10 et 100 UFC/g), 96% (concentration de <i>L. monocytogenes</i> < 10 UFC/g)	(Meyer <i>et al.</i> , 2012)
Suède	Poisson mariné, fumé, emballé. Fromage à pâte molle, semi molle et produit contenant de la viande prétraitée à la chaleur (1590 échantillons) et environnement de transformation de poisson, de viande et de produits laitiers (93 échantillons)	4,7%	0,4% (fromage), 1,2% (produits contenant de la viande), 14% (poisson fumé à froid et mariné. 2% (poisson fumé à chaud), <i>L. monocytogenes</i> > 100 UFC/g : 0,2% (fromage), 0,5% (poisson). 64% (environnement viande)	(Lambertz <i>et al.</i> , 2012)
Chine	Produits prêts à être consommés (rôti de canard, porc braisé, jambon, patte de poulet frit, oie rôtie et produits laitiers) (223 échantillons)	6,33 %	26,7% (plat de légumes froids en sauce), 6.3% (charcuterie de volaille), 2.8% (porc cuit)	(Chen <i>et al.</i> , 2014)
Brésil	Légumes ensachés (laitue, carotte, chou vert, chou) (512 échantillons)	3,1%	0,93% (salades mixtes), 2% (laitue), 4,2% (chou vert), 5,6% (mélange pour nouilles sautées), 5,6% (cresson), 23,1% (chicorée scarole) 18,2% (choux), 9,1% (épinards), 23,3% (mélange pour fondue japonaise)	(Sant'Ana <i>et al.</i> , 2012)
France	Saucisses fermentées et séchées, surface avec ou sans contact de la viande après nettoyage et désinfection et pendant l'activité (plancher, mur, salle de séchage et de vaporisation, massicot, hachoir, machine de mixage) (1029 échantillons)	15%	15,1% (surface en contact avec viande après nettoyage), 50,9% (surface en contact avec viande pendant l'activité), 13,3% (surface sans contact avec viande), 33,9% (viande crue)	(Thévenot <i>et al.</i> , 2005)
Espagne	Fruits, légumes frais entier, salades et pousses (300 échantillons)	0,7%	3,4% (laitue), 0,8% (salade mixte)	(Abadias <i>et al.</i> , 2008)
Croatie	Légumes et légumes réfrigérés (100 échantillons)	1%	Présence dans 1 chou	(Kovačević <i>et al.</i> , 2013)

7. Persistance de *L. monocytogenes* dans l'industrie agroalimentaire

L. monocytogenes peut persister des mois, voire des années dans les ateliers de transformation des aliments. Cette persistance est due à sa capacité à résister dans des environnements hostiles et/ou à la présence de sites refuges dans l'environnement permettant à la bactérie d'échapper aux conditions extrêmes.

7.1) Définition de la persistance

Dans les environnements de transformation des aliments, les souches de *L. monocytogenes* peuvent se distinguer en différents types, des souches dites persistantes et des souches dites sporadiques ou non persistantes. Selon Carpentier et Cerf (2011), la persistance est un concept encore mal défini mais pour distinguer les souches, certains travaux utilisent des méthodes de typage moléculaire. Lorsqu'un même profil moléculaire est isolé de manière répétée dans la même usine de transformation des aliments, sur plusieurs visites et sur une période étendue (des mois ou des années), les auteurs supposent que le profil appartient à la même souche et qu'elle est persistante. Une étude définit une souche comme persistante si elle est retrouvée 5 fois ou plus sur une période de temps supérieure ou égale à 3 mois. Ainsi, les souches sporadiques ou non persistantes sont définies comme telles lorsqu'elles sont isolées moins de 5 fois ou dans une période de temps inférieure à 3 mois (J. M Lundén *et al.*, 2003). Alors qu'une autre étude considère une souche comme persistante lorsqu'elle est isolée dans le même environnement plusieurs fois sur une période de 1 à 4 ans, et une souche est dite non persistante lorsqu'elle est isolée une seule fois du même environnement sur cette même période (Nilsson *et al.*, 2011).

De nombreux travaux ont révélé la présence de souches persistantes dans l'industrie agroalimentaire, que ce soit dans les industries de transformation de poisson, de lait ou de viande contaminant l'environnement pendant de longues périodes (Miettinen *et al.*, 1999; Vogel *et al.*, 2001; J. M. Lundén *et al.*, 2003; Lomonaco *et al.*, 2009).

Les mécanismes d'établissement et de persistance de certaines souches ne sont pas encore bien connus. Une étude a évalué la similarité génétique par PGFE et caractérisé par ALFP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) des souches persistantes et sporadiques isolées de 11

industries agroalimentaires. Elle révèle que la plupart des génotypes des souches persistantes sont spécifiques de ces souches et qu'il en est de même pour les souches sporadiques, ce qui laisse supposer que certains génotypes sont plus à même de causer une contamination prolongée dans les industries (Autio *et al.*, 2003).

A contrario, une autre étude comparant *in silico* la séquence du génome et le protéome putatif de deux souches hautement persistantes dans l'industrie de transformation de saumon fumé à froid identifie des séquences génomiques et un profil protéomique extrêmement similaires à d'autres souches non persistantes actuellement séquencées (Holch *et al.*, 2013). Il a également été démontré que certaines souches présentant un profil PGFE similaire sont persistantes dans une usine et non persistantes dans une autre usine (J. M. Lundén *et al.*, 2003). Ces différents constats prouvent la complexité de la définition de la persistance d'une souche et que de nombreuses études restent à réaliser.

Il est aussi possible que la persistance des souches soit causée par les nombreux facteurs environnementaux rencontrés dans le contexte de la transformation des aliments. De plus des différences de phénotypes entre les souches peuvent exister, notamment dans leur capacité à adhérer aux surfaces, à former des biofilms, à tolérer les désinfectants, ou à résister aux conditions de stress environnementaux.

7.2) Adhésion initiale de *L. monocytogenes* aux surfaces

L. monocytogenes a la capacité d'adhérer à de nombreuses surfaces retrouvées dans les usines de transformation des aliments tels que l'acier inoxydable, le caoutchouc, le verre et les polymères (polypropylène, polyuréthane, polyvinylchloride...) (Beresford *et al.*, 2001; Silva *et al.*, 2008).

Différentes études évaluent le niveau d'adhérence des souches persistantes et non persistantes. Certaines ont montré que les souches persistantes adhéraient en plus grand nombre sur de l'acier inoxydable par rapport aux souches non persistantes après un contact d'1 h et de 2 h sur la surface (Lundén *et al.*, 2000, 2002). Cependant les souches non persistantes après un temps de contact plus long (72 h) atteignent le même nombre de cellules adhérentes sur la surface que les souches persistantes (Lundén *et al.*, 2000). Ces résultats ont été confirmés par Wang *et al.* (2015)

qui révèlent une plus forte adhésion des souches persistantes sur du polystyrène le premier jour mais ensuite une adhésion identique aux souches non persistantes au bout du 3^{ème} et 5^{ème} jours.

Ces travaux confirment que les souches persistantes ont une plus forte adhérence que les souches non persistantes lorsque l'adhésion a lieu sur un temps court (quelques heures) et supposent qu'elles vont être beaucoup plus difficiles à éliminer mécaniquement, ceci favorisant leur survie et augmentant leur résistance au stress.

Indépendamment du critère de persistance, l'adhésion et la colonisation bactérienne des surfaces dépendent fortement de la nature de la surface (hydrophobicité, rugosité, charge) et des propriétés de surface des bactéries (Chavant *et al.*, 2002). Selon Silva *et al.* (2008), *L. monocytogenes* adhère plus fortement au granite et au marbre présentant une rugosité très régulière avec de nombreux points de contact et une haute capacité d'accepteur d'électron. Le polypropylène est la surface où les cellules adhèrent le moins bien. Comme dans de nombreux travaux, la variabilité d'adhérence entre les souches est très présente, dépendant de la souche et des matériaux étudiés.

7.3) Formation de biofilms

L'adhésion des souches de *L. monocytogenes* aux surfaces est une première étape permettant ainsi par la suite la formation de biofilm. Le biofilm peut être défini comme une communauté de cellules structurées incluse dans une matrice polymérique produite par les cellules et qui adhère sur une surface inerte ou vivante (Møretrø et Langsrud, 2004). La formation d'un biofilm est composée de deux étapes : (i) interaction de la bactérie avec la surface et adhésion réversible se produisant en quelques minutes ou quelques heures, (ii) adhésion irréversible des cellules à la surface, multiplication bactérienne et production d'une matrice principalement composée de polysaccharides extracellulaires nommés exopolysaccharide (EPS) associés à des ions métalliques, des cations divalents ou des macromolécules (lipides, protéines, ADN...), ensuite formation de microcolonies, d'épaisse multicouches et enfin d'un biofilm composé de plusieurs espèces microbiennes (Donlan, 2002; Møretrø et Langsrud, 2004). Le biofilm permet aux microorganismes de résister à différents stress qu'ils soient physiques ou chimiques (Cruz et Fletcher, 2011).

Certain travaux ont démontré que les souches de *L. monocytogenes* possèdent une grande variabilité dans l'adhésion aux surfaces et la formation de biofilm (Chae et Schraft, 2000; Kalmokoff *et al.*, 2001; Djordjevic *et al.*, 2002; Nilsson *et al.*, 2011). Borucki *et al.* (2003) ont montré que des souches persistantes issues de réservoirs de lait industriel ont une meilleure capacité à former des biofilms que des souches non persistantes issues de ce même environnement. Les souches persistantes analysées en microscopie électronique à balayage montrent clairement un biofilm dense en trois dimensions avec un réseau cellulaire structuré alors que les souches non persistantes forment un biofilm composé seulement d'agrégats de cellules clairsemés sur la surface en acier inoxydable et des cellules isolées attachées sur la surface en PVC (Borucki *et al.*, 2003). Norwood et Gilmour (1999) démontrent aussi une meilleure adhérence des souches persistantes sur de l'acier inoxydable. Au contraire d'autres travaux comparant ces deux types de souches n'ont détecté aucune différence dans leur capacité à former des biofilms (Djordjevic *et al.*, 2002; Harvey *et al.*, 2007; Nilsson *et al.*, 2011; Orgaz *et al.*, 2013).

Certains auteurs ont suggéré des liens entre la capacité à former des biofilms et les sérotypes. Norwood et Gilmour (1999) ont montré que les souches de sérotype 1/2c ont une meilleure adhérence que les souches 1/2a et 4b sur de l'acier inoxydable. D'autres études supposent également que les souches de la Lignée II (1/2a et 1/2c) ont une plus forte capacité à former des biofilms que les souches appartenant à la Lignée I (4b et 1/2b) sur du PVC et du polystyrène pendant 40 h à 30 °C et 48 h à 20 °C (Borucki *et al.*, 2003; Harvey *et al.*, 2007). Au contraire, Djordjevic *et al.* (2002) révèlent que les souches appartenant à la Lignée I ont une meilleure capacité à former des biofilms sur du PVC et de l'acier inoxydable pendant 40 h à 32 °C que les souches appartenant à la Lignée II.

Il semblerait que le milieu nutritif joue aussi un rôle dans la capacité des souches à former des biofilms. Harvey *et al.* (2007) révèlent que les souches de *L. monocytogenes* produisent des biofilms plus importants dans le milieu Modified Welshimer's Broth (MWB) que dans le milieu Tryptic Soy Broth (TSB). Ils observent également des biofilms plus développés dans le milieu TSB que dans du milieu TSB dilué supposant que la réduction de nutriments réduit la croissance des biofilms. En accord avec ces travaux, Djordjevic *et al.* (2002) démontrent que les souches ont une plus forte capacité à former des biofilms dans le milieu MWB que dans le milieu TSB supplémenté avec de l'extrait de levure.

La contradiction de certains de ces travaux peut s'expliquer par des différences de méthodologies, de conditions expérimentales, de taille d'échantillons et de souches bactériennes.

7.4) Tolérance et résistance aux agents désinfectants

Dans une revue, Carpentier et Cerf (2011) définissent la tolérance comme une adaptation des cellules permettant une croissance à une concentration sous létale d'un désinfectant et la résistance comme la capacité d'une souche à survivre à une concentration létale.

Certaines souches isolées dans des environnements de transformation des aliments possèdent une plus haute tolérance à certains désinfectants. Mereghetti *et al.* (2000) révèlent que 7% des souches issues de produits alimentaires et d'environnements de transformation des aliments possèdent déjà un phénotype tolérant aux ammoniums quaternaires, désinfectants largement utilisés en industries agroalimentaires. De même Xu *et al.* (2014) démontrent que 26,4% des isolats sont tolérants à ce type de désinfectant. Une autre étude a également trouvé 6% d'isolats de sérotype 4b et 20% d'isolats de sérotypes 1/2a et 1/2b présentant ce type de résistance (Ratani *et al.*, 2012). Certaines souches de *L. monocytogenes* sont donc plus tolérantes aux désinfectants et peuvent perdurer plus facilement dans les environnements de transformation des aliments.

De nombreuses études ont supposé que les souches persistantes ont une tolérance et une résistance aux désinfectants supérieures aux souches non persistantes. Cependant, Lourenço *et al.* (2009) ont montré que la résistance et la tolérance des souches aux désinfectants n'ont pas de lien avec la persistance ou non de souches isolées de laiteries. Il en est de même pour deux études où les souches persistantes et non persistantes augmentent leur tolérance aux désinfectants après une exposition à une concentration sous létale de 2 h (J. Lundén *et al.*, 2003; Heir *et al.*, 2004). D'autres études ne montrent pas de corrélation entre la résistance de souches persistantes et non persistantes à des concentrations létales de désinfectants et révèlent que les cellules attachées sur acier inoxydable sont aussi sensibles aux désinfectants que les bactéries planctoniques (Holah *et al.*, 2002; Kastbjerg et Gram, 2009).

Il semblerait que la présence de matières organiques et le type de matrice alimentaire dans lesquels se trouvent les cellules pendant la désinfection contribuent à l'efficacité des désinfectants. Ainsi Gram *et al.* (2007) ont démontré que l'utilisation d'acide peracétique comme

désinfectant sur *L. monocytogenes* dans une émulsion de saumon détruit toutes les bactéries alors que la population bactérienne est réduite de seulement 1 à 2 log dans une émulsion de viande. Une autre étude révèle que la présence de matières organiques diminue l'efficacité des désinfectants (Lourenço *et al.*, 2009).

7.5) Sites refuges

Carpentier et Cerf (2011) présument de l'existence de sites difficiles à atteindre lors des étapes de nettoyage et de désinfection pouvant servir de refuge pour les bactéries leur permettant de persister et de se propager pour contaminer d'autres surfaces. Les équipements (machine de découpe, tapis roulant...) peuvent posséder des parties complexes telles que des pièces creuses, des soudures non polies ou des endroits difficiles à atteindre par des actions mécaniques de nettoyage et de désinfection. De même, dans les ateliers, il y a des zones hors de portée du nettoyage mécanique, des joints, ou du matériel usé possédant des crevasses ou des fissures qui vont créer des conditions idéales pour la persistance bactérienne. L'eau ou des matières organiques peuvent stagner dans ces niches qui sont difficiles à rincer, nettoyer et désinfecter (Carpentier et Cerf, 2011). Les bactéries peuvent donc être exposées à des concentrations sublétales de désinfectant du fait d'une répartition inégale du produit, à un rinçage insuffisant et à la présence de matière organique connue pour inactiver les désinfectants. Ceci créant des conditions adéquates pour la croissance bactérienne et l'adaptation des bactéries (Lundén *et al.*, 2002; Lourenço *et al.*, 2009).

8. Stratégies de lutte anti-*Listeria*

Pour lutter contre la persistance de *L. monocytogenes* et son introduction dans les ateliers de transformation des aliments, différentes stratégies aussi bien réglementaires que techniques ont été mises en place afin d'améliorer son élimination et de réduire l'impact économique et sanitaire qu'engendre cette bactérie.

8.1) Réglementations

En Europe, le Règlement CE No 2073/2005 (Commission Européenne, 2005) fixe les critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires et prévoit la mise en œuvre de bonnes pratiques d'hygiène, de fabrication ainsi que la mise en œuvre des principes de l'HACCP (Analyse des risques- Points critiques pour leur maîtrise). Il demande aux exploitants du secteur alimentaire de respecter les critères microbiologiques pour certains microorganismes présentant des dangers pour la santé humaine et animale par des contrôles sur les denrées alimentaires et à certains points de la chaîne alimentaire (prélèvement d'échantillons, conduite d'analyse et mise en œuvre d'actions correctives).

Le contrôle de *L. monocytogenes* concerne principalement les denrées alimentaires prêtes à être consommées c'est-à-dire les denrées alimentaires que le producteur ou le fabricant destine à la consommation humaine directe et ne nécessitant pas une cuisson ou une autre transformation efficace pour éliminer ou réduire à un niveau acceptable les microorganismes dangereux (Règlement CE No 2073/2005).

Le règlement stipule que :

- (i) dans les denrées alimentaires prêtes à être consommées destinées aux nourrissons et dans les denrées alimentaires prêtes à être consommées destinées à des fins médicales spéciales *L. monocytogenes* doit être absente dans 25 g (n=10 où n représente le nombre d'échantillons).
- (ii) dans les denrées alimentaires prêtes à être consommées permettant le développement de *L. monocytogenes*, autres que celles destinées aux nourrissons ou à des fins médicales spéciales, le nombre de *L. monocytogenes* doit être limité à 100 UFC/g (n=5) pendant toute sa durée de conservation. Il doit y avoir absence de *L. monocytogenes* dans 25 g (n=5) au moment de la sortie du produit de l'usine de production lorsque le producteur n'est pas en mesure de démontrer à l'autorité compétente que le produit respectera la limite de 100 UFC/g pendant toute sa durée de conservation.
- (iii) dans les denrées alimentaires prêtes à être consommées ne permettant pas le développement de *L. monocytogenes*, autres que celles destinées aux nourrissons ou à des fins médicales spéciales, la concentration de *L. monocytogenes* doit être limitée à 100 UFC/g (n=5) pendant toute sa durée de conservation.

Aux Etats-Unis, une "tolérance" 0 à *L. monocytogenes* (absence dans 25 g, n=5) est mise en place quelle que soit la durée de vie du produit et l'environnement de transformation (Jordan *et al.*, 2015).

8.2) Réduction de l'arrivée de *L. monocytogenes* dans les environnements de transformation des aliments

Pour empêcher *L. monocytogenes* de se propager dans les ateliers de production, la conception de l'usine est importante. La mise en place d'un système de marche en avant est ainsi primordiale. Il a été montré que la compartimentation et la séparation des différentes opérations de transformation et notamment la séparation des zones entre produits crus et produits traités à la chaleur permettent d'éviter des contaminations croisées dans les lignes de production et des contaminations post-transformation sur le produit fini (J. M. Lundén *et al.*, 2003). De même, la séparation des zones de lavage des bottes et de lavage des mains est essentielle pour empêcher sa propagation (Jordan *et al.*, 2015). L'existence de sites refuges hébergeant *L. monocytogenes* est aussi la conséquence d'une mauvaise conception des ateliers, des équipements et de l'utilisation de matériels usés. De plus, il est très important que le personnel respecte les bonnes pratiques d'hygiène et porte les équipements de protection appropriés à l'industrie pouvant inclure des gants, blouses, bottes, filets à cheveux et masques.

La vigilance doit toujours être présente car *L. monocytogenes* est capable de se maintenir dans de nombreux environnements par sa résistance au stress et sa capacité à croître à basse température. Une contamination doit être prise au sérieux et en fonction du secteur agroalimentaire une fréquence d'échantillonnage appropriée sur des sites spécifiques doit être effectuée. Enfin, il faut établir des zones de contrôle où le risque de contamination peut être critique et localiser les voies de transmission de *L. monocytogenes* (Jordan *et al.*, 2015).

8.3) Procédure de nettoyage et de désinfection

Systématiquement, les industries agroalimentaires développent des procédures de nettoyage et de désinfection afin d'assurer une qualité satisfaisante des produits alimentaires. Après la période de production, une étape de nettoyage et de désinfection est appliquée consistant à éliminer les déchets de produits alimentaires, les salissures faites pendant la période de

production sur les équipements de la chaîne de production, les contaminations chimiques et microbiologiques.

Généralement une première étape consiste à (i) éliminer au préalable les déchets physiques par un simple rinçage à l'eau, (ii) nettoyer l'atelier par l'application d'un agent chimique, (iii) rincer, (iv) désinfecter par un agent chimique, (v) rincer et sécher l'atelier (Héry *et al.*, 2003).

Le nettoyage a pour but d'éliminer les résidus de produits alimentaires et salissures à l'aide d'un détergent (Van Houdt et Michiels, 2010). Les principaux détergents peuvent être des alcalins (soude, potasse...), des acides (acide phosphorique, nitrique ou acétique..), des agents chélatants ou des agents de surfaces (cationiques, anionique et amphotères) (Héry *et al.*, 2003). Les surfaces sont nettoyées mécaniquement par brossage, raclage et lavage des souillures visibles avec des jets à basse pression. Des mousses et des gels nettoyants ainsi que des jets à haute pression sont aussi utilisés pour nettoyer ces surfaces (Wirtanen et Salo, 2003).

La désinfection a pour objectif d'éliminer et/ou de tuer les microorganismes indésirables à l'aide d'un désinfectant sur les surfaces avant de commencer la production (Wirtanen et Salo, 2003). L'utilisation d'un type de désinfectant va dépendre du secteur agroalimentaire, du matériel utilisé, de l'adhérence des microorganismes et du produit en fabrication sur la ligne de production. Les désinfectants pouvant être utilisés en industrie agroalimentaire sont listés Tableau 4.

Tableau 4 : Type de désinfectants pouvant être utilisés en industrie agroalimentaire (Héry *et al.*, 2003).

Type de désinfectants	Exemples	Informations supplémentaires
Les halogènes	Chlore et ses dérivés : hypochlorite de sodium (eau de javel), les chlorocyanurates de sodium	Produits faciles d'emploi et peu coûteux.
Agents oxydants	Le peroxyde d'hydrogène (H ₂ O ₂), l'ozone, l'acide peracétique.	Composés très actifs mais sont corrosifs.
Aldéhydes	Le formol et le glutaraldéhyde	Large spectre bactéricide mais peuvent provoquer des irritations sur les utilisateurs et générer des résidus toxiques.
Agents tensio-actifs	Les ammoniums quaternaires (largement utilisés)	Grande stabilité, non corrosifs et bon pouvoir mouillant.
Acides	Les acides organiques : acide acétique, lactique, citrique. Les acide non organiques : nitrique, sulfurique, chlorhydrique...	Utilisés notamment pour le détartrage
Bases	Souvent associées au chlore sous forme d'alcalins chlorés (chloramine-T...)	Peuvent générer des résidus toxiques
Alcools	L'éthanol, l'isopropanol, le méthanol...	Efficaces contre les cellules végétatives mais inefficaces contre les spores.
Agents physiques	Les rayonnements ionisants, les UV	

8.4) Nouvelles stratégies de lutte

Les procédures de nettoyage et de désinfection ne sont pas les seules pratiques pouvant être utilisées en industrie agroalimentaire pour contrôler les microorganismes pathogènes. De nouvelles technologies peuvent être mises en place ou sont encore en cours d'étude afin d'améliorer la lutte contre les pathogènes alimentaires.

8.4.1) Les bactériocines

Les bactériocines sont des peptides produits par certaines bactéries possédant le potentiel d'inhiber d'autres bactéries incluant des pathogènes. Les bactériocines les plus étudiées sont celles produites par les bactéries lactiques reconnues comme étant non toxiques et possèdent un spectre d'hôte qui peut être plus ou moins large, voire même cibler une seule espèce (Jordan *et al.*, 2015). Les bactériocines ont différents mode d'action et peuvent (i) plus fréquemment former

des pores au niveau de la membrane des cellules cibles et provoquer une rupture de l'intégrité membranaire, (ii) inhiber la synthèse de DNase et RNase, ou (iii) inhiber la synthèse du peptidoglycane de la paroi bactérienne (Cleveland *et al.*, 2001; Jordan *et al.*, 2015).

La nisine produite par *Lactococcus lactis* est la seule bactériocine approuvée pour une utilisation dans les produits alimentaires aux Etats Unis et en Europe (numéro d'additif : E234). Elle est largement reconnue pour inhiber *L. monocytogenes* (Mahdavi *et al.*, 2007; García-Almendárez *et al.*, 2008) avec pour mode d'action la formation de pore dans la membrane de la cellule cible (Moll *et al.*, 1999). D'autres études ont également montré que la pédiocine et l'entérocin AS-48 pouvaient inhiber *L. monocytogenes* dans les aliments mais elles ne sont pas commercialisées (Rodríguez *et al.*, 2005; Baños *et al.*, 2016).

A ce jour, seule la nisine est autorisée pour conserver les aliments et de nombreuses études restent à être menées pour déterminer les conditions optimales d'utilisation de ces bactériocines. Il faut s'assurer de leur efficacité et de leur sûreté pour à terme permettre leur utilisation dans l'industrie agroalimentaire.

8.4.2) Les bactériophages

Les bactériophages sont des virus infectant les bactéries et sont répandus dans tous les environnements. Ils possèdent l'avantage d'être hautement spécifiques de la bactérie ciblée et sont non toxiques affichant une alternative technologique sûre pour leur utilisation dans les environnements des industries agroalimentaires. Les phages ont deux cycles de reproduction (i) un cycle lysogénique où ils vont injecter et intégrer leur matériel génétique dans le chromosome bactérien sans exprimer de virions ou (ii) un cycle lytique où ils vont injecter leur matériel génétique dans la bactérie entraînant la production de virions et la lyse bactérienne. Les phages utilisés comme agents de biocontrôle doivent être virulents, strictement lytiques et incapables de transduction et de transfert horizontal de gène (Jordan *et al.*, 2015).

Il a été montré que certains bactériophages spécifiques de *L. monocytogenes* sont capables d'infecter et d'inhiber la formation de biofilm de *L. monocytogenes* (Hibma *et al.*, 1997; Carlton *et al.*, 2005; Simões *et al.*, 2010). Certains produits de préparation de phages comme les produits LMP-102 et ListexTM ont déjà été reconnus sans danger aux Etats Unis et peuvent être utilisés comme additif alimentaire (Jordan *et al.*, 2015). Cependant des études restent à être menées sur

l'application des bactériophages et cette technologie n'est pas encore très courante dans l'industrie agroalimentaire.

8.4.3) Les détergents enzymatiques

Les enzymes utilisées comme détergent sont efficaces sur les biofilms bactériens et peuvent être utilisées comme agent de biocontrôle dans l'industrie agroalimentaire (Augustin *et al.*, 2004). Ces enzymes sont généralement des protéases et des glycoprotéines et peuvent être utilisées en synergie avec des désinfectants (Meyer, 2003). Cependant les enzymes sont coûteuses et leur production est généralement protégée par des brevets limitant leur commercialisation (Simões *et al.*, 2010).

8.4.4) Autres technologies

D'autres procédés sont actuellement testés pour lutter contre *L. monocytogenes* dans les industries agroalimentaires et peuvent être des alternatives aux désinfections chimiques telles que l'utilisation d'ozone (Guzel-Seydim *et al.*, 2004; Nicholas *et al.*, 2013), la technique de plasma froid (Ziuzina *et al.*, 2014, 2015), la photocatalyse (Long *et al.*, 2014) et la vapeur sèche saturée (Ban *et al.*, 2014). Ces technologies montrent toutes une diminution de la viabilité de *L. monocytogenes* après traitement et possèdent un fort potentiel pour la décontamination microbienne en industrie agroalimentaire.

Néanmoins, certaines de ces techniques n'ont pas encore été suffisamment étudiées et doivent encore être évaluées en termes de coût, de sécurité, d'impact environnemental et d'applications concrètes.

L. monocytogenes est une bactérie bacille à Gram positif largement répandue dans l'environnement (le sol, la végétation l'eau). Elle a la capacité de se multiplier et de résister à des conditions hostiles telles que des températures de réfrigération, de faibles valeurs de pH et de fortes concentrations en sels. C'est une bactérie pathogène capable d'infecter de nombreux hôtes (mammifères, oiseaux, poissons) dont l'Homme et est responsable de la listériose. De nombreuses épidémies de listériose ont été recensées incriminant les produits suivants : la charcuterie, les produits à base de lait, les poissons, les crustacés, les fruits et les légumes consommés crus. Cette grande variété de produits montre que *L. monocytogenes* est un problème de sécurité sanitaire majeur pour l'industrie agroalimentaire. Elle est retrouvée très fréquemment dans ces industries que ce soit dans les aliments, sur les surfaces des machines de production et sur les surfaces qui ne sont pas en contact avec les aliments (sol, canalisation, mur) où elle est capable de persister pendant de longues périodes.

Les études sur les phénotypes engendrant la persistance d'une souche sont très contradictoires mais il semblerait que la capacité de la souche à adhérer aux surfaces, à former des biofilms et à résister aux désinfectants soit déterminante dans sa propagation au sein des ateliers. L'existence de zones dans les ateliers difficiles à nettoyer mécaniquement, où de l'eau et des concentrations non létales en désinfectant peuvent stagner permet aux bactéries de survivre tout en développant une résistance à ces produits. Le contrôle de *L. monocytogenes* dans les aliments est réglementé. De bonnes pratiques d'hygiène et des procédures de nettoyage et de désinfection sont mises en œuvre par les industriels afin de s'assurer de la qualité de leur produit. Le nettoyage et la désinfection chimique est la procédure la plus courante dans l'industrie agroalimentaire mais d'autres technologies alternatives avec des actions biologiques (bactériophages, bactériocines, enzymes) sont en cours d'étude ainsi que d'autres procédés permettant de lutter contre le développement de résistance aux désinfectants chimiques.

Chapitre 2 : Impact des fluctuations hydriques sur les microorganismes

Les microorganismes sont très fréquemment exposés aux fluctuations de l'humidité relative dans leurs environnements naturels et pendant certains procédés industriels. Ces fluctuations sont composées de phase de déshydratation puis de réhydratation qui provoquent de nombreux effets sur les cellules. En effet, l'eau est un composé majeur des cellules représentant généralement 95 à 60% de leur volume (Ellis et Minton, 2003).

1. L'eau, molécule essentielle à la structure et à l'activité cellulaire

L'eau est une molécule essentielle à la survie des cellules, assurant un rôle de solvant et structurant pour les biomolécules cellulaires. Sa présence dans l'environnement et dans certains milieux (liquides, gazeux) est définie par deux paramètres : l'activité de l'eau (a_w) et l'humidité relative (HR).

1.1) Définition de l'activité de l'eau (a_w) et de l'humidité relative (HR) de l'air

L' a_w est définie par la pression de vapeur d'eau p présente dans le produit divisée par la pression de vapeur d'eau saturante p_0 représentée par l'équation suivante (1) :

$$(1) \quad a_w = \frac{p}{p_0}$$

Les valeurs de l' a_w sont comprises entre 0 et 1. L'ajout de solutés dans l'eau pure conduit à une modification de l'état hydrique du milieu. L'association entre l'eau et les solutés présents dans le milieu conduit à un changement d'organisation de l'eau, différente de celle de l'eau pure, qui engendre une diminution importante de la quantité d'eau disponible pour les organismes vivants. Plus la valeur de l' a_w est grande, plus l'eau disponible est importante dans les produits et pour les organismes vivants (Tableau 5).

Tableau 5 : Valeurs d' a_w de différents produits alimentaires limitant la croissance de microorganismes (D'après Brown, 1976).

a_w	Produits alimentaires	Inhibition des microorganismes
1 à 0,95	Produits frais (légumes, viandes, poissons, laitages)	Bacille à Gram négatif, quelques levures
0,95 à 0,91	Saucisses sèches, jambons salés, fromages	La plupart des bactéries (cocci, <i>Lacobacillus</i> , <i>Staphylococcus</i> , forme végétative de <i>Bacillus</i>), quelques moisissures
0,91 à 0,87	Salami, fromages affinés	La plupart des levures
0,87 à 0,80	Farines, riz, légumes secs	La plupart des moisissures (ex : <i>Penicillium</i>)
0,80 à 0,75	Confitures, compotes	Bactéries halophiles
0,75 à 0,65	Céréales	Moisissures xérophiles
0,67 à 0,60	Fruits secs, caramels, miel	Levures osmophiles (ex : <i>Zygosaccharomyces rouxii</i>)
0,50	Epices, pâtes alimentaires	$a_w < 0,60$ ne permet pas une croissance microbienne
0,40	Œufs en poudre	
0,30	Biscuits secs	
0,20	Poudres de lait, fruits secs	

L'humidité relative (HR) de l'air correspond à la pression partielle de vapeur d'eau dans l'air $p(vap)$ par rapport à la capacité de vapeur d'eau maximale que l'air peut contenir $p(sat)$ (Equation 2). L'HR s'exprime en pourcentage et dépend de la température et de la pression.

$$(2) \quad HR = \frac{p(vap)}{p(sat)}$$

Aussi, dans un système à l'équilibre l' a_w et l'HR sont liées par l'équation 3 suivante :

$$(3) \quad HR = a_w \times 100$$

L' a_w représente la disponibilité de l'eau dans un milieu liquide ou solide et l'HR représente la teneur en eau dans un milieu gazeux en équilibre. L'ajout d'un soluté ou le séchage du milieu permet de diminuer la disponibilité et la teneur en eau. Le séchage entraîne une évaporation de l'eau conduisant à une solidification du milieu à des HR/ a_w très faibles (Figure 7).

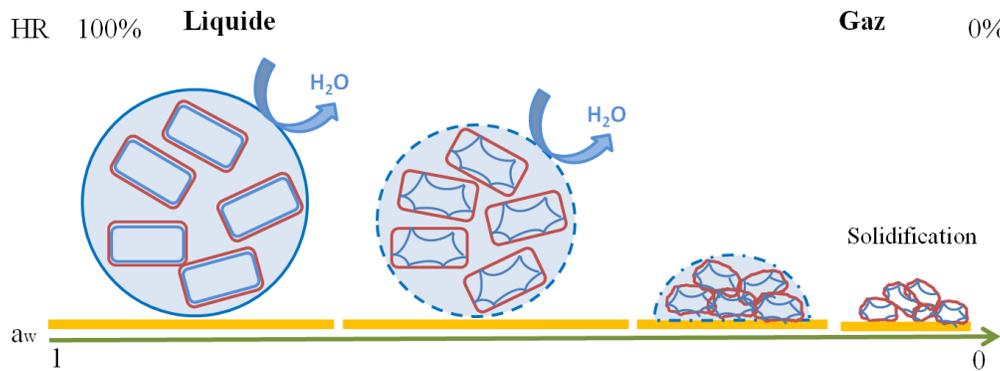


Figure 7 : Evolution d'une suspension cellulaire en milieu liquide lors d'une déshydratation. La paroi cellulaire est représentée par un trait rouge et la membrane des cellules par un trait bleu.

1.2) L'eau, un solvant pour les cellules biologiques

L'eau (H_2O) est une molécule dipolaire composée d'un atome d'oxygène chargé négativement et deux atomes d'hydrogène chargés positivement. Cette polarité lui confère la propriété d'être un solvant optimal établissant des liaisons hydrogènes avec des ions et d'autres molécules polaires.

A l'échelle cellulaire, l'eau par sa capacité de solubilisation, permet la diffusion de biomolécules dans le cytoplasme et assure la fonction biologique de diverses molécules permettant aux cellules de survivre et de se multiplier (Ball, 2008). Le cytoplasme peut contenir une concentration de 400 g/L de macromolécules, incluant des protéines, des acides nucléiques et des sucres complexes, occupant 5% à 40% du volume total des cellules. Ces macromolécules sont séparées de seulement 1 à 2 nm formant des structures plus ou moins complexes (Ellis et Minton, 2003). Cette forte concentration en macromolécules est à l'origine d'un encombrement important du cytoplasme d'une cellule biologique (Figure 8). Ainsi, l'eau intracellulaire permet la diffusion par solubilisation des biomolécules. Cette diffusion se fait à des taux pouvant être considérablement bas (en fonction de la taille de la biomolécule et de l'encombrement du milieu) et est réduit d'un facteur 10 par rapport à un système non encombré (Ellis et Minton, 2003).

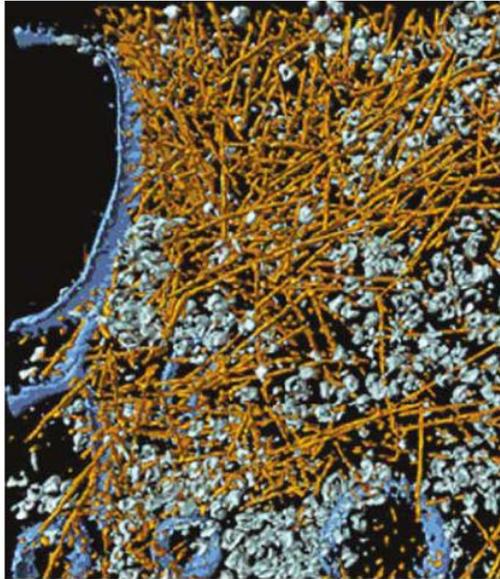


Figure 8 : Reconstitution en trois dimensions du cytoplasme d'une cellule de *Dictyostelium discoideum*. Le cytoplasme est composé de filaments d'actine (en orange), de ribosomes et d'autres molécules (bleu clair) et est entouré d'une membrane (bleu foncé) (Ellis et Minton, 2003).

De plus, dans le cytoplasme l'eau est principalement liée avec d'autres molécules d'eau. L'étude de la mobilité de l'eau chez la bactérie *Escherichia coli* et l'archée halophile *Haloarcula marismortui* a révélé que 85% d'eau était « libre » dans le cytoplasme et ne présentait pas de différence de mobilité avec de l'eau pure. Quant aux 15% d'eau restante, elle expose une mobilité réduite et interagit directement avec les molécules du cytoplasme (Persson et Halle, 2008).

1.3) L'eau et son rôle structurant pour les biomolécules

L'eau possède un rôle structurant sur les différents composants cellulaires en établissant des liaisons hydrogènes avec les groupements hydrophiles mais aussi en étant dans l'impossibilité d'interagir avec les groupements qualifiés d'hydrophobes. Elle structure les protéines, les acides nucléiques et la membrane plasmique. Elle aide au repliement de la structure secondaire des protéines. Par exemple, la protéine de surface bactérienne InlB chez *L. monocytogenes* contient des chaînes peptidiques empilées les unes sur les autres maintenues ensemble par des molécules d'eau dans des domaines riches en leucine (LRR) (Figure 9) (Marino *et al.*, 1999).

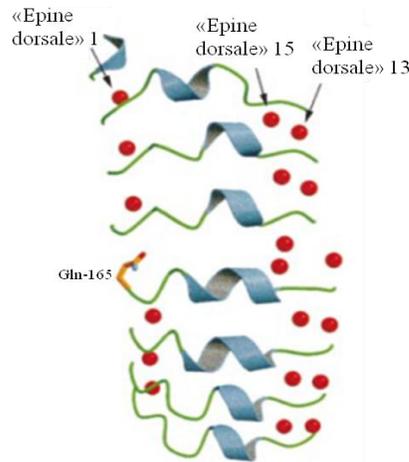


Figure 9 : Molécules d'eau impliquées dans la structure secondaire des motifs riches en leucine (LRR) de la protéine InlB de *L. monocytogenes*. Les molécules d'eau sont représentées par les sphères rouges (Marino *et al.*, 1999).

Elle joue également un rôle dans les interactions protéines-protéines et intervient dans la liaison des couples ligand/récepteur soit par la juxtaposition des groupements hydrophobes ou soit par la formation de liaisons hydrogènes avec des groupements hydrophiles. L'eau se trouve sur la surface des protéines mais elle peut aussi se trouver à l'intérieur sur des sites hydrophiles permettant de les structurer (Ball, 2008).

Les molécules d'eau sont impliquées dans la conformation des acides nucléiques où elles permettent une stabilisation de la double hélice et un maintien de la répulsion électrostatique entre les groupes phosphates de l'ADN (Ball, 2008).

De plus, l'eau participe à la structure de la membrane plasmique composée de phospholipides dans laquelle sont ancrées des protéines. Ces phospholipides ont une région hydrophile et une région hydrophobe leur permettant de former une bicouche lipidique grâce à la présence d'eau. Les phospholipides sont fluides en solution aqueuse exposant un état désordonné (L_{α}) (Figure 10.B). Cependant les propriétés dynamiques des lipides peuvent changer lors de modifications environnementales. En effet, lors d'une déshydratation, l'état désordonné (L_{α}) de la membrane passe à un état plus ordonné (L_{β}) (Figure 10.A) se traduisant par une diminution de la fluidité membranaire (Beney et Gervais, 2001) et pouvant entraîner une rupture de la membrane plasmique (Simonin *et al.*, 2007a).

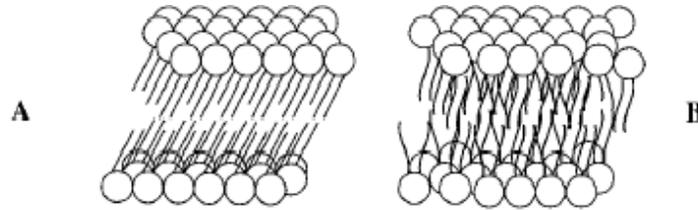


Figure 10 : Organisation des phospholipides en phase ordonnée (A) notée (L_{β}) et en phase désordonnée (B) notée (L_{α}) (Beney et Gervais, 2001).

2. Effet du séchage sur les microorganismes

L'eau étant un élément essentiel aux structures et activités cellulaires et omniprésente au cœur de la cellule, le retrait d'eau intracellulaire par un procédé de séchage cause de nombreux dommages cellulaires.

2.1) Séchage : généralités

Le séchage est un procédé qui a pour principe d'éliminer partiellement ou totalement l'eau d'un corps par évaporation transférant l'eau d'une phase liquide à une phase gazeuse. Il est largement utilisé en industrie agroalimentaire pour conserver les microorganismes (bactéries et levures).

Le séchage convectif, retrouvé le plus couramment dans l'environnement, consiste à faire circuler un flux d'air au-dessus des cellules pour évaporer les molécules d'eau. Dans le cas où la température est constante, la vitesse de séchage et donc le flux d'eau transféré ou évaporé (m) (g.s^{-1}) au sein de l'échantillon dépend principalement de la différence entre l'HR de la phase gazeuse et de l' a_w de l'échantillon de l'équation 4 suivante :

$$(4) \quad m = h S (HR_{\text{air}} - a_w^{\text{éch}})$$

Où h est le coefficient de convection ($\text{m}^2.\text{s}^{-1}$) lié à l'agitation de l'air, S est la surface de l'échantillon (m^2), HR_{air} est l'humidité relative de l'enceinte de séchage et $a_w^{\text{éch}}$ est l'activité de l'eau de l'échantillon.

Lors du séchage, la pression osmotique du milieu extracellulaire augmente par retrait de l'eau et la concentration des solutés autour des cellules entraîne un stress hyperosmotique.

Ensuite, le retrait de l'eau interstitielle cause un transfert d'eau du milieu intracellulaire vers le milieu extracellulaire. Cela augmente le ratio surface/volume puis une solidification progressive des cellules due à la diffusion de l'eau du milieu liquide environnant à la phase gazeuse. Lorsque le retrait d'eau est important, les cellules se retrouvent directement en contact avec la phase gazeuse et donc avec l'oxygène de l'air provoquant un stress oxydatif cellulaire (Figure 11) (Dupont *et al.*, 2014).

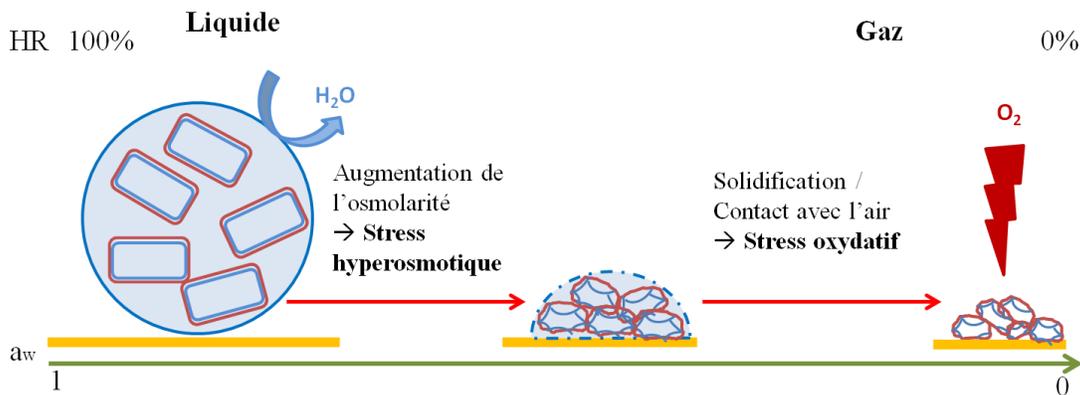


Figure 11 : Représentation schématique des phénomènes physico-chimiques et des stress cellulaires se produisant pendant le séchage d'une suspension cellulaire.

2.2) Séchage et stress osmotique cellulaire

Lors de l'étape initiale de la déshydratation, les cellules sont exposées à une augmentation de la pression osmotique extracellulaire et une perte d'eau intracellulaire provoquant un stress osmotique (Potts, 1994).

2.2.1) Le potentiel hydrique

Le stress osmotique est un déséquilibre du potentiel hydrique intracellulaire et extracellulaire qui entraîne des transferts passifs d'eau et qui suit les lois de thermodynamique (Potts, 1994). Les mouvements d'eau par osmose sont régis par des gradients de potentiel chimique qui s'établissent à l'interface (membrane plasmique) entre la cellule et le milieu dont l'expression est donnée par l'équation (5) :

$$(5) \quad \mu_w = \mu_w^0 + RT \ln a_w + \bar{V}_w P$$

Où μ_w ($\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}$) est le potentiel chimique de l'eau dans la solution, μ_w^0 ($\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}$) est le potentiel chimique de l'eau pure, \bar{V}_w ($\text{m}^3\cdot\text{mol}^{-1}$) est le volume molaire partiel de l'eau, a_w est l'activité de l'eau, R ($\text{J}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$) est la constante des gaz parfaits, T (K) est la température et P (Pa) est la pression hydrostatique.

L'eau pure est la référence pour l'état standard initial μ_w^0 . L'équation 5 peut donc être transformée telle que :

$$(6) \quad \frac{\mu_w - \mu_w^0}{\bar{V}_w} = \frac{RT \ln a_w}{\bar{V}_w} + P$$

Le terme $\frac{\mu_w - \mu_w^0}{\bar{V}_w}$ représente le potentiel hydrique et est symbolisé par Ψ (Pa). Le potentiel hydrique dans une solution liquide résulte de deux composants Ψ_s (attribuable aux solutés présents dans la solution) (7), et Ψ_p (résultant de la pression hydrostatique) (8).

$$(7) \quad \Psi_s = \frac{RT \ln a_w}{\bar{V}_w}$$

$$(8) \quad \Psi_p = P$$

A noter que Ψ_s , le potentiel résultant de l' a_w de la solution est également appelé potentiel osmotique. Comme le potentiel hydrique, il a les dimensions d'une pression et s'exprime donc en Pascal (Pa). La pression osmotique π (Pa) d'une solution est directement liée au potentiel osmotique par la relation :

$$(9) \quad \pi = -\Psi_s$$

Ainsi, le potentiel hydrique peut être représenté par deux composants, un potentiel de pression osmotique (Ψ_s) et un potentiel de pression (Ψ_p), représenté par l'équation (10) suivante :

$$(10) \quad \Psi = \Psi_p + \Psi_s$$

2.2.2) Effet du stress hyperosmotique sur les cellules

Lors de la déshydratation, la pression osmotique du milieu extracellulaire augmente, entraînant un déséquilibre hydrique entre le compartiment intracellulaire et extracellulaire. Les solutés du milieu extérieur se concentrent autour de la cellule qui tente de maintenir l'équilibre

entre les deux milieux. La cellule perd de l'eau ce qui engendre une diminution de son volume cytoplasmique tel qu'il a été montré chez la bactérie *E. coli* (Koch, 1984).

La survie des microorganismes dépend fortement des cinétiques de variation de la pression osmotique. En effet, plus la cellule est exposée à une déshydratation sévère et rapide plus sa viabilité diminue ceci signifiant que la pression osmotique n'est pas le seul paramètre influençant la viabilité (Gervais *et al.*, 1992). La vitesse plus ou moins rapide à laquelle on atteint une valeur de pression osmotique est tout aussi importante pour préserver ou détruire des cellules.

Lors d'un choc hyperosmotique, la membrane plasmique est le premier élément cellulaire endommagé, subissant différentes modifications structurales. Les lipides membranaires passent d'un état désordonné (L_{α}) à un état ordonné (L_{β}) (Figure 10) (Beney et Gervais, 2001). Cette transition de phase des lipides dépend de la température et de la pression osmotique et est appelé température de transition de phase liquide-gel (T_m) (Laroche *et al.*, 2001). Elle entraîne un changement dans l'interaction entre les lipides membranaires et une restructuration de la membrane qui se rigidifie. Ces phénomènes ont été observés dans plusieurs études examinant la réponse à une augmentation de la pression osmotique chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* et la bactérie à Gram négatif *E. coli* (Mille *et al.*, 2002; Laroche *et al.*, 2005; Simonin *et al.*, 2007a).

Simonin *et al.* (2007a) ont révélé qu'une modification transitoire et réversible de la membrane avait lieu lors de stress osmotiques modérés mais aussi que la transition de phase lipidique pouvait entraîner la mort cellulaire en affectant la perméabilité et la résistance aux contractions de la membrane. De plus, une étude réalisée sur la bactérie à Gram négatif *Geobacter sulfurrendens* a caractérisé deux mécanismes de dommages membranaires variant selon la cinétique de déshydratation. En effet, lors d'un choc hyperosmotique, une perte d'interaction entre les lipides a été observée causant une perméabilisation membranaire. Tandis qu'une déshydratation lente entraîne une augmentation de la température de transition de phase et une modification de l'ordre des lipides causant des changements structuraux plus discrets à l'origine de la mort cellulaire (Ragoonanan *et al.*, 2008).

D'autre part, l'augmentation de la pression osmotique conduit à une augmentation du ratio surface/volume (diminution du volume cellulaire) entraînant la formation de vésicules membranaires. Mille *et al.* (2002) ont observé par microscopie électronique des vésicules provenant de la membrane dans le cytoplasme bactérien de *E. coli* lors de chocs hyperosmotiques

de 26 et 46 MPa. Ce phénomène s'explique par le rétrécissement cellulaire qui entraîne une rupture de la membrane causant un changement de surface irréversible et la présence de vésicules membranaires dans le cytoplasme (Mille *et al.*, 2002).

Une autre étude réalisée sur *S. cerevisiae* met en évidence la formation de nombreuses invaginations de la membrane plasmique suivie d'une internalisation membranaire lors d'une déshydratation cellulaire rapide. A l'opposé, une déshydratation progressive préserve la cellule par la formation de plissements de la membrane et à des réarrangements de composants membranaires (Figure 12) (Dupont *et al.*, 2010).

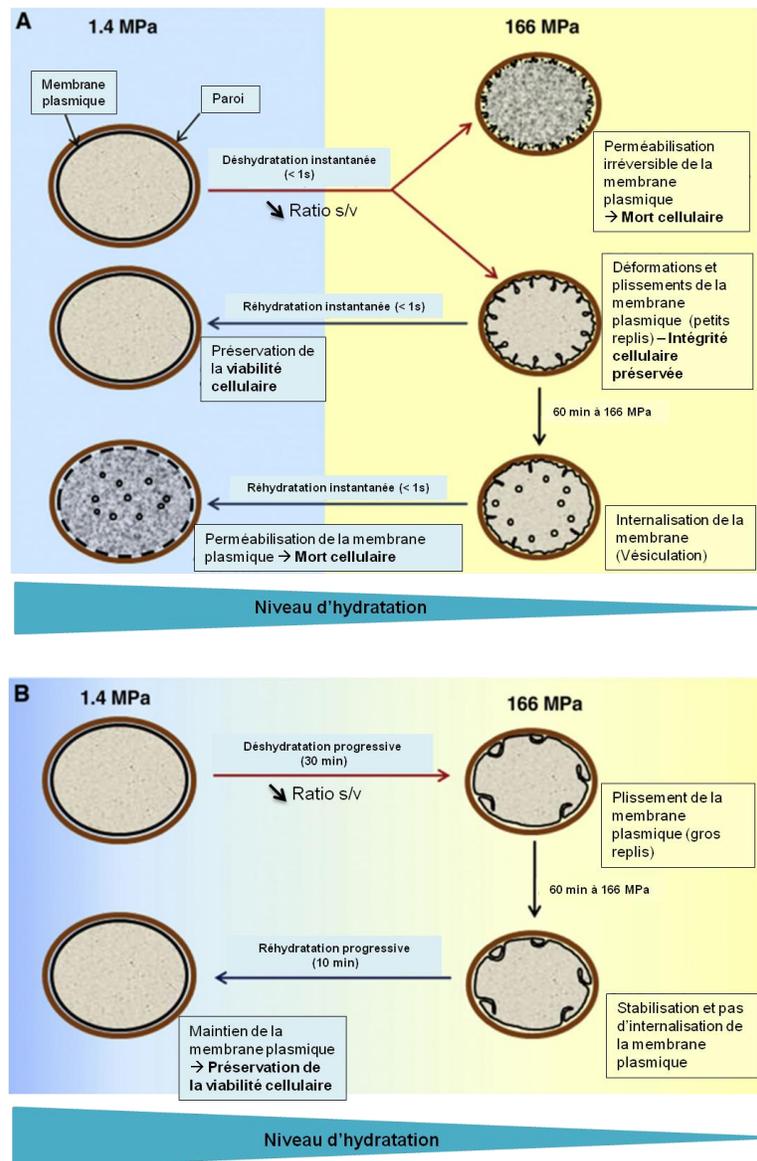


Figure 12 : Représentation schématique des mécanismes impliqués au niveau de la membrane plasmique chez la levure *S. cerevisiae* pendant un cycle de déshydratation et de réhydratation instantanée (A) et progressive (B) (D'après Dupont *et al.*, 2010).

De même, l'eau a un rôle structurant pour les protéines et les acides nucléiques. Le retrait d'eau à l'intérieur des cellules cause des dommages sur les protéines, les acides nucléiques et sur les processus cellulaires globaux. Il entraîne un dépliement des protéines, une modification chimique de l'ADN (alkylation ou oxydation), l'élimination de bases nucléiques comme la dépurination et des cassures de l'ADN (Billi et Potts, 2000).

2.3) Séchage et stress oxydatif cellulaire

Lors de la déshydratation cellulaire, le retrait de l'eau entraîne un stress osmotique mais il est également admis que la cellule subit un stress oxydatif lorsqu'elle se retrouve fortement exposée à l'oxygène atmosphérique (Potts, 1994; García, 2011). En effet, une oxydation intracellulaire 10 fois plus importante a été observée chez *S. cerevisiae* après déshydratation (Pereira *et al.*, 2003).

L'oxygène est un composé vital pour de nombreux organismes mais a un effet délétère lorsqu'il est en excès. Il est consommé lors de la respiration chez les organismes aérobies et est partiellement réduit soit par transfert d'énergie en anion superoxyde ($O_2^{\circ-}$), soit par transfert d'électron en radical hydroxyle (OH°) et peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (Figure 13). Ces radicaux sont des Espèces Réactives de l'Oxygène (ERO) et engendrent des effets délétères sur les cellules (Ziegelhoffer et Donohue, 2009). La balance entre la production des ERO et les mécanismes de défense cellulaire déterminent le degré du stress oxydatif (França *et al.*, 2007). L'augmentation de la formation des ERO dans les cellules cause de nombreux dommages sur l'ADN, les protéines et les lipides (França *et al.*, 2007).

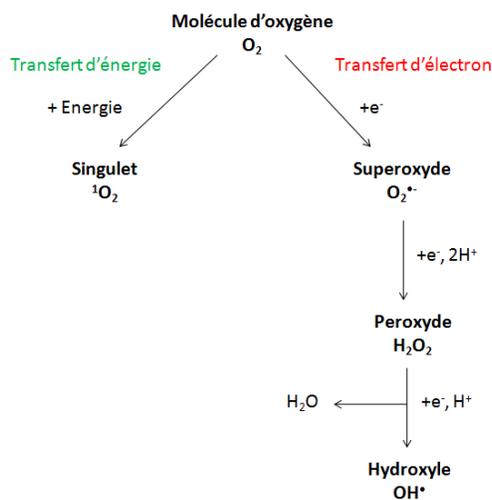


Figure 13 : Différentes espèces réactives de l'oxygène (ERO) impliquées dans le stress oxydatif (Ziegelhoffer et Donohue, 2009).

La déshydratation affecte le métabolisme énergétique et favorise la production d'ERO. En effet, une peroxydation et une dé-estérification lipidique a été observée lors de la déshydratation

sur des liposomes et sur la levure *S. cerevisiae* (Senaratna *et al.*, 1987; França *et al.*, 2005). Il se produit aussi des mécanismes d'oxydation protéique par carbonylation et un changement de conformation des protéines qui vont s'accumuler dans le cytoplasme (Prestrelski *et al.*, 1993; Fredrickson *et al.*, 2008).

L'ADN est aussi affecté par une augmentation du taux de mutation et une déstabilisation chimique affectant les processus cellulaires de réplication, de transcription et de synthèse protéique (Potts, 1994).

La perte d'eau affecte le métabolisme global cellulaire se traduisant par la réduction de la couche d'hydratation autour des biomolécules, la réduction du transport intracellulaire et la concentration des molécules cellulaires dans le cytoplasme. De surcroît, le séchage conduit à un dysfonctionnement enzymatique entraînant des réactions chimiques ne se produisant pas en condition hydratée. Par exemple les systèmes antioxydants jouant un rôle dans la dégradation des ERO peuvent ne plus fonctionner favorisant ainsi leurs actions délétères (França *et al.*, 2007).

3. Facteurs influençant la survie cellulaire aux fluctuations d'humidité relative

Les fluctuations d'humidité relative sont principalement utilisées pour la conservation de microorganismes (probiotiques, ferments) à des a_w très faibles comprises entre 0,2 et 0,1. Pour ralentir les réactions de dégradation cellulaire et augmenter la survie, différents paramètres permettent d'optimiser la conservation des microorganismes lors de cycle de déshydratation/réhydratation.

3.1) Pré-adaptation des cellules

La survie des cellules à la déshydratation dépend de leur état physiologique avant séchage et est variable selon l'espèce. En effet, la levure *Debaromyces hansenii* est plus tolérante au stress de déshydratation lorsque les cellules sont récoltées en phase exponentielle qu'en phase stationnaire de croissance (Khroustalyova *et al.*, 2001). La bactérie *Lactobacillus rhamnosus* récoltée en phase stationnaire de croissance a un taux de survie de plus de 50% contrairement aux cellules récoltées en début de phase exponentielle de croissance qui ont un taux de survie de 14% suite à un procédé de déshydratation (Corcoran *et al.*, 2004). La même conclusion a été apportée

par Mary *et al.* (1986) pour la bactérie *Rhizobium meliloti* où une amélioration du taux de survie a été observée suite à un séchage avec des bactéries récoltées en phase stationnaire de croissance. La phase stationnaire de croissance induit un état de stress cellulaire dû à l'épuisement des ressources disponibles du milieu. Ainsi, la bactérie met en place une réponse cellulaire à ce stress qui a la particularité de conditionner les cellules et ainsi d'optimiser leur survie à d'autres conditions stressantes comme la déshydratation (Morgan *et al.*, 2006). Ceci peut expliquer les résultats obtenus dans ces études.

De même, le milieu de croissance et sa concentration en microorganismes sont aussi considérés comme des facteurs importants dans la survie des cellules car le milieu de culture peut être additionné de protectants (Morgan *et al.*, 2006).

3.2) Utilisation d'agents protecteurs

Des agents protecteurs, ou protectants, peuvent être ajoutés dans le milieu pendant la croissance ou avant le séchage du microorganisme. Le type de protectant utilisé dépend du type du microorganisme à préserver (levures, bactéries). Ces protectants peuvent être de la matière sèche lactique non grasse, du sérum, du tréhalose, du glycérol, de la bétaine, de l'adonitol, du saccharose, du glucose, du lactose ou des polymères (Hubálek, 2003).

Les sucres tels que le tréhalose et le saccharose ont la capacité de remplacer l'eau autour des biomolécules par des liaisons hydrogènes stabilisant les membranes et les protéines (Leslie *et al.*, 1995). Des agents tels que les carbohydrates, les protéines, les polymères et les sucres entourent les cellules d'une matrice vitreuse avec une très haute viscosité permettant le ralentissement de la mobilité moléculaire et une meilleure préservation (Morgan *et al.*, 2006). L'ajout de solutés compatibles tels que la bétaine permet à la cellule d'équilibrer la pression osmotique afin de mieux résister au stress osmotique pendant le séchage (Morgan *et al.*, 2006).

D'autres agents comme des antioxydants limitent les dommages causés par le contact de l'échantillon avec l'oxygène atmosphérique. Enfin, des agents tensioactifs peuvent être ajoutés avant séchage pour faciliter le drainage de l'eau rendant la déshydratation plus homogène au sein des cellules.

3.3) Impact de la réhydratation sur la survie cellulaire

Le processus de réhydratation est un facteur non négligeable pour la survie cellulaire après déshydratation. En effet, une étude a montré qu'après une déshydratation à une a_w de 0,117, une réhydratation lente réalisée par une augmentation progressive de l' a_w du milieu extérieur à 0,455 pendant 14 jours améliore la viabilité de *S. cerevisiae* par rapport à une réhydratation rapide à une a_w de 0,990 (Poirier *et al.*, 1999). Des résultats similaires ont également été obtenus avec *E. coli* où une réhydratation rapide à 1,4 MPa (a_w de 0,990) d'une seconde après une déshydratation en milieu liquide de 133 MPa (a_w de 0,380) entraîne une viabilité très faible de 0,7%, alors qu'une vitesse de réhydratation lente de $-0,012 \text{ MPa}\cdot\text{sec}^{-1}$ et $-0,006 \text{ MPa}\cdot\text{sec}^{-1}$ l'augmente jusqu'à 11,5% et 2,84% sur une durée de 3 h et 6 h. La viabilité augmente fortement de 36,4% après une réhydratation contrôlée et progressive de 16 min à $-0,136 \text{ MPa}\cdot\text{sec}^{-1}$, ceci suggérant même l'existence d'une vitesse de réhydratation optimale (Mille *et al.*, 2003).

Les hypothèses émises par ces résultats supposent que la réhydratation progressive entraîne une captation lente de l'eau à travers la membrane, tandis qu'une réhydratation rapide engendre un flux rapide d'eau à travers la membrane provoquant une rupture membranaire. Mille *et al.* (2003) supposent qu'il existe une vitesse de réhydratation optimale qui doit être progressive pour permettre à la membrane cellulaire de garder son intégrité mais suffisamment rapide pour empêcher des dégradations du métabolisme et la mort cellulaire.

La température et le milieu de réhydratation peut également influencer sur la survie des cellules, ce dernier pouvant contenir des nutriments et composants cellulaires essentiels à la réparation des dommages cellulaires (Morgan *et al.*, 2006).

4. Mécanismes d'adaptation des bactéries au séchage

Malgré les nombreux effets délétères de la déshydratation et de la réhydratation sur les cellules, les microorganismes ont la capacité de mettre en place des mécanismes leur permettant de résister aux stress hydriques.

4.1) Mécanismes généraux d'adaptation des bactéries à la dessiccation

La déshydratation est un stress complexe alliant le stress osmotique et oxydatif auxquels peu d'organismes sont capables de résister. Potts (2001) a décrit que les cellules tolérantes à la dessiccation ont la particularité d'arrêter complètement leur métabolisme pendant le séchage et suite à une réhydratation de récupérer leurs fonctions métaboliques. Les bactéries à Gram positif, composées d'une membrane plasmique entourée d'une épaisse paroi cellulaire, sont plus résistantes que les bactéries à Gram négatif, composées d'une membrane externe et plasmique séparées par une fine paroi de peptidoglycane (Nocker *et al.*, 2012). Cependant ce sont les cyanobactéries (bactéries à Gram négatif) qui par leur habitat subissent d'intenses radiations solaires et sont particulièrement résistantes à la déshydratation (Billi et Potts, 2002). Ainsi, la cyanobactérie *Nostoc commune* peut résister 13 ans dans un état déshydraté (Shirkey *et al.*, 2000).

4.1.1) Mécanisme de résistance au retrait de l'eau

Pendant la première étape du séchage, les bactéries subissent un fort retrait d'eau qui passe dans leur environnement à travers des aquaporines telle que la protéine AqpZ présent chez *E. coli* (Borgnia et Agre, 2001).

Les bactéries mettent en place des mécanismes d'osmorégulation par l'accumulation de solutés compatibles permettant d'équilibrer la pression osmotique intracellulaire et extracellulaire tels que les ions K^+ , le glutamate, la glycine bêtaïne, l'ectoïne et le tréhalose (Welsh, 2000). Chez *Salmonella enterica* sérotype Thyphimurium, pathogène d'origine alimentaire, une surexpression des gènes *kdpABC*, codant un système de captation de l'ion K^+ , a été observée lors d'une déshydratation à 40% d'HR à 25 °C pendant 22 h. Ceci révèle l'importance du transport d'ions pendant le séchage (Gruzdev *et al.*, 2012). Cette observation a aussi été constatée sur la cyanobactérie *Anabaena* avec une surexpression des gènes du système de captation d'ions K^+ (Katoh *et al.*, 2004).

Des études transcriptomiques menées chez *S. enterica* ont permis de mettre en évidence une surexpression de gènes impliqués dans le transport de proline bêtaïne, de glycine, de choline et de la biosynthèse de tréhalose. Ces gènes codant les transporteurs membranaires ProP, ProU et OsmU appuient l'hypothèse de l'importance de ces solutés pour la résistance à la dessiccation (Li

et al., 2012; Finn *et al.*, 2013). De plus, les mutants *proP*, *proU* et *osmU* affichent une diminution de viabilité post-déshydratation comparé à la souche parentale (Finn *et al.*, 2013). Les gènes impliqués dans le métabolisme du tréhalose sont surexprimés pendant la première heure d'un séchage à 30% d'HR chez *Anabaena* indiquant que le tréhalose est un soluté compatible essentiel dans la dessiccation précoce stabilisant les membranes et les protéines pendant le séchage (Kato *et al.*, 2004).

L'existence de canaux mécanosensibles permettant l'efflux d'osmoprotectants ou de protéines permet de relâcher la tension membranaire induite lors du séchage. C'est le cas du canal MscL de *E. coli* qui libère principalement de la thiorédoxine lors d'une augmentation de la tension membranaire suite à un choc osmotique (Ajouz *et al.*, 1998). La sécrétion d'une certaine quantité de protéines et de biomolécules a aussi été observée lors de la réhydratation de cyanobactéries connues pour leur tolérance à la dessiccation. Néanmoins le rôle exact de ce mécanisme est encore non élucidé (Potts, 2001).

4.1.2) Synthèse de protéines

Au niveau de la population, la réponse au séchage dépend de l'état physiologique de la cellule au moment du retrait d'eau, de sa capacité à se protéger et à réparer ses composants vitaux pendant la réhydratation (Potts, 2001). Un séchage lent ou rapide n'engendre pas la même résistance au stress. Cependant la vitesse de séchage des cellules est très peu contrôlée dans les études d'analyse de synthèse protéique sous déshydratation.

Une étude transcriptomique menée sur la bactérie *S. enterica* sérotyper Thyphimurium soumise à un séchage à 40% d'HR révèle une surexpression des gènes associés à la traduction et à la transcription. Ces gènes codent des sous unités de l'ARN polymérase (RpoA, RpoB et RpoC) qui permettent de réguler des gènes spécifiques de la réponse au stress (Gruzdev *et al.*, 2012). La synthèse de protéines Hsp (*Heat Shock Protein*) telles que GroEL, IbpA et DnaK a également été observée pendant la déshydratation (Gruzdev *et al.*, 2012). Une surexpression des gènes codant des Hsp a été décelée chez la cyanobactérie *Anabaena* (Kato *et al.*, 2004). Ces protéines chaperons semblent donc importantes pour rétablir ou dégrader les protéines dénaturées lors de la déshydratation.

Une autre étude transcriptomique menée sur deux souches de *S. enterica* séchées à 11% d'HR a montré une surexpression des gènes impliqués dans le métabolisme des acides gras. Ceci suppose un changement de composition des acides gras membranaires lors de la dessiccation de *S. enterica*. En effet, le séchage peut entraîner une rigidification de la membrane plasmique engendrant une régulation homéovisqueuse de la membrane (Li *et al.*, 2012). Finn *et al.* (2013) ont observé une induction d'un transporteur de phosphate codé par le locus *pstSCAB* supposant que la synthèse d'acides nucléiques, de phospholipides et l'activation de voie de signalisation dépendante de phosphate peuvent être requises pour la tolérance au séchage.

Ces études montrent donc que les premiers mécanismes mis en place par les bactéries pour résister au retrait d'eau visent à empêcher les perturbations membranaires par accumulation de solutés et à protéger la structure des biomolécules afin de les rendre fonctionnelles pendant la réhydratation. Ensuite, les bactéries doivent contrer un nouveau stress induit par la déshydratation, le stress oxydatif dû au contact des cellules avec l'oxygène de l'air à l'état sec.

4.1.3) Mécanismes de résistance à la formation d'espèce réactives à l'oxygène (ERO)

Les bactéries tolérantes à la dessiccation ont différentes stratégies pour répondre au stress oxydatif induit pendant le séchage. Elles peuvent augmenter l'efficacité de leur défense antioxydante ou cesser leur activité métabolique pour éviter le stress oxydatif et l'accumulation de produits cellulaires toxiques (França *et al.*, 2007). Les enzymes et molécules impliquées dans la réponse au stress oxydatif sont la catalase, la superoxyde dismutase (SOD), les peroxydases et les antioxydants comme le glutathion, la vitamine C et E (França *et al.*, 2007).

Lors d'une déshydratation, une surexpression des gènes impliqués dans la réponse au stress oxydatif a été observée par analyse transcriptomique chez *S. enterica* (Gruzdev *et al.*, 2012; Finn *et al.*, 2013). De même, Katoh *et al.* (2004) ont mis en évidence une surexpression de gènes codant une catalase avec un co-facteur manganèse et une oxydoréductase chez la cyanobactérie *Anabaena* et la SOD-Fe (SodF) de *Nostoc commune* est l'une des protéines les plus abondantes dans les cellules séchées de (Shirkey *et al.*, 2000). Ces études montrent que la réponse au stress oxydatif est induite pendant le séchage et qu'elle participe à la tolérance à la dessiccation.

Une corrélation existe entre la tolérance à la dessiccation et la capacité antioxydante du microorganisme. La bactérie *Deinococcus radiodurans*, connue pour son extrême résistance aux radiations ionisantes, l'est également à la dessiccation (Mattimore et Battista, 1996). Cette tolérance est attribuée à la mise en place d'un système très perfectionné de réparation d'ADN. Les mutants de *D. radiodurans* sensibles à la dessiccation subissent une augmentation des lésions sur l'ADN par rupture des doubles brins (Mattimore et Battista, 1996).

L'accumulation d'ions Mn^{2+} par de nombreuses bactéries à Gram positif suggère un mécanisme de protection des protéines contre le stress oxydatif à l'origine d'une déshydratation (Fredrickson *et al.*, 2008). En effet, *D. radiodurans* est moins sensible à la carbonylation des protéines engendrée pendant le séchage, ceci probablement dû à sa forte capacité à accumuler le Mn^{2+} qui a un effet protecteur sur les complexes protéiques et non protéiques. Les auteurs supposent que les ions Mn^{2+} se complexent avec des ligands organiques ou inorganiques piégeant les ERO qui endommagent les protéines (Fredrickson *et al.*, 2008).

4.2) Cas de la bactérie *L. monocytogenes*

Bien que les mécanismes de résistance de *L. monocytogenes* au stress osmotique aient été beaucoup étudiés, peu de données sont publiées sur ses mécanismes de résistance à la dessiccation. *L. monocytogenes* est capable de survivre 91 jours à 15 °C sur acier inoxydable à 2% et 43% d'HR (Vogel *et al.*, 2010) et peut survivre plus de 30 jours à 25 °C sur ce même support (Takahashi *et al.*, 2011). *L. monocytogenes* a également une survie plus importante à la déshydratation que la bactérie *S. enterica* sérovar Thyphimurium et *Staphylococcus aureus*. En effet, 2,31 à 3,7 log de cellules de *L. monocytogenes* survivent 30 jours sur acier inoxydable en présence ou non de composants alimentaires contre 1,3 à 2,6 log pour *S. aureus* et 0 à 2,6 pour *S. enterica* serovar Thyphimurium (Takahashi *et al.*, 2011). Ainsi, ces études révèlent que cette bactérie est particulièrement résistante au séchage.

De manière similaire à la plupart des bactéries, *L. monocytogenes* utiliserait des osmoprotectants pour survivre à la dessiccation. Dreux *et al.* (2008) ont montré une amélioration de la survie de la bactérie à un séchage de 60% d'HR en présence de glycine bêtaïne exogène à haute concentration sur des feuilles de persil et sur une microplaque en polystyrène (Figure 14) indépendamment des 3 transporteurs de solutés compatibles (BetL, OpuC et Gbu). Cette étude

laisse supposer un hypothétique mécanisme passif d'accumulation de glycine bêtaïne chez *L. monocytogenes* ou une protection extracellulaire de ce soluté pendant la dessiccation.

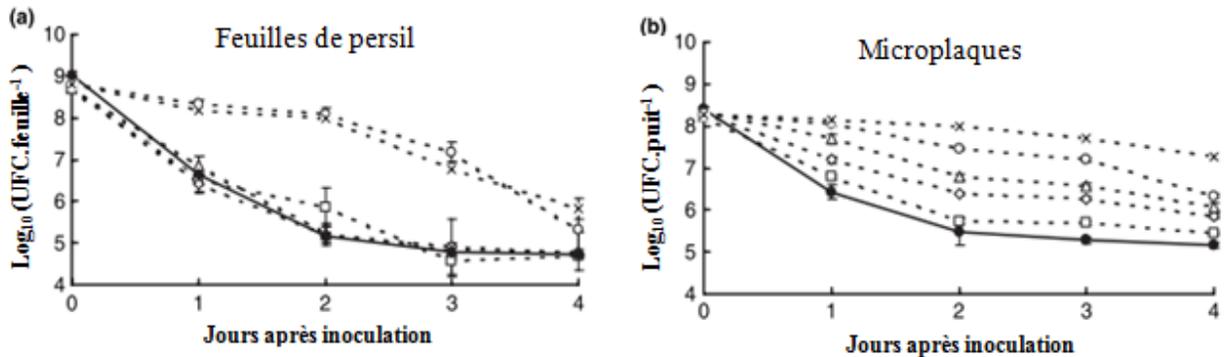


Figure 14 : Survie d'une suspension de *L. monocytogenes* LO28 cultivée en TSB sur des feuilles de persil (a) et sur des microplaques en polystyrène (b) sous faible humidité relative (60% HR \pm 13) dans une solution saline (0,9% NaCl) (ronds noirs) additionnée de 1, (carrés), 2,5 (losanges), 5 (triangles), 25 (ronds blancs) ou, 250 mmol. L $^{-1}$ (croix) de glycine bêtaïne pendant 4 jours. L'axe des ordonnées correspond aux cellules cultivables récoltées dans un tampon phosphate et énumérées après étalement des cellules sur milieu TSA gélosé (Dreux *et al.*, 2008).

Un milieu riche en nutriments (par exemple le milieu BHI) et la présence d'osmolytes exogènes comme la proline, la carnitine et la glycine bêtaïne protège la survie de *L. monocytogenes* lors de la dessiccation (Vogel *et al.*, 2010; Huang *et al.*, 2015).

La présence d'acides gras saturés (entre 20 et 60%) augmente aussi sa survie entre 1 et 2 log pendant les 14 premiers jours de séchage. Néanmoins, si la présence d'acides gras saturés peut protéger *L. monocytogenes* dans les industries agroalimentaires, ce n'est pas le cas des acides gras non saturés de l'huile de colza par exemple. Cependant, l'effet protecteur des acides gras saturés tend à diminuer après 14 jours (Figure 15) (Hingston *et al.*, 2013).

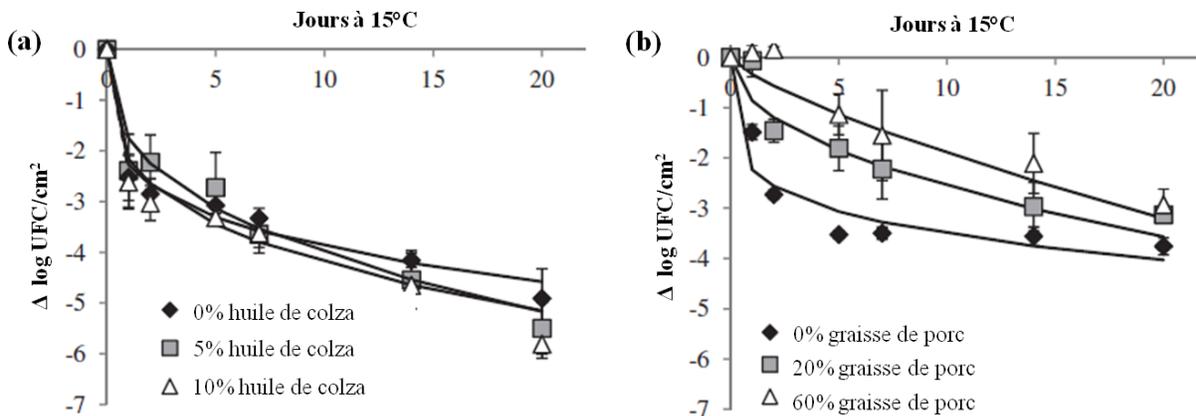


Figure 15 : Survie de *L. monocytogenes* dans diverses matrices grasses. Les cellules ont été précultivées en TSB-glucose, resuspendues en TSB-glucose contenant de l'huile de colza non saturée (5 et 10%) (a) ou de la graisse de porc (20 et 60%) (b). La suspension cellulaire a été maintenue sur acier inoxydable à 43% HR à 15 °C pendant 20 jours et la survie bactérienne a été évaluée par mesure de la cultivabilité des cellules au cours du temps. $\Delta \log \text{UFC/mL}$ correspond à la perte de cultivabilité des cellules, exprimée en log, obtenue après chaque traitement (Hingston *et al.*, 2013).

Plusieurs études ont également constaté un effet protecteur du NaCl à une concentration de 5% lors de la dessiccation de *L. monocytogenes* et dans certains cas une meilleure survie au séchage après une osmoadaptation saline (Dreux *et al.*, 2008; Vogel *et al.*, 2010; Hansen et Vogel, 2011). Alors que *L. monocytogenes* sous forme de biofilm présente une survie plus importante à la dessiccation qu'à l'état planctonique (Hansen et Vogel, 2011), *L. monocytogenes* présente à différentes concentration cellulaire sur acier inoxydable ou feuilles de persil affichent la même cinétique de survie. Ainsi, dans ces études, la concentration cellulaire n'a pas d'effet protecteur sur les cellules (Dreux *et al.*, 2007a; Hingston *et al.*, 2013).

Afin d'identifier les facteurs génétiques contribuant à la tolérance de *L. monocytogenes* à la dessiccation, une récente étude portant sur le criblage d'une banque de mutants obtenue par mutagenèse insertionnelle a permis de caractériser 15 gènes dont la mutation confère une tolérance de *L. monocytogenes* à la dessiccation et 15 gènes dont la mutation sensibilise cette bactérie au séchage (Hingston *et al.*, 2015).

Les auteurs ont observé que les mutants les plus tolérants au séchage portaient une mutation localisée dans des gènes impliqués dans la biosynthèse (*fliP*, *flhB*, *flgD*, *flgL*) et le processus de motorisation (*motB*, *fliM*, *fliY*) des flagelles. Ces résultats concordent avec une étude

transcriptomique qui montre une diminution du niveau d'expression des gènes impliqués dans la mobilité chez *S. enterica* lors de la dessiccation (Li *et al.*, 2012). Les auteurs supposent que la biosynthèse du flagelle est énergivore et que la répression de ces gènes permettrait de rediriger l'énergie dans des processus métaboliques plus cruciaux pour la survie (Hingston *et al.*, 2015).

Cette étude montre également que des mutants de *L. monocytogenes* affectés dans la biosynthèse des acides gras présentent une tolérance accrue à la dessiccation. Chez *L. monocytogenes*, les acides gras à chaînes ramifiées sont synthétisés par le système BKD (branched-chain α -keto acid dehydrogenase) (Figure 16) impliqué dans la fluidité membranaire (Zhu *et al.*, 2005).

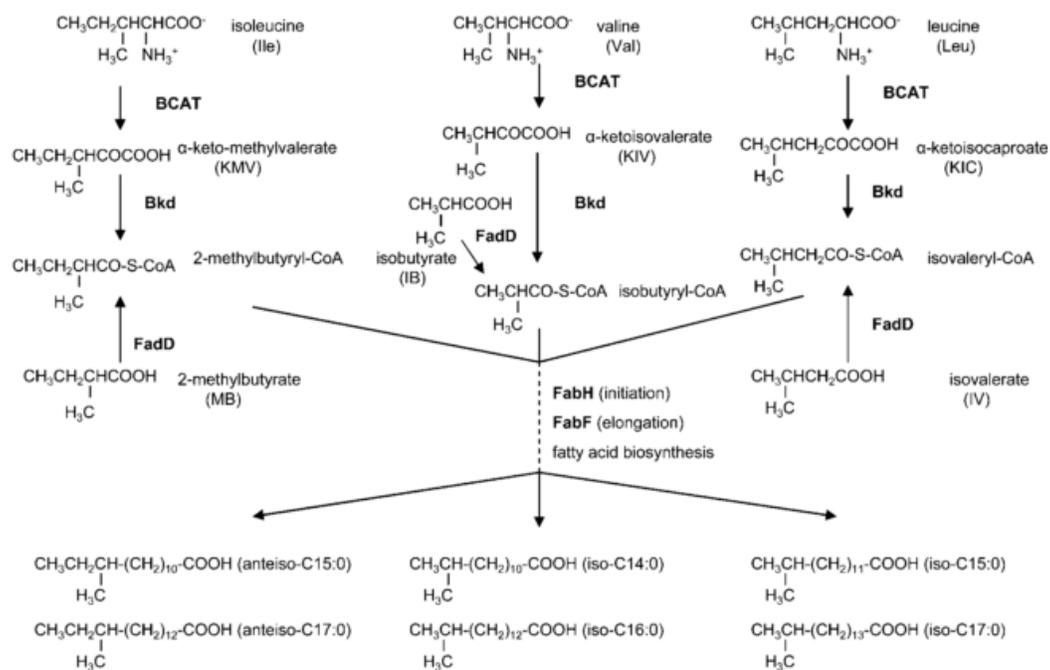


Figure 16 : Schéma de la voie de biosynthèse des acides gras à chaînes ramifiées de *L. monocytogenes*. BCAT est la *branched-chain amino acid transaminase*; Bkd, la *branched-chain α -keto acid dehydrogenase*; FabH, la *β -ketoacyl-ACP synthase III*; FadD, la *acyl-CoA synthetase*; FabF, la *β -ketoacyl ACP synthase II* (Zhu *et al.*, 2005).

Deux mutants affectés sur les gènes *lpd* et *buk*, codant une déshydrogénase dihydrolipoamide et une butyrate kinase régulée par le système BKD, présentent une forte tolérance à la dessiccation. Ces données suggèrent qu'une rigidification de la membrane plasmique induirait une tolérance de *L. monocytogenes* à la dessiccation (Hingston *et al.*, 2015).

Un des mutants isolés de l'étude présente une sensibilité accrue à la dessiccation et porte une interruption du gène codant la glutathion peroxydase, une enzyme permettant la détoxification des ERO lors d'un stress oxydatif. Ceci suppose que la réponse au stress oxydatif joue un rôle dans la tolérance à la dessiccation de *L. monocytogenes* (Hingston *et al.*, 2015). De plus, cette étude par mutagenèse par transposition a permis d'isoler d'autres mutants sensibles à la dessiccation et pour lesquels le transposon est inséré au niveau des gènes impliqués dans le métabolisme des acides aminés et dans la production d'énergie. Ceci suggère que ces voies métaboliques contribuent à la réponse au stress (Hingston *et al.*, 2015).

Le facteur σ^B impliqué dans la réponse de *L. monocytogenes* à de nombreux stress environnementaux (osmotique, basse température, acidité, oxydation...) et dans la résistance à la dessiccation de *Staphylococcus aureus* (Chaibenjwong et Foster, 2011) ne l'est pas dans la résistance au séchage de *L. monocytogenes*. Aucune différence de survie n'a été observée entre un mutant affecté pour le gène *sigB* et la souche parentale suite à un traitement de 21 jours à 15 °C sous 43% d'HR en milieu riche contenant des nutriments et des osmolytes (Huang *et al.*, 2015). Les auteurs observent tout de même une légère contribution de ce facteur au début du séchage dans des milieux pauvres en nutriments et en osmolytes (eau peptonée et milieu minimum) par une diminution plus importante de la survie du mutant affecté pour le gène *sigB* mais cette différence de survie s'estompe pendant le séchage à long terme.

5. Mécanismes de résistance au stress de *L. monocytogenes*

Malgré le peu d'études réalisées sur les mécanismes de résistance de *L. monocytogenes* au séchage, de nombreux travaux ont été effectués sur la compréhension et l'identification des principaux facteurs de la réponse aux stress de *L. monocytogenes* et notamment sur les mécanismes de résistance au stress osmotique et oxydatif (stress principaux du séchage)

5.1) Facteurs transcriptionnels spécifiques de la réponse générale au stress

Chez les procaryotes, les facteurs σ sont des sous unités de l'ARN polymérase qui lors de leur fixation au site opérateur vont favoriser la reconnaissance des régions promotrices par l'ARN polymérase permettant la transcription de certains gènes. Certains facteurs σ sont dits alternatifs,

ils permettent de répondre au stress et de réguler l'expression de gènes pour que la bactérie puisse tolérer et s'acclimater à des environnements hostiles.

Le facteur alternatif σ^B a été identifié chez différentes espèces bactériennes à Gram positif comme *S. aureus*, *Bacillus subtilis* et *L. monocytogenes* régulant l'expression de gènes de résistance à de nombreux stress (Chan *et al.*, 1998; Völker *et al.*, 1999; Ferreira *et al.*, 2001). Une étude a permis d'identifier 170 gènes dont l'expression est régulée positivement par σ^B et également 145 gènes précédés par une séquence promotrice putative spécifique de σ^B indiquant que l'expression de ces gènes est directement régulée par ce facteur chez *L. monocytogenes* (Raengpradub *et al.*, 2008).

Le facteur σ^B contribue à la tolérance de *L. monocytogenes* à de faible valeur de pH. En effet, un mutant de *L. monocytogenes* déficient pour le gène *sigB* présente une survie moins importante par rapport à la souche parentale à un pH de 2,5 (Ferreira *et al.*, 2003). Lors d'un stress acide, il existe deux mécanismes de résistance, un dépendant et un autre indépendant du facteur σ^B (Ferreira *et al.*, 2001). Le facteur σ^B joue également un rôle dans le stress osmotique en contrôlant les gènes impliqués dans le transport d'osmoprotectant (Becker *et al.*, 1998; Fraser *et al.*, 2003; Watson *et al.*, 2009), à l'adaptation au stress froid (Becker *et al.*, 2000) et dans la tolérance au stress oxydatif. En effet, la survie d'un mutant *sigB* est plus faible comparée à la souche parentale après une exposition de 15 min à une concentration de 13,8 mM d'hydroperoxyde de cumène (oxydant) (Ferreira *et al.*, 2001). De plus, une augmentation du taux de transcription du gène *sigB* a été observée chez *L. monocytogenes* après une exposition de 20 min à 0,15% d' H_2O_2 dans du milieu BHI (Becker *et al.*, 1998).

Le facteur σ^B contribue à la régulation de gènes impliqués dans le stress à la chaleur, dans le métabolisme et dans l'utilisation du glycérol comme source de carbone alternative ainsi que pendant un stress nutritionnel (Chaturongakul et Boor, 2004; van der Veen *et al.*, 2007; Abram *et al.*, 2008). Un mutant *sigB* est incapable de croître efficacement avec du glycérol comme seule source de carbone (Abram *et al.*, 2008).

D'autres facteurs de transcription impliqués dans la régulation de la réponse au stress ont été identifiés chez *L. monocytogenes*. Les facteurs de transcription σ^H , σ^L , et σ^C activent la transcription de gènes permettant la résistance au stress froid, au pH alcalin, à l'acidité, à la chaleur ou au stress osmotique. Les répresseurs transcriptionnels CtsR et HrcA empêchent la

transcription de certains gènes dont l'inactivation dans certaines conditions de stress permet l'expression de gènes de réponse au stress (Tableau 6).

Tableau 6 : Facteurs de transcription impliqués dans la régulation de la réponse au stress de *L. monocytogenes*.

Facteur de transcription	Description	Rôle	Références
σ^H	Facteur sigma alternatif	Croissance en condition alcaline (pH 9), survie dans un milieu minimum, adaptation au stress froid	(Rea <i>et al.</i> , 2004; Chan <i>et al.</i> , 2008)
σ^L (σ^{54} ou RpoN)	Facteur sigma alternatif	Osmotolérance, résistance aux bactériocines, adaptation au froid, tolérance à l'acidité	(Robichon <i>et al.</i> , 1997; Okada <i>et al.</i> , 2006; Chan <i>et al.</i> , 2008; Raimann <i>et al.</i> , 2009)
σ^c	Facteur sigma alternatif	Résistance à la chaleur, adaptation au froid	(Zhang <i>et al.</i> , 2005; Chan <i>et al.</i> , 2008)
CtsR	Répresseur transcriptionnel	Inactivé en condition de stress osmotique et acide	(Nair <i>et al.</i> , 2000)
HrcA	Répresseur transcriptionnel	Inactivé en condition générale de stress	(van der Veen <i>et al.</i> , 2007)

5.2) Réponse au stress osmotique

L. monocytogenes est confrontée très souvent au stress osmotique dans les aliments et les environnements de transformation où le salage est régulièrement utilisé pour augmenter la durée de conservation du produit alimentaire. Lors de son processus infectieux, elle s'expose à un stress osmotique de 0,3 mol/L de NaCl dans le tractus gastro-intestinal de l'hôte (Sleator *et al.*, 2003a). De ce fait, *L. monocytogenes* met en place des mécanismes de résistance permettant sa survie et notamment par l'accumulation de solutés intracellulaires.

5.2.1) Réponse de type KCl

Chez la plupart des bactéries comme par exemple *E. coli*, *S. enterica* sérotype Typhimurium, *Staphylococcus aureus* ou *Bacillus subtilis* (Ballal *et al.*, 2007; Price-Whelan *et al.*, 2013), la réponse primaire à un stress osmotique se traduit par l'accumulation d'ions K^+ permettant de restaurer la pression de turgescence et d'équilibrer la pression osmotique entre le

milieu extracellulaire et intracellulaire. Cette réponse est une réponse à court terme et transitoire lors de la détection d'un changement d'osmolarité par la bactérie.

L'étude de Patchett *et al.* (1992) montre que l'accumulation interne d'ions K^+ se produit lors d'un stress osmotique élevé à 7,5% NaCl. Ils observent une concentration d'ions K^+ intracellulaire deux fois plus élevée (0,163 mM à 0,319 mM) en comparaison avec la concentration obtenue en absence de sel. Les auteurs ne détectent aucune augmentation significative de la concentration intracellulaire de K^+ à une concentration de 2,5% et 5% de NaCl supposant que cette réponse se produit à de forte concentration en NaCl dans l'environnement.

Le potentiel de *L. monocytogenes* à accumuler le potassium est assuré par la présence du système à deux composants, KdpED. Lors d'un changement de pression osmotique, le senseur membranaire KdpD active le régulateur KdpE par phosphorylation. Ensuite, KdpE active la transcription du locus *kdp*. Le locus *kdp* code le transporteur membranaire uniport Kdp qui permet l'accumulation des ions K^+ à l'intérieur de la cellule (Sleator *et al.*, 2003b; Soni *et al.*, 2011). Différentes études ont montré la contribution du système KdpED à l'accumulation de K^+ intracellulaire. En effet, l'absence du senseur KdpE et de son régulateur KdpD est associée à une détérioration de la croissance de *L. monocytogenes* lors d'un stress osmotique (Kallipolitis et Ingmer, 2001; Brøndsted *et al.*, 2003).

5.2.2) Réponse de type soluté compatible

La principale réponse de *L. monocytogenes* au stress osmotique est l'accumulation de solutés compatibles à l'intérieur de la cellule servant d'osmoprotectant en rétablissant l'équilibre osmotique cellulaire. Ce phénomène est une réponse secondaire permettant à *L. monocytogenes* de pouvoir survivre à un stress osmotique à long terme. *L. monocytogenes* peut accumuler différents composés tels que la glycine bêtaïne, la proline bêtaïne, acétyl carnitine, la carnitine, γ -butyrobêtaïne, 3-diméthylsulphoniopropionate et la proline présente à forte concentration (Beumer *et al.*, 1994; Bayles et Wilkinson, 2000).

Les solutés compatibles sont des molécules très solubles, non chargées à un pH physiologique et qui s'accumulent à des concentrations très élevées (supérieur à 1 mol/kg d'eau). Ils n'altèrent pas les fonctions cellulaires telles que la réparation d'ADN et les interactions

protéines-ADN. Ils stabilisent aussi les structures protéiques et les fonctions enzymatiques empêchant leur dénaturation (Bayles et Wilkinson, 2000; Sleator et Hill, 2001).

Les solutés compatibles préférentiellement accumulés par *L. monocytogenes* sont la glycine bêtaïne et la carnitine qui sont transportées à l'intérieur de la cellule par trois transporteurs différents (Fraser *et al.*, 2003) (Figure 18) :

(i) Le transporteur BetL, codé par le gène *betL*, est un transporteur membranaire captant la glycine bêtaïne (Wemekamp-Kamphuis *et al.*, 2002) en symport avec un ion Na^+ (Gerhardt *et al.*, 1996). L'expression du gène du transporteur BetL n'est pas dépendante du facteur σ^B . Une étude a montré que le transcrit de *betL* est présent dans la cellule avant un stress osmotique, supposant que le transporteur joue un rôle dans le mécanisme primaire du transport de glycine bêtaïne pendant les étapes précoces du changement osmotique environnemental (Cetin *et al.*, 2004). La mutation du gène *betL* chez *L. monocytogenes* entraîne une réduction de la croissance bactérienne dans un milieu complexe en présence de NaCl (Sleator *et al.*, 2000).

(ii) Le transporteur Gbu, codé par l'opéron *gbuABC*, appartient à la famille des transporteurs à ATP Binding Cassette. Le gène *gbuA* code une ATPase, *gbuB* code une perméase et *gbuC* code une protéine se liant au substrat et l'expression est régulée par le facteur σ^B (Cetin *et al.*, 2004). Les transporteurs à ATP Binding Cassette sont des protéines transmembranaires transportant de manière unidirectionnelle diverses molécules (ions, macromolécules...) par hydrolyse de l'ATP. Le transporteur Gbu accumule la glycine bêtaïne (Wemekamp-Kamphuis *et al.*, 2002).

(iii) Le transporteur OpuC, codé par l'opéron *opuCABCD*, appartient à la famille des transporteurs à ATP Binding Cassette et capte la carnitine. En absence de BetL et Gbu il peut participer au transport de faible quantité de glycine bêtaïne (Sleator *et al.*, 2001b; Wemekamp-Kamphuis *et al.*, 2002). L'expression de cet opéron est directement régulée par le facteur σ^B (Fraser *et al.*, 2003; Cetin *et al.*, 2004). OpuC contribue aussi à la résistance à la présence de bile lors du passage de *L. monocytogenes* dans le tractus gastro-intestinal par le transport de carnitine (Watson *et al.*, 2009).

Un quatrième transporteur a été mis en évidence, OpuB, décrit comme une pompe à efflux d'exclusion des sels biliaires permettant une tolérance de *L. monocytogenes* à la bile dans l'intestin grêle supérieur. Ce transporteur a finalement été renommé BilE (*Bile Exclusion*)

(Sleator et Hill, 2010) et est transcriptionnellement régulé par le facteur σ^B (Figure 17) (Hain *et al.*, 2008).

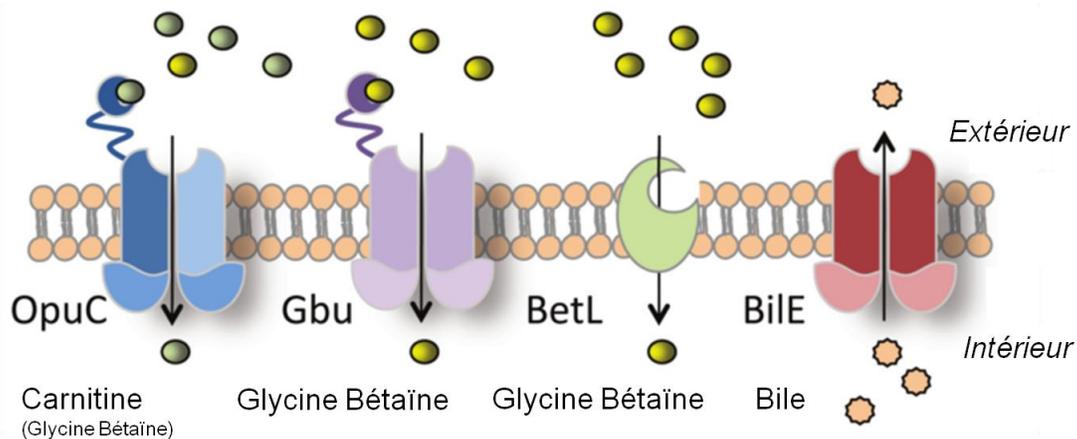


Figure 17 : Principaux transporteurs de solutés compatibles impliqués dans la résistance au stress osmotique chez *L. monocytogenes* (Sleator et Hill, 2010).

La mutation de *betL*, *gbu* ou de *opuC* chez *L. monocytogenes* entraîne une altération de la croissance en condition de stress salin (présence de 3% de NaCl) montrant l'importance de ces transporteurs pour la croissance et la survie en condition de forte osmolarité. (Sleator *et al.*, 2003a). Une étude a révélé que la glycine bêtaïne est l'osmolyte préférentiellement capté par *L. monocytogenes* quand la souche croît en BHI contenant 3% ou 6% de NaCl. La carnitine est accumulée seulement par des souches de *L. monocytogenes* mutantes altérées dans leur accumulation de glycine bêtaïne (Wemekamp-Kamphuis *et al.*, 2002). La captation de la carnitine ou de la glycine bêtaïne dépend fortement de l'environnement et de la disponibilité des nutriments présents (Sleator *et al.*, 2003a).

L'opéron *proBA* codant les protéines ProB et ProA permet la synthèse intracellulaire de proline à partir du glutamate et contribue de manière importante à la croissance de *L. monocytogenes* à haute osmolarité (Sleator *et al.*, 2001a).

5.2.3) Autres systèmes impliqués dans la réponse aux stress osmotique

D'autres systèmes cellulaires sont impliqués dans la réponse de *L. monocytogenes* au stress osmotique. En effet, une étude par électrophorèse bidimensionnelle a permis d'analyser les protéines produites lors de ce stress, notamment des protéines Ssp (*Salt Shock Protein*) qui sont

produites rapidement mais transitoirement et des protéines Sap (*Salt Acclimation Protein*) produites plus ou moins rapidement mais dont la production reste induite plusieurs heures après le stress (Duché *et al.*, 2002).

Les protéines Ssp identifiées dans cette étude sont DnaK jouant un rôle dans la stabilisation des protéines cellulaires, la protéine Ctc et trois autres protéines appartenant au métabolisme cellulaire (Duché *et al.*, 2002). La protéine Ctc est supposée être une protéine interagissant avec l'ARN ribosomique. Il a été montré qu'un mutant *ctc* croît deux fois moins vite que la souche parentale en présence de 0,6 M de NaCl ou de xylose (Gardan *et al.*, 2003). Les protéines Sap identifiées sont GbuA (qui est une sous unité du système de transport Gbu), un facteur d'élongation (EF-Tu) pouvant être impliqué dans le repliement et/ou la protection de protéines en réponse au stress, GuaB pouvant avoir un rôle dans la réparation de l'ADN et des enzymes reliées à la glycolyse et donc aux voies du métabolisme énergétique (Duché *et al.*, 2002). La protéine régulatrice CtsR, codée par l'opéron *clpC*, est un répresseur transcriptionnel qui est inactivé en condition de stress osmotique et à faible pH permettant ainsi de lever la répression qu'il exerce sur son propre opéron. Il permet ainsi la transcription des gènes *clpC*, *clpP* et *clpE*. Les gènes *clpC* et *clpE* codent des protéines chaperons dépendantes de l'ATP et le gène *clpP* code une protéase dégradant les protéines dénaturées ou endommagées et dont l'activité protéolytique peut être spécifiée par l'association ClpP-ClpC (Nair *et al.*, 2000).

Le système à deux composants LisRK contribue à la résistance au stress osmotique. En effet, un mutant *lisK* présente une capacité significativement réduite à tolérer les environnements à haute osmolarité (BHI supplémenté avec 8% de NaCl). Cette réponse semble totalement indépendante de l'accumulation de solutés compatibles et de celle de type KCl. En réponse à un stimulus osmotique, le senseur transmembranaire LisK active la protéine LisR par phosphorylation qui à son tour active la transcription du gène *htrA* (Sleator et Hill, 2005). Le gène *htrA* code la protéase à sérine HtrA qui selon Wonderling *et al.* (2004) serait requise pour dégrader des protéines dénaturées suite au stress. La protéine HtrA a été identifiée comme jouant un rôle dans la croissance de *L. monocytogenes*, dans un milieu expérimental supplémenté avec 3% et 4% de NaCl, et donc dans l'adaptation de *L. monocytogenes* à forte osmolarité (Wonderling *et al.*, 2004).

Les gènes *cspA* et *cspD* codent les protéines CspA et CspD (*Cold Shock Protein*) impliqués dans la réponse à un stress froid chez *L. monocytogenes* et leur expression est significativement induite lors de la croissance bactérienne à 37 °C en présence de BHI supplémenté avec 3% de NaCl (Schmid *et al.*, 2009). Le rôle précis des Csp de *L. monocytogenes* reste encore inconnu mais les auteurs supposent qu'elles augmentent la synthèse de transporteur d'ions Na⁺ pendant le stress osmotique, facilitant ainsi les processus de transcription et de traduction. Elles pourraient aussi permettre la réparation d'ADN grâce à leur activité chaperon sur les acides nucléiques (Schmid *et al.*, 2009).

L'inactivation du gène *hfq*, affecte la croissance de *L. monocytogenes* dans du BHI supplémenté avec 7% de NaCl. Ce gène est régulé par le facteur σ^B (Christiansen *et al.*, 2004). Hfq est une protéine qui se lie à de petits ARN régulateurs (sRNA) impliqués dans la régulation de certains gènes dont l'identité est encore inconnue chez *L. monocytogenes* (Christiansen *et al.*, 2006; Nielsen *et al.*, 2009). Très récemment, un gène nommée *lstC* codant une acétyltransférase-GNAT a été identifié comme contribuant à la croissance de *L. monocytogenes* en présence de 7% de NaCl mais son rôle est encore inconnu (Burall *et al.*, 2015).

Ainsi, de nombreux systèmes sont impliqués dans la réponse au stress osmotique de *L. monocytogenes*. Un aperçu global de ces systèmes est représenté en Figure 18.

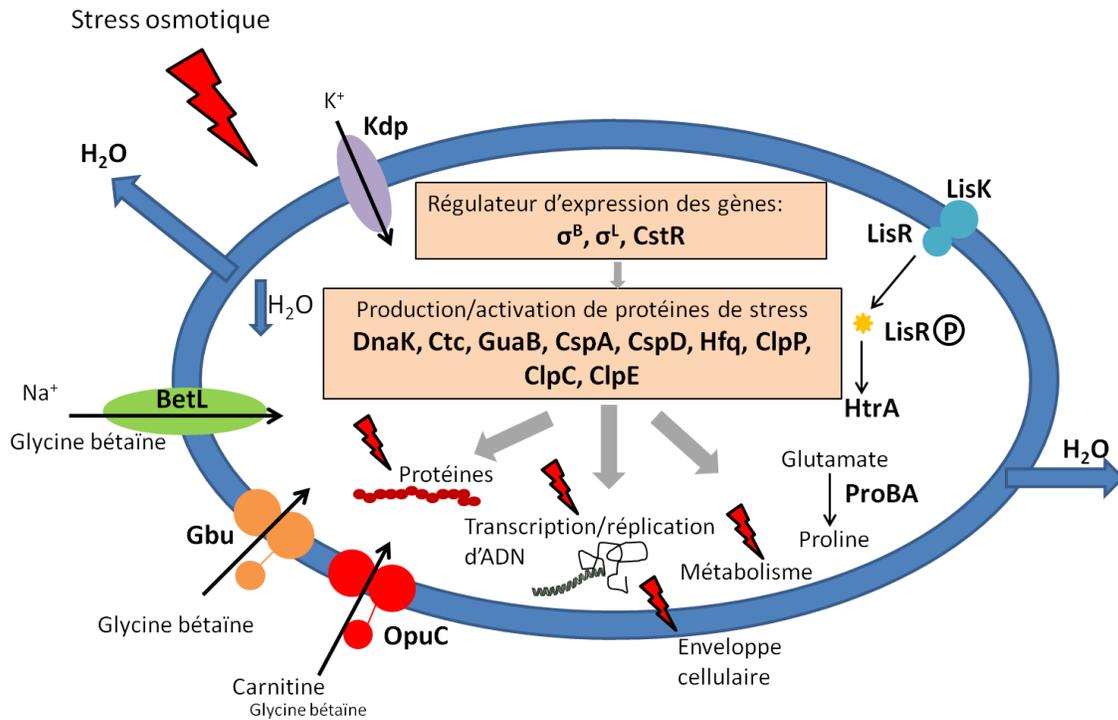


Figure 18 : Représentation schématique des principaux systèmes impliqués dans la réponse au stress osmotique chez *L. monocytogenes* (D'après Soni *et al.*, 2011; Melo *et al.*, 2015).

5.3) Réponse au stress oxydatif

Dans l'industrie agroalimentaire, *L. monocytogenes* est exposée à un stress oxydatif lors d'une modification de l'atmosphère comme par exemple dans l'emballage des produits alimentaires ou lors de l'utilisation d'agents chimiques oxydants tels que les détergents et les désinfectants (Melo *et al.*, 2015). Elle subit aussi ce stress dans le phagosome des macrophages où l'activité microbicide survient grâce à la production des ERO intracellulaires par la cellule hôte. Enfin, ce stress est aussi induit lors de la déshydratation des cellules.

5.3.1) Rôle de la catalase et de la superoxyde dismutase

L. monocytogenes possède différentes enzymes capables de dégrader les ERO. Par exemple, la superoxyde dismutase utilise le manganèse comme cofacteur (MnSOD) dans le cytosol pour catalyser l' O_2^- en H_2O_2 . De même, la catalase permet de convertir l' H_2O_2 en eau et en oxygène. Le potentiel oxydant de la MnSOD a été démontré par une augmentation de la mort

bactérienne dans les macrophages et par une croissance affectée en présence de paraquat, un générateur de ERO intracellulaires, chez une souche de *L. monocytogenes* mutée sur le gène *sod* (Archambaud *et al.*, 2006). Des résultats similaires ont été obtenus avec un mutant *kat* qui a révélé une altération de sa croissance par diminution de la taille de colonies bactériennes en présence d'oxygène. Ainsi, la catalase, codé par le gène *kat*, protège les cellules contre les dommages des ERO produites en présence d'oxygène (Azizoglu et Kathariou, 2010).

Archambaud *et al.*(2006) ont montré que la déphosphorylation de la MnSOD par une phosphatase sérine-thréonine nommée Stp augmente fortement son activité. *L. monocytogenes* en phase de croissance exponentielle produit de nombreuses MnSOD non-phosphorylées, la protégeant des ERO pendant le métabolisme respiratoire en aérobie. En phase stationnaire de croissance, la MnSOD est moins active et se retrouve de nouveau phosphorylée par une kinase bactérienne. Elle peut être sécrétée par le système de sécrétion SecA2 (Figure 19).

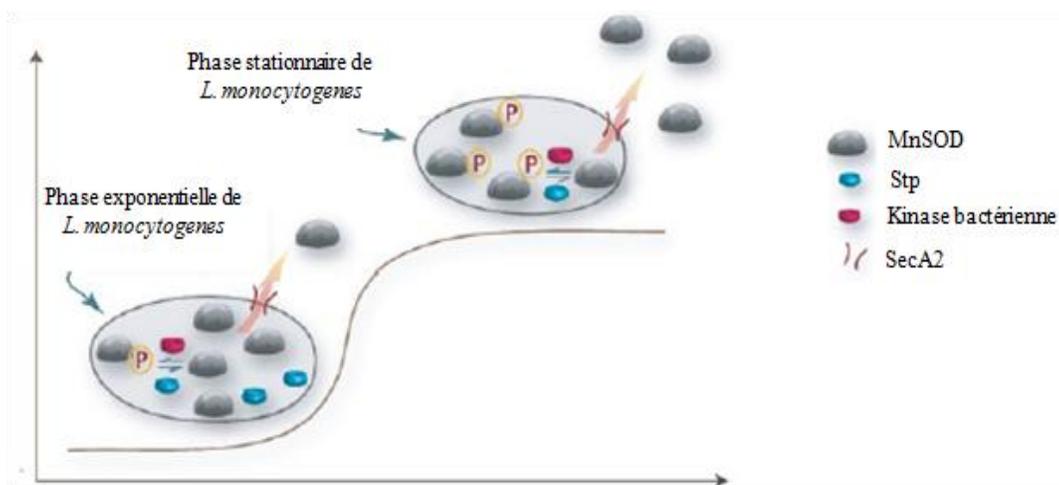


Figure 19 : Régulation de l'activité de la MnSOD par la phosphatase Stp chez *L. monocytogenes* (Archambaud *et al.*, 2006).

5.3.2) Autres facteurs impliqués dans la réponse au stress oxydatif

Chez *L. monocytogenes*, PerR est un régulateur qui agit comme un répresseur de l'expression de gènes jouant un rôle important dans la défense contre le stress oxydatif (Rea *et al.*, 2004). PerR réprime l'expression du gène *kat* ainsi que d'autres gènes tels que le gène *fur* codant un régulateur de la captation du fer, le gène *hemA* ayant un rôle dans la biosynthèse

d'hème, le gène *trxB* codant une thiorédoxine réductase, le gène *zosA* codant une ATPase qui a un rôle dans la captation du zinc et le gène *fri* codant une ferritine (Dussurget *et al.*, 2005; Rea *et al.*, 2005).

Certaines ferritines, possédant pour rôle principal le stockage du fer à l'intérieur des cellules, les protègent de l'attaque des ERO. Le génome de *L. monocytogenes* comporte le gène *fri* codant une unique ferritine appartenant à la famille des protéines Dsp. Les Dsp sont des ferritines formant des dodécamères sphériques se liant au fer. Elles peuvent se lier à 500 molécules de fer et à l'ADN de manière non spécifique. Il a été supposé que les Dsp protègent les cellules contre le stress oxydatif soit par liaison avec l'ADN soit par séquestration du fer (Smith, 2004). Un mutant *fri* de *L. monocytogenes* est plus sensible que la souche parentale à un agent générateur de radicaux superoxydes (Dussurget *et al.*, 2005). Ces mutants ont aussi une croissance considérablement réduite en présence de 20 mM ou 50 mM d'H₂O₂ par rapport à la souche parentale (Olsen *et al.*, 2005). Les mutants *fri* présentent également une faible infectiosité dans les macrophages (Dussurget *et al.*, 2005).

Tout comme la réponse au stress osmotique, l'étude de Loepfe *et al.* (2010) démontre que les Csp sont impliquées dans la tolérance au stress oxydatif. Les auteurs ont observé une diminution de la survie des mutants *cspA*, *cspB* et *cspD* à l'hydroperoxyde de cumène, un agent oxydant. Un mutant *htrA* négatif s'est révélé plus sensible au H₂O₂ comparé à la souche parentale illustrant le rôle de la protéase HtrA dans la tolérance au stress oxydatif (Wonderling *et al.*, 2004). L'expression du gène *htrA* est régulée par le système à deux composants LisRK (Kallipolitis et Ingmer, 2001).

La réponse SOS répare les dommages causés à l'ADN lors d'un stress. Un mutant *recA* codant la protéine RecA, un activateur majeur de la réponse SOS, présente une sensibilité accrue à un stress de 60 mM d'H₂O₂, avec une réduction bactérienne de 3 log de plus par rapport à la souche parentale (van der Veen *et al.*, 2010).

D'autres facteurs impliqués dans les mécanismes de réparation des acides nucléiques, des protéines, des membranes et des enzymes contribuent sûrement à la tolérance au stress oxydatif mais peu d'études ont été réalisées sur *L. monocytogenes* à ce jour.

5.4) Protection croisée

Comme observé chez d'autres microorganismes, *L. monocytogenes* est capable d'induire des réponses de protection croisée à d'autres stress. En effet, l'exposition de *L. monocytogenes* à un stress sublétal induit une réponse qui par la suite augmente sa tolérance à différents stress. L'exposition de *L. monocytogenes* à un pH acide sublétal entraîne une plus haute tolérance à un pH létal de 3,5 et une protection croisée à la chaleur, l'éthanol, au stress osmotique et au stress oxydatif (O'Driscoll *et al.*, 1996; Lou et Yousef, 1997; Skandamis *et al.*, 2008) ainsi qu'une protection à des traitements à haute pression et à la congélation (Wemekamp-Kamphuis *et al.*, 2004). Une pré-adaptation de *L. monocytogenes* à la chaleur induit une protection à l'éthanol, au stress oxydatif (H₂O₂), au stress osmotique et au stress acide alors qu'un stress sublétal au H₂O₂ (0,05%) conduit à une plus forte tolérance à un stress oxydatif de 0,1% d'H₂O₂ (Lou et Yousef, 1997; Skandamis *et al.*, 2008). Une pré-adaptation des cellules au stress osmotique induit une protection croisée et une résistance au stress oxydatif (Lou et Yousef, 1997; Bergholz *et al.*, 2012), à la chaleur, à l'acidité (Skandamis *et al.*, 2008) et aux sels biliaires (Begley *et al.*, 2002). Le stress froid à 4 °C établit une plus haute tolérance à la résistance à un stress osmotique de 3% de NaCl (Pittman *et al.*, 2014). Une autre étude révèle qu'une pré-adaptation de *L. monocytogenes* à 7 °C induit une adaptation de *L. monocytogenes* pendant sa croissance en présence de NaCl (Bergholz *et al.*, 2010).

Les nombreux gènes exprimés en réponse à un stress sont régulés par les mêmes facteurs de transcription (σ^B , σ^L , σ^H , σ^C , CstR et HrcA) et peuvent expliquer les phénomènes de protection croisée au niveau des différents stress chez *L. monocytogenes*. De même, les régulateurs transcriptionnels engagés dans la réponse au stress ne sont pas spécifiques à un seul stress mais peuvent contribuer à une réponse adaptative à différentes conditions (Tableau 7).

Tableau 7 : Principaux mécanismes et protéines connus dans la réponse adaptative de *L. monocytogenes* au stress osmotique, oxydatif, à l'acidité, au froid et à la chaleur (D'après Soni *et al.*, 2011).

Système d'adaptation au stress / protéines	Description	Stress osmotique	Stress oxydatif	Stress acide	Stress chaud	Stress froid	Références
σ^B	Facteur sigma alternatif	+	+	+	+	+	(Becker <i>et al.</i> , 2000; Ferreira <i>et al.</i> , 2001; Fraser <i>et al.</i> , 2003; van der Veen <i>et al.</i> , 2007; Raengpradub <i>et al.</i> , 2008)
σ^L / RpoN	Facteur sigma alternatif	+		+		+	(Okada <i>et al.</i> , 2006; Chan <i>et al.</i> , 2008; Raimann <i>et al.</i> , 2009)
σ^H	Facteur sigma alternatif					+	(Rea <i>et al.</i> , 2004; Chan <i>et al.</i> , 2008)
σ^C	Facteur sigma alternatif				+	+	(Zhang <i>et al.</i> , 2005; Chan <i>et al.</i> , 2008)
KdpED	Système à deux composants	+					(Kallipolitis et Ingmer, 2001; Brøndsted <i>et al.</i> , 2003)
LisRK	Système à deux composants	+	+	+	+		(Cotter <i>et al.</i> , 1999; Kallipolitis et Ingmer, 2001; Sleator et Hill, 2005)
CtsR	Régulateur de transcription négatif	+		+	+		(Nair <i>et al.</i> , 2000)
PerR	Régulateur de transcription négatif		+				(Rea <i>et al.</i> , 2005)
HrcA	Régulateur de transcription négatif				+		(van der Veen <i>et al.</i> , 2007)
BetL	Transporteur d'osmolyte	+					(Sleator <i>et al.</i> , 2000)
Gbu	Transporteur d'osmolyte	+				+	(Gerhardt <i>et al.</i> , 2000; Sleator <i>et al.</i> , 2003a)
OpuC	Transporteur d'osmolyte	+				+	(Angelidis <i>et al.</i> , 2002; Sleator <i>et al.</i> , 2003a)
ProBA	Synthèse de proline	+					(Sleator <i>et al.</i> , 2001a)
Csp	Cold shock protein	+	+			+	(Schmid <i>et al.</i> , 2009; Loepfe <i>et al.</i> , 2010)
OppA	Transporteur d'oligopeptides					+	(Borezee <i>et al.</i> , 2000)
GAD	Système glutamate décarboxylase			+			(Cotter <i>et al.</i> , 2005)
Catalase	Catalase		+			+	(Azizoglu et Kathariou, 2010)
SOD	Superoxyde dismutase		+			+	(Archambaud <i>et al.</i> , 2006; Cacace <i>et al.</i> , 2010)

Fri	Ferritine se liant à l'ADN		+		+	+	(Dussurget <i>et al.</i> , 2005)
ATPase-F₀F₁	ATPase membranaire d'efflux de proton			+			(Cotter <i>et al.</i> , 2000)
RecA	Régulateur de la réponse SOS		+		+		(van der Veen <i>et al.</i> , 2010)
ClpB, ClpC, ClpE, ClpP	Protéine chaperon dépendante de l'ATP et protéases	+		+	+		(Nair <i>et al.</i> , 2000)
HtrA	Protéase sérine	+	+	+	+		(Wonderling <i>et al.</i> , 2004; Stack <i>et al.</i> , 2005; van der Veen <i>et al.</i> , 2007)
Hfq	Protéine chaperon se liant à l'ARN	+				+	(Christiansen <i>et al.</i> , 2004)
Ctc	Protéine ribosomale	+			+	+	(Gardan <i>et al.</i> , 2003; van der Veen <i>et al.</i> , 2007; Cacace <i>et al.</i> , 2010)
DnaK	Protéine chaperon	+			+	+	(Duché <i>et al.</i> , 2002; van der Veen <i>et al.</i> , 2007; Cacace <i>et al.</i> , 2010)
Thit	Système de captation de la thiamine			+			(Madeo <i>et al.</i> , 2012)
ADI	Système arginine déaminase			+			(Ryan <i>et al.</i> , 2009)
Lmo0038	Protéine putative du le système arginine déaminase			+	+		(Chen <i>et al.</i> , 2009a)
GrpE	Protéine chaperon				+	+	(van der Veen <i>et al.</i> , 2007; Cacace <i>et al.</i> , 2010)
GroEL, GroES	Protéine chaperon				+	+	(van der Veen <i>et al.</i> , 2007; Cacace <i>et al.</i> , 2010)
UvrA, UvrB, recN, DinB, UmuDC	Réparation d'ADN			+	+		(Kim <i>et al.</i> , 2006; van der Veen <i>et al.</i> , 2007)

+ : Gène dont l'expression apporte une contribution fonctionnelle dans ces conditions de stress.

En industrie agroalimentaire, les conditions environnementales sont défavorables pour les microorganismes. En effet, *L. monocytogenes* est confrontée au stress osmotique et au stress oxydatif mais aussi au stress acide par l'utilisation de produits chimiques, à la chaleur à cause des procédés thermiques mis en œuvre pour conserver les aliments et les faibles températures où certains ateliers sont réfrigérés lors de la transformation de certains aliments. Tous ces stress génèrent un phénomène de pré-adaptation de *L. monocytogenes* qui peut permettre à la bactérie de résister aux cycles de nettoyage ainsi qu'au séchage.

Les fluctuations de l'humidité relative induisent des perturbations importantes chez les microorganismes. En effet, l'eau est une molécule vitale pour les cellules, assurant la diffusion des biomolécules dans le cytoplasme et apportant la structure et la fonction des protéines, des acides nucléiques et des membranes. Le séchage consiste à enlever l'eau des cellules entraînant un stress hyperosmotique et un stress oxydatif. Il cause de nombreux dommages sur différents composants cellulaires et peut offrir un réel potentiel de destruction sur les microorganismes. Plusieurs paramètres rentrent en compte pour assurer une viabilité cellulaire importante lors de la conservation de microorganismes. Ainsi, la vitesse de déshydratation, de réhydratation, la matrice de séchage et la présence de solutés se révèlent comme étant des facteurs clés de la viabilité cellulaire. Ces paramètres pourraient donc être modulés pour optimiser la destruction de microorganismes pathogènes ou d'altération.

Les réponses adaptatives des microorganismes à ce stress sont principalement des mécanismes contrebalançant le stress osmotique par accumulation de solutés compatibles et d'osmoprotectants, ainsi que l'utilisation d'enzymes antioxydantes en réponse au stress oxydatif. La réponse au séchage peut être très complexe et difficile à élucider. *L. monocytogenes* est une bactérie particulièrement résistante au séchage mais son mécanisme d'adaptation à la dessiccation a été très peu étudié contrairement aux autres stress environnementaux. Elle possède de nombreux systèmes de réponse aux stress osmotique et oxydatif afin de pouvoir les tolérer et s'adapter. De plus, une protection croisée de ces stress la rend résistante à d'autres stress létaux. *L. monocytogenes* est une bactérie tolérante aux conditions extrêmes de l'environnement et est difficile à éradiquer complètement dans l'industrie agroalimentaire et pendant le séchage.

Résultats et discussion

L'objectif général de ce travail de thèse est d'évaluer le comportement de *L. monocytogenes* face aux fluctuations hydriques et de déterminer les modifications cellulaires engendrées par ces fluctuations. Les conditions de séchage d'une suspension de *L. monocytogenes* entraînant un effet destructeur maximal ont été déterminées en modulant différents paramètres cinétiques et physico-chimiques du procédé. Une approche comparative visant à évaluer la résistance des souches de *L. monocytogenes* selon leur habitat, leur sérotype et leur génotype a été menée. Par la suite les modifications de la structure cellulaire conduisant à la mort cellulaire après séchage ont été examinées.

Le premier chapitre de cette partie présente les résultats obtenus sur la résistance au stress hydrique de 30 souches de *L. monocytogenes* issues principalement de l'industrie agroalimentaire et vise à répondre à la question suivante :

- Existe-il des différences de résistance au stress hydrique entre différentes souches de *L. monocytogenes* ?

Le deuxième chapitre s'intéresse au comportement de *L. monocytogenes* exposée à différentes conditions de fluctuation d'humidité relative afin de déterminer les conditions les plus létales pour sa destruction et de répondre aux questions suivantes :

- Est-ce que les conditions de fluctuation de l'humidité relative peuvent affecter la survie de *L. monocytogenes* ?
- La réhydratation est elle une étape importante dans la diminution de la survie de *L. monocytogenes* ?

Enfin, le troisième chapitre détaille les modifications cellulaires survenant chez *L. monocytogenes* après la déshydratation et concerne les questions suivantes :

- Quelles sont les effets de la déshydratation sur la structure cellulaire de *L. monocytogenes* ?
- L'oxydation joue-elle un rôle dans la diminution de la survie de *L. monocytogenes* pendant le séchage ?

Chapitre 1 : Résistance des souches de *Listeria monocytogenes* au stress hydrique

1. Introduction

L. monocytogenes est une espèce dont les caractères phénotypiques sont très diversifiés. Les souches de *L. monocytogenes* se distinguent par 13 sérotypes différents (Rocourt et Seeliger, 1985), elles peuvent être isolées d'environnements distincts et ont la particularité de posséder un niveau virulence hétérogène défini selon trois catégories : virulente, hypovirulente et avirulente (Roche *et al.*, 2001).

L'objectif de ce travail est d'évaluer le potentiel de destruction du stress hydrique sur 30 souches de *L. monocytogenes*. Les 30 souches de cette étude ont été sélectionnées par l'Anses, coordinateur du projet EcoSec, qui a retenu des souches appartenant à 4 sérotypes différents, 1/2a, 1/2b, 1/2c et 4b, fréquemment retrouvés dans les aliments, les ateliers des industries agroalimentaires et qui sont responsables de la majorité des cas de listériose (Liu, 2006). L'ensemble des souches est constitué principalement de souches isolées d'environnements de transformation des aliments et d'aliments variés ainsi que de quelques souches séquencées et annotées isolées de cas clinique permettant des études transcriptomique et protéomique dans le cadre du projet. Certaines souches sont persistantes dans l'industrie agroalimentaire, possèdent un niveau de virulence connu (virulente ou hypovirulente) ou non déterminé.

L'évaluation de la survie des 30 souches au stress hydrique fait partie d'une tâche du projet ANR EcoSec visant à cribler les souches de *L. monocytogenes* selon leur capacité à survivre à un stress hyperosmotique en milieu liquide avec pression osmotique contrôlée et un séchage sur une matrice solide. Le stress hyperosmotique a été réalisé avec une solution glycérolée présentant une a_w de 0,480 permettant une sélection rapide des souches. Ensuite un traitement par séchage des bactéries à 75% d'HR a été effectué. Cette condition est plus réaliste du point de vue industriel (70% est l'HR minimale pouvant être obtenue en industrie d'après l'un des partenaires industriels du projet) et moins délétère pour les cellules permettant ainsi de discriminer les souches entre elles. Le but final de cette étude est de sélectionner quatre souches possédant différents niveaux de résistance au stress hydrique pour la suite des travaux et du projet.

2. Diversité de la résistance des souches de *L. monocytogenes* à un stress hyperosmotique

2.1) Objectif

L'évaluation de la survie des 30 souches de *L. monocytogenes* à un stress hyperosmotique a été effectuée avec du glycérol car il permet de définir des a_w très faibles en solution (jusqu'à 0,12) ce que ne permet pas des solutés comme le NaCl ou le saccharose. Ce stress a été réalisé à une a_w de 0,480 correspondant à une pression osmotique de 101 MPa par rapport à une pression iso-osmotique de 1,38 MPa (a_w de 0,990) se rapportant à la pression osmotique intracellulaire des bactéries. Cette a_w est discriminante car des a_w plus élevées n'auraient pas pu permettre de discriminer les souches entre elles étant donné que *L. monocytogenes* utilise le glycérol comme source de carbone pouvant minimiser le stress (Joseph *et al.*, 2008). De plus, des traitements hyperosmotiques à cette a_w ont déjà permis de discriminer des bactéries à Gram positif, à Gram négatif et des levures (Mille *et al.*, 2005). Lemétais *et al.* (2012) ont révélé que face à ce stress la levure *S. cerevisiae* a un comportement de résistance similaire à celui du séchage aérien. Ainsi les résultats obtenus dans cette étude, permettront de déterminer si une corrélation existe entre la résistance de *L. monocytogenes* au stress hyperosmotique avec du glycérol et au séchage aérien.

2.2) Matériel et méthodes

2.2.1) Souches de *L. monocytogenes*

La liste des 30 souches de *Listeria monocytogenes* utilisées dans cette étude ainsi que leur lignée, sérotype, virulence et origine est présentée Tableau 8. L'ensemble de ces souches a été fourni par l'Anses (Maison Alfort, France) coordinateur du projet EcoSec.

Tableau 8 : Souches de *Listeria monocytogenes* utilisées dans cette étude.

Souche	Lignée	Sérotype	Virulence	Origine	Caractéristiques particulières
IN14	I	4b	Hypovirulente	Aliment	Groupe virulence IV (Roche <i>et al.</i> , 2012)
IN11	I	4b	Hypovirulente	Aliment	Groupe virulence V (Roche <i>et al.</i> , 2012)
06CEB189LM	I	4b	Hypovirulente	Cas de listériose avec poisson à Berlin	
AF90	I	4b	Virulente	Oreille de bovin	
06CEB211LM	I	4b	Virulente	Pomme de terre	
AF28	I	4b	Virulente	Matière première de produits laitiers frais	
F2365	I	4b	Virulence ND	Lait et produits laitiers	Séquencée et annotée, J. Craig Venter Institute (Nelson <i>et al.</i> , 2004)
CCL 128	I	4b	Virulence ND	Environnement fromage	Souche persistante filière fromage
AF160	I	1/2b	Virulente	Moules décortiquées cuites	
06CEB212LM	I	1/2b	Virulente	Lait	
SLCC2755	I	1/2b	Virulence ND	Humain	Séquencée et annotée, Université de Giessen, Université de Gottingen, (Kuenne <i>et al.</i> , 2013)
CCL 391	I	1/2b	Virulence ND	Intérieur multivac filière porc	Persistante
Lm109	I	1/2b	Virulence ND	Tapis désossage porc	Persistante
CCL500	I	1/2b	Virulence ND	Lait	
06CEB178LM	II	1/2a	Hypovirulente	Hareng fumé	
AF95	II	1/2a	Hypovirulente	Environnement plats cuisinés	Groupe virulence I (Roche <i>et al.</i> , 2012)
BO43	II	1/2a	Hypovirulente	Fromage	Groupe virulence III (Roche <i>et al.</i> , 2012)
EGD-e(BUG1600)	II	1/2a	Virulente	Cas clinique animal	Séquencée et annotée, Institut Pasteur Paris, (Glaser <i>et al.</i> , 2001)
AF114	II	1/2a	Virulente	Environnement volaille	
AF39	II	1/2a	Virulente	Matière première porc	
CCL390	II	1/2a	Virulence ND	Chariot malaxage filière porc	Persistante
CCL501	II	1/2a	Virulence ND	Saumure fromagerie	
CCL207	II	1/2a	Virulence ND	Table inox hareng et saumon fumé	Persistante (1998 à 2002)
CCL210	II	1/2a	Virulence ND	Trémis atelier salage poisson fumé	Persistante (1999 à 2002)
CCL213	II	1/2a	Virulence ND	Plan de travail conditionnement poisson fumé	Persistante dans l'atelier de salage (1999-2001)

AF105	II	1/2c	Hypovirulente	Environnement porc	Groupe virulence III (Roche <i>et al.</i> , 2012)
99EB15LM	II	1/2c	Hypovirulente	Atelier d'industrie agroalimentaire bovin	Groupe virulence I (Roche <i>et al.</i> , 2012)
AF104	II	1/2c	Virulente	Environnement porc	
LO28	II	1/2c	Virulente	Isolat humain	Séquencée mais pas annotée, Broad Institute
CCL218	II	1/2c	Virulence ND	Equipement acier inoxydable porc ou volaille	Vraisemblablement persistante (isolée au cours de 3 visites différentes soit sur produit, soit sur surface)

Virulence ND = Virulence Non Déterminée

2.2.2) Conditions de culture

Les différentes souches de *L. monocytogenes* ont été conservées à -80 °C sous forme d'aliquotes contenant 1 mL d'une culture en phase stationnaire de croissance en suspension dans du milieu Tryptic Soy Broth (TSB, pour 1 L d'eau distillée : 17 g de peptone de caséine, 3 g de peptone de soja, 5 g de NaCl, 2,5 g de phosphate dipotassique, 2,5 g de glucose stérilisé à l'autoclave à 120 °C pendant 15 min, Sigma Aldrich, St Quentin Fallavier, France) supplémenté avec 20% de glycérol (v/v). A partir de ces aliquotes, des souchiers ont été préparés par ensemencement sur boîtes de Petri contenant du milieu Tryptic Soy Agar (TSA, Sigma Aldrich, St Quentin Fallavier, France). Les souchiers ont été utilisés après 48 h de croissance dans une étuve à 25 °C et ont été ensuite conservés à 4 °C pendant 1 mois maximum.

Pour les essais expérimentaux, la préculture a été réalisée par inoculation de cinq colonies à partir des souches pures de *L. monocytogenes* dans 10 mL de milieu TSB et incubée pendant 16 h à 25 °C sans agitation. La culture de *L. monocytogenes* estensemencée à partir de la préculture en ajustant la DO₆₀₀ à 0,0005 en TSB puis incubée à 25 °C pendant 24 h. Les cultures ont été récoltées en début de phase stationnaire de croissance.

2.2.3) Préparation des solutions à activité de l'eau contrôlée

Afin de préparer les solutions à des valeurs d' a_w souhaitées, les concentrations en glycérol nécessaires ont été calculées à partir de l'équation de Norrish (11) (Norrish, 1966) :

$$(11) \quad a_w = (1 - X_s)e^{-KX_s^2}$$

Où X_s est la fraction molaire et K est le coefficient de Norrish du soluté utilisé pour augmenter la pression osmotique. Pour le glycérol, ce coefficient a une valeur de 1,16. La correspondance entre la pression osmotique π (Pa) et la valeur de l' a_w est donnée par l'équation suivante (12) :

$$(12) \quad \pi = - \frac{RT \ln a_w}{\bar{V}_w}$$

Où R est la constante des gaz parfaits ($J \cdot mol^{-1} \cdot K^{-1}$), T est la température (K) et \bar{V}_w est le volume partiel de l'eau ($m^3 \cdot mol^{-1}$).

Les quantités de glycérol utilisées pour préparer les différentes solutions à une valeur d' a_w contrôlées sont présentées dans le Tableau 9.

Tableau 9 : Masse de glycérol utilisée pour préparer les solutions à a_w contrôlées.

Pression osmotique (MPa)	Activité de l'eau (a_w)	Masse de glycérol (g) pour 1000 g d'eau distillée
1,38	0,990	51
101	0,480	3618

La valeur de l' a_w des solutions eau/glycérol a été vérifiée par un appareil à miroir Aqualab 3TE mesurant l' a_w (erreur $\pm 0,003$) (Decagon Devices, Pullman, USA).

2.2.4 Déshydratation des bactéries par chocs hyperosmotiques

Avant le traitement, les cellules (25 mL de culture) ont été lavées une fois par centrifugation (10 min à $3645 \times g$ à 25 °C) et resuspendues en solution binaire eau/glycérol (20 mL) à une pression osmotique de 1,38 MPa ($a_w = 0,990$) (correspondant à la pression osmotique physiologique des cellules). Pour réaliser le choc hyperosmotique, 1 mL de cette suspension bactérienne (10^9 cellules/mL) a été placé dans un tube Eppendorf puis centrifugé à $5100 \times g$ pendant 10 min à 25 °C. Le surnageant a ensuite été retiré et remplacé par 1 mL de solution binaire eau/glycérol à 101 MPa ($a_w = 0,480$). Le culot a été rapidement resuspendu et les bactéries ont été incubées pendant 1 h dans un bain thermostaté à 25 °C.

2.2.5) Protocole de réhydratation

Pour réhydrater les bactéries, la suspension cellulaire, après avoir été bien vortexée, a été diluée au 10^{ème} dans la solution binaire eau/glycérol à 1,38 MPa. Ce type de réhydratation a donné lieu à deux étapes de réhydratation. Une réhydratation à une pression osmotique de 4 MPa ($a_w = 0,970$) à la dilution au 10^{ème} puis une deuxième réhydratation à 1,38 MPa ($a_w = 0,990$) à la dilution au 100^{ème}.

2.2.6) Mesure de la cultivabilité bactérienne

La cultivabilité des bactéries a été estimée par la méthode des Unités Formant Colonies (UFC). Après l'étape de réhydratation, des dilutions décimales ont été réalisées sur la suspension cellulaire dans la solution binaire eau/glycérol à 1,38 MPa ($a_w = 0,990$) et ont été étalées sur milieu gélosé TSA. Les colonies ont été comptées après une incubation de 48 h à 25 °C. Chaque résultat est rapporté à un témoin n'ayant subi aucun traitement hyperosmotique. Les expériences ont été répétées au minimum trois fois sur trois cultures indépendantes.

2.2.7) Analyse statistique

Pour classer les 30 souches selon leur résistance au stress hyperosmotique, l'homogénéité des variances (test F) a été testée. Les résultats ont révélé une homogénéité des variances ($p > 0,05$). Une analyse de variance (ANOVA) et un test post-hoc HSD de Tukey (si $p < 0,05$) ont été réalisés pour déterminer si des différences significatives existaient entre les souches. Les analyses ont été effectuées en utilisant le logiciel R (version 3.1.2).

2.3) Résultats

La perte de cultivabilité des 30 souches de *L. monocytogenes* exposées au stress hyperosmotique à une a_w de 0,480 a révélé une variabilité significative de la résistance des souches au stress. La souche LO28 montre une réduction décimale de 2,5 log comparée à la souche AF90 qui affiche une plus forte résistance avec une réduction décimale de 0,3 log (Figure 20). Ces résultats montrent une diversité parmi les souches qui peuvent être classifiées en trois groupes, selon le test Tukey HSD, avec les souches résistantes au stress hyperosmotique étiquetées avec un "a" (Figure 20 - barres rouges), les souches sensibles étiquetées avec un "d" (Figure 20 - barres vertes) et enfin, les souches présentant une résistance intermédiaire au stress hyperosmotique étiquetées avec un "b" et un "c" (Figure 20 - barres oranges).

Les deux souches LO28 et AF104 sont les plus sensibles et les trois souches CCL501, 06CEB178LM et AF95 ont une résistance intermédiaire au stress hyperosmotique. À l'exception de ces 5 souches, il n'y a statistiquement pas de différence entre les 25 autres souches montrant que globalement, les souches de *L. monocytogenes* ont la même capacité à résister à ce type de stress et peu de souches perdent plus d'un log de survie. *L. monocytogenes* est capable d'utiliser le glycérol comme source de carbone et est capable de l'internaliser (Joseph *et al.*, 2008). Ainsi le stress osmotique engendré ici est atténué par la diffusion libre du glycérol à l'intérieur des cellules qui amoindrit la contrainte mécanique engendrée par la diminution du volume cellulaire. Ceci rend cette approche limitante pour évaluer la résistance de *L. monocytogenes* au stress hydrique.

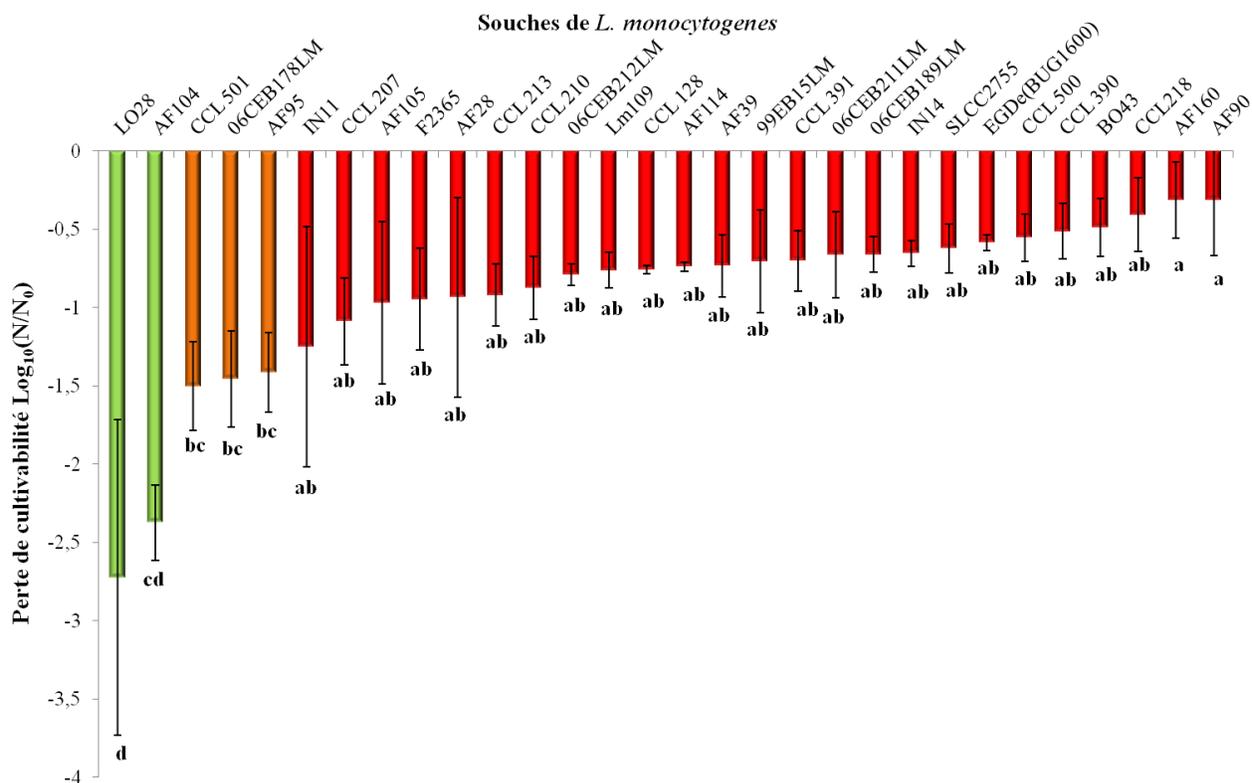


Figure 20 : Perte de cultivabilité des 30 souches de *L. monocytogenes* exposées à un stress hyperosmotique avec une solution glycérolée à une a_w de 0,480 pendant 1 h. Les barres d'erreurs correspondent aux écarts-types calculés à partir de 3 répétitions indépendantes. Les pertes de cultivabilité possédant des lettres différentes sous chaque barres sont significativement différentes (Tukey HSD; $p < 0,05$).

Selon notre classement, les souches résistantes au stress hyperosmotique étant trop nombreuses (25 sur 30 souches) et le nombre de souches sensibles et de résistance intermédiaire étant trop faible (2 et 3 sur 30 souches), il ne semblait pas pertinent de proposer une prévalence de sérotype, d'origine ou de virulence des souches dans chaque niveau de résistance au stress hyperosmotique.

3. Diversité de résistance des souches de *L. monocytogenes* au séchage

3.1) Introduction

Cette partie a fait l'objet d'une publication intitulée "*Listeria monocytogenes* ability to survive desiccation: influence of serotype, origin, virulence and genotype" et est en soumission dans le journal *International Journal of Food Microbiology*.

L. monocytogenes est une bactérie appartenant à 13 sérotypes différents et possédant un niveau de virulence hétérogène. Elle a été isolée dans de nombreux environnements et notamment dans l'industrie agroalimentaire où elle peut y persister pendant de longues périodes. Le séchage est un stress pouvant être rencontré dans l'industrie agroalimentaire par *L. monocytogenes* notamment à la fin des procédures de nettoyage et de désinfection et pendant certains procédés de transformation alimentaire (fumage, affinage...). Afin d'évaluer la résistance des 30 souches de *L. monocytogenes* à la déshydratation (précédemment exposées au stress hyperosmotique), les bactéries ont été séchées dans une enceinte à une humidité relative contrôlée intermédiaire de 75% pendant 3 h à 25 °C sur un coupon de polypropylène (Résultats - Chapitre 2 - Matériel et méthodes partie 2.2.1). Ainsi, la mesure de la survie des souches a permis de distinguer trois groupes de souches en fonction de leur résistance. Un groupe de souches résistantes au séchage, un groupe de souches de résistance intermédiaire et un groupe de souches sensibles au séchage. Dans chacun de ces groupes, la prévalence des différents sérotypes, du niveau de virulence et de l'origine a pu être évaluée. De plus, d'après les travaux de Hingston *et al.* (2015), une comparaison génomique a été effectuée afin de déterminer, pour 4 souches étudiées, la conservation de 31 gènes potentiellement impliqués dans les mécanismes de résistance au séchage. Les séquences de ces 31 gènes issues du génome des souches SLCC2755 (résistante au séchage), F2365 (résistance intermédiaire au séchage) et LO28 (sensible au séchage) ont été comparées avec celle de la souche de référence EGD-e (résistante au séchage).

3.2) Article "*Listeria monocytogenes* ability to survive desiccation: influence of serotype, origin, virulence and genotype"

Fiona Zoz, Cosette Grandvalet, Emilie Lang, Cyril Iaconelli, Patrick Gervais, Stéphane, Guyot, Laurent Beney

Abstract: *Listeria monocytogenes*, a bacterium that is responsible for listeriosis, is a very diverse species. Desiccation resistance has been little studied in *L. monocytogenes*, although it is a stress that is largely encountered by this microorganism in food-processing environments and that could be managed to prevent its presence. The objective of this study was to evaluate the resistance of 30 *L. monocytogenes* strains to moderate desiccation (75% relative humidity) and evaluate the risk of resistance of strains according to their phenotype, serotype, and genotype. The results showed a great heterogeneity of strains regarding their ability to survive (loss of cultivability between 0.4 and 2.0 log). Strains were classified into three groups according to desiccation resistance (sensitive, intermediate, or resistant), and the strain repartition was analyzed relative to serotype, virulence level and environmental origin of the strains. No correlation was found between isolate origin and desiccation resistance. All serotype 1/2b strains were classified into the group of resistant strains. Virulent and hypovirulent strains were distributed among the three groups of desiccation resistance. Finally, a genomic comparison was performed based on 31 genes that were previously identified as being involved in desiccation resistance. The presence of those genes was localized among the genomes of the four sequenced strains and compared regarding strain-resistance levels. High nucleotide conservation was identified between resistant and sensitive desiccation strain. In conclusion, the 1/2b serotype may indicate a trend of resistance to relative humidity fluctuations. However, this work not corroborates previous work regarding the identification of 31 desiccation-associated genes by insertional mutagenesis and suggests that expression level of those genes may influence strain survival to desiccation.

Keywords: *Listeria monocytogenes*, Desiccation, Resistance, Serotype, Food-processing environment, Virulence

1. Introduction

The colonization of food-production premises by the foodborne pathogen *Listeria monocytogenes* causes large sanitary and economic risks. *L. monocytogenes* is responsible for listeriosis, which can lead to severe infection in immunocompromised people, pregnant woman, and elderly people, with a high death rate (from 20% to 30%) (Goulet et al., 2012). The level of contamination of food by *L. monocytogenes* remains high, as reported by the U.S. Food and Drug Administration (U. S. Food And Drug Administration, 2016a, 2016b), leading to a significant economic impact on the food industry due to the recall and destruction of incriminated products. To prevent implantation as well as colonization of production surfaces by *L. monocytogenes* and other pathogens, various methods are used to clean and disinfect them, including the application of detergents, enzymes, chemical disinfectants, or mechanical force (Van Houdt and Michiels, 2010). These procedures are polluting and waste water, which could be reduced by the use of additional protocols. In recent preliminary studies, it has been shown that the control of ambient air humidity (in particular to a moderate relative humidity (RH)) and rehydration kinetics, may offer such a complementary means to improve the hygiene of surfaces (Lang et al., 2016; Zoz et al., 2016).

However, the diversity of strains and their different ability to resist water stress has been little studied. With 13 different serotypes defined in a combination of 14 somatic antigens (O) present on the cell wall and four flagellar antigens (H), *L. monocytogenes* exhibits genetic and phenotypic variety (Farber and Peterkin, 1991). Four serotypes, 1/2a, 1/2b, 4b, and 1/2c, are commonly found in food, food-processing, or natural environments and are responsible for 98% of human listeriosis (Liu, 2006). Moreover, *L. monocytogenes* strains exhibit a variation in virulence (virulent and hypovirulent strains) that is related to different mechanisms and phenotypic behaviors (Roche et al., 2012). For example, some hypovirulent strains have a mutated or truncated virulence transcription factor (PrfA), a truncated internalin (InlA), or a low phospholipase activity, which affect the host cell adhesion and the lysis of the host cell vacuole upon infection, respectively (Roche et al., 2005; Témoïn et al., 2008).

L. monocytogenes is widely distributed in hostile environments. It can grow in high-salt concentrations, up to 10% NaCl (McClure et al., 1989), tolerates low-pH environments (O'Driscoll et al., 1996), and survives and grows in a wide range of temperatures (2–45 °C)

(Gandhi and Chikindas, 2007). This resistance allows *L. monocytogenes* to enter and persist in food-processing chains. In the literature, different studies showed differences in stress resistance among *L. monocytogenes* strains, such as acidic, heat, ethanol, carbon starvation, alkaline, or osmotic stress conditions. Some of those studies showed a correlation between stress resistance and serotype, origin, or virulence (Francis and Beirne, 2005; Liu et al., 2005; Moorhead and Dykes, 2003; Van Der Veen et al., 2008). However, to our knowledge, no screening based on *L. monocytogenes* desiccation tolerance has been performed.

The objective of this study was to test the ability of 30 *L. monocytogenes* strains to survive desiccation at 75% RH and to evaluate the risk of strain resistance to desiccation according to phenotype, serotype, and genotype. This RH is representative of RH levels that are commonly encountered in food industry premises (Zoz et al., 2016). We classified *L. monocytogenes* strains into three categories: desiccation-resistant strains, desiccation-sensitive strains, and strains with intermediate resistance to desiccation. This permits the suggestion of a prevalence of serotype, origin, or virulence in each desiccation-resistance group. According to accessible genomic sequences, the 31 desiccation-associated genes identified previously by Hingston et al. (2015) were identified in four genome strains belonging to different tolerance categories and a sequence comparison was then performed.

2. Materials and methods

2.1. Bacterial strains and culture conditions

The 30 *L. monocytogenes* strains were supplied by the Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses, Maisons-Alfort, France) (Table 1). Strains were stored on Tryptic Soy Broth (TSB; Sigma-Aldrich, St. Quentin Fallavier, France) supplemented with 20% glycerol at -80 °C. For revitalization, bacteria were isolated with a sterile swab on Tryptic Soy Agar (TSA; Sigma-Aldrich) plates, incubated at 25 °C for 48 h, and stored at 4 °C for a maximal period of 1 month on TSA. Subcultures were grown from five colonies inoculated into 10 ml of TSB and incubated overnight at 25 °C. The subcultures were adjusted to a final OD₆₀₀ of 0.005 in 50 ml of fresh TSB before incubation at 25 °C for ~24 h, depending on the strains, until stationary growth phase.

Table 1 List of the *L. monocytogenes* strains used in this study and their characteristics.

Strain	Serotype	Virulence	Origin	Characteristics
IN14	4b	Hypovirulent	Unknown food	Virulence group IV (Roche et al., 2012)
IN11	4b	Hypovirulent	Unknown food	Virulence group V (Roche et al., 2012)
06CEB189LM	4b	Hypovirulent	Fish, seafood, and processing environment	
AF90	4b	Virulent	Beef and processing environment	
06CEB211LM	4b	Virulent	Vegetables	
AF28	4b	Virulent	Dairy products and processing environment	
F2365	4b	ND	Dairy products and processing environment	Genome sequenced, J. Craig Venter Institute (Nelson et al., 2004)
CCL 128	4b	ND	Dairy products and processing environment	P
AF160	1/2b	Virulent	Fish, seafood, and processing environment	
06CEB212LM	1/2b	Virulent	Dairy products and processing environment	
SLCC2755	1/2b	ND	Clinical case	Genome sequenced, University of Giessen, University of Gottingen (Kuenne et al., 2013)
CCL 391	1/2b	ND	Pork and processing environment	P
Lm109	1/2b	ND	Pork and processing environment	P
CCL 500	1/2b	ND	Dairy products and processing environment	
06CEB178LM	1/2a	Hypovirulent	Fish, seafood, and processing environment	
AF95	1/2a	Hypovirulent	Ready-to-eat processing environment	Virulence group I (Roche et al., 2012)
BO43	1/2a	Hypovirulent	Dairy products and processing environment	Virulence group III (Roche et al., 2012)
EGD-e(BUG1600)	1/2a	Virulent	Clinical case	Genome sequenced, Institut Pasteur Paris (Glaser et al., 2001)
AF114	1/2a	Virulent	Poultry and processing environment	
AF39	1/2a	Virulent	Pork and processing environment	
CCL 390	1/2a	ND	Pork and processing environment	P
CCL 501	1/2a	ND	Dairy products and processing environment	
CCL 207	1/2a	ND	Fish, seafood, and processing environment	P
CCL 210	1/2a	ND	Fish, seafood, and processing environment	P

CCL 213	1/2a	ND	Fish, seafood, and processing environment	P
AF105	1/2c	Hypovirulent	Pork and processing environment	Virulence group III (Roche et al., 2012)
99EB15LM	1/2c	Hypovirulent	Beef and processing environment	Virulence group I (Roche et al., 2012)
AF104	1/2c	Virulent	Pork and processing environment	
LO28	1/2c	Virulent	Clinical case	Permanent draft, Broad Institute
CCL218	1/2c	ND	Poultry and processing environment	P

ND, not determined virulence; P, persistent strain. A strain was considered as persistent if it was isolated repeatedly (at least three times) on different visits by competent authorities.

2.2. Desiccation and rehydration processes

The controlled-environment drying chambers were hermetic plastic boxes (20 × 13 × 6 cm) containing a saturated salt solution. To control RH (Lemetais et al., 2012), sodium chloride (Sigma-Aldrich) was used to obtain 75% RH. A ventilator (Sunon; Radiospares, Beauvais, France) was placed in the drying chamber to increase mass transfer.

Cultures of 30 strains (25 ml) were centrifuged for 10 min at $3645 \times g$ and washed once with phosphate-buffered saline (PBS; Sigma-Aldrich). Pellets were suspended in 20 ml of PBS. For desiccation experiments, 10 μ l of cell suspension with a final concentration of 1×10^9 CFU/ml were placed onto hydrophobic polypropylene coupons, a surface that can be found in the food industry, such as in tanks, pipework, and accessories and on cutting surfaces (Oulahal et al., 2008). Coupons were formed from 15 × 10 × 2 mm rectangles of polypropylene (Scientix, Fougères, France). They were cleaned in 70% ethanol, rinsed with distilled water, and sterilized overnight in an oven at 116 °C.

Samples were placed in the drying chambers at 75% RH on a rack, to keep them above salt solutions, for 3 h at 25 °C. Bacterial cells were rehydrated instantaneously with 1 ml of PBS by 30 successive aspirating and dispensing cycles using a micropipette.

2.3. Measurement of bacterial cultivability

The viability of bacteria was estimated using a spread plating method on TSA. Colonies were counted after incubation for 48 h at 25 °C and recorded as CFU/ml. Cultivability was expressed as $\log_{10}(N/N_0)$, where N represents the final cell concentration and N_0 represents the initial cell concentration.

2.4. Statistical analysis

The bacterial cultivability of the 30 strains after desiccation stress was determined in three independent experiments. To classify the 30 strains according to their resistance to desiccation, variance homogeneity (*F*-test) was tested. Our results revealed a homogeneous variance ($p > 0.05$). An ANOVA and Tukey's honestly significant difference test (if $p < 0.05$) were performed to determinate whether significant differences existed among different strains. Analyses were performed using the R software, version 3.1.2.

2.5. DNA sequencing and genomic analysis

The nucleotide sequences of desiccation-associated genes were completed by PCR amplification and Sanger sequencing (Genewiz, Essex, United Kingdom). Primers targeting the genomic regions of the *L. monocytogenes* LO28 strain (Table S1) were purchased from Eurofins Genomics (Ebersberg, Germany) and were designed based on the published *L. monocytogenes* EGD-e genome sequences (GenBank accession number NC_003210) to amplified desiccation-associated homologous genes. SLCC2791 and SLCC2792 primers (Table S1) were designed based on the *L. monocytogenes* SLCC2755 genome sequence (NC_018587) to amplified *lmo2468* homologous gene. PCR was performed with Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) in a T100 Thermal Cycler (Bio-Rad) according to the parameters accompanying the polymerase. The sequences of both strands of amplified genes were established by Sanger sequencing (Genomewiz, Essex, United Kingdom) using corresponding PCR amplification primers. DNA sequences have been deposited in GenBank with the following accession numbers: *lmo0289* (KX519376), *lmo0372* (KX519377), *lmo0616* (KX519378), *lmo0676* (KX519379), *lmo0679* (KX519380), *lmo0686* (KX519381), *lmo0699*

(KX519382), *lmo0706* (KX519383), *lmo1194* (KX519384), *lmo1219* (KX519385), *lmo1220* (KX519386), *lmo1371* (KX519387), *lmo1728* (KX519388), *lmo1742* (KX519389), *lmo1744* (KX519390), *lmo1786* (KX519391), *lmo2470* (KX519392), *lmo2503* (KX519393).

Open reading frames encoding proteins similar to the amino acid sequences encoded by *lmo0371*, *lmo0372*, *lmo0565*, *lmo0616*, *lmo0983*, *lmo1174*, *lmo1194*, *lmo1219*, *lmo1220*, *lmo1728*, *lmo2443*, *lmo2470*, *lmo2490*, *lmo2503*, *lmo2768*, *lmo2778*, *lmo0289*, *lmo0676*, *lmo0679*, *lmo0686*, *lmo0696*, *lmo0699*, *lmo0700*, *lmo0706*, *lmo0771*, *lmo1370*, *lmo1371*, *lmo1582*, *lmo1742*, *lmo1744* and *lmo1786* of the *L. monocytogenes* strain EGD-e were searched among the genome sequences of *L. monocytogenes* SLCC2755, F2365 (NC_002973.6), and LO28 (AARY00000000) strains using the BLAST online software (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Sequence alignments were performed using the CLUSTAL Omega program network service (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).

Supplementary Table S1. List of primers used in this study for PCR amplification

Locus-tag	Forward primer	Reverse primer
Lmo0289	5'-TCGATAATTTACAAGTGTACAATG-3'	5'-AGAATGAGGAGAGTCAACAATAA-3'
Lmo0372	5'-AAACGGTGTCAAACCATTTCG-3'	5'-ATTCACGCATGATTTCAACTAAT-3'
Lmo0616	5'-AAATTTGCTTCTTGGATAAACTATA-3'	5'-TTGATAATTTTCATCGAAAGAAGC-3'
Lmo0676	5'- ATGCGTAAAATAACTTCTAGACG-3'	5'-GTCAAAATAAAAGCAGGCATTAA-3'
Lmo0679	5'- ATTTGACAGATGAGATGATTCAA-3'	5'-TTAGAACTTGATTTTGTCTGCG-3'
Lmo0686	5'-CCAAGCGTCGCAAGAAACC-3'	5'-CTGCTGCTGCTTTTCTTGGC-3'
Lmo0699	5'-TATCCGTTTTTGAAGAGTTGAC-3'	5'-TCACATCTAGTTCCATTTGCGT-3'
Lmo0706	5'-TATGTGGCCAATACGAAGGC-3'	5'-TTTCGGCCGTATTTAGCAGTG-3'
Lmo1194	5'-GCAATCATTAAATGCAATCTTGAT-3'	5'-GCTTTTCGAAAACCTTTTGATACGC-3'
Lmo1194	5'-TGAAGAAGCAGTTTTTACACAA-3'	5'-GCTTCGTTTATTAGCAAATTTGT-3'
Lmo1219	5'-GCTAAGTTGTTTTGACTTAGTCA-3'	5'-GCCCATTGACCAAATTCCTC-3'
Lmo1220	5'- ATATAAGCAACATAATATTTATTAG-3'	5'-TTAATTAGGTACTTCCACCCAT-3'
Lmo1371	5'-GTGGCAAAGAATATGATGTAGT-3'	5'-TTAACCGTGAATTGCATTGCC-3'
Lmo1371	5'-TGGAGACTGCATTCCAACGA-3'	5'-GTCTTCTTGCCATTAGCATTG-3'
Lmo1728	5'-CCGTATTTTTGTGGAACTAGT-3'	5'-TTGCTCTGAAATATTACTTTTTAG-3'
Lmo1728	5'-CAATGTTCAAGCGGACTTTGC-3'	5'-CCACGTGAATCGCATCCTTT-3'
Lmo1742	5'-GGCTATCAAAAATGGAATAGAC-3'	5'-CCTTGAATAGTCACTTGTTCTGA-3'
Lmo1744	5'-ATGAAAATTTTAGTATTCGGTGGT-3'	5'-TCACCTCTTCAACTAGTGCTA-3'
Lmo1786	5'-AGGTTAACAGCGTTTGTAAATA-3'	5'-GCAATCCCACAGGACACAA-3'
Lmo2503	5'-CCACACATAAAATTGATTACAAAAG-3'	5'-TAGTATTTCAACAAAACATCCAT-3'
Lmo2791	5'-AGCAACAGAAAAGAAATCCTGA-3'	5'-TAACTCAGCCCAATGGTTCGC-3'

3. Results and discussion

3.1. Desiccation resistance of *L. monocytogenes* strains and link with their persistence properties

The 30 strains of *L. monocytogenes* that were dried at 75% RH for 3 h (Fig. 1) showed significant variability in loss of cultivability ($p < 0.05$). The CCL207 strain was the most sensitive to desiccation (2.0 log reduction), whereas the Lm109 strain was the most resistant (0.4 log reduction). These results showed a wide diversity among *L. monocytogenes* strains, which were classified into three groups according to the Tukey's honestly significant difference test: desiccation-resistant strains, labeled with an "a" (strains Lm109 to AF39); sensitive strains, labeled with a "g" (strains CCL210 to CCL207); and strains with intermediate resistance to desiccation, labeled with an "a" and a "g" (strains F2365 to CCL501). Moreover, these results showed that persistent strains were present in three groups, indicating that persistent strains in the food industry were not more resistant to desiccation than nonpersistent strains (Fig. 1).

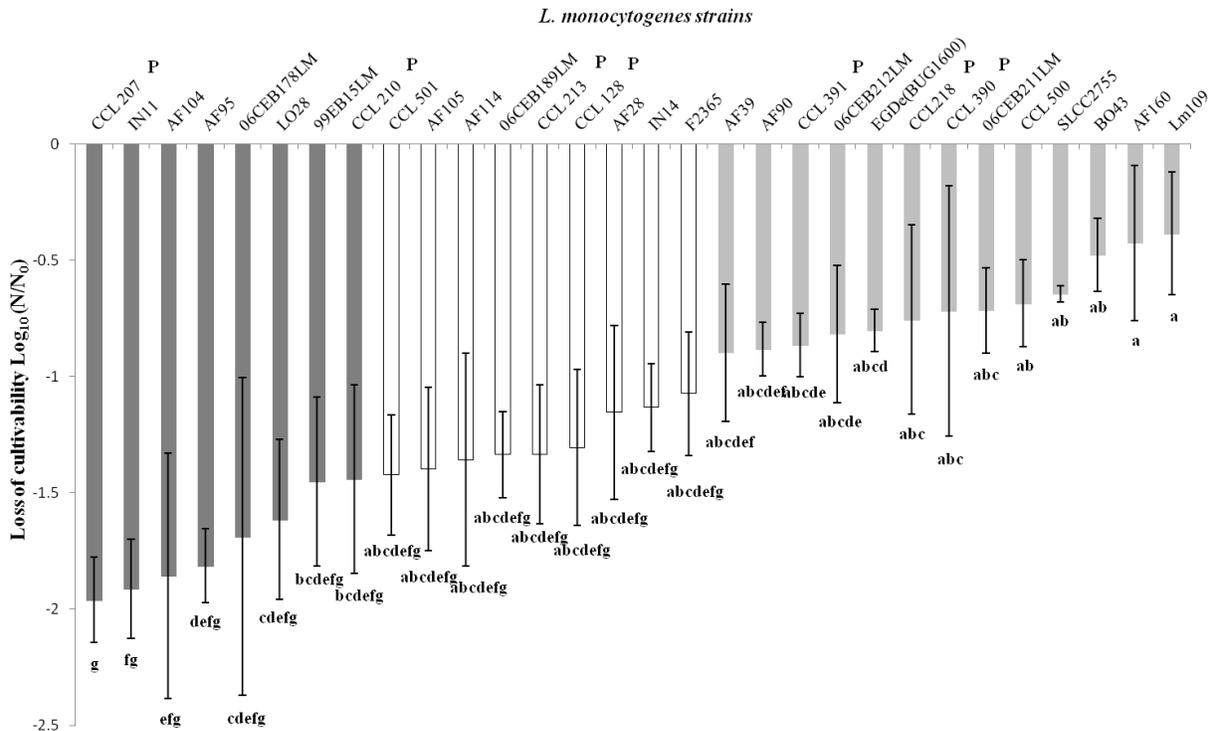


Fig. 1 Loss of cultivability of 30 environmental *L. monocytogenes* strains during desiccation on polypropylene coupons incubated to 75% RH at 25 °C for 3 h with an instantaneous rehydration. The values for each strain followed by different letters indicate significant differences ($p < 0.05$), as determined by the Tukey’s honestly significant difference test. Light-gray bars: desiccation-resistant strains, labeled with an “a” and without a “g”; dark-gray bars: desiccation-sensitive strains, labeled with a “g” and without an “a”; white bars: strains with an intermediate resistance to desiccation, labeled with an “a” and a “g”. The letter “P” corresponds to persistent strains in the food industry. Error bars correspond to the SD calculated from three independent triplicates.

3.2. Evaluation of the relation between resistance to desiccation stress and origin, serotype, or virulence

The results presented in Fig. 2 show the distribution of strains into three groups according to desiccation resistance related to strain serotype and origin. A heterogeneous repartition of different origins in the three groups was observed (Fig. 2a). Strains isolated from meat (pork and beef), clinical cases, ready-to-eat, fish, and seafood processing were distributed into the desiccation-sensitive and resistant groups. Strains isolated from meat and meat-processing environments represented 38.5% ($n = 5$) of the 13 strains that were resistant to desiccation and 25.0% ($n = 2$) of the eight strains that were sensitive to desiccation. Strains isolated from ready-to-eat and processing environments represented 7.69% ($n = 1$) of desiccation-resistant strains

against 12.5% (n = 1) of desiccation-sensitive strains. Clinical isolates represented 15.4% (n = 2) of desiccation-resistant strains and 12.5% (n = 1) of desiccation-sensitive strains. Finally, strains isolated from fish, seafood, and processing environments represented 7.69% (n = 1) of desiccation-resistant strains against 37.5% (n = 3) of desiccation-sensitive strains. Bacterial isolates from poultry and dairy products and their processing environments were distributed between desiccation-resistant strains and strains with intermediate desiccation resistance, but they were not present among desiccation-sensitive strains.

The unequal number of isolate origins was not sufficient to make general conclusions but allowed us to emphasize a tendency. These results showed that there was no correlation between resistance to desiccation and origin because no predominance of origin was detected in phenotypic groups (sensitive, resistant, or intermediate strains). A study showed that strains isolated from clinical cases were more tolerant to osmotic stress than were strains isolated from seafood (Viallette et al., 2003). In contrast, another study demonstrated that the strain's behavior toward osmotic stress was independent of its origin (Faleiro et al., 2003). Our results appear to demonstrate that desiccation-resistance is strain-dependent, rather than origin dependent. In each environment presented in this study, *L. monocytogenes* underwent desiccation, which is omnipresent in food-processing environments and in foods (sausages, smoked salmon, cheese, and dairy product) (Kramarenko et al., 2013).

The four serotypes studied here (1/2a, 1/2b, 1/2c, and 4b) are more prevalent in food environments and are mostly responsible for the clinical cases of listeriosis. To our knowledge, no work compared *L. monocytogenes* desiccation resistance according to serotype. A study showed that in the bacterium *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium, which lacks an O polysaccharide (OPS), a part of lipopolysaccharide (LPS) used for *Salmonella enterica* serotyping affects the resistance to desiccation among the six LPS mutant strains (Garmiri et al., 2008). However, for other stresses, a difference among *L. monocytogenes* serotypes has been reported. A study comparing 138 strains showed that serotype 1/2b strains have a higher tolerance to saline stress at 7 °C, while serotype 4b strains have a higher tolerance to saline stress at 30 °C (Van Der Veen et al., 2008). Lianou et al., (2006) compared 25 strains and showed that strain serotype was not correlated to acid stress, but that serotype 4b strains were more tolerant to heat stress.

In our study, the distribution of the studied serotypes revealed that serotype 1/2a, 1/2c, and 4b strains were present in the three phenotypic groups (sensitive, intermediate, and resistant to desiccation) (Fig. 2a). Serotype 1/2a strains were equally represented in each group. Serotype 1/2c was largely present (37.5%; n = 3) in desiccation-sensitive strains and slightly present in other groups (around 10%, n = 1). Serotype 4b strains represented 15.3% of the resistant strains, 55.5% of the intermediate strains, and 12.5% of the sensitive strains. In contrast, all serotype 1/2b strains were present in desiccation-resistant strains. This suggests that serotype 1/2a, 1/2c, and 4b strains are neither sensitive nor resistant to desiccation, whereas serotype 1/2b strains have a greater resistance to desiccation, which may be related to a specific adaptive response of strains or a specific component of the cell wall (Uchikawa et al., 1986).

Among the strains with known virulence (18 of the 30 strains), hypovirulent and virulent strains were represented in the three phenotypic groups. The size of the different groups was small, with seven strains in the desiccation-resistant group, five strains in the group with intermediate resistance to desiccation, and six strains in the desiccation-sensitive group. Thus, it is difficult to conclude a relationship between virulence and resistance to desiccation in *L. monocytogenes*. However, our study tended to show that virulent and hypovirulent strains may be resistant and/or sensitive to desiccation. A study showed a possible link between salt stress resistance, and virulence, but not desiccation. It showed that the carnitine transporter OpuC is involved in *L. monocytogenes* resistance to osmotic stress and in its ability to reach and multiply in the liver and spleen (Wemekamp-kamphuis et al., 2002). Moreover, an invasive capacity increase in response to salt stress was detected for 4b serotype strains (Walecka et al., 2011). In contrast, another study that compared avirulent and virulent strains did not report differences in resistance to salt stress (Liu et al., 2005).

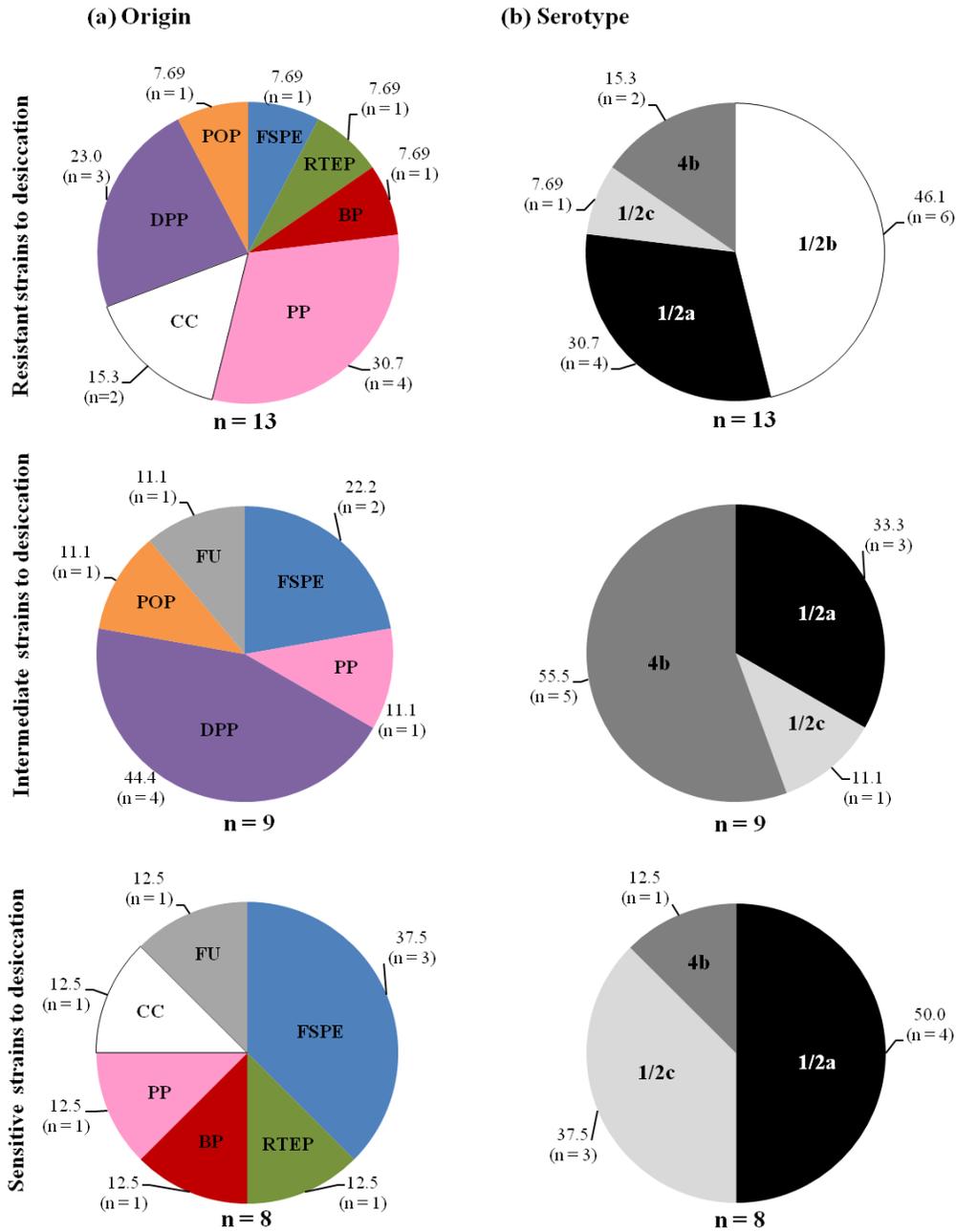


Fig. 2. Distribution of different characteristics in resistant, intermediate, and sensitive strains regarding desiccation to 75% RH for 3 h at 25 °C based on origin (a) (FSPE = fish, seafood, and processing environment; RTEP = ready-to-eat processing environment; BP = beef and processing environment; PP = pork and processing environment; CC = clinical case; DPP = dairy products and processing environment; POP = poultry and processing environment; FU = food unknown) and serotype (b). The numbers located beside each portion represent the percentage of strains with the phenotypic characteristic. The letter “n” corresponds to the number of strains.

3.3. Identification of 31 desiccation-associated genes in the genome sequences of the *L. monocytogenes* SLCC2755, F2365, and LO28 strains

Hingston et al. (2015) identified 31 desiccation-associated genes. We conducted a genomic comparative analysis to locate these 31 genes in the genome sequences of the *L. monocytogenes* SLCC2755, F2365, and LO28 strains using the genome sequence of the EGD-e strain as a reference.

Thirty of the thirty one genes have been identified in the SLCC2755 genome (Table 2). These genes encode proteins that have a sequence identity that ranges from 88.9% to 100% compared with EGD-e homologous proteins. However, regarding *lmo2768*, two contiguous putative genes, corresponding to the locus tags, LMOSLCC2755_2792 (CBY50384) and LMOSLCC2755_2791 (CBY50383), have been identified in the SLCC2755 genome sequence. Encoded proteins correspond to the amino (LMOSLCC2755_2792) and carboxy regions (LMOSLCC2755_2791) of the *lmo2768* product and share respectively 85% and 98% amino acid sequence identity with EGD-e homologous protein (Table 2). Consequently, the *L. monocytogenes* SLCC2755 strain does not encode a functional protein because of a nonsense mutation induced by the insertion of a thymine at position 279 relative to the first position of the AUG start codon (+1), which introduces a premature stop codon. This nonsense mutation has been verified by Sanger sequencing in the *L. monocytogenes* SLCC2755 DNA genomic region. The unexpected frameshift mutation in the *L. monocytogenes* SLCC2755 *lmo2768* gene led us to analyze this locus in other *L. monocytogenes* strains. BlastP analysis on 136 *L. monocytogenes* strains genomic sequences available revealed that two other strains, FSLF2-208 (EFR83173) and Lm_1889 (EXL21314), exhibit truncated homologous protein. However this result is due to a non-finalized genomic sequence for the FSLF2-208 strain and an annotation mistake for the Lm_1889 strain whose locus_tag X847_2307 extended by 99 upstream nucleotides encodes a protein sharing 100% amino acid identity with EGD-e homologous protein. From this study, it appears that frameshift mutation of *lmo2768* is an extremely rare event. *lmo2768* encodes a potential permease ABC transporter with an unknown function (Burke et al., 2014). *L. monocytogenes lmo2768* mutants are sensitive to lysozyme, suggesting a role in cell-wall homeostasis (Durack et al., 2015) and in responses to desiccation and osmotic stresses (Hingston et al., 2015). In our study, the EGD-e and SLCC2755 strains did not exhibit differences in survival to desiccation (Fig. 1); consequently, this gene does not seem to be essential for the

desiccation resistance of *L. monocytogenes* in our experimental conditions (75% RH at 25 °C for 3 h) compared to Hingston et al.'s experiment (43% RH at 15 °C for 5 days).

All 31 desiccation-associated genes identified in the Hingston et al., (2015) study were located in the genome sequence of the *L. monocytogenes* F2365 strain. The amino acid encoding sequences had a percentage identity from 89% to 100% compared with EGD-e homologous proteins, with the exception of *lmo0711*, which was less conserved. The *L. monocytogenes* F2365 genome reports a potential gene (locus tag: LMOF2365_0789) encoding a protein (AAT03570) that shares 78% identity compared with the EGD-e *lmo0711* product. The *lmo0711* gene encodes an ATP-sensitive inner potassium channel that allows K⁺ uptake and the accumulation of K⁺ ions inside cells during osmotic stress (Sleator et al., 2003). The *L. monocytogenes* 568 *lmo0711* mutant was more resistant to desiccation and osmotic treatment compared with the wild-type strain (Hingston et al., 2015). However, our work showed that the *L. monocytogenes* F2365 strain was more sensitive to desiccation than was the EGD-e strain (Fig. 1). This suggests that the low phylogenetic conservation of this gene may modify the efficiency of this channel, thus optimizing survival to drying. However only directed mutagenesis approach may confirm this hypothesis because genetic background could also influence the sensitivity to desiccation.

The genome sequence of the *L. monocytogenes* LO28 strain is only available in draft version and consists of 1,150 contigs (AARY02000001-AARY02001150). First analysis of the *L. monocytogenes* LO28 genome revealed the presence of sequences sharing 100% nucleotide identity with 9 of the 31 desiccation-associated genes from *L. monocytogenes* EGD-e strain (Table 2: *lmo0371*, *lmo0676*, *lmo0696*, *lmo0700*, *lmo0771*, *lmo0983*, *lmo1370*, *lmo2490*, and *lmo2768*). Two genes, homologous to *lmo0565* and *lmo1582*, showed one nucleotide substitution (*lmo0565*, T63→C and *lmo1582* A204→G) without modification in amino acid sequences encoded. These 11 homologous genes were located in 11 separate draft sequences (Table 2).

Fifteen desiccation-associated genes were located at the extremity of contig sequences; consequently, sequences were not entirely accessible. Finally, the 5 desiccation-associated genes *lmo0372*, *lmo0676*, *lmo0686*, *lmo1742* and *lmo1744* were located in the four contigs: cont3.134 (*lmo0372*), cont3.73 (*lmo0676*), cont3.40 (*lmo0686*), cont3.172 (*lmo1742* and *lmo1744*). However, nucleotide alignments of these sequences with the EGD-e gene sequences revealed nucleotide deletions in *lmo0372* (A631), *lmo0676* (T71), *lmo1742* (A1039) and *lmo1744* (T30

and A536) as well as nucleotide insertions in *lmo0676* (A downstream T401), *lmo0686* (AG downstream A216) and *lmo1744* (A downstream C491).

These nucleotide deletion and insertion introducing premature in-frame translational stop codon causes a loss of gene function in the LO28 strain. To confirm these nonsense mutations and to determine sequence of uncompleted genes, PCR amplifications were performed in the *L. monocytogenes* LO28 genomic DNA and nucleotides sequences were determined. Sequence checking revealed the absence of nucleotide deletion or insertion in *lmo0372*, *lmo0676*, *lmo0686*, *lmo1742*, and *lmo1744* homologous genes in the LO28 strain genome. Furthermore, these 5 nucleotide sequences shared 100% identity with EGD-e homologous sequences as well as nucleotide sequence of fifteen genes located at the extremity of contigs. From this study, it appears that the 31 desiccation-associated genes identified in Hingston et al. study (2015) were 100% conserved between *L. monocytogenes* EGD-e and LO28 strains despite the difference in desiccation resistance of these both strains in our experimental conditions. In Hingston et al. study (2015), the *L. monocytogenes* 568 strains was exposed to 43% RH in TSB plus 1% glucose, while in this study the thirty strains were exposed to moderate desiccation (75% RH) in PBS. These differences may not involve the same genes in desiccation resistance. However, even at low RH, *L. monocytogenes* EGD-e has shown to be more resistant than the LO28 strains to 43% and 11% RH (Zoz et al., 2016).

Table 2 Sequences from *L. monocytogenes* SLCC2755, F2365, and LO28 genomes similar to those of desiccation-associated genes from the *L. monocytogenes* EGD-e strain.

Locus_tag/CDS localization (contig and position) homologous to EGD-e genes (Accession)			
EGD-e locus_tag (NC_003210)	SLCC2755 strain (NC_018587)	F2365 strain (NC_002973.6)	LO18 strain* (AARY00000000)
Lmo0289	LMOSLCC2755_RS01 870	LMOF2365_RS01605	contig3.424 (1149..>2280) AARY02000424 → KX519376
Lmo0371	LMOSLCC2755_RS02 225	LMOF2365_RS01975	cont3.134 complement (489..1202) AARY02000134
Lmo0372	LMOSLCC2755_RS02 230	LMOF2365_RS01980	contig3.134 (1359..2800) AARY02000134 → KX519377
Lmo0565	LMOSLCC2755_RS03 190	LMOF2365_RS02960	cont3.50 complement (2358..2984) AARY02000050
Lmo0616	LMOSLCC2755_RS03 445	LMOF2365_RS03215	cont3.776 complement (615..>1200] AARY02000776 → KX519378
Lmo0676	LMOSLCC2755_RS03 775	LMOF2365_RS03550	contig3.73 (3755..4522) AARY02000073 → KX519379
Lmo0679	LMOSLCC2755_RS03 790	LMOF2365_RS03565	cont3.842 (<1..653) AARY02000842 → KX519380
Lmo0686	LMOSLCC2755_RS03 825	LMOF2365_RS03600	contig3.40 complement (2299..3128) AARY02000040 → KX519381
Lmo0696	LMOSLCC2755_RS03 875	LMOF2365_RS03650	cont3.129 complement (543..965) AARY02000129
Lmo0699	LMOSLCC2755_RS03 890	LMOF2365_RS03665	cont 3.701 (<1..599) AARY02000701 → KX519382
Lmo0700	LMOSLCC2755_RS03 895	LMOF2365_RS03670	cont3.79 (360..1907) AARY02000079
Lmo0706	LMOSLCC2755_RS03 925	LMOF2365_RS03700	cont3.734 (<1..826) AARY02000734 → KX519383
Lmo0771	LMOSLCC2755_RS04 195	LMOF2365_RS03935	cont3.563 (996..1448) AARY02000565
Lmo0983	LMOSLCC2755_RS05 280	LMOF2365_RS05030	cont3.576 (306..785) AARY02000576
Lmo1174	LMOSLCC2755_RS09 435	LMOF2365_RS05905	cont3.609 (211..>1620) AARY02000609 → KX555278
Lmo1194	LMOSLCC2755_RS06 265	LMOF2365_RS06000	cont3.290 complement (<1..996) AARY02000290 → KX519384
Lmo1219	LMOSLCC2755_RS06 390	LMOF2365_RS06125	cont3.1143 (167..>480) AARY02001143 → KX519385
Lmo1220	LMOSLCC2755_RS06 395	LMOF2365_RS06130	cont3.466 complement (1941 ..>2160) AARY02000466 → KX519386

Lmo1370	LMOSLCC2755_RS07 165	LMOF2365_RS06900	cont3.120 (2381..3448) AARY02000120
Lmo1371	LMOSLCC2755_RS07 170	LMOF2365_RS06905	cont3.120 (3463..>4680) AARY02000120 → KX519387
Lmo1582	LMOSLCC2755_RS08 225	LMOF2365_RS07960	cont3.289 complement (141..1139) AARY02000289
Lmo1728	LMOSLCC2755_RS09 355	LMOF2365_RS08815	cont3.561 (<1..>1740) AARY02000561 → KX519388
Lmo1742	LMOSLCC2755_RS09 425	LMOF2365_RS08885	cont3.172 (1371..3112) AARY02000172 → KX519389
Lmo1744	LMOSLCC2755_RS09 435	LMOF2365_RS08895	Contig3.172 (1371..3112) AARY02000172 → KX519390
Lmo1786	LMOSLCC2755_RS09 660	LMOF2365_RS09120	cont3.33 complement (6277...>7140] AARY02000033 → KX519391
Lmo2443	LMOSLCC2755_RS12 765	LMOF2365_RS12240	cont3.146 (1712...>3000) AARY02000146 → KX555279
Lmo2470	LMOSLCC2755_RS12 910	LMOF2365_RS12385	cont3.419 (1147...>2280) AARY02000419 → KX519392
Lmo2490	LMOSLCC2755_RS13 010	LMOF2365_RS12485	cont3.14 complement (8369-8608) AARY02000014
Lmo2503	LMOSLCC2755_RS09 660	LMOF2365_RS12550	cont3.115 (3844...>4740) AARY02000115 → KX519393
Lmo2768	LMOSLCC2755_2792 LMOSLCC2755_2791 (FR733646.1)	LMOF2365_RS13980	cont3.147 (365..1515) AARY02000147
Lmo2778	LMOSLCC2755_RS14 555	LMOF2365_RS14035	contig3.172 complement (<1..877) AARY02000172 → KX555280

* Accession numbers are indicated for each contig and new locus_tag accession numbers are notified after the arrow if necessary.

< and > symbols signified uncompleted CDS.

4. Conclusion

In conclusion, *L. monocytogenes* desiccation resistance is strain-dependent, and it can be difficult to predict the behavior of *L. monocytogenes* species regarding desiccation. Although strain origin was not correlated with desiccation resistance, serotype 1/2b strains were most resistant to desiccation. Virulent strains were present in the three groups of resistance to desiccation, which can lead to food safety issues. Except for the *lmo2768* homologous gene of *L. monocytogenes* SLCC2755 strains which presented a nonsense mutation in the SLCC2755 strain, genomic comparison of *L. monocytogenes* EGD-e, SLCC2755, F2365, and LO28 genomic sequence based on the 31 desiccation-associated genes showed high conservation of these genes

despite various resistance to desiccation. However, the analysis was carried out using strains for which genome sequences are accessible, and focused on specific genes and not on the entire genome. Other complementary studies are required to confirm these results on the desiccation tolerance of different *L. monocytogenes* strains. Moreover transcriptional expression level of these genes could be explored in regard to resistance to desiccation. This phenomenon could capture the attention of the research community, to understand the physiological or molecular implications of this observation, thus permitting a better understanding of *L. monocytogenes* diversity and species-related risk.

Acknowledgments

This work was supported by the Agence Nationale de la Recherche (ANR) under the project “EcoSec”. We thank all partners of EcoSec project: Labeyrie-Group, Dessica, MF conseil, IRSTEA, ANSES, INRA-Theix and in particular Dr Brigitte Carpentier who initiated the project.

References

- Burke, T.P., Loukitcheva, A., Zemansky, J., Wheeler, R., Boneca, I.G., Portnoy, D.A., 2014. *Listeria monocytogenes* is resistant to lysozyme through the regulation, not the acquisition, of cell wall-modifying enzymes. *J. Bacteriol.* 196, 3756–3767.
- Durack, J., Burke, T.P., Portnoy, D. A., 2015. A *prl* mutation in SecY suppresses secretion and virulence defects of *Listeria monocytogenes secA2* mutants. *J. Bacteriol.* 197, 932–942.
- Faleiro, M.L., Andrew, P.W., Power, D., 2003. Stress response of *Listeria monocytogenes* isolated from cheese and other foods. *Int. J. Food Microbiol.* 84, 207–216.
- Farber, J.M., Peterkin, P.I., 1991. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiol. Rev.* 55, 476–511.
- Francis, G.A., Beirne, D.O.Ó., 2005. Variation among strains of *Listeria monocytogenes* : differences in survival on packaged vegetables and in response to heat and acid conditions. *Food*

Control 16, 687–694.

Gandhi, M., Chikindas, M.L., 2007. *Listeria*: A foodborne pathogen that knows how to survive. *Int. J. Food Microbiol.* 113, 1–15.

Garmiri, P., Coles, K.E., Humphrey, T.J., Cogan, T.A., 2008. Role of outer membrane lipopolysaccharides in the protection of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium from desiccation damage. *FEMS Microbiol. Lett.* 281, 155–159.

Glaser, P., Frangeul, L., Buchrieser, C., Rusniok, C., Amend, A., Baquero, F., Berche, P., Bloecker, H., Brandt, P., Chakraborty, T., Charbit, A., Chetouani, F., Couve, E., de Daruvar, A., Dehoux, P., Domann, E., Domínguez-Bernal, G., Duchaud, E., Durant, L., Dussurget, O., Entian, K.-D., Fsihi, H., Garcia-Del Portillo, F., Garrido, P., Gautier, L., Goebel, W., Gómez-López, N., T. Hain, Hauf, J., Jackson, D., Jones, L.-M., Kaerst, U., Kreft, J., Kuhn, M., Kunst, F., Kurapat, G., Madueño, E., Maitournam, A., Mata Vicente, J., Ng, E., Nedjari, H., Nordsiek, G., Novella, S., de Pablos, B., Pérez-Díaz, J.-C., Purcell, R., Rimmel, B., Rose, M., Schlueter, T., Simoes, N., Tierrez, A., Vázquez-Boland, J.-A., Voss, H., Wehland, J., Cossart, P., 2001. Comparative genomics of *Listeria* species. *Science.* 294, 849–852.

Goulet, V., Hebert, M., Hedberg, C., Laurent, E., Vaillant, V., De Valk, H., Desenclos, J.-C., 2012. Incidence of listeriosis and related mortality among groups at risk of acquiring listeriosis. *Clin. Infect. Dis.* 54, 652–660.

Hingston, P. A., Piercey, M.J., Hansen, L.T., 2015. Genes associated with desiccation and osmotic stress in *Listeria monocytogenes* as revealed by insertional mutagenesis. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 5350–5362.

Kramarenko, T., Roasto, M., Meremae, K., Kuningas, M., Poltsama, P., Elias, T., 2013. *Listeria monocytogenes* prevalence and serotype diversity in various foods. *Food Control* 30, 24–29.

Kuene, C., Billion, A., Mraheil, M.A., Strittmatter, A., Daniel, R., Goesmann, A., 2013. Reassessment of the *Listeria monocytogenes* pan-genome reveals dynamic integration hotspots and mobile genetic elements as major components of the accessory genome. *BMC Genomics* 14, 1–19.

Lang, E., Zoz, F., Iaconelli, C., Guyot, S., Alvarez-Martin, P., Beney, L., Perrier-Cornet, J.-M., Gervais, P., 2016. Recovery estimation of dried foodborne pathogens is directly related to rehydration kinetics. PLoS One 11, e0160844.

Lianou, A., Stopforth, J.D., Yoon, Y., Wiedmann, M., Sofos, J.N., 2006. Growth and stress resistance variation in culture broth among *Listeria monocytogenes* strains of various serotypes and origins. J. Food Prot. 69, 2640–2647.

Liu, D., 2006. Identification, subtyping and virulence determination of *Listeria monocytogenes*, an important foodborne pathogen. J. Med. Microbiol. 55, 645–659.

Liu, D., Lawrence, M.L., Ainsworth, A.J., Austin, F.W., 2005. Comparative assessment of acid, alkali and salt tolerance in *Listeria monocytogenes* virulent and avirulent strains. FEMS Microbiol. Lett. 243, 373–378.

McClure, P., Roberts, A., Otto Oguru, P., 1989. Comparison of the effects of sodium chloride, pH and temperature on the growth of *Listeria monocytogenes* on gradient plates and in liquid medium. Lett. Appl. Microbiol. 9, 95–99.

Moorhead, S.M., Dykes, G. a., 2003. The role of the *sigB* gene in the general stress response of *Listeria monocytogenes* varies between a strain of serotype 1/2a and a strain of serotype 4c. Curr. Microbiol. 46, 461–466.

Nelson, K.E., Fouts, D.E., Mongodin, E.F., Ravel, J., DeBoy, R.T., Kolonay, J.F., Rasko, D. A., Angiuoli, S. V., Gill, S.R., Paulsen, I.T., Peterson, J., White, O., Nelson, W.C., Nierman, W., Beanan, M.J., Brinkac, L.M., Daugherty, S.C., Dodson, R.J., Durkin, A. S., Madupu, R., Haft, D.H., Selengut, J., Van Aken, S., Khouri, H., Fedorova, N., Forberger, H., Tran, B., Kathariou, S., Wonderling, L.D., Uhlich, G. A., Bayles, D.O., Luchansky, J.B., Fraser, C.M., 2004. Whole genome comparisons of serotype 4b and 1/2a strains of the food-borne pathogen *Listeria monocytogenes* reveal new insights into the core genome components of this species. Nucleic Acids Res. 32, 2386–2395.

O’Driscoll, B., G Gahan, C., Hill, C., 1996. Adaptive acid tolerance response in *Listeria monocytogenes*: isolation of an acid-tolerant mutant which demonstrates increased virulence. Appl. Environ. Microbiol. 62, 1693–1698.

Oulahal, N., Brice, W., Martial, A., Degraeve, P., 2008. Quantitative analysis of survival of *Staphylococcus aureus* or *Listeria innocua* on two types of surfaces: polypropylene and stainless steel in contact with three different dairy products. *Food Control* 19, 178–185.

Roche, S.M., Gracieux, P., Milohanic, E., Albert, I., Virlogeux-Payant, I., Témoin, S., Grépinet, O., Kerouanton, A., Jacquet, C., Cossart, P., Velge, P., 2005. Investigation of specific substitutions in virulence genes characterizing phenotypic groups of low-virulence field strains of *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 6039–48.

Roche, S.M., Grépinet, O., Kerouanton, A., Ragon, M., Leclercq, A., Témoin, S., Schaeffer, B., Skorski, G., Mereghetti, L., Le Monnier, A., Velge, P., 2012. Polyphasic characterization and genetic relatedness of low-virulence and virulent *Listeria monocytogenes* isolates. *BMC Microbiol.* 12, 304.

Sleator, R.D., Gahan, C.G.M., Hill, C., 2003. A postgenomic appraisal of osmotolerance in *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 1–9.

Témoin, S., Roche, S.M., Grépinet, O., Fardini, Y., Velge, P., 2008. Multiple point mutations in virulence genes explain the low virulence of *Listeria monocytogenes* field strains. *Microbiology* 154, 939–948.

U. S. Food And Drug Administration, 2016a. CRF frozen foods expands voluntary recall to include all frozen vegetable and fruit products due to possible health risk. <http://www.fda.gov/Safety/Recalls/ucm499406.htm>.

U. S. Food And Drug Administration, 2016b. Market district voluntarily recalls bulk sunflower seeds. <http://www.fda.gov/Safety/Recalls/ucm499324.htm>.

Uchikawa, K., Sekikawa, I., Azuma, I., 1986. Structural studies on teichoic acids in cell walls of several serotypes of *Listeria monocytogenes*. *J. Biochem.* 99, 315–327.

Van Der Veen, S., Moezelaar, R., Abee, T., Wells-Bennik, M.H.J., 2008. The growth limits of a large number of *Listeria monocytogenes* strains at combinations of stresses show serotype- and niche-specific traits. *J. Appl. Microbiol.* 105, 1246–1258.

Van Houdt, R., Michiels, C.W., 2010. Biofilm formation and the food industry, a focus on the

bacterial outer surface. J. Appl. Microbiol. 109, 1117–31.

Vialette, M., Pinon, A., Chasseignaux, E., Lange, M., 2003. Growths kinetics comparison of clinical and seafood *Listeria monocytogenes* isolates in acid and osmotic environment. Int. J. Food Microbiol. 82, 121–131.

Walecka, E., Molenda, J., Karpíšková, R., Bania, J., 2011. Effect of osmotic stress and culture density on invasiveness of *Listeria monocytogene* strains. Int. J. Food Microbiol. 144, 440–445.

Wemekamp-kamphuis, H.H., Wouters, J.A., Sleator, D., Gahan, C.G.M., Hill, C., Abee, T., Sleator, R.D., 2002. Multiple deletions of the osmolyte transporters BetL , Gbu , and OpuC of *Listeria monocytogenes* affect virulence and growth at high osmolarity. Appl. Environ. Microbiol. 68, 4710–4716.

Zoz, F., Iaconelli, C., Lang, E., Iddir, H., Guyot, S., Grandvalet, C., Gervais, P., Beney, L., 2016. Control of relative air humidity as a potential means to improve hygiene on surfaces: a preliminary approach with *Listeria monocytogenes*. PLoS One 11, e0148418.

3.3) Principaux résultats et conclusion de l'article

Les principaux résultats présentés dans cet article montrent que la résistance de *L. monocytogenes* est variable selon les souches indiquant que son comportement face au séchage est difficile à prédire. En effet, la souche Lm109, la plus résistante, présente une perte de cultivabilité de 0,4 log contre 2,0 log pour la souche CCL207 ce qui montre une grande diversité de résistance parmi les souches de *L. monocytogenes*. Les souches persistantes, isolées d'environnements de transformation des aliments, ne sont pas plus résistantes au séchage car ces souches sont présentes dans les trois groupes de niveau de résistance.

Les souches de sérotype 1/2b appartiennent toutes au groupe de souches résistantes au séchage supposant une meilleure adaptation des souches appartenant à ce sérotype. Pour les souches dont la virulence est connue (18 sur 30 souches), les souches hypovirulentes et virulentes sont présentes dans les trois groupes indiquant que le niveau de virulence des souches ne peut pas prédire le niveau de résistance au séchage. Les différentes origines sont distribuées de façon

hétérogène dans les différents groupes démontrant que l'origine des souches n'est pas un caractère pouvant prédire leur résistance.

La comparaison *in silico* des séquences des 31 gènes, impliqués dans la résistance à la dessiccation dans l'étude de Hingston *et al.* (2015), a détecté un faible pourcentage d'identité sur un gène codant un canal potassique entre la souche EGD-e et F2365 et une mutation non-sens sur un gène codant un transporteur ABC (*ATP Binding Cassette*), dont le rôle est encore inconnu, chez la souche SLCC2755 (résistante au séchage). Hormis ces résultats les séquences des gènes sont hautement conservées entre les souches EGD-e (résistante au séchage) et LO28 (sensible au séchage), F2365 (résistance intermédiaire au séchage) et SLCC2755 (résistante au séchage). Les souches LO28 et EGD-e présentent une identité de 100% sur ces 31 gènes alors qu'elles sont classées respectivement sensible et résistante à la déshydratation.

La résistance de *L. monocytogenes* au séchage appliqué dans cette étude est très variable en fonction des souches et difficile à prédire. Excepté pour le sérotype 1/2b présent dans la catégorie des souches résistantes, aucun autre phénotype et marqueur génétique n'a pu être distingué pour prédire le comportement des souches au séchage. Cependant le nombre d'individu dans certaines analyses n'est peut être pas suffisant pour en tirer des conclusions. Ainsi, de nombreuses études restent encore à être réalisées pour comprendre ces différences aussi bien au niveau physiologique que moléculaire.

4. Discussion et sélection des souches

L'objectif de ces travaux a été d'évaluer le potentiel de destruction du stress hydrique d'un panel de 30 souches de *L. monocytogenes*. Pour cela, les souches ont été exposées à un stress hyperosmotique généré avec une solution glycérolée pendant 1 h et à un séchage à 75% d'HR à 25 °C pendant 3 h. Le niveau de survie des souches suite à ces deux stress a permis de les classer en trois catégories en fonction de leur résistance. Afin de pouvoir prédire le comportement des souches, nous avons cherché à établir un lien entre l'origine, la virulence, le sérotype ou le génotype et la résistance au séchage.

L'étude de la résistance au séchage de *L. monocytogenes* a révélé que les souches sont très différentes avec des comportements variables. Toutes les souches de sérotype 1/2b sont des

souches qui ont été classées comme résistantes au séchage sur les 30 souches. Une étude comparant la résistance d'une souche de *L. monocytogenes* de sérotype 1/2a et d'une autre souche de sérotype 4c a montré que le gène *sigB* codant pour le facteur de transcription σ^B est impliqué dans la réponse au stress osmotique, acide et à la chaleur (Moorhead et Dykes, 2003). L'implication de ce facteur contribue fortement à la résistance de la souche de sérotype 1/2a alors que son implication est plus basse pour la souche de sérotype 4c qui affiche une plus faible résistance à ces stress. Le facteur σ^B qui est partiellement impliqué dans la réponse précoce à la dessiccation de *L. monocytogenes* dans un milieu minimum (Huang *et al.*, 2015), comme le PBS que nous avons utilisé dans cette étude, pourrait contribuer de façon plus importante à la réponse à la dessiccation chez les souches de sérotype 1/2b. Une étude menée sur le séchage de *S. enterica* a révélé qu'une souche mutée sur une partie du lipopolysaccharide, permettant le sérotypage de *S. enterica*, affecte la survie de la bactérie à la dessiccation (Garmiri *et al.*, 2008). Ainsi, les souches de sérotype 1/2b de *L. monocytogenes* pourraient se différencier dans leur résistance au séchage grâce à une structure différente de la paroi cellulaire qui pourrait entraîner une réponse spécifique de ces souches.

Une distribution hétérogène des souches virulentes et hypovirulentes dans les trois catégories de niveau de résistance a été observée supposant que le niveau de virulence n'est pas un caractère phénotypique relié à la résistance des souches à la dessiccation. Le faible nombre de souches représentées dans chacun des groupes incite cependant à prendre ces conclusions avec précaution et il serait intéressant d'augmenter le nombre de souche dans des prochaines études.

Selon notre étude, l'origine n'est pas un marqueur phénotypique de résistance au séchage chez *L. monocytogenes*. Cependant, bien que les souches utilisées soient issues d'environnements différents, nos expériences ont été réalisées dans des conditions de stress standardisés avec le même milieu de préculture, de culture (TSB) ainsi que le même milieu de stress (PBS). Les souches pré-adaptées à leurs milieux d'origine (laiteries, usine de transformation de viande, poisson...) ont pu perdre leurs caractères phénotypiques d'adaptation à leurs milieux d'origine ne permettant pas de détecter de corrélation entre la résistance au stress et l'origine des souches.

Les séquences des 31 gènes impliqués dans la résistance au séchage sont hautement conservées entre les souches EGD-e (résistante au séchage) et LO28 (sensible au séchage), F2365 (résistance intermédiaire au séchage) et SLCC2755 (résistante au séchage) alors que dans l'étude

de Hingston *et al.* (2015), les 31 gènes inactivés de la souche de *L. monocytogenes* 568 affecte (pour 16 gènes) ou améliore (pour 15 gènes) la résistance de la souche au séchage. Notre étude n'explique pas la différence de résistance au séchage des quatre souches puisque ces gènes sont conservés entre les souches. Cependant, Hingston *et al.* (2015) ont utilisé une souche unique présentant un fond génétique donné, pour laquelle la mutation d'un seul gène modifiait la résistance au séchage. Dans notre étude, les séquences des 31 gènes ont été étudiées sur 4 souches dont le fond génétique est variable, l'absence ou la présence d'autres gènes mutés pourrait impacter sur la résistance. De plus, les travaux de Hingston *et al.* (2015) relatent un séchage de *L. monocytogenes* à 43% d'HR dans un milieu nutritif à des temps prolongés (de 1 à 7 jours) où la réponse au séchage induite par la souche peut ne pas impliquer les mêmes gènes de réponse au stress que lors d'une dessiccation modérée et plus courte dans un milieu non nutritif (PBS) (75% HR et 3 h dans notre étude).

Dans la réponse au stress, la part génétique est importante permettant aux bactéries de s'adapter et de survivre aux conditions environnementales hostiles par l'induction de nombreux facteurs de résistance. L'environnement peut aussi imposer une forte pression de sélection qui conditionne le phénotype de chaque souche. La résistance aux stress dépend aussi de la physiologie et des gènes exprimés lors du stress ce qui peut expliquer la différence de résistance constatée. L'environnement peut sélectionner des souches possédant des traits spécifiques de résistance. Une étude montre par exemple que des souches de même profil moléculaire sont persistantes dans une usine et non persistante dans une autre. Les bactéries s'adaptent, mettent en place des mécanismes spécifiques à leurs conditions environnementales d'origine et peuvent résister ou non à des environnements différents (J. M. Lundén *et al.*, 2003).

La diversité de résistance des souches est amoindrie lorsqu'elles sont exposées à un stress hyperosmotique avec du glycérol. Ces résultats sont probablement dus à une entrée du glycérol dans les cellules permettant de maintenir leur volume cellulaire ce qui peut atténuer le stress. Cependant, lorsqu'on compare la perte de cultivabilité des souches au séchage et au stress osmotique (Figure 21) peu de souches se détachent de la droite où $x=y$ montrant une similarité entre la résistance au stress osmotique et au séchage. Les souches les plus résistantes au séchage, comme AF160 ou BO43, et les souches les plus sensibles au séchage, comme LO28 ou AF104, le sont également au stress osmotique. Ainsi, pour ces souches une certaine cohérence est observée

dans leur résistance aux deux stress et ceci reflète l'idée que le stress osmotique lors du séchage est important pour la mortalité cellulaire.

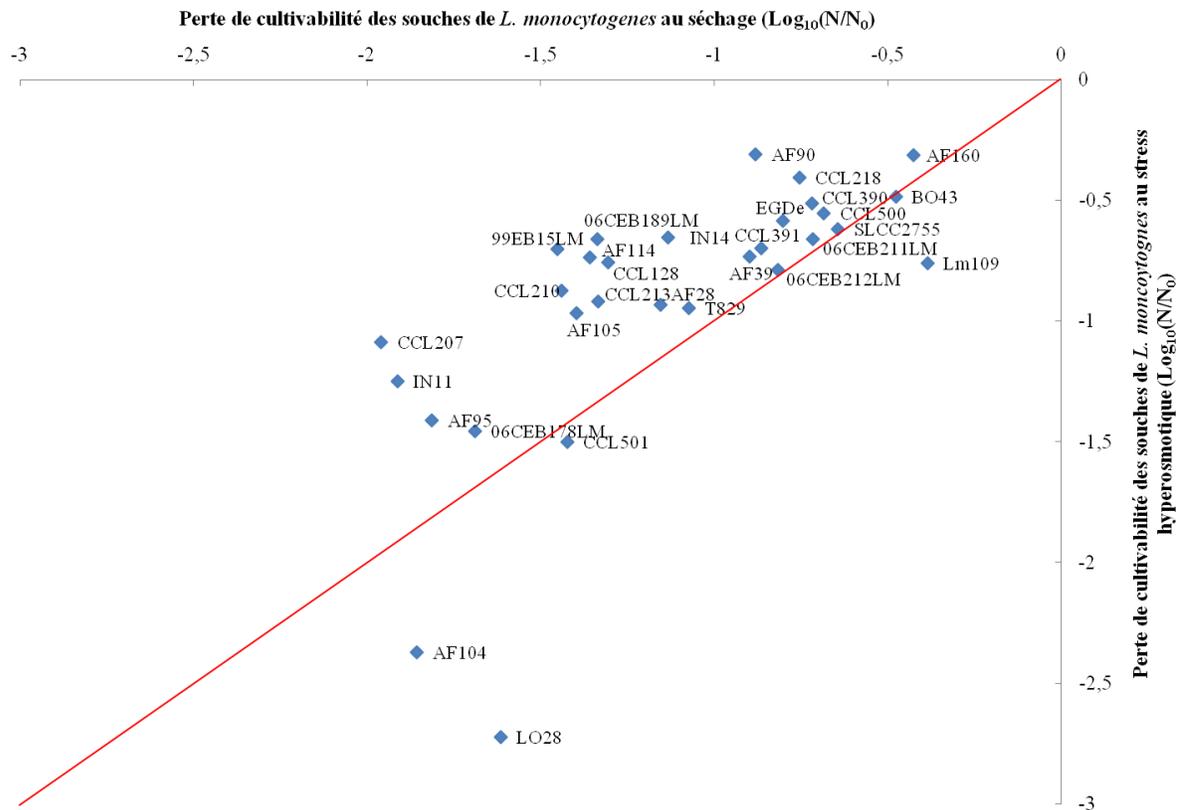


Figure 21 : Lien entre la perte de cultivabilité des souches de *L. monocytogenes* au séchage (75% d'HR, 3 h à 25 °C) et au stress hyperosmotique (a_w de 0,480, 1 h à 25 °C). Le trait rouge est une droite où $y=x$.

À ce jour, peu de données existent sur la résistance des bactéries au stress osmotique en présence de glycérol à forte concentration. Cependant, une étude a montré que lors d'une exposition à une solution hyperosmotique de glycérol pendant 30 min, *E. coli*, *Lactobacillus bulgaricus* et la levure *Candida utilis* ont un taux de survie de 0% à 80 MPa. La levure *S. cerevisiae*, résistante au stress osmotique, a un taux de survie de 20% à 102,1 MPa et *Lactobacillus plantarum* un taux de survie de 70% à 80 MPa (Mille *et al.*, 2005). Dans notre étude, *L. monocytogenes* a un taux de survie de 53% pour la souche la plus résistante AF90 et de 0,4% pour la souche la plus sensible LO28 lors un stress hyperosmotique d'1 h à 101 MPa. Ceci permet de conclure que certaines souches de *L. monocytogenes* sont particulièrement résistantes au stress osmotique.

Les deux tests de survie ont permis à l'ensemble des partenaires du projet de choisir 4 souches avec des sérotypes et des résistances différentes au stress hydrique et également isolées d'environnements différents pour la poursuite des travaux. La virulence n'a pas été un critère retenu pour la sélection car de nombreuses souches présentaient une virulence non déterminée.

Les souches retenues sont :

- la souche LO28 de sérotype 1/2c dont le génome est séquencé, qui provient d'un isolat humain et qui présente un profil sensible au stress osmotique et au séchage.

- la souche CCL128 de sérotype 4b possédant une résistance intermédiaire au stress osmotique et au séchage et qui est persistante dans la filière fromage.

- la souche CCL500 de sérotype 1/2b possédant un profil de forte résistance au stress osmotique, au séchage et provenant d'un isolat de lait.

- la souche EGD-e(BUG1600) de sérotype 1/2a résistante au séchage provenant d'un cas clinique animal et dont le génome a été séquencé et annoté, ce qui présente un intérêt pour les études de transcriptomique et protéomique prévues dans le projet.

Chapitre 2 : Influence des fluctuations de l'humidité relative de l'air sur la survie de *Listeria monocytogenes*

1. Introduction

L. monocytogenes a la capacité de persister dans les environnements de transformations des aliments (Carpentier et Cerf, 2011) et de résister à de nombreux stress (Soni *et al.*, 2011). Les procédures de nettoyage et de désinfection appliquées en industrie agroalimentaire utilisent de nombreux détergents et désinfectants chimiques nocifs pour l'environnement (Van Houdt et Michiels, 2010). Malgré l'utilisation de ces produits, *L. monocytogenes* persiste dans les ateliers et est la cause de nombreux rappels de produits contaminés engendrant d'importants problèmes économiques et sanitaires. Bien maîtrisé et optimisé, le séchage pourrait être un procédé à utiliser après les procédures de nettoyage et de désinfection afin d'améliorer la décontamination des surfaces.

L'objectif de ce chapitre a été d'évaluer le potentiel de destruction des fluctuations hydriques sur *L. monocytogenes*. Pour cela, la survie des 4 souches de *L. monocytogenes* (EGD-e, CCL500, CCL128 et LO28) a été mesurée après un processus de séchage conduit en modulant différents paramètres afin de déterminer les conditions de déshydratation les plus létales. Les paramètres testés sont (i) le milieu de séchage et de réhydratation, (ii) la vitesse de déshydratation, (iii) la vitesse de réhydratation, (iv) l'humidité relative, (v) les cycles successifs de déshydratation et réhydratation.

2. Impact du milieu de séchage et de réhydratation sur la survie de *L. monocytogenes*

2.1) Introduction

Dans un premier temps, il a été nécessaire d'évaluer l'importance du milieu dans lequel les bactéries sont séchées puisque certaines études montrent que le milieu de séchage peut avoir un impact sur la survie des bactéries. Par exemple, une étude montre que le séchage en milieu nutritif TSB avec 1% de glucose entraîne une meilleure survie par rapport à un séchage dans un

milieu pauvre en nutriment comme une solution de PPS (*Physiological Peptone Saline*) composée de 0,85% de NaCl et de 1% de peptone (Vogel *et al.*, 2010). Le séchage en industrie agroalimentaire est une étape réalisée après la procédure de nettoyage et de désinfection et théoriquement les souillures alimentaires et les nutriments disponibles pour les bactéries ne sont plus présents dans l'atelier de production. Cependant, le sel, largement utilisé notamment lors des étapes de salage dans les industries de poissons, peut encore être présent.

De ce fait, la souche la plus résistante au séchage de notre étude, EGD-e a été resuspendue dans différentes solutions dépourvues en nutriments et la survie au séchage a été évaluée. Les solutions testées sont des solutions salines à différentes concentrations de NaCl, de l'eau distillée et de l'eau du réseau de ville (celle-ci est utilisée dans l'industrie agroalimentaire pour rincer les surfaces). La suspension de *L. monocytogenes* EGD-e a été séchée à 75% d'HR pendant 3 h à 25 °C et a ensuite été réhydratée avec différentes solutions pour observer si un substrat en particulier induit un effet protecteur lors de la réhydratation. Les résultats ont été comparés avec ceux obtenus lors du séchage de la souche EGD-e dans le PBS (solution utilisée pour la discrimination des 30 souches).

2.2) Matériel et méthodes

2.2.1) Préparation des enceintes de séchage à humidité relative contrôlée

Les enceintes de séchage sont composées d'une boîte hermétique (20 cm × 13 cm × 6 cm) contenant une solution saturée en NaCl permettant d'atteindre et de maintenir une HR de 75%.

Un ventilateur d'une puissance maximum de 4,1 W avec un diamètre de 80 mm et une hauteur de 25 mm équipé de 7 pâles (Sunon, Radiospares, France) a été placé dans l'enceinte de séchage pour contrôler la vitesse de séchage. La température et l'humidité relative dans l'enceinte ont été enregistrées à l'aide d'un capteur embarqué (Lascar, Radiospares, France).

Le principe de l'enceinte de séchage a été de déposer une solution saturée en sel à une valeur d' a_w contrôlée au fond de la boîte de séchage. L' a_w de la solution saline s'équilibre avec l'humidité relative de l'enceinte et le contenu en eau de l'échantillon s'équilibre avec celui de la phase aérienne. Le ventilateur permet de maîtriser la convection de l'air (et donc la vitesse de

transfert de l'eau) (i) entre l'échantillon et la phase aérienne et (ii) entre la phase aérienne et la phase liquide saturée en sel dans l'enceinte (Figure 22).

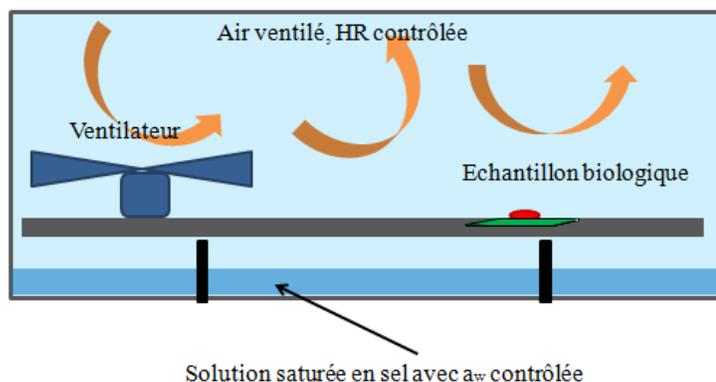


Figure 22 : Enceinte de séchage utilisée pour l'étude.

Des coupons de polypropylène (15 mm × 10 mm × 2 mm) (Scientix, Fougères, France) ont été utilisés pour déposer les suspensions bactériennes dans l'enceinte de séchage. Cette matière a des propriétés hydrophobes permettant de limiter l'adhésion des bactéries sur la surface, facilitant ainsi l'étape de réhydratation et de récupération des bactéries. Avant chaque utilisation, les coupons ont été nettoyés avec de l'éthanol à 70%, rincés avec de l'eau distillée et stérilisés pendant 16 h dans une enceinte à 116 °C.

2.2.2) Conditions de déshydratation et réhydratation

La souche EGD-e a été cultivée comme précédemment décrit dans la partie résultats du chapitre 1 (Matériel et méthodes - partie 2.2.2 - Conditions de culture).

Avant le séchage, les cellules (25 mL de culture) ont été lavées une fois par centrifugation (10 min à $3645 \times g$ à 25 °C) avec les différentes solutions testées, dont une solution de 3% de NaCl, 0,9% de NaCl, 0,1% de NaCl, 0,01% NaCl, d'eau distillée, d'eau du réseau de ville ou de tampon phosphate salin (PBS, 0,01 M de tampon phosphate, 0,0027 M de KCl, 0,137 M NaCl, Sigma Aldrich, St Quentin Fallavier, France), et remises en suspension avec les différentes solutions testées à une concentration bactérienne d'environ 10^9 UFC/mL. Pour les expériences de séchage, 10 μ L de cette suspension bactérienne ont été déposés sur le coupon de polypropylène.

Ensuite les échantillons ont été placés dans l'enceinte de séchage précédemment décrite à 75% d'HR pendant 3 h dans une étuve à 25 °C à une tension d'entrée du ventilateur de 5V.

Les bactéries ont été réhydratées instantanément avec 1 mL des différentes solutions testées et détachées du coupon de polypropylène par 30 cycles d'aspiration et de refoulement.

2.2.3) Mesure de la cultivabilité cellulaire

La viabilité des bactéries a été estimée par la méthode des UFC après l'étape de réhydratation comme décrit dans la partie résultats chapitre 1 (Matériel et méthodes - partie 2.2.6 - Mesure de la cultivabilité bactérienne).

2.3) Résultats

Les résultats présentés Figure 23 ne montrent pas de différence de survie après séchage dans une solution à 3% de NaCl, à 0,9% de NaCl, d'eau distillée ou de PBS quelle que soit la solution de réhydratation. Par contre, une diminution significative de la survie est observée lorsque la souche est séchée dans une solution à faible concentration en NaCl (0,1% et 0,01%) et réhydratée avec la même solution ou avec de l'eau distillée. Cependant, il n'y a aucune diminution significative de la survie bactérienne lorsque EGD-e est séchée dans ces solutions à faibles concentrations en sel (0,1% et 0,01%) et réhydratée avec du PBS. Le séchage de la souche EGD-e dans l'eau du réseau de ville et réhydratée avec la même solution ou avec de l'eau distillée engendre les taux de survie les plus faibles parmi toutes les conditions testées. Une augmentation de la survie est observée lorsque les bactéries resuspendues dans de l'eau du réseau de ville sont séchées puis réhydratées avec du PBS.

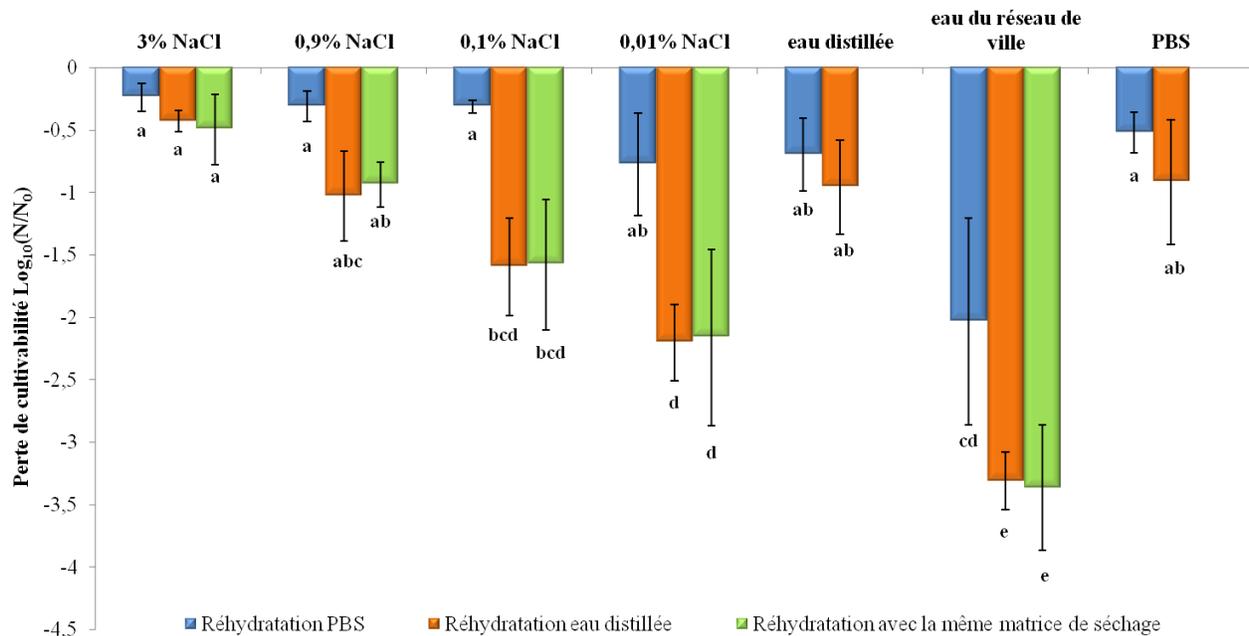


Figure 23 : Perte de cultivabilité d'une suspension de *L. monocytogenes* EGD-e séchée dans différentes solutions (3% NaCl, 0,9% NaCl, 0,1% NaCl, 0,01% NaCl, PBS, eau distillé et eau du réseau de ville) à 75% d'HR pendant 3 h à 25 °C et réhydratée soit avec du PBS, de l'eau distillée ou avec la même solution que la solution de séchage. Les barres d'erreurs correspondent aux écarts-types calculés à partir de 4 répétitions indépendantes. Les pertes de cultivabilité possédant des lettres différentes sous chaque barres sont significativement différentes (Tukey HSD; $p < 0,05$).

Cette expérience révèle que les solutions contenant de fortes concentrations en NaCl ont un effet protecteur lors de la réhydratation et de la déshydratation. Certaines études ont déjà rapporté que le NaCl induisait une protection lors du séchage (Dreux *et al.*, 2008; Vogel *et al.*, 2010; Hingston *et al.*, 2013). Plusieurs hypothèses pourraient expliquer cet effet protecteur. En présence de NaCl, les cellules sèchent moins rapidement, baignent dans une solution aqueuse plus longtemps et sont moins en contact avec l'oxygène de l'air que les cellules séchées avec peu de NaCl. Les fortes concentrations en NaCl peuvent également induire des mécanismes de réponse au stress osmotique comme l'accumulation ou la synthèse de protéines de stress. Il a été montré que l'antiporteur MrpABCDEF G Na⁺/H⁺ joue un rôle important dans l'osmoadaptation de *L. monocytogenes* et que l'ion Na⁺ est impliqué dans les mécanismes de résistance au stress en permettant d'équilibrer la pression osmotique entre le milieu intracellulaire et extracellulaire (Bergholz *et al.*, 2012).

La réhydratation avec une solution de PBS entraîne une plus forte survie après un séchage à de faibles concentrations en sel et en eau du réseau de ville. Ceci pourrait s'expliquer par la présence de sel dans le PBS à de plus forte concentration entraînant une réhydratation plus lente protégeant les cellules et en minimisant le choc hypoosmotique (Dupont *et al.*, 2010).

Le séchage dans l'eau du réseau de ville est le traitement le plus létal pour les cellules. Cependant, l'eau du réseau de ville contient de nombreux composés notamment de l'hypochlorite de sodium, des nitrates, des traces de pesticides pouvant induire des effets néfastes sur les cellules indépendamment du séchage. Cette expérience a été réalisée pour tenter de se rapprocher au plus près du nettoyage réalisé sur les sites de production après le protocole de nettoyage et de désinfection. Néanmoins, l'eau du réseau de ville n'est pas standardisée et sa composition dépend du réseau d'eau et de la région où se trouve l'industrie.

Pour conclure, ces résultats montrent que la solution de séchage a un impact sur la survie des bactéries et que de fortes concentrations en NaCl peuvent avoir un effet protecteur sur les cellules. Il est également important de noter que la solution de réhydratation est tout aussi importante pour la survie des cellules car un apport d'ions induit également un effet protecteur sur les cellules. Ces résultats montrent que dans certaines conditions le substrat de séchage est important mais que le substrat de réhydratation peut l'être tout autant.

Pour la suite de l'étude, nous avons choisi d'utiliser le PBS comme solution de séchage et de réhydratation pour toutes nos expériences. En effet, ce tampon phosphate salin assure le maintien du pH limitant les conditions de stress avant séchage. De plus l'expérience présentée dans cette partie ne montre pas de différence de survie après séchage lorsque les cellules sont en suspension dans l'eau distillée, dans les solutions salines présentant de fortes concentrations en NaCl et dans le PBS.

3. Influence des fluctuations hydriques sur la survie de *L. monocytogenes*

3.1) Introduction

Cette partie a fait l'objet d'une publication intitulée "*Control of air relative humidity as a potential means to improve hygiene on surfaces: a preliminary approach with Listeria monocytogenes*" parue dans le journal Plos One en 2016 (Volume 11, page e0148418).

Les fluctuations de l'humidité relative connues pour avoir des effets délétères sur les cellules ont été peu étudiées pour éliminer les microorganismes pathogènes et indésirables en industrie agroalimentaire. Les procédures de nettoyage et de désinfection n'étant pas totalement efficaces pour éliminer la bactérie pathogène *L. monocytogenes*, l'effet léthal des fluctuations hydriques pourrait être un moyen efficace pour améliorer l'hygiène des surfaces et empêcher l'implantation de cette bactérie dans les ateliers.

Afin d'évaluer le potentiel destructeur et d'optimiser l'effet léthal des fluctuations de l'humidité relative, la survie des quatre souches de *L. monocytogenes* (EGD-e, CCL500, CCL128 et LO28) a été mesurée après des expositions à différentes conditions d'humidité relative sur des coupons de polypropylène à 25 °C. Les différentes conditions testées sont : (i) l'humidité relative (99%, 75%, 68%, 43% et 11% HR), (ii) les vitesses de séchage (iii) l'application de deux cycles successifs de déshydratation et de réhydratation, (iv) deux types de réhydratation : une instantanée et une progressive

3.2) Article "Control of air relative humidity as a potential means to improve hygiene on surfaces: a preliminary approach with *Listeria monocytogenes*"



RESEARCH ARTICLE

Control of Relative Air Humidity as a Potential Means to Improve Hygiene on Surfaces: A Preliminary Approach with *Listeria monocytogenes*

Fiona Zoz, Cyril Iaconelli, Emilie Lang, Hayet Iddir, Stéphane Guyot, Cosette Grandvalet, Patrick Gervais, Laurent Beney*

UMR PAM Université Bourgogne-Franche-Comté / AgroSup Dijon, Dijon, France

* lbene@u-bourgogne.fr



OPEN ACCESS

Citation: Zoz F, Iaconelli C, Lang E, Iddir H, Guyot S, Grandvalet C, et al. (2016) Control of Relative Air Humidity as a Potential Means to Improve Hygiene on Surfaces: A Preliminary Approach with *Listeria monocytogenes*. PLoS ONE 11(2): e0148418. doi:10.1371/journal.pone.0148418

Editor: Adelaide Almeida, University of Aveiro, PORTUGAL

Received: September 11, 2015

Accepted: January 18, 2016

Published: February 3, 2016

Copyright: © 2016 Zoz et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper.

Funding: This work received support from the Agence Nationale de la Recherche (France): Fiona Zoz grant (PhD student), materials, chemicals, equipment.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Abstract

Relative air humidity fluctuations could potentially affect the development and persistence of pathogenic microorganisms in their environments. This study aimed to characterize the impact of relative air humidity (RH) variations on the survival of *Listeria monocytogenes*, a bacterium persisting on food processing plant surfaces. To assess conditions leading to the lowest survival rate, four strains of *L. monocytogenes* (EGDe, CCL500, CCL128, and LO28) were exposed to different RH conditions (75%, 68%, 43% and 11%) with different drying kinetics and then rehydrated either progressively or instantaneously. The main factors that affected the survival of *L. monocytogenes* were RH level and rehydration kinetics. Lowest survival rates between 1% and 0.001% were obtained after 3 hours of treatment under optimal conditions (68% RH and instantaneous rehydration). The survival rate was decreased under 0.001% after prolonged exposure (16h) of cells under optimal conditions. Application of two successive dehydration and rehydration cycles led to an additional decrease in survival rate. This preliminary study, performed in model conditions with *L. monocytogenes*, showed that controlled ambient RH fluctuations could offer new possibilities to control foodborne pathogens in food processing environments and improve food safety.

Introduction

Listeria monocytogenes, the causative agent of listeriosis, is an ubiquitous Gram-positive bacterium distributed in many environments [1–4] and is also frequently isolated in food processing environments or in raw food products [5–9]. *Listeria monocytogenes* primarily enters the food-production chain by cross-contamination from surfaces and equipment, making this pathogen a major threat to the food industry and consumers [10–12]. Human listeriosis occurs only occasionally, but potentially causes severe infection in vulnerable people, such as pregnant women, unborn infants, neonates, the elderly, and immunocompromised people, and might cause febrile gastroenteritis in healthy people [13, 14]. Furthermore, product contamination

leads to a significant economic impact on food industry due to recall and destruction of incriminated products. Like most other microorganisms, *L. monocytogenes* is adapted to many otherwise stressful environmental conditions as reviewed by Gandhi and Chikindas (2007) [15]. It can grow in high salt concentrations of up to 10% NaCl [16], tolerates low-pH environments [16], and grows in a wide range of temperatures (2°C to 45°C) [15] [17]. Moreover, *L. monocytogenes* can be persistent in food industry environments where it can survive for several months or years [18–20]. This ability to persist and multiply makes contamination by *L. monocytogenes* difficult to control and eradicate. Therefore, food-processing facilities must be designed carefully, with an emphasis on effective cleaning and disinfection operations in the production line.

Various methods are used during cleaning and disinfection processes, both to sanitize food processing environments through the use of alkaline and acid detergents, enzymes and mechanical force on the surface, and to control the organism residing in the food and the processing devices through the use of a wide range of chemical disinfectants as reviewed by Van Houdt and Michiels (2010) [21]. However, contaminated food product recalls involving *L. monocytogenes* remain numerous as reported by the U.S. Food and Drug Administration [22–25]. Thus, it is important to find effective ways to prevent the establishment of *L. monocytogenes* in production plants and to avoid biofilm formation. Therefore, any factor that affects the early steps of contamination by this pathogen could be exploited, either in itself or in combination with other destructive tools.

Dehydration, drying, or desiccation is often used as a method of preservation of microorganisms as reviewed by Morgan et al (2006) [26]. However, a high survival rate in bacteria after drying is rarely observed, especially without optimization of the drying process (use of protectants, optimal kinetics and temperature). Indeed, fluctuations of relative air humidity (RH) are known to have lethal effects on cells [27–30], but are not well considered as a means to control microorganisms populations. *L. monocytogenes* seems to be relatively resistant to desiccation, exhibiting, for example, the capacity to survive 91 days of desiccation on stainless steel at various RHs (2% and 43%) [31]. Another study showed that *L. monocytogenes* survived after 30 days of desiccation on stainless steel at 25°C [32]. However, the main parameters known to affect the resistance of microorganisms to dehydration and rehydration have not been sufficiently studied to make conclusions about their efficiency. In particular, the RH level and the kinetics of RH fluctuations could be optimized to improve lethal effect on cells [29, 33]. Indeed, fast changes in RH have, generally, more detrimental effects than progressive ones. Moreover, conditions of low RH, contrary to conditions of high RH, are known to favor the long-term preservation of cells, macromolecular systems, and membranes [34–36].

In this study, viability of four *L. monocytogenes* strains (EGDe, CCL500, CCL128, and LO28) was determined after exposure to different conditions of RH fluctuations.

Materials and Methods

Bacterial strains and culture conditions

Listeria monocytogenes strains were supplied by the Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses; Maisons-Alfort, France). *Listeria monocytogenes* EGDe strain (BUG1600) (serotype 1/2a) isolated from a case of animal listeriosis [37, 38], CCL500 strain (serotype 1/2b) isolated from milk, CCL128 strain (serotype 4b) isolated from and persistent in the cheese industry, and LO28 strain (serotype 1/2c) isolated from a case of human listeriosis [39], were used in this study. Strains were stored on tryptic soy broth supplemented with 20% glycerol (TSB; Sigma-Aldrich, St. Quentin Fallavier, France) at –80°C. For revitalization, bacteria were isolated with a sterile swab on tryptic soy agar (TSA, Sigma-Aldrich) plate, incubated at 25°C for 48 h and stored at 4°C for a maximal period of one

month. Subculture was performed by inoculation of five colonies in 10 mL of TSB and incubated overnight at 25°C. Final culture was performed by diluting the subculture to adjust the final OD₆₀₀ to 0.005 in 50 mL of fresh TSB before incubation at 25°C for 24 h to reach the stationary growth phase.

Preparation of environmental drying chambers and polypropylene coupon

The controlled environment drying chambers were hermetic plastic boxes (20 cm × 13 cm × 6 cm) containing a saturated salt solution to control RH [29]. A saturated solution of NaCl, KI, K₂CO₃, and LiCl (Sigma-Aldrich) was added at the bottom of the drying chambers to obtain 75%, 68%, 43%, and 11% RH in the hermetic box, respectively. A ventilator of 4.1 W (max.) with a diameter of 80 mm and a height of 25 mm comprising seven blades (Sunon, Radiospares, France) was placed in the drying chamber to control the rate of drying.

Coupons were formed from 15 mm × 10 mm × 2 mm rectangles of polypropylene (Scientix, Fougères, France). They were cleaned in 70% ethanol, rinsed with distilled water, and sterilized overnight in an oven at 116°C.

Dehydration and rehydration processes

Dehydration conditions. Stationary growth phase cultures of EGDe, CCL500, CCL128, and LO28 strains (25 mL) were centrifuged for 10 min at 3645 ×g and washed once with phosphate-buffered saline (PBS, Sigma-Aldrich). Pellets were suspended in 20 mL of PBS. For desiccation experiments, 10 µL of cell suspension with a final concentration of 1 × 10⁹ CFU/mL was placed onto the hydrophobic polypropylene coupons, a surface that can be found in the food industry in tanks, pipeworks, accessories, and on cutting surfaces [40]. Samples were placed in the drying chambers on a rack to keep them above the salt solutions. The various conditions (11%, 43%, 68%, and 75% RH for 30, 60, 90, 120, and 180 min) were tested while the chambers were maintained at 25°C and ventilated at the same rate to increase desiccation. Variations in the operating rate of the ventilator inside the drying chamber allowed control of the hydric equilibrium between the sample and air with the various rates. The ventilator rate was changed by controlling the input voltage to the ventilator (3, 5, 7.5, and 12 V).

Rehydration conditions. For instantaneous rehydration, 1 mL of PBS was deposited on the dried cells which subsequently were detached from the polypropylene coupon by 30 successive aspirating and dispensing cycles using a micropipette. For progressive rehydration, dried cells were introduced into a closed chamber with RH adjusted at 99% for 60 min at 25°C. 1 mL of PBS was then deposited on the wet bacteria and recovered by 30 successive aspirating and dispensing cycles using a micropipette.

In preliminary experiments we checked that no bacteria remained attached to polypropylene coupons after drying and rehydration. Briefly, after recovery of bacteria, coupons were stained for 5 min. with 100 µL of methylene blue (Sigma-Aldrich) solution (0.25 g/L) and rinsed with 1 mL of distilled water. Finally, the absence of bacteria was checked by observation with an optical microscope.

Dehydration and rehydration cycle

Suspensions of CCL500, EGDe, CCL128, and LO28 strains were prepared as described above. Samples were placed into the drying chambers containing saturated solutions of K₂CO₃ or KI reaching 43% and 68% RH, respectively, and the chambers were maintained at 25°C and ventilated for 180 min. At the end of the first cycle, bacterial cells were rehydrated instantaneously with 10 µL of distilled water and samples were reintroduced into the chamber at 25°C for 180

min. At the end of the second cycle, bacterial cells were rehydrated with 1 mL of PBS and were detached from the polypropylene coupons by aspirating and dispensing the samples 30 times using a micropipette.

Measurement of cell cultivability

The viability of bacteria was estimated by spread plating method. After rehydration, cell suspensions were serially diluted and appropriate 10-fold dilutions were plated on TSA. Colonies were counted after incubation for 48 h at 25°C and recorded as CFU/mL. Viability was expressed as $\log_{10}(N/N_0)$, where N represents the final cell concentration and N_0 represents the initial cell concentration. The detection threshold of the method representing the maximum loss of detectable viable cell is -4.5.

Drying kinetics

Water loss during desiccation. Four drops of 10 μ L of PBS (same volume as the bacterial suspensions) on four polypropylene coupons were weighed with a precision balance (precision ± 0.0003 g, Sartorius, France) after desiccation in a drying chamber at 99%, 75%, 68%, 43%, and 11% RH at 25°C. The weight of the coupons containing the droplets was measured after 1, 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120, and 180 min for each condition to obtain curves relating evaporated water mass as a function of drying time.

Calculation of drying constants. To characterize the kinetics of drying generated by the different experimental conditions used (RH level and ventilator speed), experimental points were fitted to an exponential curve (Eq 1), i.e. decrease in water mass as a function of time. Using the reduction of the sum of squares scores between the experimental curve and the model (*fminsearch* function in Matlab R2012a), two variables were estimated: τ and r . τ is the time constant of the system and represents the time needed to lose 63% of the initial weight. $r^*0.01$ represents the final dried weight present on the coupon.

$$M(t) = 0.01 \left(\exp\left(\frac{-t}{\tau}\right) + r \right) \quad (1)$$

Finally, maximal speed (V_{\max}) for each desiccation at the various relative humidities was calculated as shown in Eq 2.

$$V_{\max} = \frac{-0.01}{\tau} \quad (2)$$

Statistical analysis

All data were collected in four independent experiments. To compare the various results obtained in this study, the variance homogeneity (*F*-test) was tested. Our results revealed a homogeneous variance ($p > 0.05$). An ANOVA and Tukey's honestly significant difference test (if $p < 0.05$) were performed to determinate whether significant differences existed between different strains. Analyses were performed using R software, version 3.1.2.

Results

RH level and drying kinetics affect the survival of *L. monocytogenes*

Viability kinetics of CCL500, LO28, EGDe, and CCL128 *L. monocytogenes* strains at 75%, 68%, 43%, and 11% RH in ventilated hermetic boxes for 180 min at 25°C were studied, and in

parallel, evaporation of water was measured by weight loss (Fig 1). At 99% RH (control), no evaporation was detected and the viability of the four strains remained stable (Fig 1A). Because ventilator speed was the same for each of the different RH conditions, drying occurred at different rates for the various RHs.

During dehydration at 75% or 68% RH, sample evaporation occurred more slowly than at 43% and 11% RH. Indeed, after 60 min of dehydration, the sample weight was 2 mg at 75% RH, 2.6 mg at 68% RH, 0.85 mg at 43% RH, and 0.65 mg at 11% RH. At 75% and 68% RH, no further weight loss was detected after 90 min of drying. After dehydration at 75% RH, liquid remained on the coupon surface, whereas at 68%, 43%, and 11% RH, a dehydrated cell layer was observed.

Viability of the four strains at 75% RH was stable during the first 60 min of drying and decreased between 60 and 180 min of drying, except for CCL500 viability, which significantly decreased at 180 min of drying (Fig 1B). Between 90 and 180 min of drying, stabilization of viability for CCL500 and CCL128 strains, and a slight, but not significant, increase in the viability of EGDe and LO28 strains were measured. No significant differences were found for each strain, between survival after 180 and 960 min.

Dehydration at 68% RH showed evaporation characteristics almost identical to those at 75% RH. Indeed, at 30 min of drying, sample weight at 68% RH was not significantly different than at 75% RH (Fig 1B and 1C). There was no more weight loss after 90 min of drying. Viability of the four strains of *L. monocytogenes* at 68% RH decreased slightly during the first 60 min for all strains. After 60 min, viability continued to decline strongly with a significant difference ($p < 0.05$) to 180 min (Fig 1C). Indeed, at 180 min, there was a significant difference ($p < 0.05$) between the decrease in viability of LO28, which is more sensitive, and the other strains. Cell survival decreased for the four strains between 180 and 960 min after drying at 68% RH, and no bacterial survival was detected at 960 min in any strain, involving a decrease in cell viability of more than 4.5 log₁₀ units.

Dehydration at 43% RH was faster than that at 75% and 68% RH. There was no further weight decrease after 90 min of drying (Fig 1D). Viability of the four strains at 43% RH decreased rapidly during the first 90 min of drying. Decrease in viability occurred mainly during water evaporation. Significant differences ($p < 0.05$) between the viability of the four strains dried at 43% RH for 180 min was observed. No significant differences were found for any strains between survival after 180 and 960 min.

Dehydration at 11% RH was faster than that at 43% RH (Fig 1D and 1E). Kinetics of viability at 11% RH were similar to those during drying at 43% RH (Fig 1C), with a decrease in viability during sample evaporation (in this case, 30 min) and a period of stabilization when sample evaporation peaked. No significant differences were found for any strains between survival after 180 and 960 min (Fig 1D).

These experiments revealed that, in all cases, cell death occurred during the transient dehydration step, and thus decrease in viability occurred concomitantly with water evaporation. Cell viability only continued to decline after the transient dehydration step at 68% RH, where hydric equilibrium was reached.

Influence of drying kinetics on the survival of *L. monocytogenes*

As cell death could be influenced by RH level and drying kinetics, we performed additional experiments to study the respective contributions of these linked parameters. To study the effect of RH, two levels of RH (43% and 68%) most lethal to *L. monocytogenes* were selected (Fig 1). We performed drying at these RH levels with different drying rates. The various rates were obtained by varying the ventilator rate in the drying chamber. A fast ventilator rate at

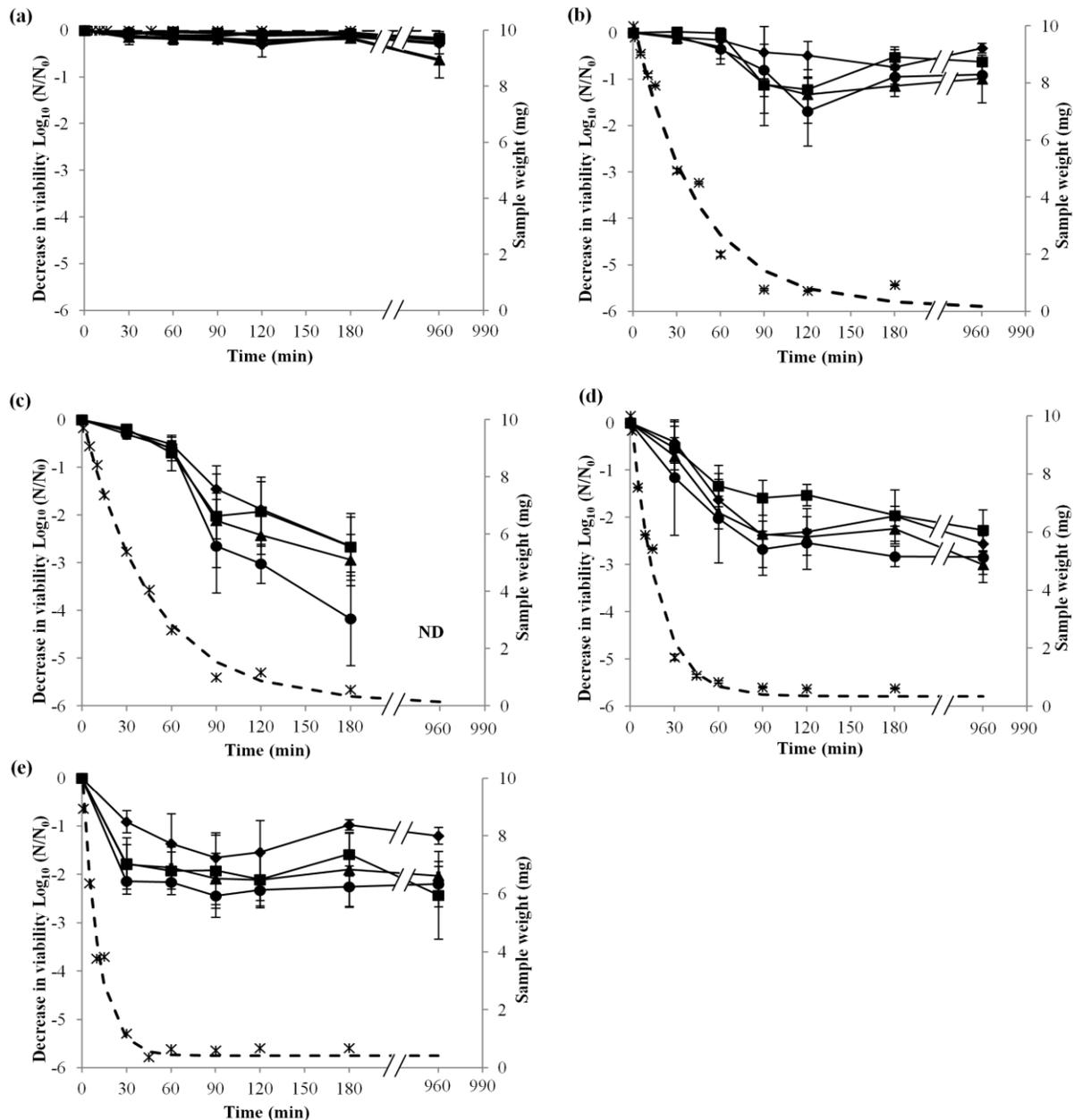


Fig 1. *L. monocytogenes* survival at different RH. Decrease in viability of *L. monocytogenes* strains, EGDe (square), CCL500 (diamond), CCL128 (triangle), and LO28 (circle), during desiccation on polypropylene coupons incubated at 25°C and 99% RH (a), 75% RH (b), 68% RH (c), 43% RH (d), and 11% RH (e) for 30, 60, 90, 120, 180, and 960 min with an instantaneous rehydration in 1 mL of PBS. Error bars correspond to the SD calculated from four independently repeated experiments. Sample weight was estimated by weighing samples dried at 99% RH, 75% RH, 43% RH, and 11% RH for 1, 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180, and 960 min. (*) corresponds to experimental points and (- -) corresponds to the curve of the sample weight loss model. ND (not detectable) represents the decrease in viability of any of the strains under the limit of detection by this method.

doi:10.1371/journal.pone.0148418.g001

68% RH corresponding to a V_{\max} of $0.38 \cdot 10^{-3}$ mg/min and a slow ventilator rate at 43% RH corresponding to a V_{\max} of $0.32 \cdot 10^{-3}$ mg/min had a similar V_{\max} (Table 1). An increase in ventilator rate allowed modification of the kinetics of drying, allowing equilibrium to be reached more quickly as shown by 3τ values in Table 1. Whatever the drying time considered, results showed that for each strain, no significant influence of drying speed on viability at 180 and 960 min was detected either for 68% RH or 43% RH, except for the EGDe strain to 43% RH at 960 min and LO28 to 68% RH at 180 min. Overall, these results suggested that, in the tested range of drying kinetics, neither duration nor evaporation rate of the transient dehydration step were crucial parameters increasing cell death. The most influential parameter was RH level, and 68% RH was the more detrimental level whatever strain, drying speed, and time considered.

Impact of rehydration kinetics on *L. monocytogenes* survival

We assumed that rehydration conditions could play a role in cell death, regardless of drying ones [29, 33]. To study the impact of this parameter, dried samples were rehydrated instantaneously by direct immersion into PBS or progressively by equilibration in an atmosphere with high RH (99%). These experiments were conducted at a RH of 43% or 68% (Fig 1). Results are reported in Fig 2, and taking into account rehydration kinetics and strains, ANOVA showed a significant difference ($p < 0.05$) in decrease in viability for each strain and according to the rehydration kinetics. Cell survival was markedly influenced by the rehydration kinetics (except for EGDe); instantaneous rehydration was more detrimental to cells than progressive rehydration. However, drying at 68% RH for 180 min followed by progressive and instantaneous rehydration did not significantly influence rehydration kinetics in any strain.

Effect of an additional dehydration–rehydration cycle

Because the main objective of this study was to check the efficiency of atmospheric RH fluctuations for *L. monocytogenes* decontamination, we tried to improve the lethal effect by applying two consecutive dehydration–rehydration cycles. For this purpose, cells were equilibrated at 43% and 68% RH for 180 min per cycle with instantaneous rehydration.

For all strains, after two consecutive dehydration–rehydration cycles, a greater decrease in viability was observed than after only one cycle (Fig 3). ANOVA showed a significant difference in decrease in viability between the four strains among the different treatments. No bacterial viability was detected after the application of two dehydration–rehydration cycles to 68% RH for each strain (Fig 3). Therefore, an additional dehydration–rehydration cycle significantly increased the decrease in viability.

Discussion

Results of our study showed that ambient RH fluctuations are an efficient means by which to kill *L. monocytogenes* freshly deposited onto an inert surface. In particular, cell death is promoted by a transient dehydration step followed by instantaneous rehydration. Cell death is also favored by maintaining cells at 68% RH; in this particular case, mode of rehydration did not influence cultivability. To explain these lethal effects, the main mechanisms causing cell degradation during dehydration–rehydration or desiccation–wetting need to be considered.

Causes of death of *L. monocytogenes* during hydric fluctuations

From a physicochemical point of view, cell death under severe dehydration–rehydration is generally related to three main constraints that are mechanical, structural and oxidative [41, 42]. The mechanical constraint applied to cells results from mass transfers between cells and their

Table 1. Drying parameters and viability of *Listeria monocytogenes* dried at 25°C at various dehydration kinetics.

RH drying chambers	Kinetics parameters of dehydration		Decrease in viability of <i>L. monocytogenes</i> strains (Log ₁₀ (N/N ₀), (± SD) ^a)											
	V _{max} (10 ⁻³ mg/min)	τ (min)	EGDe			CCL500			CCL128			LO28		
			Time when 95% of weight sample is evaporated (min) = 3τ	180 min	960 min	180 min	960 min	180 min	960 min	180 min	960 min	180 min	960 min	
43%	0.72	13.69	41.07	-2.32 (± 0.40) ^{ab}	-3.74 (± 0.6) ^c	-2.59 (± 0.41) ^{abc}	-3.02 (± 0.28) ^{abc}	-2.77 (± 0.29) ^{ab}	-3.49 (± 0.24) ^b	-3.11 (± 0.17) ^a	-3.97 (± 0.26) ^a			
	0.56 ^c	17.81	53.43	-1.95 (± 0.54) ^a	-2.27 (± 0.43) ^{ab}	-1.97 (± 0.21) ^a	-2.55 (± 0.16) ^{abc}	-2.24 (± 0.31) ^a	-3 (± 0.2) ^{ab}	-2.82 (± 0.21) ^a	-2.84 (± 0.52) ^a			
	0.32	31.24	93.72	-2.43 (± 0.78) ^{ab}	-3.36 (± 0.65) ^{bc}	-2.36 (± 0.72) ^{ab}	-3.1 (± 0.35) ^{bc}	-2.51 (± 0.55) ^{ab}	-3.48 (± 0.35) ^b	-3.22 (± 0.31) ^a	-4.1 (± 0.54) ^a			
68%	0.38	25.8	77.4	-3.85 (± 0.07) ^c	<-4.5 ^d	-3.63 (± 0.32) ^c	<-4.5 ^d	-4.15 (± 0.36) ^b	<-4.5 ^c	<-4.5 ^b	<-4.5 ^b			
	0.28	34.9	104.7	-3.08 (± 0.38) ^{abc}	<-4.5 ^d	-2.81 (± 0.76) ^{abc}	<-4.5 ^d	-3.47 (± 0.94) ^b	<-4.5 ^c	-3.82 (± 1.1) ^a	<-4.5 ^b			
	0.22 ^c	45.71	137.13	-2.66 (± 0.7) ^{abc}	<-4.5 ^d	-2.65 (± 0.61) ^{abc}	<-4.5 ^d	-2.98 (± 0.53) ^{ab}	<-4.5 ^c	-4.17 (± 0.98) ^a	<-4.5 ^b			

* Values for each strain followed by different letters indicate significant differences (p < 0.05) as determined by the Tukey post hoc test.

^a Results correspond to conditions studied in Fig 1.

doi:10.1371/journal.pone.0148418.t001

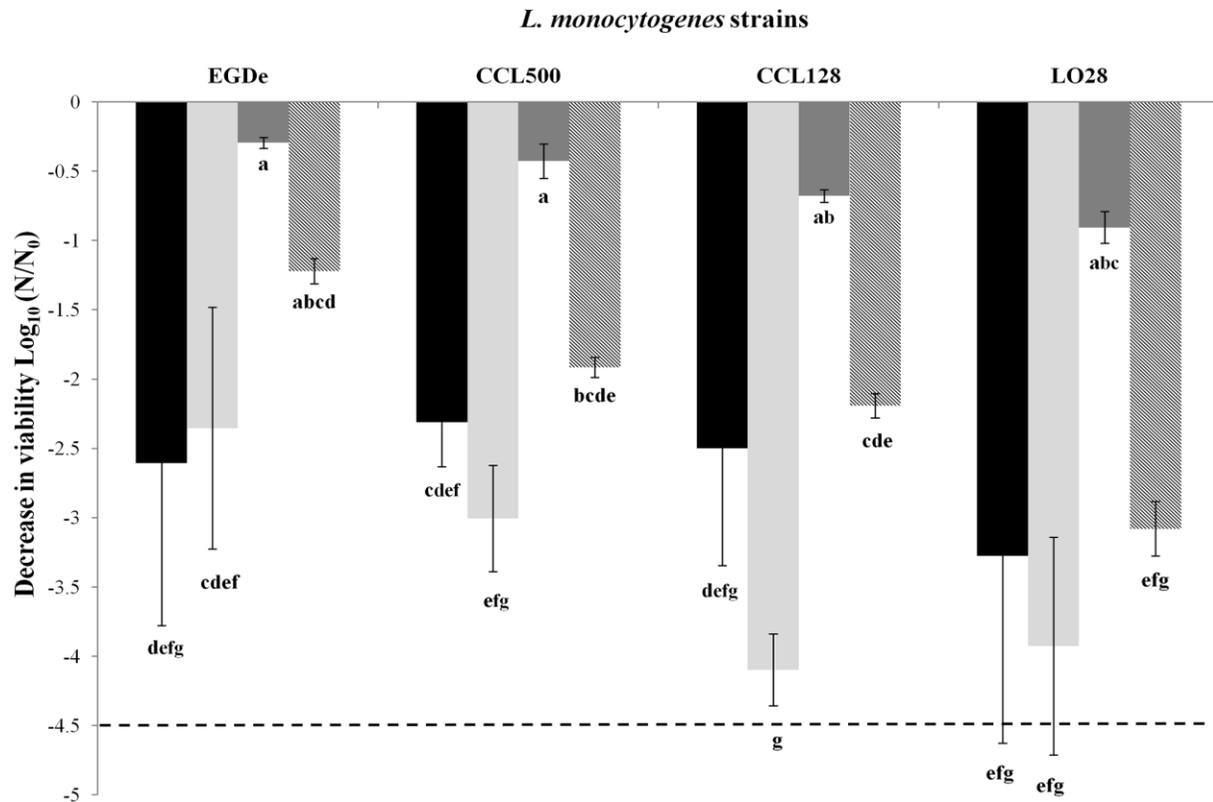


Fig 2. *L. monocytogenes* survival after different kinetics of rehydration. Decrease in viability of *L. monocytogenes* strains (EGDe, CCL500, CCL128, and LO28 strains) in PBS during desiccation on polypropylene coupons incubated at 25°C and at 43% RH or 68% RH for 180 min. Initial concentration was equivalent to 10⁹ CFU/mL. Two models of rehydration were studied: an instantaneous rehydration and a progressive rehydration. Black bars correspond to drying at 68% RH with a slow rehydration and light gray bars correspond to drying at 68% RH with a rapid rehydration. Dark gray bars correspond to drying at 43% RH with a slow rehydration and hatched bars correspond to drying at 43% RH with a rapid rehydration. Error bars correspond to the SD calculated from four repeated experiments. (---) corresponds to the method detection limit.

doi:10.1371/journal.pone.0148418.g002

surrounding environments; it consists mainly of osmotic flows, which cause a cell volume decrease during dehydration and then swelling during rehydration[43]. A direct consequence of osmotic stress is an alteration of the cell plasma membrane during dehydration, with reported formation of invaginations and eventually formation of plasma membrane vesicles that lead to a decrease in the membrane area [33, 44]. Instantaneous rehydration induces fast water re-entry and leads to cell lysis as observed in bacteria and yeast; by contrast, progressive rehydration favors membrane integrity recovery. These mechanical events could actually explain results presented in our study because cell death was mainly related to the transient drying step (Fig 1) and because instantaneous rehydration promoted it (Fig 2). Therefore, mechanical stress could contribute to the lethal effect observed and could explain why increase desiccation tolerance was observed for *L. monocytogenes* presenting a putatively less fluid membrane [45]. Oxidation is also proposed to explain cell death during desiccation of *L. monocytogenes* [45]. Oxidation is thought to result from cell metabolic dysfunction and arrest caused

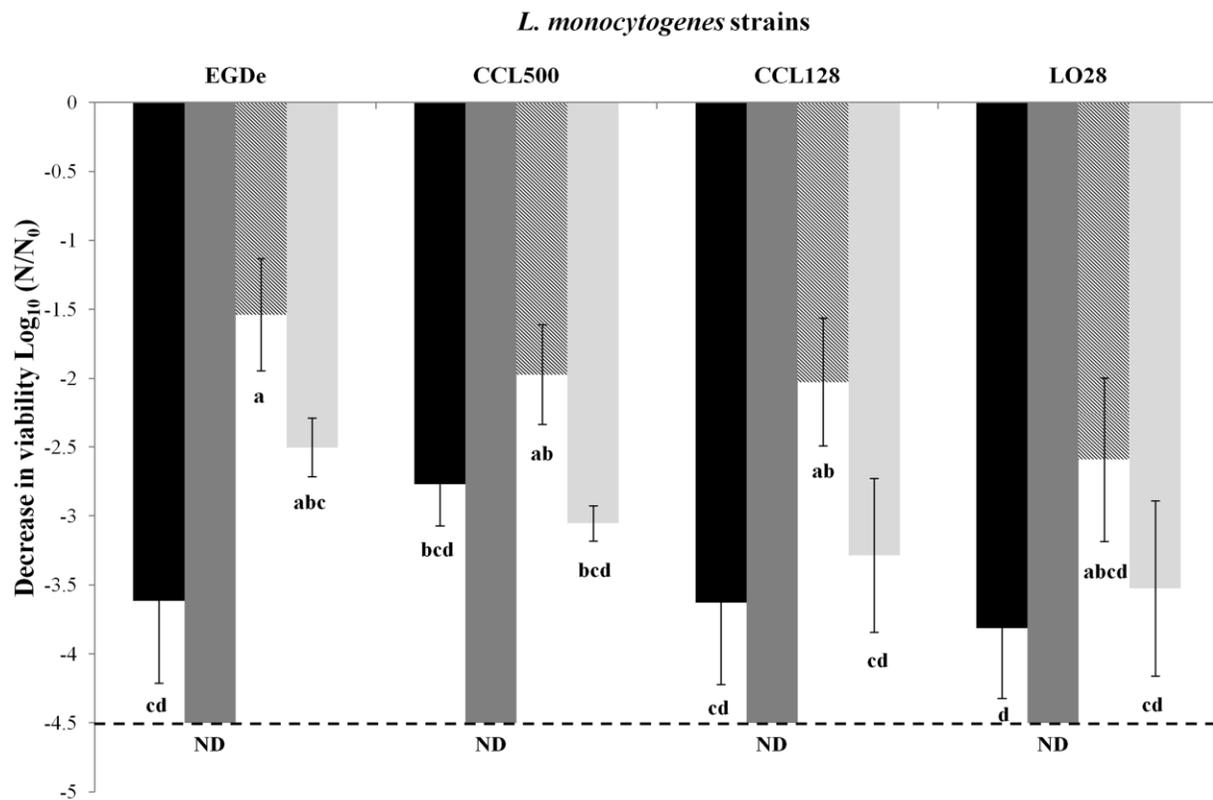


Fig 3. Impact of dehydration-rehydration cycle on *L. monocytogenes* survival. Decrease in viability of *L. monocytogenes* EGDe, CCL500, CCL128 and LO28 strains in PBS during desiccation at 43% RH and 68% RH on polypropylene coupons with one cycle at 25°C for 180 min or with two successive cycles at 25°C for 180 min each with an instantaneous rehydration in 10 μ L of distilled water between the two cycles. Initial concentration was equivalent to 10^9 CFU/mL. Black bars correspond to drying at 68% RH for one cycle and dark gray bars correspond to drying at 68% RH for two cycles. Hatched bars correspond to drying at 43% RH for one cycle and light gray bars correspond to drying at 43% RH for two cycles. Error bars correspond to the SD calculated from four repeated experiments. (---) corresponds to the method detection limit. ND (not detectable) represents decrease in viability of four strains which is under method detection limit.

doi:10.1371/journal.pone.0148418.g003

by dehydration [42]. Accordingly, most reactive oxygen species that are generated by cellular reactions are supported by enzymatic systems that are denatured by dehydration. Oxidation is also related to the transition from the liquid to the aerial medium, which increases the direct contact between samples and gaseous oxygen (oxygen that is less concentrated and less mobile in water than in air). In the case of our experiments, this last phenomenon occurs below 75% RH. Accordingly, the bacterial suspension medium (PBS) is mainly composed of NaCl, and this salt solution displays a water activity of 0.75 at 25°C in saturated solution [46]. This means that exposure of PBS to 75% RH induces water evaporation from the sample until the formation of a saturated liquid solution (crystal formation) of NaCl. This was confirmed by our experiments because bacterial samples exposed to 75% RH remained liquid at the end of the dehydration process. In these conditions, cells were exposed to increased osmotic pressure (and therefore to mechanical and structural constraints) without direct contact with air. This may be the reason that treatment at 75% RH was less detrimental to cells than at other RH levels tested (Fig 1). Nevertheless, survival observed at 68% RH cannot result exclusively from this

industrial premises. From our results, we conclude that the main principle involved is a decrease in RH to a level that is not so low that it stabilizes cells, but sufficiently high to induce dehydration-related damage. By contrast with temperature and chemical agents, largely used as technological environmental parameters for the effective control of microorganism activities in rooms or plants, RH was not considered as an effective means by which to increase the safety of industrial environments. This study shows that RH control might offer new optimization ways to reduce bacterial contamination in food production plants and other environments, such as hospitals, schools, or conveyances. Important research remains to be conducted before the application of RH for control of bacterial contamination can be introduced. A study of the contribution of other parameters, to observe the lethal effects of RH fluctuation, is necessary. These parameters include resistance of spoilage and other pathogenic microorganisms (bacteria, yeast, and molds), the influence of substrates (from meat, fish, and juices) in the suspension medium before dehydration, and other surface materials. Finally, we plan to perform industrial assays under field conditions.

Acknowledgments

This work was supported by French Agence Nationale de la Recherche (ANR) under the project “EcoSec”. We thank all partners of EcoSec project: Labeyrie-Group, Dessica, MF conseil, IRSTEA, ANSES SBCL Unit: Staphylocoques, Bacillus, Clostridies et Lait, INRA-Theix UR454 Microbiologie.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: FZ SG CG PG LB. Performed the experiments: FZ HI. Analyzed the data: FZ CI SG CG LB EL. Contributed reagents/materials/analysis tools: FZ CI HI. Wrote the paper: FZ CI EL CG SG LB.

References

1. Weis J, Seeliger HP. Incidence of *Listeria monocytogenes* in nature. *Appl Microbiol.* 1975; 30: 29–32. PMID: [807164](#)
2. Watkins J, Sleath KP. Isolation and enumeration of *Listeria monocytogenes* from sewage, sewage sludge and river water. *J Appl Bacteriol.* 1981; 50: 1–9. PMID: [6262293](#)
3. Welshimer HJ, Donker-Voet J. *Listeria monocytogenes* in nature. *Appl Microbiol.* 1971; 21: 516–519. PMID: [4994904](#)
4. Fenlon DR. Wild birds and silage as reservoirs of *Listeria* in the agricultural environment. *J Appl Bacteriol.* 1985; 59: 537–543. PMID: [3938452](#)
5. Cox LJ, Kleiss T, Cordier JL, Cordellana C, Konkel P, Pedrazzini C, et al. *Listeria* spp. in food processing, non-food and domestic environments. *Food Microbiol.* 1989; 6: 49–61.
6. Kramarenko T, Roasto M, Meremae K, Kuningas M, Poltsama P, Elias T. *Listeria monocytogenes* prevalence and serotype diversity in various foods. *Food Control.* 2013; 30: 24–29.
7. Lambert ST, Nilsson C, Bradenmark A, Sylven S, Johansson A, Jansson LM, et al. Prevalence and level of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods in Sweden 2010. *Int J Food Microbiol.* 2012; 160: 24–31. doi: [10.1016/j.ijfoodmicro.2012.09.010](#) PMID: [23141642](#)
8. Parisi A, Latorre L, Fraccalvieri R, Miccolupo A, Normanno G, Caruso M, et al. Occurrence of *Listeria* spp. in dairy plants in Southern Italy and molecular subtyping of isolates using AFLP. *Food Control.* 2013; 29: 91–97.
9. Laksanalamai P, Joseph LA, Silk BJ, Burall LS, Tarr CL, Gerner-Smidt P, et al. Genomic characterization of *Listeria monocytogenes* strains involved in a multistate listeriosis outbreak associated with cantaloupe in US. *PLOS One.* 2012; 7: e89024
10. Lin CM, Takeuchi K, Zhang L, Dohm CB, Meyer JD, Hall PA, et al. Cross-contamination between processing equipment and deli meats by *Listeria monocytogenes*. *J Food Protect.* 2006; 69: 71–79.
11. Wilks SA, Michels HT, Keevil CW. Survival of *Listeria monocytogenes* Scott A on metal surfaces: implications for cross-contamination. *Int J Food Microbiol.* 2006; 111: 93–98. PMID: [16876278](#)

12. Autio T, Hielm S, Miettinen M, Sjöberg AM, Aarnisalo K, Björkroth J, et al. Sources of *Listeria monocytogenes* contamination in a cold-smoked rainbow trout processing plant detected by pulsed-field gel electrophoresis typing. *Appl Environ Microbiol*. 1999; 65: 150–155. PMID: [9872773](#)
13. Vazquez-Boland JA, Kuhn M, Berche P, Chakraborty T, Dominguez-Bernal G, Goebel W, et al. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clin Microbiol Rev*. 2001; 14: 584–640. PMID: [11432815](#)
14. Wing EJ, Gregory SH. *Listeria monocytogenes*: clinical and experimental update. *J Infect Dis*. 2002; 185 Suppl 1: S18–24. PMID: [11865436](#)
15. Gandhi M, Chikindas ML. *Listeria*: A foodborne pathogen that knows how to survive. *Int J Food Microbiol*. 2007; 113: 1–15. PMID: [17010463](#)
16. McClure PJ, Roberts TA, Oguru PO. Comparison of the effects of sodium chloride, pH and temperature on the growth of *Listeria monocytogenes* on gradient plates and in liquid medium. *Lett Appl Microbiol*. 1989; 9: 95–99.
17. Walker SJ, Archer P, Banks JG. Growth of *Listeria monocytogenes* at refrigeration temperatures. *J Appl Bacteriol*. 1990; 68: 157–162. PMID: [2108109](#)
18. Carpentier B, Cerf O. Review—Persistence of *Listeria monocytogenes* in food industry equipment and premises. *Int J Food Microbiol*. 2011; 145: 1–8. doi: [10.1016/j.ijfoodmicro.2011.01.005](#) PMID: [21276634](#)
19. Miettinen MK, Björkroth KJ, Korkeala HJ. Characterization of *Listeria monocytogenes* from an ice cream plant by serotyping and pulsed-field gel electrophoresis. *Int J Food Microbiol*. 1999; 46: 187–192. PMID: [10100898](#)
20. Chmielewski RAN, Frank JF. Biofilm Formation and Control in Food Processing Facilities. *Compr Rev Food Sci F*. 2003; 2: 22–32.
21. Van Houdt R, Michiels CW. Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface. *J Appl Microbiol*. 2010; 109: 1117–1131. doi: [10.1111/j.1365-2672.2010.04756.x](#) PMID: [20522145](#)
22. Alpine Slicing and Cheese Conversion Company Issues Voluntary Recall of “Edelweiss Creamery Premium Fondue Blend” Because of Possible Health Risk. 2011; **Available:** <http://www.fda.gov/Safety/Recalls/ucm286000.htm>. **Accessed 21 October 2014.**
23. King And Prince Seafood Corp. Issues Voluntary Recall Notice On Nova Style Cold Smoked Salmon And Sable Fish Lox, Salmon Sushi Fillets, And Salmon Trim Because Of Possible Health Risk. 2011 [cited 2014 Oct 21]; **Available:** <http://www.fda.gov/Safety/Recalls/ucm281097.htm>.
24. Rome Packing Co., Inc. Recalls Fresh And Frozen Crab Meat Because Of Possible Health Risk. 2014. **Available:** <http://www.fda.gov/Safety/Recalls/ucm420386.htm>. **Accessed 21 October 2014.**
25. Sunburst Foods Recalls Products Because Of Possible Health Risk. 2014; **Available:** <http://www.fda.gov/Safety/Recalls/ucm418645.htm>. **Accessed 21 October 2014.**
26. Morgan CA, Herman N, White PA, Vesey G. Preservation of micro-organisms by drying; A review. *J Microbiol Meth*. 2006; 66: 183–193.
27. Bateman JB, Stevens CL, Mercer WB, Carstensen EL. Relative humidity and the killing of bacteria: the variation of cellular water content with external relative humidity or osmolality. *J Gen Microbiol*. 1962; 29: 207–219. PMID: [13966801](#)
28. Dunklin EW, Puck TT. The lethal effect of relative humidity on air-borne bacteria. *J Exp Med*. 1948; 87: 87–101. PMID: [18911172](#)
29. Lemetals G, Dupont S, Beney L, Gervais P. Air-drying kinetics affect yeast membrane organization and survival. *Appl Microbiol Biot*. 2012; 96: 471–480.
30. McEldowney S, Fletcher M. The effect of temperature and relative humidity on the survival of bacteria attached to dry solid surfaces. *Lett Appl Microbiol*. 1988; 7: 83–86.
31. Vogel BF, Hansen LT, Mordhorst H, Gram L. The survival of *Listeria monocytogenes* during long term desiccation is facilitated by sodium chloride and organic material. *Int J Food Microbiol*. 2010; 140: 192–200. doi: [10.1016/j.ijfoodmicro.2010.03.035](#) PMID: [20471709](#)
32. Takahashi H, Kuramoto S, Miya S, Kimura B. Desiccation survival of *Listeria monocytogenes* and other potential foodborne pathogens on stainless steel surfaces is affected by different food soils. *Food Control*. 2011; 22: 633–637.
33. Mille Y, Beney L, Gervais P. Magnitude and kinetics of rehydration influence the viability of dehydrated *E. coli* K-12. *Biotechnol Bioeng*. 2003; 83: 578–582. PMID: [12827699](#)
34. Wolkers WF, van Kilsdonk MG, Hoekstra FA. Dehydration-induced conformational changes of poly-L-lysine as influenced by drying rate and carbohydrates. *BBA-Gen Subjects*. 1998; 1425: 127–136.

35. Golowczyc MA, Gerez CL, Silva J, Abraham AG, De Antoni GL, Teixeira P. Survival of spray-dried *Lactobacillus kefir* is affected by different protectants and storage conditions. *Biotechnol Lett.* 2011; 33: 681–686. doi: [10.1007/s10529-010-0491-6](https://doi.org/10.1007/s10529-010-0491-6) PMID: [21140192](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21140192/)
36. Castro HP, Teixeira PM, Kirby R. Storage of lyophilized cultures of *Lactobacillus bulgaricus* under different relative humidities and atmospheres. *Appl Microbiol Biot.* 1995; 44: 172–176.
37. Murray EGD, Webb RA, Swann MBR. A disease of rabbits characterised by a large mononuclear leucocytosis, caused by a hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes* (n.sp.). *J Pathol Bacteriol.* 1926; 29: 407–439.
38. Becavin C, Bouchier C, Lechat P, Archambaud C, Creno S, Gouin E, et al. Comparison of widely used *Listeria monocytogenes* strains EGD, 10403S, and EGD-e highlights genomic variations underlying differences in pathogenicity. *MBio.* 2014; 5: e00969–00914. doi: [10.1128/mBio.00969-14](https://doi.org/10.1128/mBio.00969-14) PMID: [24667708](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24667708/)
39. Vicente MF, Baquero F, Perez-Diaz JC. Cloning and expression of the *Listeria monocytogenes* haemolysin in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett.* 1985; 30: 77–79.
40. Pompermayer DMC, Gaylarde CC. The influence of temperature on the adhesion of mixed cultures of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to polypropylene. *Food Microbiol.* 2000; 17: 361–365.
41. Potts M. Desiccation tolerance of prokaryotes. *Microbiol Rev.* 1994; 58: 755–805. PMID: [7854254](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7854254/)
42. Dupont S, Rapoport A, Gervais P, Beney L. Survival kit of *Saccharomyces cerevisiae* for anhydrobiosis. *Appl Microbiol Biot.* 2014; 8821–8834
43. Poirier I, Marechal PA, Evrard C, Gervais P. *Escherichia coli* and *Lactobacillus plantarum* responses to osmotic stress. *Appl Microbiol Biotechnol.* 1998; 50: 704–709. PMID: [9891930](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9891930/)
44. Dupont S, Beney L, Ritt JF, Lherminier J, Gervais P. Lateral reorganization of plasma membrane is involved in the yeast resistance to severe dehydration. *Biochim et Biophys Acta.* 2010; 1798: 975–985.
45. Hingston PA, Piercey MJ, Hansen LT. Insertional mutagenesis reveals genes associated with desiccation and osmotic stress in *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol.* 2015; (In press)
46. Stokes RH, Robinson RA. Standards solutions for humidity control at 25°C. *Ind Eng Chem.* 1949; 41: 2013.
47. Huang YN, Ellis TC, Hansen LT. Role of sigB and osmolytes in desiccation survival of *Listeria monocytogenes* in simulated food soils on the surface of food grade stainless steel. *Food Microbiol.* 2015; 46: 443–451. doi: [10.1016/j.fm.2014.09.007](https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.09.007) PMID: [25475314](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25475314/)
48. Sleator RD, Wouters J, Gahan CGM, Abee T, Hill C. Analysis of the role of OpuC, an osmolyte transport system, in salt tolerance and virulence potential of *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol.* 2001; 67: 2692–2698. PMID: [11375182](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11375182/)

3.3) Principaux résultats et conclusion de l'article

Les principaux résultats obtenus dans ce chapitre montrent que la survie de *L. monocytogenes* aux différentes conditions testées est souche dépendante. L'effet destructeur des fluctuations hydriques sur la survie de *L. monocytogenes* est principalement attribué à l'humidité relative atteinte pendant le séchage et le mode de réhydratation. Ainsi, l'étape de déshydratation n'est pas uniquement responsable de la mort bactérienne car le type de réhydratation y contribue fortement.

Le traitement optimal pour détruire *L. monocytogenes* est une déshydratation sous 68% d'HR entraînant selon les souches une destruction entre 2 et 4 log après 3 h de séchage et une destruction atteignant le seuil minimal de détection (< 4,5 log) au delà de 16 h de séchage à 25 °C. Tandis que pour les valeurs d'HR de 75%, 43% et 11% la cultivabilité bactérienne est stable au cours du temps entraînant, selon les souches et l'HR, une destruction entre 0,3 et 3 log. Alors que les différentes vitesses de séchage étudiées ne sont pas impliquées dans la mort bactérienne, la cinétique de réhydratation est un facteur majeur de la mort cellulaire. Une réhydratation progressive de *L. monocytogenes* après un séchage est moins délétère qu'une réhydratation instantanée. La réhydratation instantanée expose les bactéries à une lyse bactérienne plus importante hypothétiquement due à une rupture de la membrane plasmique après l'entrée d'eau très rapide dans les cellules séchées. Ces travaux démontrent également que des cycles successifs de déshydratation et de réhydratation entraînent une perte supplémentaire de survie bactérienne et ouvrent une piste pour améliorer la destruction bactérienne.

Pour conclure, cette étude révèle que les fluctuations d'humidité relative offre un réel potentiel lors qu'elles sont maîtrisées pour contrôler des microorganismes pathogènes tels que *L. monocytogenes* pouvant réduire leur implantation dans les ateliers des industries agroalimentaires.

4. Discussion

L'efficacité de la déshydratation et réhydratation sur la destruction d'une suspension de *L. monocytogenes* déposée sur une surface a été évaluée afin d'éviter sa propagation et sa persistance dans les ateliers. La bibliographie rapporte que les HR moyennes entre 50% et 70%

maintenues sur une longue période sont plus délétères sur les microorganismes (Dunklin et Puck, 1948; Castro *et al.*, 1995). L'augmentation de la mortalité et sa progression pendant le maintien des cellules à 68% d'HR peuvent être reliées à l'impact du niveau de séchage sur la mobilité moléculaire. Ce phénomène est exploité dans les méthodes de préservation où les microorganismes lyophilisés sont préservés en dessous de 15% d'HR. Leur survie est considérablement réduite lorsque l'HR de conservation augmente (Castro *et al.*, 1995). En effet, lorsque l'HR est très basse, les structures cellulaires sont désorganisées et les Espèces Réactives de l'Oxygène (ERO) sont présentes mais leurs déplacements et leurs interactions sont très ralentis. Ainsi, les valeurs d'HR moyennes comme 68% sont assez basses pour permettre des dommages oxydatifs, structuraux et mécaniques mais assez hautes pour maintenir la mobilité des constituants cellulaires et ainsi accélérer les réactions délétères pour les cellules.

Un autre facteur important pour la destruction bactérienne est le mode de réhydratation après séchage. En effet, une plus grande perte de cultivabilité est observée lorsque les bactéries séchées à la même HR sont réhydratées instantanément. Ainsi, la déshydratation n'est pas le seul facteur à prendre en compte pour détruire efficacement les microorganismes. L'étape de réhydratation est définie comme l'étape critique lors des procédés de préservation des cellules. Il a été montré qu'une réhydratation progressive d'une valeur d' a_w de 0,117 à 0,455, offre à la levure *S. cerevisiae* une meilleure viabilité qu'une réhydratation rapide aux même a_w . Il a été supposé que le flux rapide d'eau à l'intérieur des cellules rompt la membrane instable et fragile après le séchage, contrairement à une entrée d'eau lente qui préserve la viabilité cellulaire (Poirier *et al.*, 1999). La réhydratation dans un milieu complexe contenant des agents protectants (protéines, sucres...) entraîne aussi une meilleure survie de la bactérie *Pantoea agglomerans* permettant une meilleure capacité à réparer les dommages cellulaires (Costa *et al.*, 2000). Ainsi, la survie cellulaire dépend du milieu et de la vitesse de réhydratation. Dans notre étude, le PBS a été utilisé comme milieu de réhydratation car il est pauvre en nutriment, présente la même survie bactérienne qu'un séchage avec de l'eau distillée (Figure 23) et permet une destruction bactérienne plus efficace.

Ces deux étapes sont très importantes pour engendrer la mort cellulaire, il est intéressant de pouvoir les contrôler afin d'obtenir l'élimination la plus complète en alliant une déshydratation avec une valeur d'HR la plus délétère pour les cellules et une réhydratation instantanée. Les deux cycles successifs de déshydratation-réhydratation de 3 h chacun réalisés à 68% et 43% d'HR ont

entraîné une perte de cultivabilité supplémentaire voir une diminution de la population bactérienne en dessous du seuil de détectabilité à 68% d'HR. Les cycles de déshydratation et réhydratation optimisent la destruction bactérienne et peuvent être un moyen efficace pour améliorer l'hygiène dans les industries agroalimentaires.

Cependant, il n'est pas exclu qu'en appliquant ces cycles de façon répétée qu'une sous population bactérienne de *L. monocytogenes* puissent devenir tolérante au séchage. En effet, un deuxième cycle de séchage à 43% d'HR ne permet pas d'avoir une diminution logarithmique de même ampleur qu'au premier cycle supposant une éventuelle adaptation ou sélection des cellules résistantes au deuxième cycle. Il est possible que lors du premier cycle les cellules les plus fragiles soient éliminées et que les cellules survivantes présentent un état physiologique différent.

En effet, au sein d'une population, les bactéries sont hétérogènes à un instant donné quant à leur état physiologique, à l'expression de leur génome et à leur «vécu» (Booth, 2002). De plus les cellules ayant survécu au premier cycle se sont probablement adaptées au stress subit en modifiant l'expression de leur génome pouvant développer ainsi des mécanismes de résistance au séchage sur le long terme.

Le milieu de déshydratation est aussi important pour optimiser le procédé et éliminer le plus grand nombre de cellules de *L. monocytogenes*. En effet, la survie de *L. monocytogenes* au séchage dépend du milieu dans lequel la bactérie est séchée. Elle survit mieux à la dessiccation en présence d'acide gras saturés que d'acide gras non saturés (entre 1 et 2 log de plus) (Hingston *et al.*, 2013). De plus, un milieu riche en nutriment et la présence d'osmolytes exogènes (proline, glycine bêtaïne et carnitine) protègent *L. monocytogenes* de la dessiccation. L'utilisation d'un milieu pauvre en nutriments (PPS, 0,85% NaCl et 1% de peptone) entraîne une survie bactérienne plus faible qu'avec du milieu TSB supplémenté en glucose (Vogel *et al.*, 2010; Huang *et al.*, 2015). Les nutriments peuvent favoriser la survie de *L. monocytogenes* en leur fournissant de l'énergie alors que le PBS utilisé dans ces travaux, tout comme le PPS, est exempt de nutriments et représente le milieu le moins favorable pour la survie de *L. monocytogenes*. Ces observations mettent en avant l'importance d'une surface propre, dépourvue de souillures alimentaires pour optimiser la destruction de *L. monocytogenes* par le séchage.

En termes d'application dans les ateliers de production, la valeur d'HR de 68% présente l'avantage de ne pas être excessivement basse pour être atteinte dans les ateliers après les étapes

de nettoyage et de désinfection. En effet, les HR à bas niveau sont difficiles à atteindre car les surfaces sont rincées à l'eau (mur, machine, sol). L'application d'une réhydratation instantanée semble difficile à associer à la reprise de la production par les opérateurs car l'atelier est séché après les étapes de nettoyage et de désinfection. Le cycle de déshydratation et réhydratation est une alternative intéressante car aucune cultivabilité bactérienne n'a été détectée après deux cycles d'une durée totale de 6 h (2 fois 3 h) à 68% d'HR. Cependant, avant d'appliquer cette technique qui nécessite un arrêt de la production et un coût énergétique important selon la surface de l'atelier, des optimisations du processus sont nécessaires.

Chapitre 3 : Exploration des modifications cellulaires de *Listeria monocytogenes* face aux fluctuations hydriques

1. Introduction

Les fluctuations hydriques ont de nombreux effets sur les cellules biologiques. La déshydratation expose les cellules à un stress hyperosmotique et un stress oxydatif se traduisant par une contraction volumique de la cellule suite à la sortie d'eau, l'agrégation de protéines, la désorganisation de la membrane plasmique et la production d'ERO intracellulaires (Potts, 1994). La réhydratation est aussi une étape importante car elle est responsable d'une forte mortalité cellulaire lorsqu'elle est instantanée causant une perméabilisation et une vésiculation membranaire chez la levure *S. cerevisiae* (Dupont *et al.*, 2010). A notre connaissance, les mécanismes impliqués dans la mort et la survie de *L. monocytogenes* lors des fluctuations de l'humidité relative n'ont pas été étudiés. Les expériences présentées dans le Chapitre 2 de la partie résultats révèlent que les facteurs majeurs engendrant la mort bactérienne de *L. monocytogenes* exposée aux fluctuations hydriques sont une valeur d'humidité relative de 68% et une réhydratation instantanée.

L'objectif de ce chapitre est de déterminer les mécanismes cellulaires influençant la survie de *L. monocytogenes* pendant le séchage et la réhydratation. Les techniques choisies permettent l'investigation des modifications pendant le séchage lorsque l'environnement cellulaire passe d'un état liquide à un état gazeux (solidification des cellules) ou après l'étape de réhydratation. La membrane plasmique a été la première cible cellulaire explorée. L'approche a consisté à étudier sa structure par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF) ainsi que sa perméabilité, mesurée par cytométrie en flux couplé à un marqueur cellulaire. Ensuite, l'état de l'ensemble des protéines et de la paroi cellulaire après déshydratation a été étudié par IRTF. Pour finir, l'enveloppe cellulaire et la morphologie de *L. monocytogenes* ont été observées par microscopie à force atomique (MFA) et l'impact de l'oxydation sur la survie bactérienne a été étudié en procédant à des séchages en absence d'oxygène.

2. Matériel et méthodes

2.1) Déshydratation en milieu aérien en absence d'oxygène

Les souches de *L. monocytogenes* ont été cultivées comme précédemment décrit dans la partie résultats du chapitre 1 (Matériel et méthodes - partie 2.2.2 - Conditions de culture).

Avant le séchage en absence d'oxygène, 25 mL de culture bactérienne ont été lavés une fois par centrifugation pendant 10 min à $3645 \times g$ à 25 °C et ont été resuspendus dans 20 mL de PBS non dégazé c'est-à-dire avec de l'oxygène dissout encore présent dans la solution ou dans 20 mL de PBS dégazé avec un flux de gaz de N₂ [100%] pendant 4 h (20 mL dégazé/min) (Air Liquide, France). Les expériences de séchage en anaérobiose ont été réalisées dans une chambre anaérobiose (Bactron II, Sheldon Manufacturing, Inc., Cornelius, OR) contenant du N₂H₂CO₂ [85%, 5%, 10%] (Air Liquide, France). Comme précédemment décrit, 10 µL de suspension bactérienne ont été déposés sur un coupon de polypropylène. Ensuite les échantillons ont été placés dans les enceintes de séchage à différentes conditions d'humidité relative pendant différents temps à 25 °C.

Pour toutes les expériences en anaérobiose, les bactéries ont été réhydratées instantanément avec 1 mL de PBS non dégazé et récupérées par 30 cycles d'aspiration et de refoulement dans la chambre anaérobiose. Après la remise en suspension des cellules, la cultivabilité bactérienne a été mesurée comme décrit précédemment en présence d'oxygène.

2.2) Estimation de l'intégrité membranaire par cytométrie en flux

La cytométrie en flux est une technique d'analyse permettant de mesurer les caractéristiques individuelles de cellules en suspension. Les bactéries sont entraînées à très grande vitesse à travers un flux liquide et passent dans le faisceau d'un laser ce qui permet de les compter et les caractériser. La lumière réémise est ensuite collectée par 3 détecteurs qui permettent de caractériser les cellules :

- Le détecteur FSC analysant la lumière diffusée dans la continuité du faisceau lumineux corrélé à la taille de la bactérie.
- Le détecteur SSC analysant la lumière diffusée dans l'angle droit du faisceau lumineux corrélé à la granulométrie de la bactérie.

- Les détecteurs de fluorescence analysant les signaux de fluorescence liés à l'utilisation de fluorochrome (FL1, FL2, FL3...).

2.2.1) Marquage des bactéries à l'IP

L'intégrité membranaire des cellules a été évaluée par cytométrie en flux avec l'iodure de propidium (IP) (Molecular Probes, Invitrogen, France). L'IP est une sonde fluorescente présentant une longueur d'onde d'excitation à 535 nm et une longueur d'onde d'émission à 617 nm. L'IP s'intercale au niveau des acides nucléiques et entre dans les cellules uniquement lorsque la membrane cellulaire est perméabilisée et/ou altérée. Par conséquent cela va permettre de distinguer les cellules dont la membrane est altérée au sein d'une population cellulaire.

Afin de marquer *L. monocytogenes* avec l'IP, une solution stock d'IP à 10 mg/mL en eau distillée a été utilisée et stockée à 4 °C. Les bactéries réhydratées après séchage ont été marquées avec 1 µg/mL d'IP pendant 10 min dans l'obscurité à 25 °C. En parallèle, un marquage de cellules viables non séchées (témoin négatif) et de cellules chauffées à 90 °C pendant 45 min (témoin positif) ont été réalisés (Figure 24).

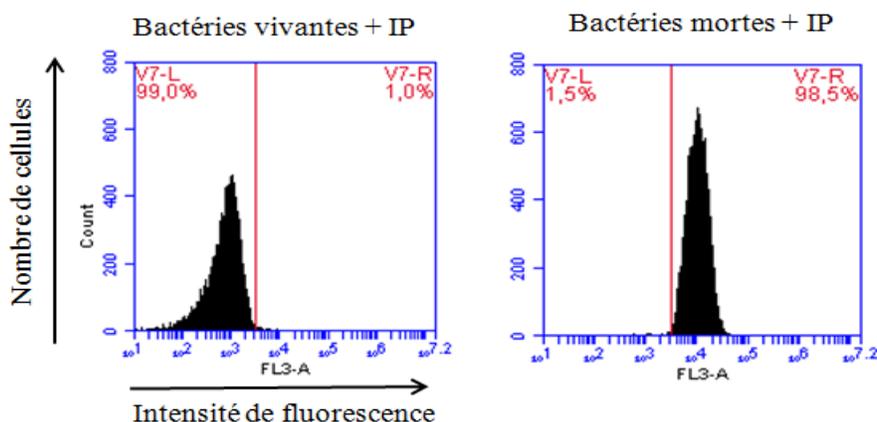


Figure 24 : Intensité de fluorescence obtenue en cytométrie en flux lors du passage des bactéries vivantes ou mortes marquées à l'IP. Les pourcentages des parties V7-L et V7-R expriment le pourcentage de bactéries non marquées à l'IP (bactéries vivantes) et marquées à l'IP (bactéries mortes) respectivement. Le seuil rouge permet de séparer la population de bactéries vivantes et de bactéries mortes.

2.2.2) Analyse par cytométrie en flux

Une fois marquées à l'IP et ajustées à une concentration de 10^7 cellules/mL dans du PBS, les bactéries sont analysées en cytométrie en flux. Pour chaque échantillon, 10000 événements ont été collectés à une vitesse moyenne d'environ 300 événements/seconde par un cytomètre BD Accuri C6 (Becton Dickinson, San José, Ca, USA) équipé d'un laser (excitation 488 nm) et la fluorescence a été récupérée grâce au filtre FL3 > 670 nm. Les données ont été collectées et analysées avec le logiciel BD CSampler Software. Les résultats sont issus au minimum de quatre répétitions indépendantes. En parallèle la cultivabilité a été déterminée par numération des UFC sur gélose TSA. Les bactéries n'ayant pas crû sur milieu gélosé après déshydratation par rapport à la concentration bactérienne initiale ont été définies comme des bactéries non cultivables.

2.3) Analyse structurale de *L. monocytogenes* après séchage par spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (IRTF)

2.3.1) Principe de la spectroscopie infrarouge

Le rayonnement infrarouge (10 à 140000 cm^{-1}) est un rayonnement électromagnétique composé de 3 régions distinctes : les irradiations proches, moyennes et lointaines. Les irradiations moyennes ($400 - 4000\text{ cm}^{-1}$) sont celles utilisées pour l'analyse des échantillons en spectroscopie IRTF. Elles vont passer à travers un échantillon où certaines de ces radiations vont être absorbées. En effet, à ces fréquences, toutes les molécules possèdent des fréquences d'absorption caractéristiques et des vibrations moléculaires spécifiques. Ainsi une "empreinte" moléculaire de l'échantillon sous la forme d'un spectre est récupérée pour l'analyse des résultats représentant l'absorption des différentes molécules en fonction des fréquences infrarouge (Figure 25).

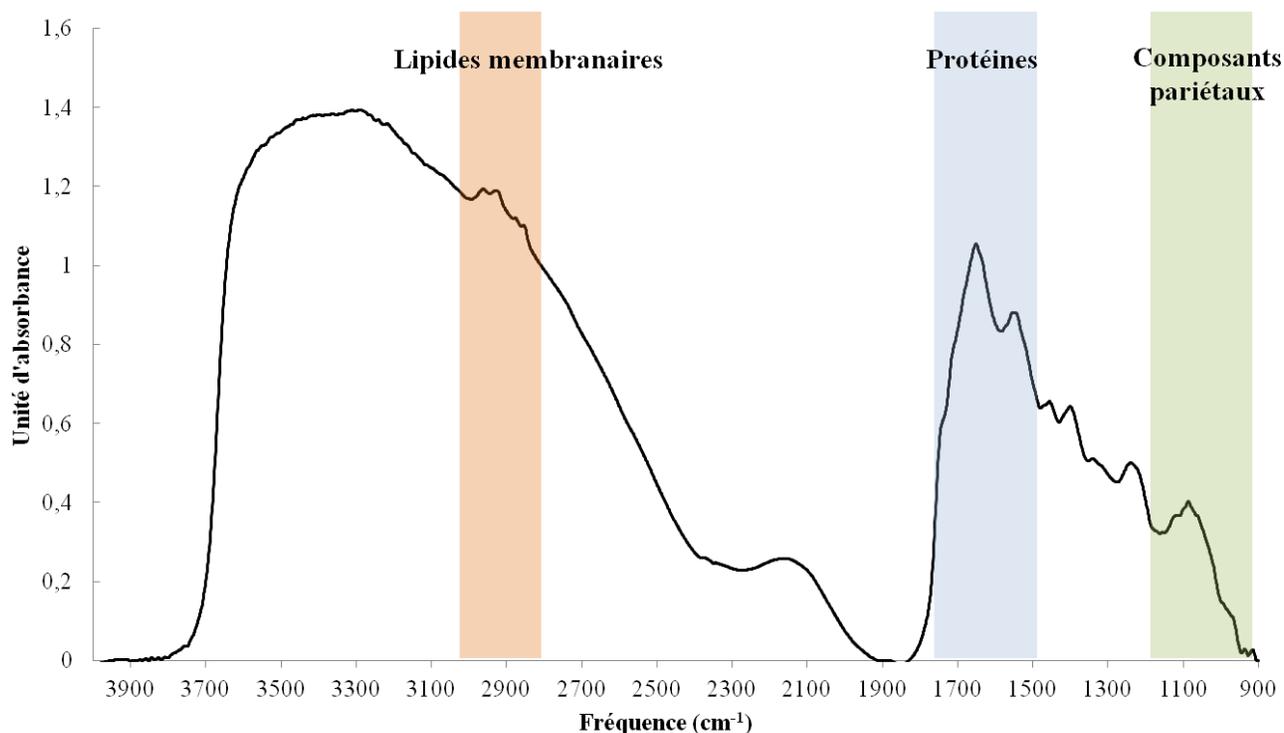


Figure 25 : Spectre brut caractéristique obtenu sur *L. monocytogenes* pour un balayage d'une fréquence de 900 cm^{-1} à 4000 cm^{-1} . Les bandes orange, bleu et verte représentent respectivement la zone de fréquence des lipides membranaires, des protéines et des composants pariétaux.

Ce spectre de *L. monocytogenes* comporte toutes les bandes caractéristiques permettant d'étudier les différents groupements moléculaires de la bactérie. La zone de fréquence de 3000 à 2800 cm^{-1} correspond aux lipides membranaires. Les protéines sont situées dans la bande de 1750 à 1500 cm^{-1} et les composants pariétaux situés dans la bande de 1200 à 900 cm^{-1} . Le tableau 10 montre les différentes bandes infrarouges caractéristiques des lipides, protéines et de la paroi.

Tableau 10 : Fréquences infrarouges caractéristiques des groupements moléculaires présents chez les bactéries (liste non exhaustive) (D'après Davis and Mauer, 2010).

Fréquence cm^{-1}	Groupements moléculaires
2955	Etirement asymétrique des CH_3 des acides gras
2930	Etirement asymétrique des CH_2 des acides gras
2870	Etirement symétrique des CH_3 des acides gras
2850	Etirement symétrique des CH_2 des acides gras
1695-1675	Bande amide I des protéines
1655	Structure en hélice α de la bande amide I des protéines
1637	Structure en feuillet β de la bande amide I des protéines
1550-1520	Bande amide II des protéines
1515	Bande de la tyrosine
1052	Vibrations cycliques des C-O-C, C-O dans les polysaccharides

2.3.2) Protocole

Les échantillons en spectroscopie IRTF ont été analysés par transmission. Le principe est de faire passer le faisceau infrarouge à travers l'échantillon où l'énergie et l'absorption sont mesurées (Figure 26).

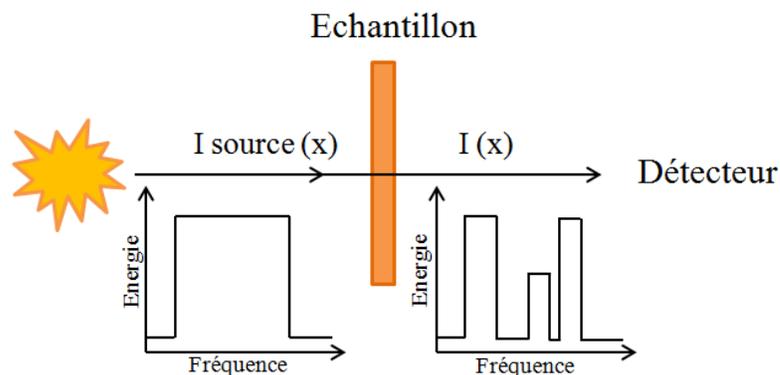


Figure 26 : Principe de la transmission en IRTF. $I_{\text{source}}(x)$ est l'intensité globale émise par le faisceau infrarouge et $I(x)$ est l'intensité transmise par l'échantillon.

Pour préparer les échantillons avant les mesures en spectroscopie IRTF, 1 mL d'une suspension bactérienne dans du PBS à une concentration de 10^9 cellules/mL a été centrifugée 3 fois à $5100 \times g$ pendant 10 min à 25 °C pour enlever le maximum de surnageant. En effet, l'eau peut altérer le signal, il est donc important d'avoir le moins possible d'eau dans l'échantillon. Le culot bactérien a été déposé à l'aide d'une cœse au milieu d'une pastille ronde de sélénure de zinc (ZnSe) transparente aux rayonnements infrarouges. Les bactéries ont ensuite été séchées dans les différentes conditions étudiées et, après chaque séchage, chaque échantillon a ensuite été recouvert d'une seconde pastille de ZnSe puis entouré de parafilm pour l'analyse en spectroscopie IRTF.

Les échantillons ont été placés dans la cellule à transmission dans le spectromètre infrarouge IRTF Vector 22 (Bruker, Karlsruhe, Allemagne) et les spectres ont été enregistrés sur une plage de fréquences comprise entre 4000 et 900 cm^{-1} (la résolution spectrale était de 4 cm^{-1}). Pour obtenir le spectre de chaque échantillon, 50 scans ont été enregistrés puis moyennés. Les spectres moyens obtenus aussi appelés spectres bruts, ont été analysés à l'aide du logiciel OPUS 6.5 (Bruker, Karlsruhe, Allemagne).

L'analyse des spectres bruts a nécessité la mise en œuvre de plusieurs opérations mathématiques : (1) détermination de la dérivée seconde après lissage en 17 points, (2) normalisation des dérivées secondes par rapport au pic caractéristique de la tyrosine (autour de 1515 cm^{-1}) ou au pic caractéristique des νCH_3 symétriques (autour de 2870 cm^{-1}) en vue d'analyser respectivement les protéines, la paroi et la fluidité des lipides membranaires.

2.4) Analyse morphologique de *L. monocytogenes* par Microscopie à Force Atomique (MFA)

2.4.1) Principe de la microscopie à force atomique

La microscopie à force atomique est un type de microscopie permettant de balayer la surface d'un échantillon et de visualiser la topographie de la surface. Elle permet d'obtenir des images en trois dimensions avec des résolutions latérales de 0,01 Å et verticales de 0,1 Å dans des environnements de différentes natures (sec ou liquide par exemple) sans préparation spécifique de l'échantillon.

La microscopie à force atomique comprend (i) un détecteur optique composé d'une diode laser et d'un photodétecteur, (ii) un assemblage levier-pointe permettant de balayer la surface de l'échantillon, (iii) d'un tube piézo-électrique sur lequel est déposé l'échantillon et (iv) d'un système de rétrocontrôle permettant de maintenir la force d'interaction constante entre la pointe et la surface de l'échantillon (Figure 27).

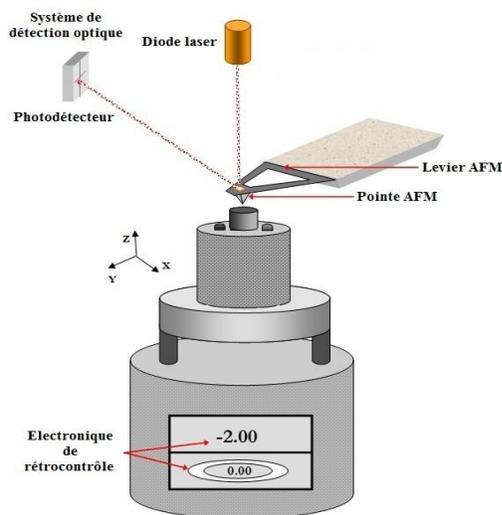


Figure 27 : Schéma représentant les différents constituants de la Microscopie à Force Atomique (Bruker - Veeco Instruments, Santa Barbara, CA)

Les forces s'exercent entre la pointe attachée à l'extrémité du levier souple et la surface de l'échantillon qui se déplace à l'aide du tube piézoélectrique. La flexibilité du levier est mesurée en focalisant le faisceau laser sur le levier qui se réfléchit en quatre cadrans du photodétecteur permettant de discerner les forces latérales et les forces à la surface de l'échantillon. La MFA permet de mesurer des forces de l'ordre du piconewton (10^{-12} N).

La force d'interaction entre les atomes de la pointe et ceux de la surface est maintenue constante au cours du balayage *via* une boucle de rétrocontrôle. L'enregistrement des mouvements (selon les directions X, Y et Z) du tube piézo-électrique délivre une information topographique de la surface en trois dimensions. L'acquisition d'une image est réalisée ligne par ligne à une fréquence de mesure de l'ordre du Hertz.

2.4.2) Analyse par microscopie à force atomique

Les expériences en MFA ont été réalisées en collaboration avec le Laboratoire Interdisciplinaire Carnot de Bourgogne (ICB) et plus particulièrement avec le Pr Eric Lesniewska et Cédric Thomas sur la plateforme ARCEN.

La préparation des échantillons a consisté à déposer 10 μL d'une suspension cellulaire de *L. monocytogenes* à une concentration de 10^9 cellules/mL sur une lamelle de 12 mm recouverte de poly-D-lysine (Dutscher) permettant aux bactéries d'augmenter leur adhésion à la surface grâce aux charges électrostatiques (la surface bactérienne est chargée négativement et la poly-D-lysine est chargée positivement). L'échantillon a ensuite été déposé dans une enceinte de séchage à humidité relative contrôlée à 25 °C aux différentes conditions de séchage testées.

L'observation de *L. monocytogenes* séchée en AFM a été réalisée avec un microscope à force atomique multimode Nanoscope 8 (Bruker, Veeco Instruments, Santa Barbara, CA) associé à un dispositif de modulation de force. Les images ont été obtenues en mode *Peak force* avec une pointe ScanAsyst-HR-AIR d'une constante de raideur K de 0,4 N/m. Le mode *Peak force* consiste à mesurer 2000 interactions/s entre la pointe et l'échantillon tout au long de la mesure de l'image avec une fréquence de 2 kHz. Les images ont été analysées avec le logiciel Nanoscope Analysis 1.5 (Bruker).

2.4.3) Mesure de l'élasticité par microscopie à force atomique en mode Force Volume

Le mode Force Volume permet de réaliser lors de l'acquisition de l'image 128 courbes de force par ligne sur 128 lignes soit 16384 courbes de forces (Figure 28). A partir de ces courbes, il est possible de mesurer le comportement élastique de la surface de l'échantillon et donc dans notre étude l'élasticité de surface de *L. monocytogenes* après séchage.

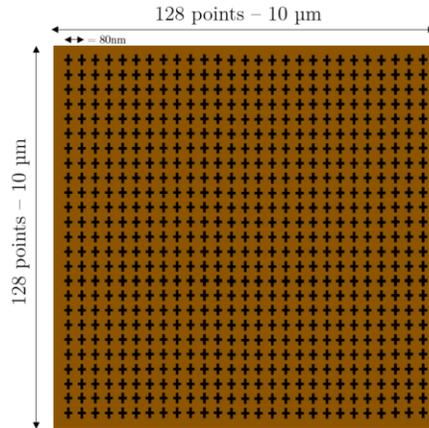


Figure 28 : Schéma d'une image en mode Force Volume

Le module de Young ou le module d'élasticité est une constante E (exprimé en MPa) qui relie la contrainte de traction et la déformation d'un matériau. Un matériau dont le module de Young est très élevé est dit rigide. Le modèle utilisé dans cette étude pour mesurer le module de Young est le modèle de Hertz, largement utilisé, ne prenant pas en compte l'adhérence et les forces d'interactions entre la surface de la pointe et l'échantillon (Figure 29). Le modèle de Hertz considère une sphère élastique lisse (la pointe MFA) de rayon R face à un plan rigide (l'échantillon).

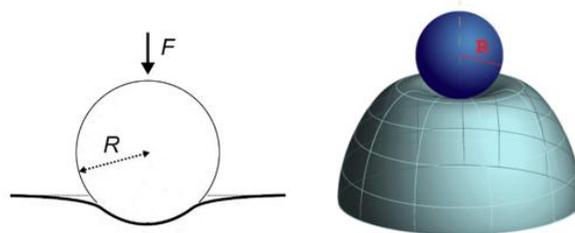


Figure 29 : Modèle de Hertz

Par le modèle de Hertz, le module de Young E (Pa) est calculé selon l'équation 13 suivante :

$$(13) \quad E = \frac{3}{4} (1 - \nu^2) \frac{K}{\sqrt{R}}$$

Où ν est le coefficient de Poisson (caractérise la contraction de la matière perpendiculairement à la direction de l'effort appliqué), K (N.m^{-1}) est la constante de raideur de la pointe MFA et R est le rayon de la sphère de la pointe MFA.

Dans notre étude, les échantillons ont été préparés comme décrit ci-dessus (2.4.2). Les mesures de Force Volume ont été collectées en mode *Peak Force* avec une pointe ScanAsyst-HR-AIR d'une constante de raideur K de $0,4 \text{ N.m}^{-1}$. Les mesures en force volume ont été répétées au minimum 3 fois sur 3 échantillons indépendants.

3. Résultats

3.1) Impact du séchage et de la vitesse de réhydratation sur la perméabilisation membranaire

Le chapitre précédent, (Résultats - Chapitre 2 : Influence des fluctuations hydriques sur la survie de *L. monocytogenes*) a révélé que la vitesse de réhydratation a un fort impact sur la survie de *L. monocytogenes*. En effet, nous avons montré qu'une réhydratation instantanée induit une plus importante mortalité bactérienne comparée à une réhydratation progressive après un même traitement de séchage. Ces résultats supposent qu'une réhydratation instantanée entraînerait un flux d'eau rapide à l'intérieur des cellules qui ferait subir aux cellules un choc hypoosmotique engendrant une lyse cellulaire par rupture de la membrane plasmique. Afin de vérifier cette hypothèse, le nombre de bactéries incorporant l'IP a été mesuré en cytométrie en flux après le séchage des 4 souches (EGD-e, LO28, CCL500 et CCL128) à 75%, 68% et 43% d'HR pendant 3 h après une réhydratation instantanée ou progressive. En parallèle, la cultivabilité a été mesurée par dénombrement des bactéries sur milieu gélosé.

Le nombre de bactéries non cultivables est significativement différent selon le type de réhydratation après un séchage à 75% et 43% d'HR (Figure 30). En effet, moins de bactéries non cultivables ont été observées pendant une réhydratation progressive qu'instantanée, excepté à 68% d'HR où le nombre de bactéries non cultivables n'est pas significativement différent quel que soit le type de réhydratation pour toutes les souches.

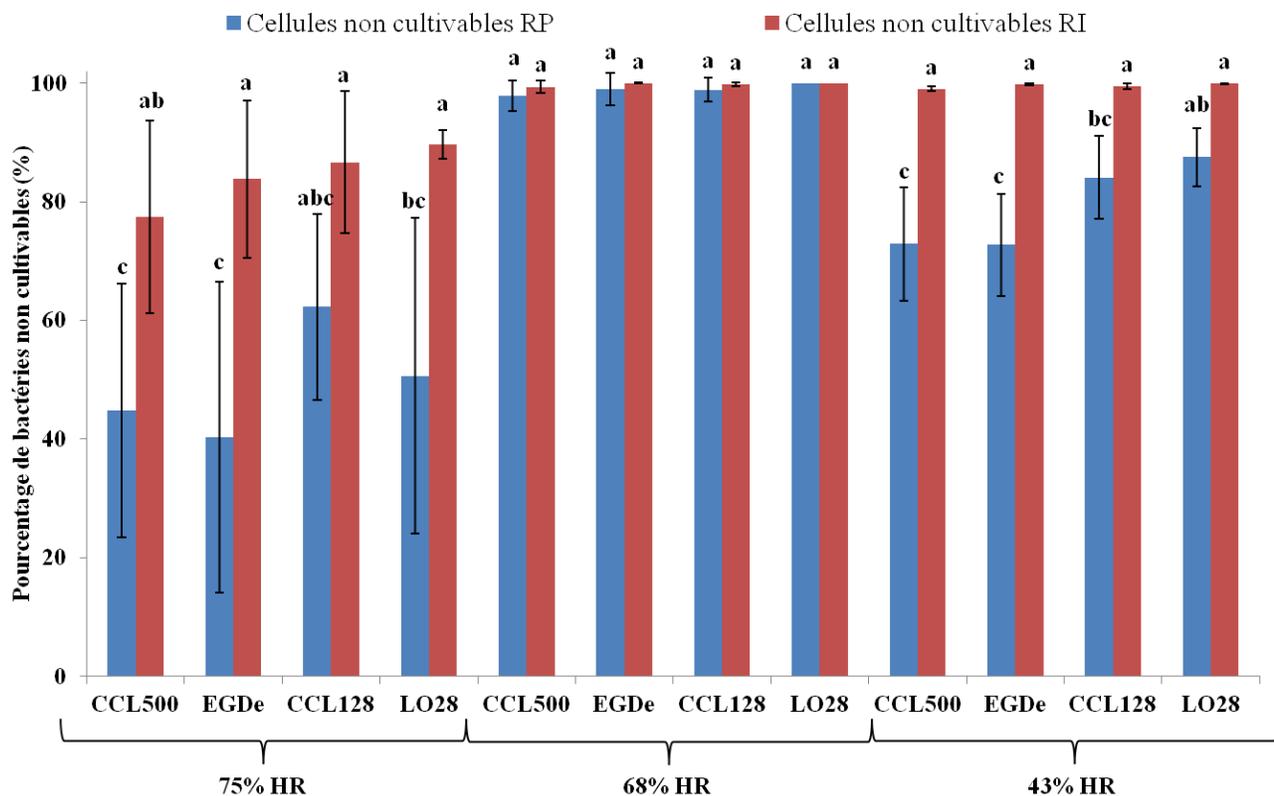


Figure 30 : Pourcentage de bactéries non cultivables des souches de *L. monocytogenes* CCL500, EGD-e, CCL128, et LO28 séchées dans du PBS à 75%, 68% et 43% d'HR pendant 3 h à 25 °C après une réhydratation progressive (RP) ou une réhydratation instantanée (RI). Les barres d'erreurs correspondent aux écarts-types calculés à partir de minimum 4 répétitions indépendantes. Les pourcentages de bactéries non cultivables possédant des lettres différentes sont significativement différents pour chaque condition d'HR (Tukey HSD; $p < 0,05$).

La perméabilisation membranaire après un séchage à 75%, 68% et 43% est significativement différente selon le type de réhydratation excepté pour la souche LO28 et la souche CCL500 à 68% d'HR où les grands écarts-types soulignent un problème de répétabilité des expériences (Figure 31). De façon générale, la réhydratation instantanée provoque une plus forte perméabilisation membranaire qu'une réhydratation progressive avec 9% à 70% de bactéries perméabilisées lors d'une réhydratation progressive et 40% à 90% lors d'une réhydratation instantanée.

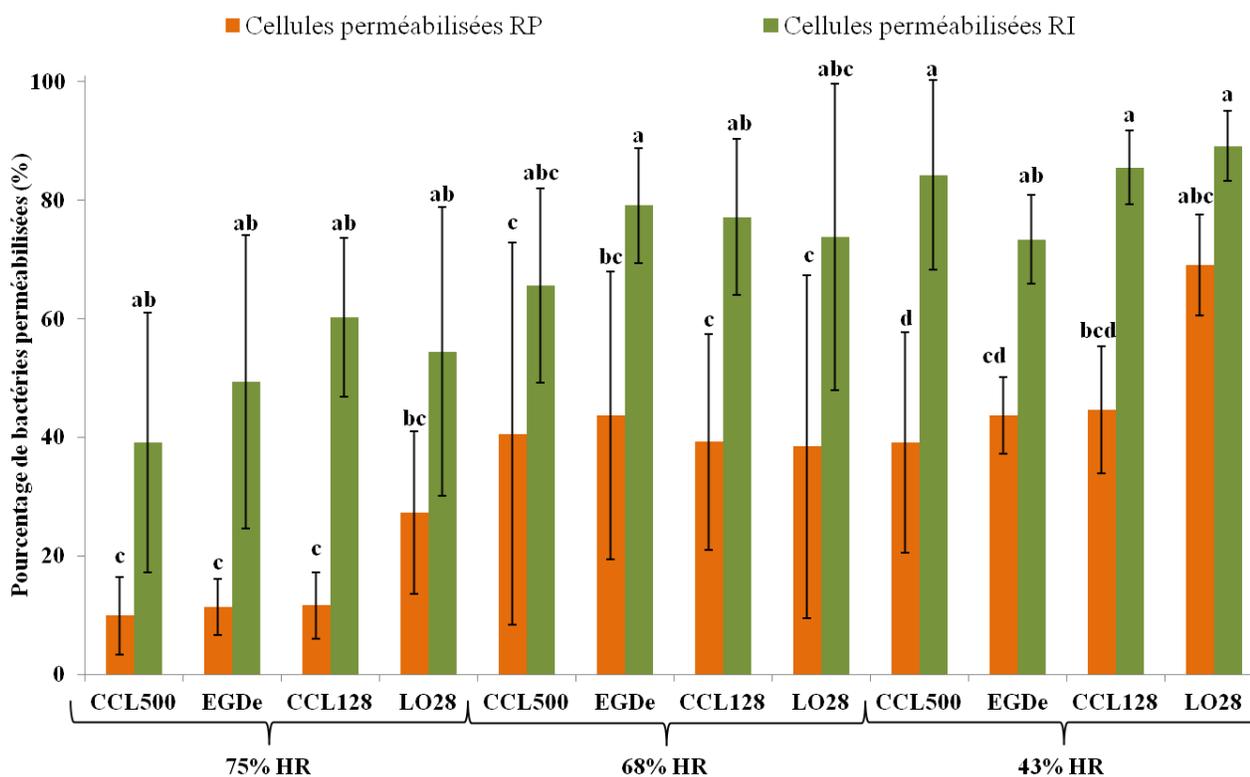


Figure 31 : Pourcentage de bactéries perméabilisées des souches de *L. monocytogenes* CCL500, EGD-e, CCL128 et LO28 séchées dans du PBS à 75%, 68% et 43% d'HR pendant 3 h à 25 °C après une réhydratation progressive (RP) ou une réhydratation instantanée (RI). Les barres d'erreur correspondent aux écarts-types calculés à partir de minimum 4 répétitions indépendantes. Les pourcentages de bactéries perméabilisées possédant des lettres différentes sont significativement différents pour chaque condition d'HR (Tukey HSD; $p < 0,05$).

A 75% et 43% d'HR, la réhydratation instantanée entraîne une plus forte perte de cultivabilité bactérienne et un plus fort pourcentage de cellules perméabilisées que lors d'une réhydratation progressive. A 68% d'HR, le nombre de cellules non cultivables n'est pas différent quel que soit le type de réhydratation alors que le nombre de cellules perméabilisées est plus important après une réhydratation instantanée. Ceci confirme que la vitesse de réhydratation joue un rôle dans la mort cellulaire entraînant un gonflement des cellules et une perméabilisation membranaire. Ce processus a déjà été démontré sur d'autres microorganismes comme la levure *S. cerevisiae* et la bactérie *E. coli* en milieu liquide hyperosmotique où une réhydratation instantanée entraîne la formation de vésicules de membrane plasmique à l'intérieur des cellules provoquant une perméabilisation membranaire et la mort cellulaire (Mille *et al.*, 2003; Dupont *et al.*, 2010).

En plus de cette constatation, un nombre de bactéries non cultivables plus important est observé comparé au nombre de bactéries perméabilisées pour toutes les conditions de séchage et de réhydratation.

Lors d'un stress, *L. monocytogenes* peut entrer dans un état appelé *Viable But Non-Culturable* (VBNC). L'état de VBNC est défini comme un état où les cellules sont métaboliquement actives mais incapables de croître sur un milieu permettant leur croissance. Il est donc possible que dans notre étude l'écart entre le nombre de cellules non cultivables et le nombre de cellules perméabilisées soit dû à l'entrée des bactéries en état de VBNC et donc non perméabilisés mais non cultivables sur milieu gélosé TSA. Pour appuyer cette hypothèse, une étude montre qu'une population de cellules de *L. monocytogenes* séchées entre 47% et 69% d'HR sur des feuilles de persil pendant 15 jours ont une diminution de leur cultivabilité au cours du temps alors que le nombre de cellules viables (métaboliquement active) est beaucoup plus important que le nombre de cellules cultivables. Ceci laisserait supposer une sous-estimation de la population de cellules viables sur milieu gélosé (Dreux *et al.*, 2007b).

Une deuxième hypothèse présume qu'une partie des bactéries détectées comme non marquées à l'IP et donc non perméabilisées sont encore vivantes lors du passage en cytométrie et meurent au cours du temps ne permettant pas de les cultiver. Les mesures en cytométrie ont effectivement été réalisées immédiatement après le traitement de séchage et de réhydratation alors que les mesures par UFC se déroulent sur une durée de 24 h après le traitement. Il se peut également que les bactéries n'étant pas détectées par le cytomètre comme perméabilisées soient mortes mais non marquées à l'IP car incapables de l'incorporer dû à la présence de nombreux dégâts intracellulaires.

En conclusion, la perméabilisation de la membrane plasmique ne permet pas d'expliquer toute la mortalité cellulaire après déshydratation et réhydratation. Il aurait pu être intéressant pour affiner ces résultats de mesurer le nombre de bactéries perméabilisées au cours du temps afin d'évaluer la lyse cellulaire pouvant peut être expliquer ou réduire l'écart entre les pourcentages de cellules perméabilisées et non cultivables.

3.2) Impact de l'oxydation sur la survie de *L. monocytogenes* pendant la déshydratation

Pendant la déshydratation, les cellules subissent un stress oxydatif lorsqu'elles se retrouvent en contact avec l'oxygène de l'air. Afin de déterminer si l'oxygène a une influence sur la mort bactérienne, la perte de cultivabilité de la souche EGD-e, une des souches les plus résistante au séchage (Résultats - Chapitre 1 : Diversité de résistance des souches de *L. monocytogenes* au stress hydrique), a été séchée sous gaz $N_2H_2CO_2$ dans du PBS non dégazé (oxygène dissout dans la solution) et dans du PBS dégazé (oxygène absent de la solution) pendant des séchages de 3 h et 16 h à 75% , 68% , 43% et 11% d'HR. La perte de cultivabilité a ensuite été comparée avec celle obtenue lors des séchages en présence d'oxygène. Ainsi, les conditions d'anaérobiose pendant le séchage de *L. monocytogenes* ont permis de déterminer si l'oxygène altère ou non la survie bactérienne et si des différences de survie pouvaient se présenter lorsque le milieu de séchage contient encore de l'oxygène (PBS non dégazé) ou non (PBS dégazé).

La perte de cultivabilité de la souche EGD-e en présence et en absence d'oxygène ne présente pas de différence significative lors d'une déshydratation de 3 h et 16 h à 75%, 68% et 11% d'HR (Figure 32). Lors d'un séchage à 43% d'HR, une légère diminution de la cultivabilité des bactéries dans du PBS dégazé en absence d'oxygène est observée passant d'une perte de 1,8 log et de 2,2 log en aérobie à 3,8 log et 3,5 log en anaérobiose à 3 h et 16 h respectivement.

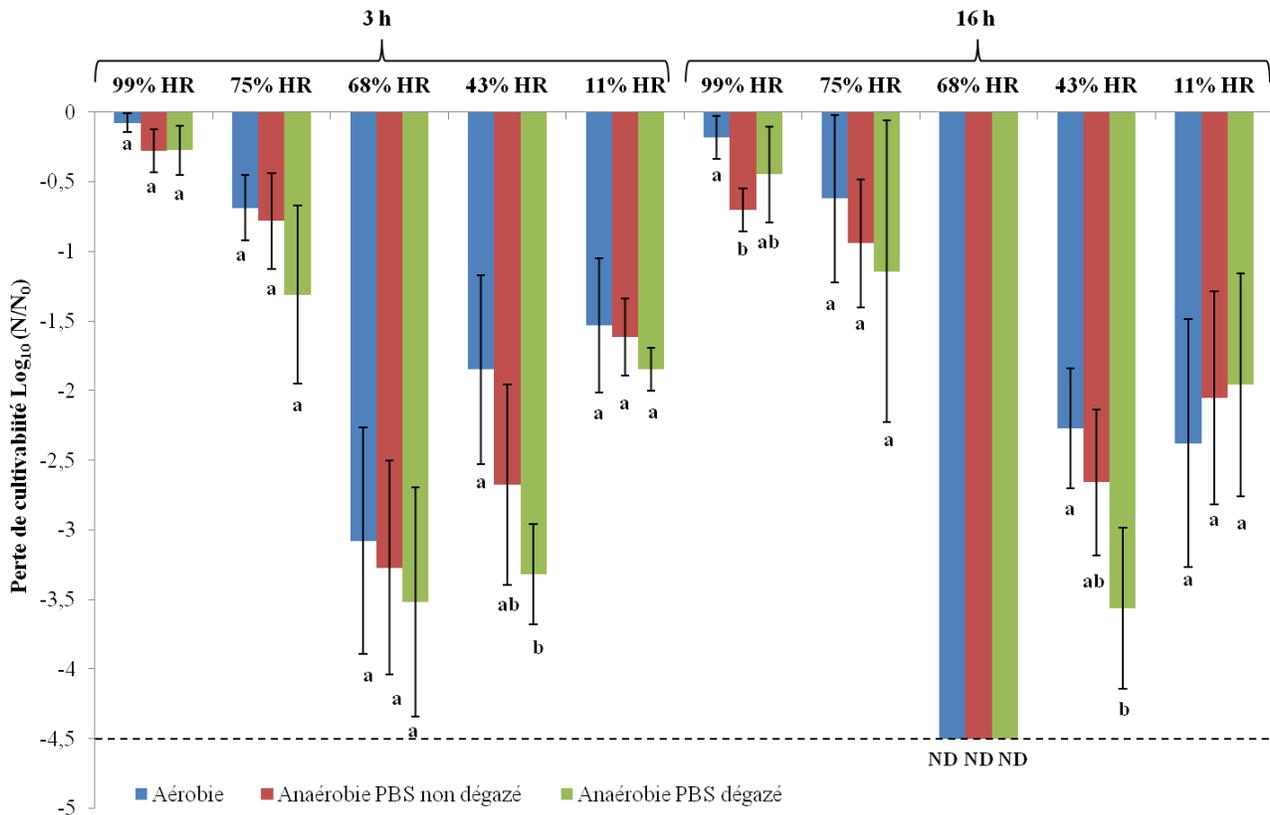


Figure 32 : Perte de cultivabilité de la souche de *L. monocytogenes* EGD-e séchée dans du PBS non dégazé et dégazé à 99%, 75%, 68%, 43% et 11% d'HR pendant 3 h et 16 h à 25 °C en présence d'oxygène (aérobie) et en absence d'oxygène (anaérobie) sous gaz N₂H₂CO₂ [85%, 5%, 10%]. Les barres d'erreur correspondent aux écarts-types calculés à partir de 3 répétitions indépendantes. Les pertes de cultivabilité bactérienne possédant des lettres différentes sont significativement différentes pour une condition d'HR et un temps de séchage donné (Tukey HSD; p < 0,05). ND (Non Détectable) représente la perte de cultivabilité sous la limite de détection de la méthode de dénombrement des cellules sur milieu gélosé (---).

L'absence de différence de perte de cultivabilité après séchage en présence et en absence d'oxygène révèle que la présence d'oxygène (et donc un possible stress oxydatif) n'a pas d'incidence sur la cultivabilité de *L. monocytogenes*. A 43% d'HR, l'anaérobie est plus délétère pour la survie bactérienne. A 68% d'HR, la présence d'oxygène ne semble pas non plus expliquer l'importante perte de cultivabilité à 16 h. Ceci révèle une condition d'instabilité à 68% d'HR qui n'est pas liée à une dégradation due à des phénomènes d'oxydation.

Ainsi, ces résultats suggèrent que la mortalité de *L. monocytogenes* pendant le séchage n'est pas liée au stress oxydatif mais plutôt à des dégâts structuraux qu'engendrent les fluctuations hydriques sur la membrane cellulaire.

3.3) Exploration par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier des structures cellulaires de *L. monocytogenes* au cours du séchage

La spectroscopie IRTF est une méthode directe permettant de visualiser les dommages cellulaires liés au séchage. Ceci n'est pas le cas avec les méthodes indirectes utilisées précédemment. En effet, l'étape de réhydratation a été nécessaire pour la mesure de la cultivabilité et l'évaluation de la perméabilisation membranaire par marquage à l'IP. Ces méthodes n'ont pas permis de rendre compte de l'état des cellules au cours du séchage. Cette technique nous a permis d'étudier l'évolution de la fluidité membranaire par analyse des groupements νCH_2 symétriques des acides gras des phospholipides, la structure secondaire des protéines cytoplasmiques et la structure de la paroi cellulaire composée principalement de peptidoglycane (Figure 33).

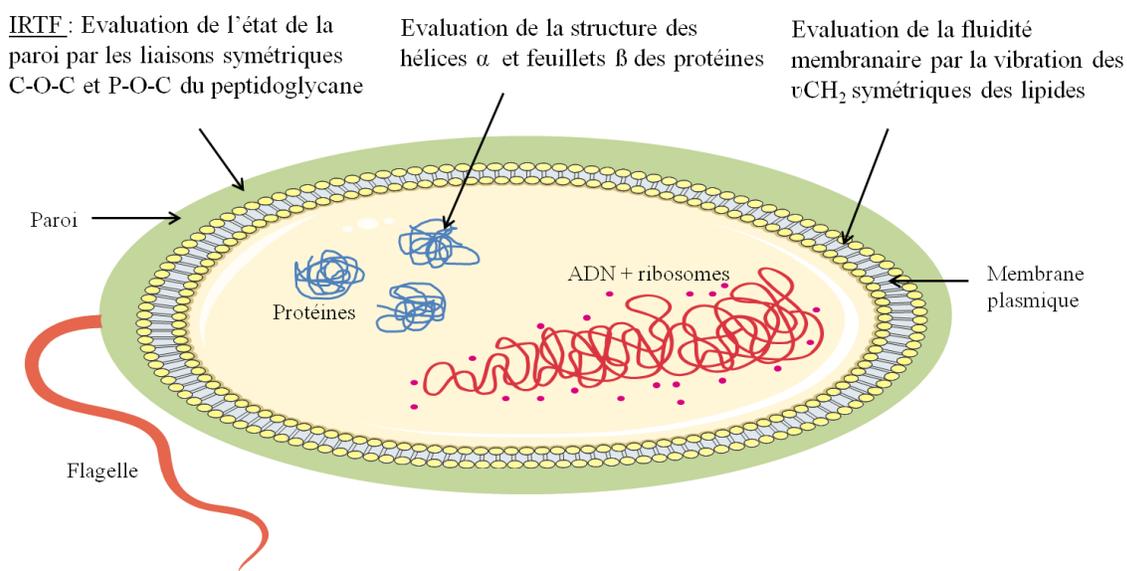


Figure 33 : Schéma des différentes structures bactériennes (membrane plasmique, protéines et paroi cellulaire) analysées en spectroscopie IRTF dans cette étude.

Afin d'étudier l'évolution de ces systèmes macromoléculaires en fonction de l'humidité relative et du temps, la souche de *L. monocytogenes* EGD-e a été séchée sur des pastilles de ZnSe à 75%, 68% et 43% HR pendant 3 h et 16 h et analysée par spectroscopie IRTF comme décrit dans la partie Matériels et Méthodes.

3.3.1) Effet du séchage sur la fluidité membranaire de *L. monocytogenes*

Lors d'un stress environnemental, les microorganismes modifient leur fluidité membranaire entraînant une régulation homéovisqueuse de la membrane. Par exemple, la levure *S. cerevisiae* et la bactérie *E. coli* diminuent leur fluidité membranaire dans un milieu hyperosmotique engendrant une rigidification de la membrane plasmique (Mille *et al.*, 2002; Simonin *et al.*, 2007a). En spectroscopie IRTF, le changement de la fluidité membranaire de *L. monocytogenes* a été analysé en comparant la fréquence de vibration des νCH_2 symétriques des phospholipides présents sur la membrane se situant autour de 2850 cm^{-1} à différentes conditions de séchage.

La fréquence des νCH_2 symétriques à 3 h de séchage est instable et les valeurs obtenues présentent de grands écarts-types qui ne permettent pas de mettre en évidence une variation de la fluidité membranaire au cours du séchage (Figure 34). Cette instabilité peut être due à la faible valeur du signal recueilli, elle-même liée aux très petites quantités d'échantillons sur la pastille de ZnSe. Ceci pourrait également s'expliquer biologiquement par des phénomènes de réorganisation membranaire produisant une instabilité de cette structure cellulaire pendant le séchage (Mille *et al.*, 2002; Laroche *et al.*, 2005)

Après 16 h de séchage, les écarts-types sont un peu plus faibles que le contrôle et la fréquence de vibration des CH_2 symétriques lors des différentes conditions de séchage a une tendance à diminuer par rapport au témoin. Ceci pourrait révéler une diminution de la fluidité membranaire et une organisation plus structurée des phospholipides de la membrane plasmique engendrant une rigidification (Mille *et al.*, 2002). Il n'y a pas de différence de fréquence des CH_2 symétriques entre les séchages à 75%, 68% et 43% d'HR. Cependant, il faudrait refaire les expériences pour confirmer cette tendance.

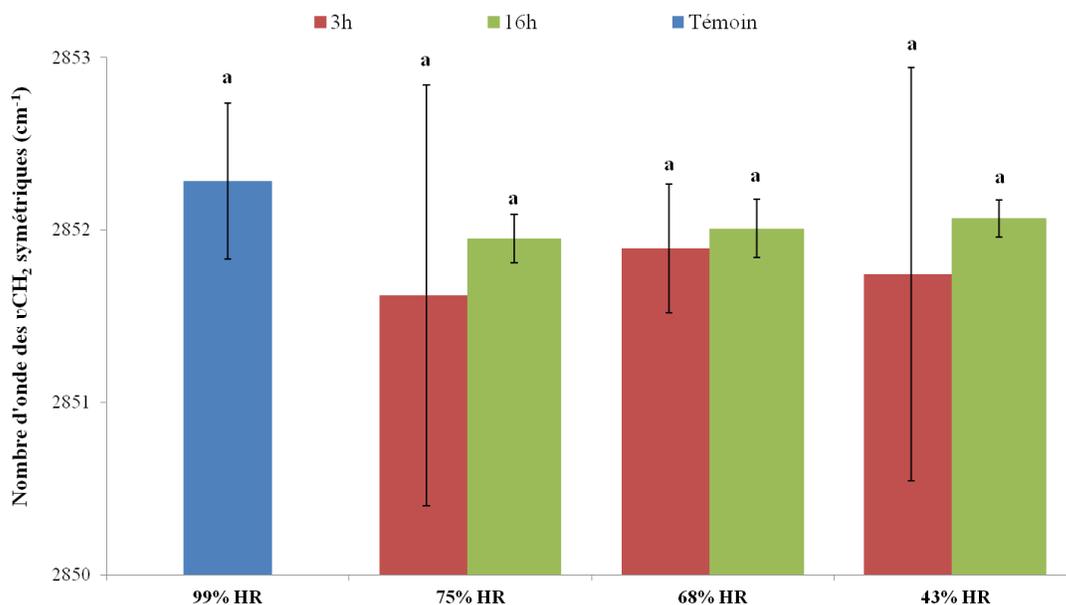


Figure 34 : Nombre d'ondes des νCH_2 symétriques des phospholipides membranaires analysée en spectroscopie IRTF sur la souche de *L. monocytogenes* EGD-e exposée à 75%, 68% et 43% d'HR pendant 3 h et 16 h à 25 °C sur des pastilles de ZnSe. Les fréquences possédant des lettres différentes sont significativement différentes (Tukey HSD; $p < 0,05$).

En conclusion, ces résultats ne révèlent pas de phénomènes structuraux majeurs sur la membrane de *L. monocytogenes* même si une tendance à la rigidification membranaire est observée après séchage aux différents niveaux d'HR comparés au contrôle. Il n'y a également pas de différence observée entre les conditions de séchage.

3.3.2) Effet du séchage sur l'ensemble des protéines de *L. monocytogenes*

L'analyse globale de la structure secondaire des protéines de la bande amide I a été réalisée par la comparaison des pics des spectres normalisés avec la bande tyrosine (1515 cm^{-1}) sur *L. monocytogenes* EGD-e séchée pendant 3 h et 16 h à 75%, 68% et 43% d'HR.

Sur chacun des spectres, la fréquence de vibration à 1650 cm^{-1} et 1632 cm^{-1} révèle la structure des hélices α et des feuilletts β de l'ensemble des protéines cellulaires (Figure 35). Ces pics apparaissent dans chacun des spectres que ce soit sur le spectre contrôle représentant la structure des protéines de la souche EGD-e non déshydratée et sur les spectres de la souche EGD-e séchée aux différentes HR. Par rapport au contrôle, les pics à 1650 cm^{-1} et 1632 cm^{-1} sont conservés dans chacune des conditions de séchage et aucun pic n'apparaît ni ne disparaît.

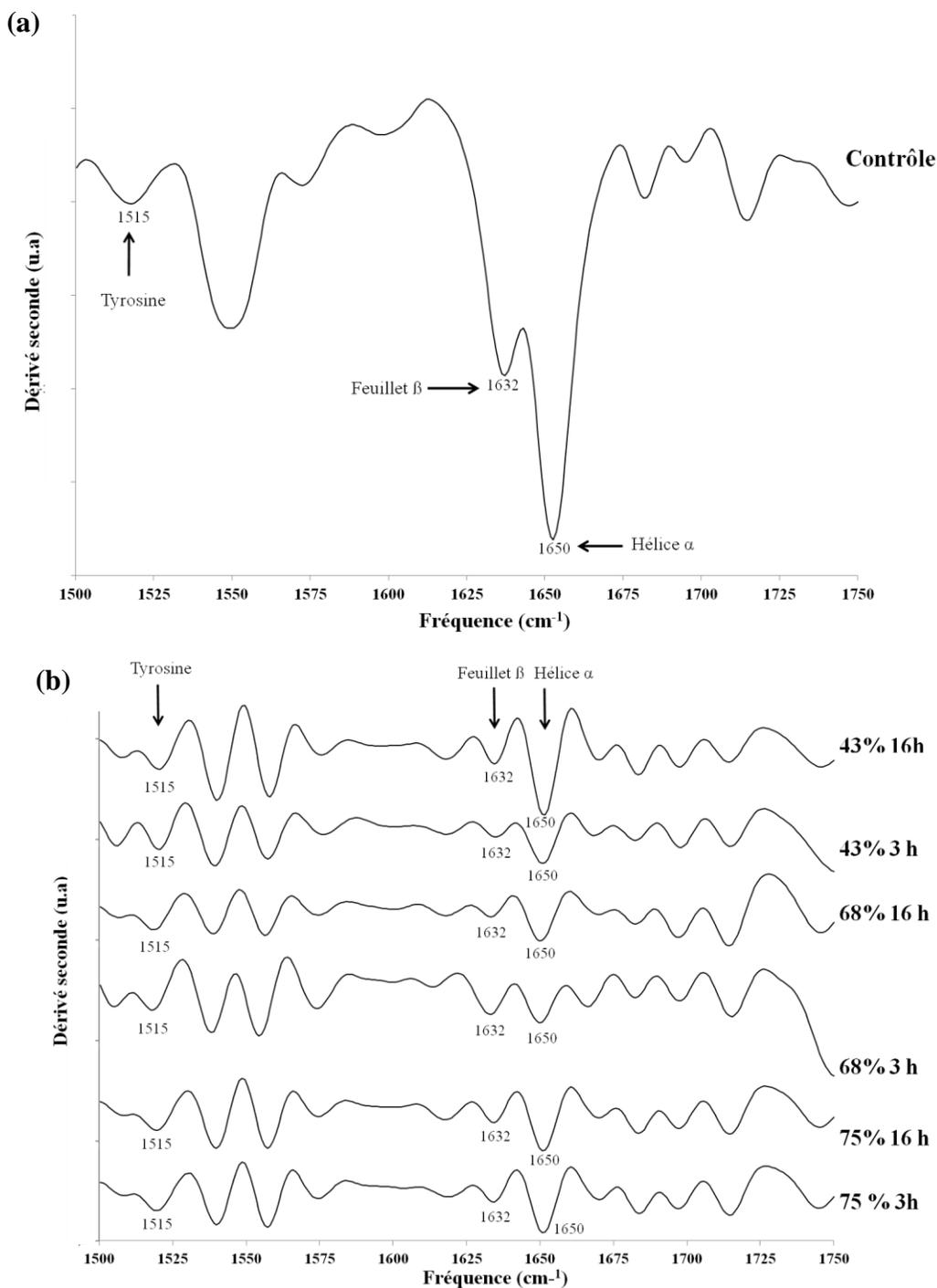


Figure 35 : Dérivés secondes des spectres de la structure secondaire des protéines de la bande amide I analysés en spectroscopie à IRTF de *L. monocytogenes* EGD-e non déshydratée (a) et séchée (b) à 75%, 68% et 43% pendant 3 h et 16 h à 25 °C sur une pastille de ZnSe. Les spectres ont été normalisés avec la bande de la tyrosine (1515 cm^{-1}). Les spectres correspondent à un spectre modèle choisi pour chaque condition.

Une étude a montré que l'apparition de pics à 1620 cm^{-1} en conditions de stress thermique sur la bactérie *E. coli* entraînait l'apparition d'un pic à 1620 cm^{-1} en raison des phénomènes d'agrégation protéique cellulaire (Guyot *et al.*, 2014). Aucune apparition de pic à cette fréquence n'a été observée dans ces expériences supposant qu'aucun phénomène d'agrégation ne se produit pendant la déshydratation de *L. monocytogenes*. Cependant, comme pour l'analyse des lipides, des répétitions d'expériences doivent être effectuées pour obtenir d'avantage de spectres exploitables et confirmer ces résultats.

3.3.3) Effet du séchage sur la paroi de *L. monocytogenes*

Afin d'évaluer l'état de la structure de la paroi cellulaire de *L. monocytogenes*, le nombre d'onde autour de 1052 cm^{-1} des liaisons symétriques C-O-C et P-O-C du peptidoglycane de *L. monocytogenes* EGD-e a été comparé aux différentes conditions de séchage testées (75%, 68% et 43% d'HR).

La fréquence de vibration des liaisons symétriques C-O-C et P-O-C a tendance à augmenter aux 3 conditions de séchages et plus fortement à 68% d'HR pouvant être révélateur d'une altération du peptidoglycane de la paroi cellulaire (Figure 36), comme déjà étudié par Kardas *et al.* (2014). La paroi est plus déstabilisée à 68% d'HR qu'à 43% supposant que 68% est une HR moins stabilisatrice pour les cellules qu'une HR plus basse. De plus, comparé au témoin, les fréquences de vibration augmentent fortement pour toutes les HR testées révélant que la déshydratation a un fort impact sur la paroi.

Cependant, ces valeurs ne sont pas répétables car elles montrent des grands écarts-types au niveau des fréquences des liaisons C-O-C et P-O-C. Comme pour les résultats précédents, le nombre de spectres exploitables devrait être augmenté et la spectroscopie en IRTF en mode ATR devrait être envisagée pour améliorer le signal.

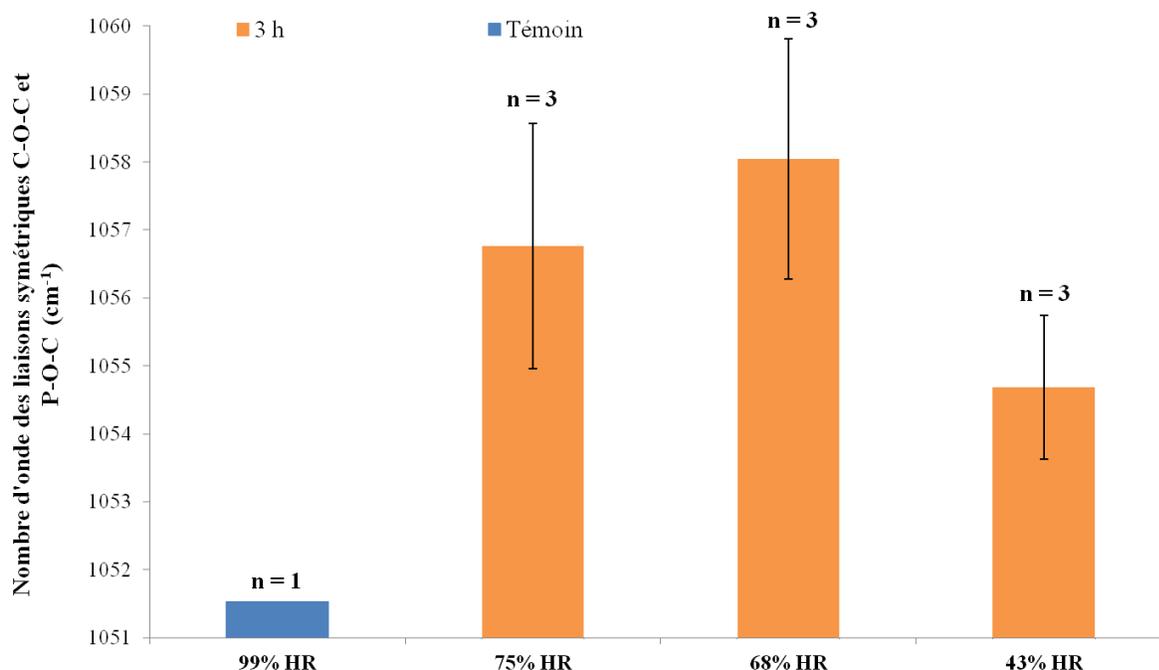


Figure 36 : Nombre d'onde des liaisons C-O-C et P-O-C symétriques du peptidoglycane de la paroi bactérienne analysée en spectroscopie à IRTF sur la souche de *L. monocytogenes* EGD-e exposée à 75%, 68% et 43% d'HR pendant 3 h à 25 °C sur des pastilles de ZnSe. La lettre *n* représente le nombre de spectres analysés pour évaluer la fréquence moyenne des liaisons C-O-C et P-O-C.

Tous les résultats obtenus en spectroscopie IRTF sont peu répétables et ne peuvent être correctement exploités sans une amélioration de la méthode utilisée. Ces expériences ont été réalisées en mode transmission, c'est-à-dire par le passage du faisceau infrarouge sur une partie de l'échantillon, dû aux contraintes des conditions de sécurité P2 imposées pour manipuler *L. monocytogenes*. Pour la suite, il peut être intéressant de refaire les expériences en mode ATR (*Attenuated Total Reflectance*). En effet, ce mode permet au faisceau infrarouge de « rebondir » à la surface de l'échantillon permettant d'analyser plusieurs points de l'échantillon afin d'améliorer la qualité du signal sur de faibles quantités de matière cellulaire. Ces expériences devront être réalisées en conditionnement P2 ce qui n'a pas été possible lors de cette étude, l'appareil se trouvant sur une plateforme d'imagerie (Dimacell) accessible à tous.

3.4) Observation de la morphologie de *L. monocytogenes* par Microscopie à Force Atomique au cours du séchage

3.4.1) Morphologie de *L. monocytogenes* après séchage à différents niveaux d'HR

Les observations en microscopie à force atomique de *L. monocytogenes* EGD-e séchée à différentes HR ont permis de visualiser la morphologie des bactéries après séchage, d'évaluer leur rugosité, l'élasticité de leur surface, leur dimension, la variation de leur volume cellulaire ainsi que l'excès de surface après séchage. En effet, lors du séchage, les cellules subissent des variations volumiques. Le rapport surface/volume augmente et un excès de surface apparaît. La mesure du volume bactérien a été calculée en considérant la bactérie comme un cylindre composé de deux demi-sphères à chaque extrémité.

La microscopie à force atomique permet d'observer les bactéries sans traitement de l'échantillon. En effet, les bactéries ont été directement visualisées après séchage sans réhydratation celles-ci n'ayant subi aucune préparation contrairement à d'autres types d'analyses microscopiques telles que la microscopie électronique à transmission ou la microscopie électronique à balayage.

Les bactéries incubées 3 h à 99% d'HR ont une forme de bacille avec une surface lisse et structurée (Figure 37). Sous toutes les conditions de séchage testées (75%, 68%, 43% et 11% d'HR) les bactéries sont entourées de cristaux de sel. Ceci est dû à la concentration en NaCl du PBS qui augmente pendant le séchage suite à l'évaporation de l'eau de l'échantillon. A 75%, 43% et 11% d'HR, les bactéries présentent une surface lisse et restent structurées même si quelques rugosités apparaissent sur les surfaces comparé à ce qui peut être observé sur les bactéries incubées à 99% d'HR. A 68% d'HR, les bactéries séchées ont un aspect différent des autres conditions. Elles ont une surface plate et sont déstructurées et déformées.

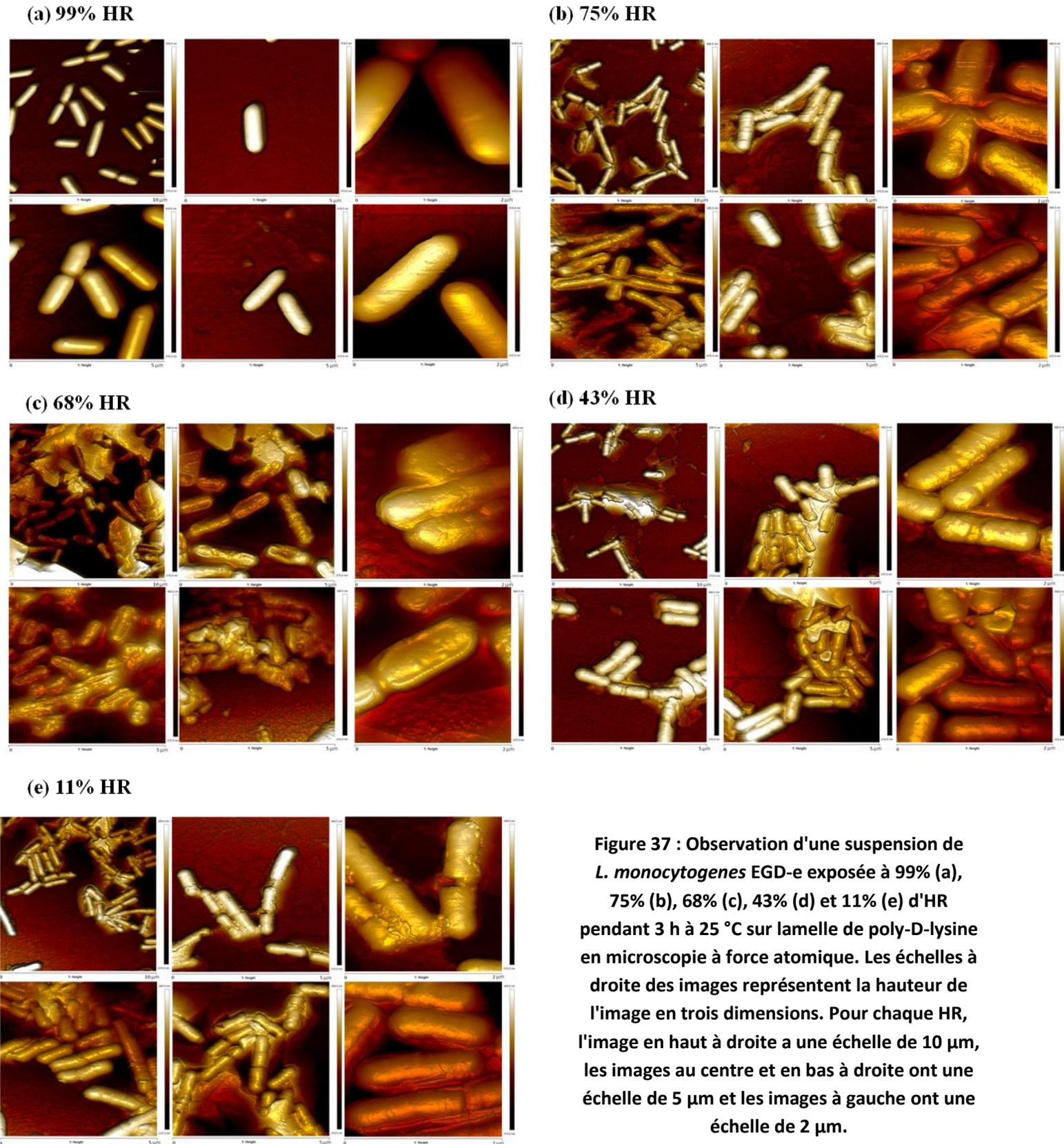


Figure 37 : Observation d'une suspension de *L. monocytogenes* EGD-e exposée à 99% (a), 75% (b), 68% (c), 43% (d) et 11% (e) d'HR pendant 3 h à 25 °C sur lamelle de poly-D-lysine en microscopie à force atomique. Les échelles à droite des images représentent la hauteur de l'image en trois dimensions. Pour chaque HR, l'image en haut à droite a une échelle de 10 μm , les images au centre et en bas à droite ont une échelle de 5 μm et les images à gauche ont une échelle de 2 μm .

Les bactéries exposées 3 h à 75%, 68%, 43% et 11% d'HR sont plus petites avec une diminution de leur longueur, largeur et hauteur comparé aux bactéries non séchées (incubées 3 h à 99% d'HR) (Tableau 11). Les bactéries perdent entre 0,36 et 0,58 μm de longueur, entre 157 et 243 nm de largeur et entre 173 et 232 nm de hauteur selon les différents niveaux d'HR. Cette diminution de taille des bactéries est due à une diminution du volume cellulaire.

En effet, le volume des cellules après séchage à 75%, 68%, 43% et 11% d'HR, respectivement, correspond à 35%, 37%, 32% et 27% du volume cellulaire initial estimé par rapport aux bactéries exposées à 99% d'HR (Tableau 11). Ainsi, si la surface initiale (mesurée à 99% d'HR) des bactéries était conservée et si cette dernière n'était pas compressible, les bactéries présenteraient un excès de surface de 48%, 45%, 51% et 56% impliquant l'apparition de déformations surfaciques (perte de l'aspect lisse initial).

Cet excès de surface et cette diminution du volume cellulaire constatés sont la cause des rugosités de surface observées sur les images obtenues en MFA (Figure 37). Malgré cela, les profils de surface des bactéries analysées montrent des surfaces bactériennes lisses à 75%, 43% et 11% d'HR. Au contraire à 68% d'HR, les profils de surface observés présentent des bactéries avec des surfaces rugueuses et plates (Tableau 11).

De plus, par rapport aux bactéries non séchées, les modules d'élasticité de la surface des bactéries séchées augmentent passant de 2,48 MPa sur les bactéries incubées à 99% d'HR à 152,63 MPa, 41,58 MPa, 26,73 MPa et 132,96 MPa à 75%, 68%, 43% et 11% d'HR, révélant une augmentation de la rigidité de la surface de *L. monocytogenes* à toutes les conditions de séchage testées (Tableau 11).

Tableau 11 : Caractéristiques morphologiques d'une suspension de *L. monocytogenes* EGD-e exposée à 99%, 75%, 68%, 43% et 11% d'HR pendant 3 h mesurées par analyse des images obtenues en microscopie à force atomique. La dimension, le volume, la surface et le module d'élasticité ont été obtenus par analyse de bactéries issues de trois cultures indépendantes. Les profils de surface représentent la surface des bactéries vue en coupe transversale. Chaque couleur représente la surface d'une bactérie.

HR (%)	Dimension bactérienne (Longueur, Largeur, Hauteur)	Volume cellulaire moyen et pourcentage par rapport au volume cellulaire initial	Surface moyenne et pourcentage de surface en excès	Profil de la surface bactérienne	Elasticité (Module d'Young)
99 %	Long: 1,78 μm ($\pm 0,33$) Larg : 653,08 nm ($\pm 121,27$) Haut : 555,56 nm ($\pm 18,48$)	0,45 μm^3 100%	3,38 μm^2 0%		2,48 MPa ($\pm 0,57$)
75%	Long : 1,38 μm ($\pm 0,47$) Larg : 433,09 nm ($\pm 76,24$) Haut : 375,30 nm ($\pm 32,60$)	0,15 μm^3 35,28%	1,75 μm^2 48,15%		152,63 MPa ($\pm 11,54$)
68%	Long: 1,42 μm ($\pm 0,37$) Larg : 495,27 nm ($\pm 67,13$) Haut : 323,38 nm ($\pm 59,14$)	0,16 μm^3 37,50%	1,83 μm^2 45,70%		41,58 MPa ($\pm 16,10$)
43%	Long : 1,32 μm ($\pm 0,12$) Larg : 409,50 nm ($\pm 31,94$) Haut : 382,16 nm ($\pm 7,98$)	0,14 μm^3 32,31%	1,64 μm^2 51,38%		26,73 MPa ($\pm 14,86$)
11%	Long : 1,20 μm ($\pm 0,30$) Larg : 426,12 nm ($\pm 58,86$) Haut : 345,62 nm ($\pm 67,46$)	0,12 μm^3 27,67%	1,45 μm^2 56,94 %		132,96 MPa ($\pm 29,28$)

Ainsi, une très forte diminution du volume cellulaire a été observée après séchage, avec des cellules possédant entre 27% et 37% du volume cellulaire initial moyen (Figure 43). A 75% et 68% le pourcentage du volume cellulaire initial atteint après séchage est similaire et une légère diminution est observée à 43% d'HR et à 11% d'HR où les cellules possèdent seulement 27% du volume cellulaire initial.

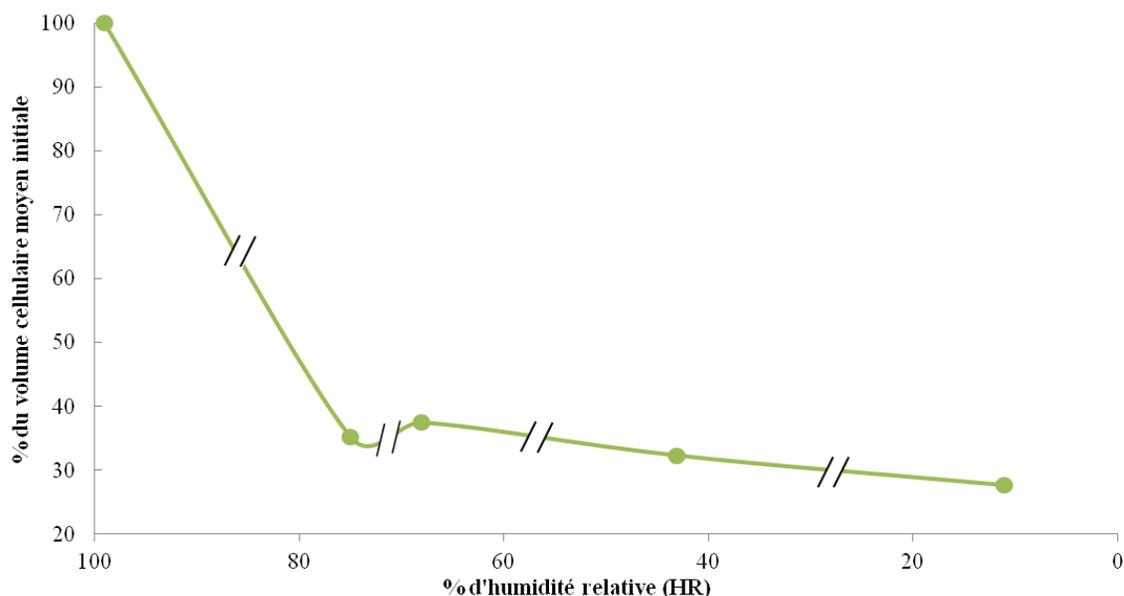


Figure 38 : Variation du volume cellulaire de *L. monocytogenes* EGD-e lors d'un séchage d'une suspension cellulaire pendant 3 h à 25 °C sous différentes conditions d'humidité relative (99%, 75%, 68%, 43% et 11%).

Ces résultats montrent une diminution du volume cellulaire de l'ordre de 62% à 82% lors de la déshydratation de *L. monocytogenes*. Le volume bactérien ayant diminué et le rapport surface/volume augmenté (dans l'hypothèse d'un maintien de la quantité de surface initiale), l'excès de surface au niveau des bactéries suppose un plissement de l'enveloppe cellulaire bactérienne. Ceci a déjà été montré chez la levure *S. cerevisiae* où des stress hyperosmotiques entraînent un plissement de la membrane sous certaines conditions (Dupont *et al.*, 2010). Les différentes images des bactéries séchées à 68% d'HR affichent des bactéries plus déstructurées et déformées montrant qu'à cette HR les bactéries subissent de plus importants dommages cellulaires. Ceci confirme les résultats précédents où à cette valeur d'HR, la perte de cultivabilité cellulaire est plus importante comparé aux autres conditions de séchage et une altération de la paroi de peptidoglycane a été observée en spectroscopie IRTF.

Les mesures du module d'Young permettent de déterminer l'élasticité de la surface bactérienne. Plus le module d'Young est grand, plus la surface est dite rigide. Dans notre étude, l'élasticité de surface de *L. monocytogenes* non séchée se trouve à une moyenne de 2,48 MPa (Figure 39).

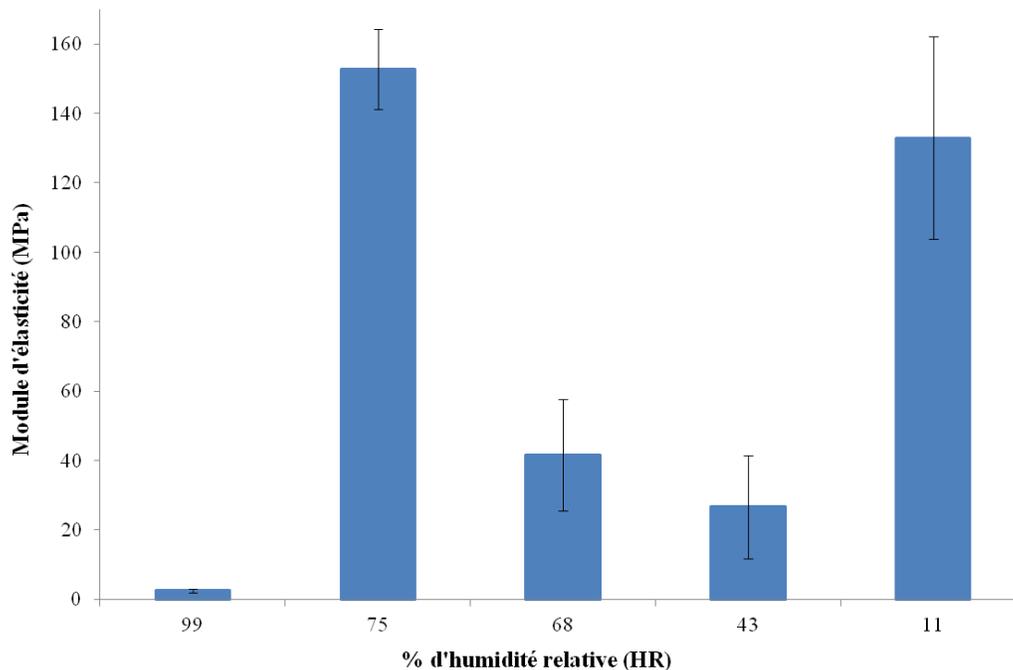


Figure 39 : Variation du module d'élasticité (Module d'Young) obtenus chez *L. monocytogenes* EGD-e séchée 3 h à 25 °C à différentes HR.

A 75% et 11% d'HR, l'élasticité est similaire entre les deux conditions et augmente fortement par rapport aux bactéries non séchées (152,63 et 132,96 MPa) correspondant à une forte rigidité de l'enveloppe cellulaire. A 75% d'HR, ce phénomène pourrait être dû à la contraction volumique des cellules et à la contraction de l'enveloppe cellulaire associée. A 11% d'HR, le séchage est à un niveau très bas entraînant une solidification de l'échantillon et probablement de la paroi bactérienne. Dans le cas des bactéries séchées à 68% et 43% d'HR, le module d'élasticité est plus élevé que celui des bactéries non séchées mais plus bas que celui des bactéries séchées à 75% et 11% d'HR. Ceci pourrait correspondre à un phénomène de relâchement de la paroi lors du séchage aux HR intermédiaires. Ce phénomène n'est pas facile à expliquer car on pourrait estimer que plus la valeur d'HR est basse, plus l'enveloppe cellulaire se

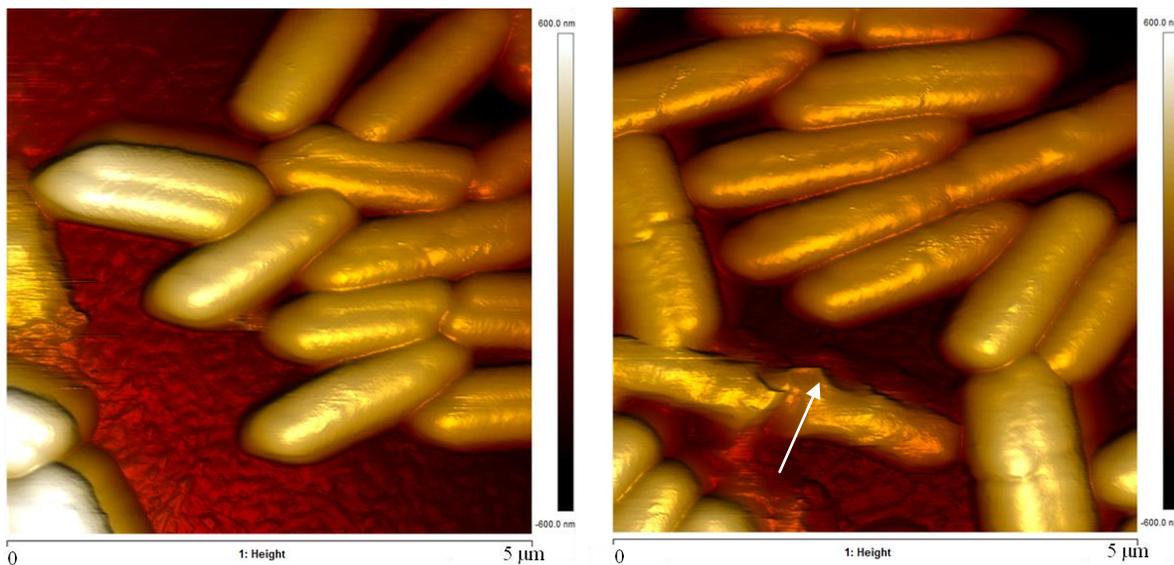
durcit pendant le séchage. Seules quelques hypothèses peuvent être émises : le phénomène pourrait par exemple être relié à l'évolution structurale du peptidoglycane observée en spectroscopie IRTF (Figure 36) ou encore, à un phénomène de perméabilisation membranaire corrélé au profil aplati de la surface observé à 68% d'HR qui n'a cependant pas été observé à 43% d'HR.

3.4.2) Morphologie de *L. monocytogenes* après réhydratation

La morphologie des bactéries après réhydratation instantanée a également été étudiée. Pour cela, les bactéries séchées à 68% d'HR et 11% d'HR sur les lamelles de poly-D-lysine ont été réhydratées instantanément par dépôt de 10 μ L de PBS sur la lamelle et observées en microscopie à force atomique.

Après un séchage de 11% d'HR suivi d'une réhydratation instantanée les bactéries retrouvent 118,81% de leur volume initial (Figure 40b). Les bactéries sont plus allongées que celles à 99% d'HR (Tableau 11) passant d'une longueur de 1,78 μ m à 2,43 μ m après un séchage à 11% d'HR suivi d'une réhydratation instantanée. Après réhydratation les bactéries retrouvent la même largeur et hauteur qu'à 99% d'HR. Elles ont également un volume cellulaire supérieur (0,53 μ m³) au volume mesuré à 99% d'HR (0,45 μ m³) (Tableau 11). L'observation microscopique montre également une bactérie complètement lysée présentant un aspect déstructuré, aplati et des rugosités en surface (Figure 40a - Flèche blanche).

(a) Séchage de la souche EGD-e à 11% d'HR suivi d'une réhydratation instantanée



(b)

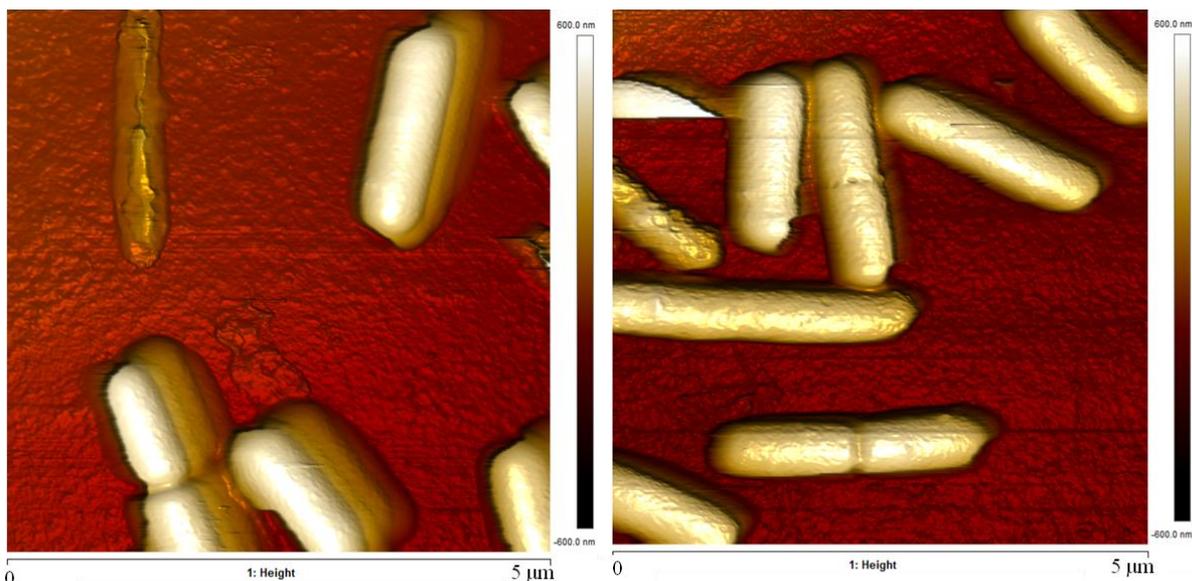
Dimension bactérienne			Volume cellulaire moyen	Pourcentage du volume cellulaire initial
Longueur (μm)	Largeur (nm)	Hauteur (nm)		
2,43 (± 0,51)	613 (±173,84)	490,63 (±85,62)	0,53 μm ³	118,81%

Figure 40 : (a) Observation d'une suspension de *L. monocytogenes* EGD-e séchée à 11% d'HR pendant 3 h à 25 °C et réhydratée instantanément sur lamelle de poly-D-lysine en microscopie à force atomique.

Les échelles à droite des images représentent la hauteur de l'image en trois dimensions. La flèche blanche présente une bactérie lysée (b) Caractéristiques morphologiques des bactéries séchées à 11% d'HR et réhydratées instantanément mesurées par analyse des images obtenues en microscopie. La dimension bactérienne et le volume cellulaire moyen ont été obtenus par analyse de bactéries issues de trois cultures indépendantes.

Après un traitement de 68% d'HR suivi d'une réhydratation rapide, les bactéries ne retrouvent seulement que 66,89% de leur volume initial (Figure 41b). Les dimensions des bactéries sont conservées au niveau de leur longueur et de leur hauteur mais elles sont moins larges que les bactéries incubées à 99% d'HR (Tableau 11). Les images montrent que certaines bactéries sont complètement lysées ou déstructurées avec des rugosités en surface (Figure 41a).

(a) Séchage de la souche EGD-e à 68% d'HR suivi d'une réhydratation instantanée



(b)

Dimension bactérienne			Volume cellulaire moyen	Pourcentage du volume cellulaire initial
Longueur (μm)	Largeur (nm)	Hauteur (nm)		
1,59 (± 0,33)	525,25 (±90,39)	515,90 (±87,85)	0,30 μm ³	66,89 %

Figure 41 : (a) Observation d'une suspension de *L. monocytogenes* EGD-e séchée à 68% d'HR pendant 3 h à 25 °C et réhydratée instantanément sur lamelle de poly-D-lysine en microscopie à force atomique.

Les échelles à droite des images représentent la hauteur de l'image en trois dimensions. (b) Caractéristiques morphologiques des bactéries séchées à 68% d'HR et réhydratées instantanément mesurées par analyse des images obtenues en microscopie. La dimension bactérienne et le volume cellulaire moyen a été obtenus par analyse de bactéries issues de trois cultures indépendantes.

Les analyses en MFA révèlent que les bactéries séchées à 11% d'HR et réhydratées rapidement récupèrent leur volume cellulaire initial qui peut être une caractéristique des cellules qui survivent au séchage et à la réhydratation. Au contraire, les bactéries séchées à 68% d'HR et réhydratées instantanément récupèrent seulement 66,89% de leur volume cellulaire initial suggérant que ces bactéries ont subi un phénomène de perméabilisation pendant le séchage et/ou la réhydratation et ne survivent pas à ces fluctuations.

4. Discussion

Au niveau cellulaire, trois contraintes sont impliquées dans la mort cellulaire provoquée par la déshydratation et la réhydratation et sont des contraintes mécanique, structurale et oxydative (Potts, 1994; Dupont *et al.*, 2014).

Les contraintes mécaniques appliquées aux cellules sont principalement le résultat d'un stress hyperosmotique que la cellule subit au début de la déshydratation par les flux d'eau transmembranaires. Lors de la déshydratation de *L. monocytogenes* aux HR testées (75%, 68%, 43% et 11% d'HR), une diminution du volume cellulaire de 60 à 70% a été observée avec des surfaces rugueuses laissant supposer que des plissements se forment au niveau de l'enveloppe cellulaire bactérienne. L'enveloppe bactérienne se durcit pendant l'étape initiale du séchage. Cette enveloppe se relâche si le séchage est stoppé aux HR intermédiaires de 68% et 43%. Le séchage à 11% d'HR conduit à la solidification des cellules. De plus, les analyses réalisées en spectroscopie IRTF ont révélé une tendance de *L. monocytogenes* à diminuer sa fluidité membranaire entraînant une rigidification de la membrane plasmique pouvant engendrer une lyse cellulaire (Laroche *et al.*, 2005; Simonin *et al.*, 2007a). D'un autre côté, une altération de la paroi à 75%, 43% et 68% d'HR a été évaluée en spectroscopie IRTF avec une plus importante altération du peptidoglycane à 68% d'HR pouvant expliquer l'incapacité des cellules à se réhydrater après séchage à cause des dommages subit sur la paroi.

Lorsque la cellule se retrouve en contact avec l'oxygène de l'air, elle subit un stress oxydatif (Billi et Potts, 2002; Dupont *et al.*, 2014). Cependant cette étude montre que l'oxydation n'est pas un phénomène majeur permettant d'induire la mort chez *L. monocytogenes*. En effet, les séchages réalisés en absence d'oxygène n'ont pas engendré de modification des taux de viabilité cellulaire. *L. monocytogenes* dispose toutefois de mécanismes antioxydants très efficaces pour résister à ce stress qu'elle rencontre souvent dans l'environnement et lors de son infection dans les macrophages et notamment la catalase et la superoxyde dismutase pouvant dégrader les ERO (Chapitre 2 de la synthèse bibliographique).

Ainsi, la mort de *L. monocytogenes* lors de la déshydratation puis de la réhydratation pourrait s'expliquer principalement par l'effet des contraintes mécaniques et structurales qu'induisent les fluctuations d'HR sur les cellules. Un schéma récapitulatif des processus potentiellement impliqués est proposé Figure 42.

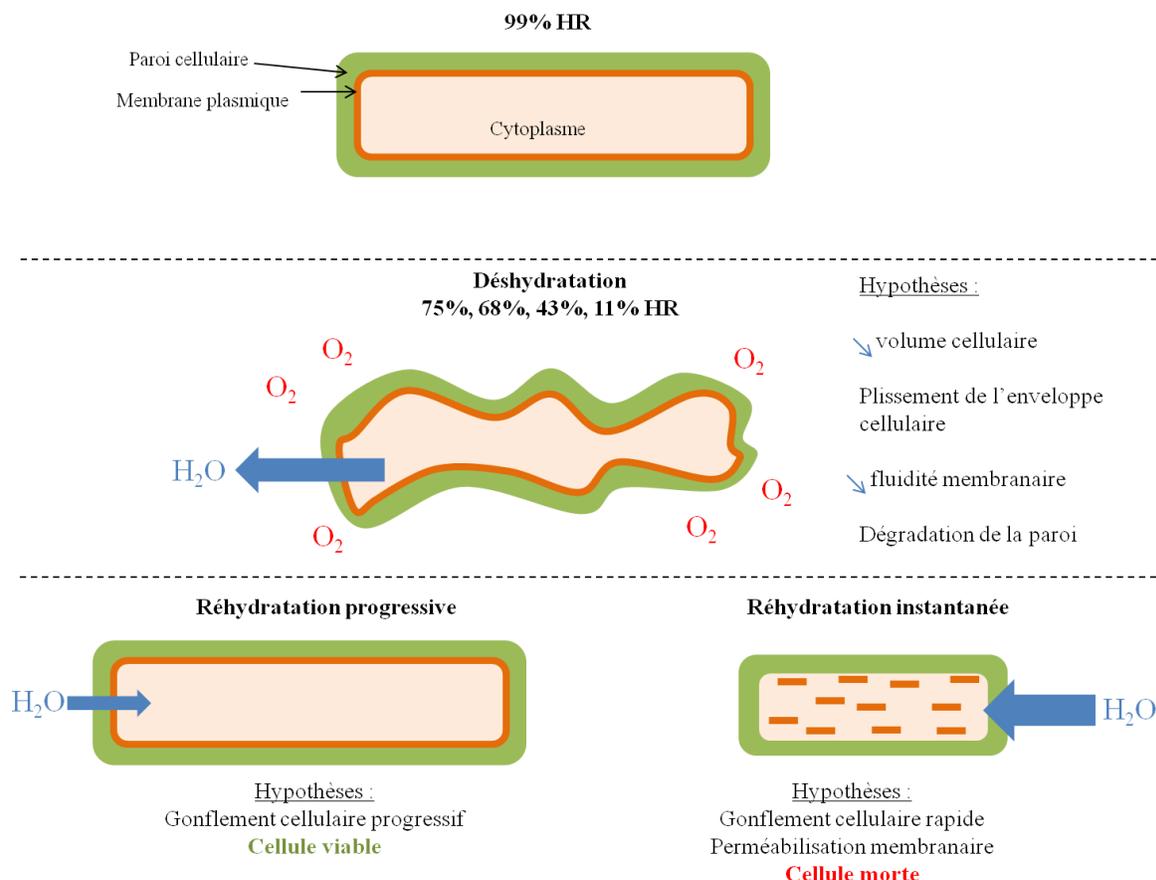


Figure 42 : Schéma des différentes hypothèses de la mort de *L. monocytogenes* au cours de la déshydratation et de la réhydratation.

La cinétique de réhydratation après la déshydratation peut permettre soit de récupérer des cellules vivantes soit d'engendrer la mort cellulaire. Des expériences en milieu liquide avec du glycérol ont démontré que pendant la déshydratation la membrane plasmique des cellules se plissait pouvant former des vésicules chez *E. coli* et *S. cerevisiae*. De plus, ces études ont montré que la réhydratation instantanée entraîne une lyse des cellules contrairement à une réhydratation progressive qui préserve la viabilité des cellules (Mille *et al.*, 2003; Simonin *et al.*, 2007b; Dupont *et al.*, 2010).

Les analyses de *L. monocytogenes* ayant subi une déshydratation en milieu aérien suggèrent les mêmes phénomènes que les études citées précédemment. La réhydratation entraîne une entrée d'eau à l'intérieur des cellules qui se traduit par un gonflement, comme observé en MFA. Ensuite, la membrane se perméabilise et se rompt après une réhydratation instantanée ou se maintient après une réhydratation progressive. Une étude sur le séchage aérien de *S. cerevisiae*

a révélé par microscopie à épifluorescence le même phénomène qu'en milieu liquide. La membrane est bien délimitée et conservée après un séchage suivi d'une réhydratation progressive tandis qu'une réhydratation instantanée décompose la membrane qui se disperse dans le cytoplasme (Lemétais *et al.*, 2012).

*Discussion
générale*

Au cours de ce projet, nous avons d'abord évalué la résistance de différentes souches de *L. monocytogenes* au stress hydrique afin de déterminer si différents caractères phénotypiques (sérotypage, niveau de virulence et origine des souches) pouvaient prédire son comportement face à ce stress. Cette étude a montré que, face au stress hydrique, *L. monocytogenes* a un comportement très variable selon les souches qui présentent différents niveaux de résistance. Le séchage des microorganismes à différentes HR a permis de définir les conditions optimales pour la destruction de *L. monocytogenes*. A la suite de ce travail exploratoire, les modifications physiologiques pendant la déshydratation et la réhydratation ont été examinées afin de mieux comprendre les phénomènes physiques engendrant la mort bactérienne. Dans cette discussion générale, des réponses aux questions posées initialement vont être apportées.

Existe-il des différences de résistance au stress hydrique des souches de *L. monocytogenes* ?

Cette étude a permis de démontrer que les souches de *L. monocytogenes* sont différemment résistantes au séchage et au stress hyperosmotique. Les souches présentant une sensibilité ou une résistance plus importante au séchage le sont aussi au stress hyperosmotique. Ceci met en évidence un lien entre la résistance de *L. monocytogenes* à ces deux types de stress. L'étude de Lemetais *et al.* (2012) a également montré que le stress hyperosmotique par le glycérol pouvait être prédictif de l'aptitude au séchage.

Malgré la diversité des souches étudiées, ni l'origine, ni la virulence, ni la comparaison *in silico* des séquences de 31 gènes impliqués dans la résistance au séchage n'ont pu expliquer la différence de comportement des souches. Seules les souches de sérotypage 1/2b sont classées dans la catégorie des souches les plus résistantes au séchage mettant peut être en lumière un caractère phénotypique spécifique de ces souches.

Etant donné que dans notre étude le nombre de souches analysées est trop faible pour en tirer des conclusions, cette expérimentation devrait être complétée en comparant des souches virulentes et hypovirulentes dans leur résistance au séchage. La réponse au stress peut être en lien avec la virulence de *L. monocytogenes* car une souche virulente semble mieux adaptée aux stress environnementaux. En effet, *L. monocytogenes* est confrontée à de nombreux stress lors de son infection dans l'hôte et est exposée à un stress osmotique de 0,3 mol/L de NaCl dans le tractus

gastro-intestinal de l'hôte (Sleator *et al.*, 2003a) et aux sels biliaires. De plus, lors de son internalisation dans les macrophages, la bactérie est exposée au "burst" oxydatif engendré par la cellule hôte qui produit des ERO pour la neutraliser. Une étude a montré que le transporteur de la carnitine de *L. monocytogenes* (soluté compatible de *L. monocytogenes*) lors du stress osmotique, permet également à la bactérie d'atteindre et de se multiplier dans le foie et la rate de son hôte (Wemekamp-Kamphuis *et al.*, 2002). Cependant, une étude comparant la résistance au stress osmotique de trois souches virulentes et avirulentes a montré aucune différence de résistance face au stress salin (Liu *et al.*, 2005). Ainsi, des études complémentaires sur la résistance des souches de *L. monocytogenes* au séchage pourraient compléter ces résultats par analyse d'un panel de souches encore plus important afin de réaliser des tests statistiques plus robustes.

L'analyse *in silico* des séquences de 31 gènes impliqués dans la résistance au séchage pour quatre souches différentes (EGD-e, SLCC2755, F2365 et LO28) a montré que ces gènes étaient très conservés entre les souches, ceci n'expliquant pas les différences de résistance observées. Le séquençage du génome entier d'un plus grand nombre de souches sensibles et résistantes au séchage pourrait être réalisé afin de comparer les génomes des différentes souches et d'identifier d'autres facteurs pouvant être impliqués dans la résistance.

Des études complémentaires effectuées par l'Anses et l'INRA, partenaire du projet EcoSec, visent à déterminer les profils transcriptomiques et protéomiques de la souche LO28 et EGD-e, souche la plus sensible et souche la plus résistante, respectivement, après séchage à une HR de 75% pendant 3 h. Ces études vont permettre de mettre en évidence les ARNm messagers transcrits et l'ensemble des protéines traduites pendant le séchage. Ainsi, ces méthodes vont permettre de confirmer ou d'infirmer l'expression de certains gènes. L'humidité relative sélectionnée est 75% car elle représente la condition induisant le moins de mortalité bactérienne afin de permettre la recherche de mécanismes mis en place par *L. monocytogenes* face au séchage.

Est-ce que les conditions de fluctuation de l'humidité relative peuvent affecter la survie de *L. monocytogenes* ?

Les fluctuations de l'humidité relative affectent la survie de *L. monocytogenes* et pourraient être exploitées dans un procédé permettant d'améliorer sa destruction. Le séchage sous

68% d'HR (parmi les quatre valeurs étudiées) représente la condition la plus létale pour la bactérie et des cycles de déshydratation/réhydratation amplifient le phénomène. Les expériences réalisées au cours de cette étude ont consisté à exposer une suspension de *L. monocytogenes* au séchage sous forme de goutte sur un coupon de polypropylène. Le polypropylène a été utilisé comme surface modèle car il est retrouvé dans les ateliers des industries agroalimentaires sur les surfaces de découpe, les réservoirs, les canalisations et sur certains accessoires (Oulahal *et al.*, 2008). *L. monocytogenes* a la capacité d'adhérer au polypropylène ainsi qu'à de nombreux matériaux retrouvés dans les ateliers de transformation des aliments (acier inoxydable, caoutchouc, PVC, polycarbonate, polyuréthane...) (Beresford *et al.*, 2001). Cependant, le polypropylène est le matériau où elle adhère le moins bien et n'a pas d'impact sur la viabilité bactérienne comparé aux autres (Silva *et al.*, 2008). Ainsi, il a été sélectionné dans notre étude car cette surface semblait la plus neutre générant le moins de biais (adhésion, perte de viabilité du au contact avec la surface) pour évaluer l'impact du séchage sur la survie des bactéries.

Au vu des résultats, l'étude de l'impact des fluctuations hydriques sur la survie de *L. monocytogenes* est pertinente sur les autres matériaux, afin de vérifier si la survie de *L. monocytogenes* est similaire à celle observée sur le polypropylène. Ceci permettrait ainsi d'avoir une vision globale de l'impact du séchage sur différentes surfaces des ateliers, comme par exemple sur des équipements en acier inoxydable ou sur des joints et tuyaux en caoutchouc.

Le but de notre étude était de développer une stratégie pour empêcher l'implantation de *L. monocytogenes* et éviter la formation de biofilms. Les biofilms, très fréquents dans l'industrie agroalimentaire, sont des amas structurés de cellules entourés d'une matrice polymérique extracellulaire attachée à une surface et sont très résistants aux stress environnementaux. . Les expérimentations de déshydratation dans cette étude ont été réalisées sur des cellules en suspension dans du PBS représentant l'impact du séchage sur la survie de cellules de *L. monocytogenes* qui n'ont pas encore adhéré sur les surfaces et ne sont pas persistantes dans l'atelier. Ainsi, il serait également intéressant de réaliser une étude complémentaire sur la survie des biofilms de *L. monocytogenes* à 68% d'HR, afin d'évaluer si la destruction bactérienne ne serait pas moins importante que sur des cellules planctoniques.

L'impact du séchage après nettoyage et désinfection de la surface sur des biofilms de *L. monocytogenes* a été testé par l'Anses pour le projet EcoSec. Sur d'autres matériaux comme l'acier inoxydable et la céramique, les résultats montrent qu'un séchage à 75% d'HR pendant 3 h à

25 °C, après une procédure de nettoyage et de désinfection, optimise les procédures d'hygiène. En effet, ils ont constaté une absence de *L. monocytogenes* sur les coupons séchés après une procédure de nettoyage et de désinfection, et une présence de *L. monocytogenes* sur les coupons nettoyés et désinfectés mais non séchés. Ce constat confirme que le séchage maîtrisé est une solution pour améliorer l'hygiène dans les ateliers des industries agroalimentaires.

Le PBS a été sélectionné comme milieu de séchage car il pouvait être représentatif d'un atelier appauvri en nutriments après nettoyage et désinfection des surfaces. Cependant, le milieu dans lequel sèche *L. monocytogenes* conditionne également sa survie. Les milieux nutritifs protègent *L. monocytogenes* et améliorent sa survie contrairement à un milieu sans nutriments (Vogel *et al.*, 2010). Ainsi dans notre étude, le PBS représente le milieu idéal pour détruire *L. monocytogenes*, alors que dans les ateliers industriels il existe des zones de rétention (fissures, coupures sur les surfaces...) difficiles à atteindre lors des procédures d'hygiène où des souillures alimentaires peuvent encore être présentes et expliquer la destruction difficile des bactéries protégées dans ces zones (Carpentier et Cerf, 2011).

La température est également à prendre en compte pour détruire les bactéries par le séchage car certains ateliers sont réfrigérés. En effet, *L. monocytogenes* résiste et croît à des températures minimales inférieures à 4 °C. Dans ces conditions, la bactérie met en place de nombreux systèmes de résistance au stress froid pouvant engendrer une protection croisée contre le stress hydrique ou osmotique (Pittman *et al.*, 2014).

Ainsi, des études complémentaires sur la survie de *L. monocytogenes* aux fluctuations hydriques devraient être réalisées sur différentes surfaces, dans différents milieux de séchage et à différentes températures permettant d'optimiser le séchage pour des conditions rencontrées dans l'industrie agroalimentaire par *L. monocytogenes*.

La réhydratation est-elle une étape importante dans la diminution de la survie de *L. monocytogenes* ?

Cette étude révèle qu'une réhydratation instantanée de *L. monocytogenes* améliore la mort cellulaire comparée à une réhydratation progressive. Un stress hypoosmotique lors d'une réhydratation instantanée dû à la rapide entrée d'eau dans la cellule engendre une perméabilisation membranaire. Dans les études évaluant la survie de *L. monocytogenes* à la

dessiccation, c'est une réhydratation instantanée par immersion des coupons dans une solution qui est généralement appliquée sur les cellules séchées (Vogel *et al.*, 2010; Hansen et Vogel, 2011; Hingston *et al.*, 2015; Huang *et al.*, 2015). Ceci montre que l'impact du séchage sur la survie est généralement surestimé car l'effet du mode de réhydratation n'est pas pris en compte. Cependant bien que négligée, la réhydratation est une étape obligatoire pour l'évaluation de la survie de microorganismes au séchage.

La réhydratation est une étape à prendre compte dans les ateliers des industries agroalimentaires car après avoir séché l'atelier, l'humidité relative ambiante, si elle n'est pas contrôlée, peut augmenter progressivement pendant la reprise de production et humidifier les surfaces. Ainsi, une persistance et une dissémination des cellules de *L. monocytogenes* présentes peuvent avoir lieu. D'autres bactéries pathogènes d'origine alimentaire retrouvées très fréquemment dans les produits alimentaires secs, telles que *S. enterica* et *Cronobacter sakazakii* présentent une diminution de 2 à 3 log de plus lors d'une réhydratation instantanée après un séchage à 11% d'HR comparé à une réhydratation très lente d'1h30 (Lang *et al.*, 2016) (Publication présentée en annexe). Ces résultats montrent que la survie des bactéries après un séchage est fortement corrélée avec le mode de réhydratation et que ce paramètre devrait être davantage pris en compte pour évaluer la charge microbienne d'une surface ou d'un produit sec. En effet, la présence de pathogènes est sous-évaluée à cause des protocoles de réhydratation rapide et peut engendrer un important risque sanitaire.

Quelles sont les effets de la déshydratation sur la structure cellulaire de *L. monocytogenes* ?

L'analyse de la déshydratation sans prendre en compte la réhydratation est compliquée car peu de techniques permettent l'étude de la matière sèche sur du matériel biologique. La microscopie à force atomique et la spectroscopie IRTF sont deux techniques utilisées au cours de ce travail, qui ont permis d'analyser des échantillons biologiques à l'état sec sans nécessité de traitement après le séchage. La microscopie électronique à transmission et à balayage présentaient le risque d'endommager les cellules et de produire des artefacts sur les bactéries séchées. Les autres outils comme la cytométrie en flux et la mesure de la cultivabilité bactérienne demandent obligatoirement une réhydratation qui a un impact sur la viabilité cellulaire.

Ces deux techniques ont permis de mettre en évidence que le stress mécanique dû au stress osmotique engendré par le séchage est l'une des premières causes de mortalité de *L. monocytogenes*. La MFA est souvent utilisée pour analyser la morphologie et la structure des bactéries comme l'architecture de la paroi cellulaire, les interactions surface-cellules et les modifications de la paroi cellulaire suite à des changements environnementaux (Dorobantu *et al.*, 2012; Dufrière, 2014). Cette technique permet d'analyser des cellules vivantes car elles ne sont pas dénaturées, fixées, colorées et peuvent être observées dans leurs conditions physiologiques. Lors de la déshydratation aux HR testées une contraction du volume cellulaire due à la sortie d'eau intracellulaire a été observée sur *L. monocytogenes*. Les bactéries ont une surface hétérogène présentant des rugosités indiquant un plissement de l'enveloppe cellulaire. Les bactéries séchées à 68% d'HR ont un aspect plus particulier car elles sont plus plates et beaucoup plus déformées qu'aux autres HR. De plus, les bactéries ne retrouvent pas leur volume cellulaire initial après réhydratation, ce qui laisse supposer qu'elles ont subi d'importants dégâts pendant le séchage et se sont lysées lorsque le processus de séchage est stoppé à cette valeur d'HR. Des expériences de spectroscopie en IRTF et MFA menées sur *Lactobacillus helveticus* après séchage ont également conduit à ces observations (Santivarangkna *et al.*, 2007).

Le module d'Young sur des cellules individuelles permet de mesurer quantitativement l'élasticité et la dureté de la cellule (Webb *et al.*, 2011). Par exemple, une étude réalisée sur *E. coli* a montré une diminution de la rigidité de sa surface après l'infection par un bactériophage (Chen *et al.*, 2009b). Dans nos travaux, la mesure du module d'Young montre un durcissement de la paroi cellulaire à toutes les HR avec une rigidification plus importante à 75% et 11% d'HR. Ceci peut être expliqué par la contraction osmotique puis par la solidification due au retrait d'eau très important à 11%. D'autre part, ces deux HR sont les traitements les moins délétères pour les cellules et une forte rigidification de la paroi cellulaire pourrait ainsi expliquer la survie plus importante. Un durcissement de la paroi pourrait protéger les cellules de la rupture de l'enveloppe cellulaire.

Ces résultats seraient à mettre en lien avec les études transcriptomique et protéomique réalisées par l'Anses et l'INRA qui pourront déterminer si la transcription d'un gène ou la traduction d'une protéine de la paroi cellulaire pourrait expliquer cette rigidification. Les résultats en spectroscopie IRTF montrent également une tendance de la membrane à se rigidifier pouvant entraîner des dommages membranaires et une perméabilisation selon le niveau d'hydratation

(Simonin *et al.*, 2007a). Aucune agrégation protéique n'a été observée, alors que le séchage est connu pour endommager la structure des protéines (Potts, 1994). Une altération du peptidoglycane à 68% d'HR a pu être mise en évidence. Ces résultats corrélerent avec l'observation des bactéries en MFA où les cellules semblent complètement déstructurées et lysées. Cependant les expériences en spectroscopie IRTF devraient être de nouveau réalisées en mode ATR pour obtenir de meilleurs signaux et des spectres plus exploitables sur *L. monocytogenes*.

En complément de cette étude, la fluidité membranaire pourrait être analysée sur des liposomes fabriqués avec des lipides extraits de la membrane de *L. monocytogenes*, afin de mesurer plus précisément l'impact structural du séchage sur sa membrane. Il serait également intéressant de réaliser une analyse lipidomique sur *L. monocytogenes* avant et après séchage afin de déterminer les changements membranaires à l'origine de la mort ou de l'adaptation de la bactérie au séchage. Enfin, pour mieux comprendre les différences entre les souches, ces expériences devraient être aussi conduites sur la souche LO28 et EGD-e, afin de comparer les différences physiologiques entre une souche sensible et une souche résistante.

L'oxydation joue-elle un rôle dans la diminution de la survie de *L. monocytogenes* pendant le séchage ?

Bien que le séchage induise fréquemment un stress oxydatif conduisant à la formation d'ERO chez les microorganismes provoquant des dommages sur les lipides, les protéines et l'ADN (França *et al.*, 2007), le séchage en absence d'oxygène de *L. monocytogenes* n'a pas amélioré la survie des bactéries comparé à un séchage en aérobiose. Bien que ces phénomènes d'oxydation n'aient pas pu être mis en évidence sur la survie bactérienne, il n'est pas exclu que le séchage induise tout de même la production d'ERO intracellulaires, qui est contrée par *L. monocytogenes* grâce à la catalase et la superoxyde dismutase. Il existe des sondes fluorescentes permettant de déceler la production d'ERO dans les cellules par cytométrie en flux. Certaines ont été testées au cours de cette thèse pour analyser la production d'ERO intracellulaires lors du séchage de *L. monocytogenes*. Cependant, aucune des différentes sondes utilisées sur la bactérie n'a pu conduire à un protocole et des expériences fiables pour répondre à cette question. Ainsi, la poursuite de cette piste de recherche pour analyser l'oxydation pendant le séchage de *L. monocytogenes* pourrait être envisagée. De plus, la présence de lipides peroxydés

chez *L. monocytogenes* exposées à la déshydratation pourrait également être examinée par analyse lipidomique.

Application de fluctuations d'humidité relatives dans les industries agroalimentaires

Ces études ont pour but d'empêcher la persistance de *L. monocytogenes* dans les ateliers des industries agroalimentaires en maîtrisant l'humidité relative de l'air et en diminuant l'utilisation d'eau et de désinfectants. Dans les ateliers réfrigérés, l'HR de 68% est une condition applicable après nettoyage et désinfection, mais une diminution de l'HR en dessous de 65% serait difficile à atteindre. Cependant, il est possible d'atteindre des HR de moins de 50% dans les ateliers à température ambiante. Ainsi, la survie de *L. monocytogenes* à des HR entre 60 et 50% pourrait être testée pour évaluer la destruction bactérienne dans ce type d'atelier.

Afin d'optimiser le séchage dans les ateliers où l'eau est omniprésente et sert à rincer les surfaces, il a fallu au cours de ce projet évaluer l'influence des cinétiques de séchage d'une goutte d'eau sur différentes surfaces d'un atelier (sol, mur, équipements). En effet, des travaux menés par IRSTEA, partenaire du projet EcoSec, ont montré que la quantité d'eau était plus importante au sol et sur les équipements avant séchage, et que la cinétique de séchage n'était pas la même selon la nature du milieu liquide (jus de saumon ou eau distillée). Leur étude a montré qu'une goutte d'eau distillée sèche complètement après 3 h 40, alors qu'une goutte de jus de saumon sèche au bout de 2 h 50 à 11% d'HR grâce à une plus basse tension interfaciale. Ainsi le séchage de l'atelier doit être optimisé afin que toutes les surfaces puissent être complètement sèches. Dans ces travaux, l'étude des cinétiques de séchage des suspensions cellulaires et de la survie de *L. monocytogenes* a révélé que la diminution de la survie était corrélée à l'évaporation de l'eau de la goutte. Une fois la goutte séchée à son maximum, la survie reste constante. Ainsi, l'évaporation de l'eau pendant le séchage est primordiale pour détruire *L. monocytogenes* excepté à 68% d'HR où la destruction bactérienne est continue au cours du temps.

Il est difficile de maîtriser l'humidité relative dans toutes les zones de l'atelier, l'étude d'IRSTEA au cours de ce projet a montré que même avec un déshumidificateur de 60 à 70% d'HR, l'eau peut rester après séchage sur l'équipement et certains recoins du sol. Ceci est dû à une mauvaise évacuation de l'eau ou à une faible vitesse de l'air. De plus, la température est un paramètre à prendre en compte car elle accélère le séchage à plus haute température. Ainsi l'HR,

la ventilation et l'apport de chaleur influencent l'évaporation de l'eau et par conséquent influence la survie de *L. monocytogenes*. Tous ces facteurs peuvent rendre difficile l'application de cycles de déshydratation/réhydratation, il peut être difficile de réguler rapidement l'HR si l'atelier présente des gros volumes. Cependant, des essais avec un déshumidificateur (60 à 70% d'HR) dans un atelier a permis d'améliorer l'efficacité et la durée du séchage. En reliant les cinétiques de survie de *L. monocytogenes* aux différentes HR et un modèle prédictif de séchage d'un atelier par un déshumidificateur, IRSTEA a montré que le séchage et l'inactivation microbienne sont 1,5 fois plus rapides.

Ainsi, la déshumidification de l'air, quand elle est maîtrisée, optimise la destruction de *L. monocytogenes* et améliore le séchage des surfaces des ateliers. Une étude réalisée par deux partenaires industriels du projet, MF Conseil et Dessica, a montré que trois techniques étaient intéressantes pour améliorer le séchage dans les industries dont les roues dessicantes présentant un coût énergétique réduit et une installation simple dans les ateliers.

Conclusion et perspectives

Ce travail de thèse a permis d'évaluer l'impact des fluctuations hydriques pour diminuer la survie d'un microorganisme pathogène, *L. monocytogenes*, et de comprendre les mécanismes physiologiques impliqués dans la survie ou la mort de cette bactérie afin de pouvoir améliorer la décontamination des surfaces dans les ateliers des industries agroalimentaires.

Nous avons déterminé que les souches de *L. monocytogenes* n'ont pas toutes le même comportement au séchage et que certaines, plus résistantes, pourraient persister dans les ateliers. En maîtrisant les fluctuations hydriques, il est possible d'obtenir une forte mortalité bactérienne même avec les souches les plus résistantes au séchage. L'HR est par conséquent un facteur efficace pour diminuer la survie de *L. monocytogenes* déposée sur une surface inerte. La mort bactérienne est principalement provoquée par l'exposition des bactéries à des HR intermédiaires sur des périodes prolongées engendrant une instabilité structurale et la mort cellulaire. Ainsi, ces travaux ont montré que les contraintes mécanique et structurale, induites par le stress osmotique pendant le séchage sont les plus importantes pour la mortalité de *L. monocytogenes*. Ces travaux ont également montré que l'enveloppe cellulaire, comprenant la membrane et la paroi, est la principale structure subissant des dommages chez *L. monocytogenes* après séchage, pouvant également expliquer les différences de survie entre les souches et les espèces bactériennes. En effet, dans notre étude, les souches de *L. monocytogenes* présentent une différence de résistance au séchage et ceci pourrait être le reflet de l'existence de différences structurales et de différentes propriétés de surface entre les souches au niveau de la paroi et de la membrane. De plus, des études complémentaires réalisées en présence de nutriments pourraient favoriser le métabolisme énergétique bactérien et ainsi permettre d'étudier les voies mises en place par les bactéries pour résister aux différentes HR.

En conclusion, les fluctuations de l'humidité relative sont efficaces pour améliorer l'hygiène des surfaces en industrie agroalimentaire et ont un fort potentiel de destruction cellulaire sur *L. monocytogenes* lorsqu'elles sont maîtrisées. Par ailleurs, l'ajout d'une étape de séchage en condition contrôlée après les procédures de nettoyage et de désinfection a permis d'améliorer la destruction de *L. monocytogenes* (Anses). Les fluctuations de l'HR générées à petite échelle dans ce travail ont pu être transposées avec succès à plus grande échelle (IRSTEA, Dessica, MF Conseil, Labeyrie). Ainsi, l'humidité relative est un paramètre clé pour contrôler les populations de microorganismes. Cependant, l'impact des fluctuations hydriques devrait aussi

être étudié sur d'autres microorganismes pathogènes et d'altération présents dans l'industrie agroalimentaire. L'existence d'une HR entraînant une forte mortalité cellulaire spécifique à chaque espèce n'est pas exclue. Il est possible que 68% d'HR ne soit pas la condition optimale pour détruire chaque microorganisme. Certains sont plus adaptés à des a_w faibles. Par exemple, les moisissures ont la capacité de se multiplier à une a_w minimum de 0,80 et les bactéries sporulantes comme *Clostridium* et *Bacillus* sont très résistantes aux stress environnementaux. D'autres microorganismes, comme les moisissures xérophiles et les levures osmophiles, peuvent croître à des a_w minimales de 0,65 et 0,60 et peuvent également poser des problèmes d'altération des produits alimentaires. Des HR plus faibles pourraient alors être nécessaires pour les détruire. Tous les microorganismes évoluent en fonction de leur environnement et s'adaptent au stress auquel ils sont exposés. Par ailleurs, des questions se posent sur l'efficacité à long terme de cette méthode car l'application fréquente de cycle de déshydratation et réhydratation pourrait aussi sélectionner naturellement des souches résistantes à ces stress ou permettre une adaptation.

Ce travail est complémentaire des travaux réalisés par les différents partenaires du projet EcoSec qui ont permis d'appréhender l'impact de la fréquence de désinfection couplé à un séchage sur la survie et la persistance de *L. monocytogenes* ainsi que de comprendre les phénomènes adaptatifs au séchage par des études transcriptomique et protéomique. Au niveau de l'optimisation du procédé de déshumidification IRSTEAM, Dessica et MF Conseil ont travaillé sur le développement d'un outil numérique de prévision des zones chaudes/humides dans une enceinte à grand volume et recherché les procédés de déshumidification d'air les plus économes en énergie. Ce procédé sera ensuite validé dans un atelier avec la contribution du partenaire industriel du projet (Groupe Labeyrie).

Par la suite, ces travaux pourront permettre de mieux comprendre le comportement des microorganismes aux fluctuations hydriques et de considérer l'humidité relative comme un facteur à prendre compte pour améliorer l'hygiène. De plus, l'HR pourrait permettre, une fois maîtrisée, de réduire l'impact environnemental des opérations d'hygiène par la diminution de la consommation d'eau, d'énergie et de biocides améliorant les conditions de travail des opérateurs.

Ce travail peut inciter à contrôler l'HR dans d'autres environnements et notamment dans les hôpitaux où les infections nosocomiales, dues fréquemment à *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*, sont de plus en plus fréquentes à cause de l'émergence de

microorganismes multi-résistants aux antibiotiques, désinfectants et antiseptiques. Cette méthode pourrait permettre d'améliorer la destruction de microorganismes persistants se trouvant dans les chambres, les blocs opératoires et ainsi de lutter contre les infections nosocomiales.

*Références
bibliographiques*

- Abadias, M., Usall, J., Anguera, M., Solsona, C., et Viñas, I. (2008) Microbiological quality of fresh, minimally-processed fruit et vegetables, and sprouts from retail establishments. *Int. J. Food Microbiol.* **123**: 121–129.
- Abram, F., Su, W.L., Wiedmann, M., Boor, K.J., Coote, P., Botting, C., et al. (2008) Proteomic analyses of a *Listeria monocytogenes* mutant lacking σ^B identify new components of σ^B regulon and highlight a role for σ^B in the utilization of glycerol. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**: 594–604.
- Ajouz, B., Berrier, C., Garrigues, A., Besnard, M., et Ghazi, A. (1998) Release of thioredoxin via the mechanosensitive channel MscL during osmotic downshock of *Escherichia coli* cells. *J. Biol. Chem.* **273**: 26670–26674.
- Angelidis, A.S., Smith, L.T., Hoffman, L.M., et Smith, G.M. (2002) Identification of OpuC as a chill-activated and osmotically activated carnitine transporter in *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 2644–2650.
- Annous, B.A., Becker, L.A., Bayles, D.O., Labeda, D.P., et Wilkinson, B.J. (1997) Critical role of anteiso-C15:0 fatty acid in the growth of *Listeria monocytogenes* at low temperatures. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 3887–3894.
- Archambaud, C., Nahori, M.-A., Pizarro-Cerda, J., Cossart, P., et Dussurget, O. (2006) Control of *Listeria* superoxide dismutase by phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **281**: 31812–31822.
- Augustin, M., Ali-Vehmas, T., et Atroshi, F. (2004) Assessment of enzymatic cleaning agents and disinfectants against bacterial biofilms. *J. Pharm. Pharm. Sci.* **7**: 55–64.
- Aureli, P., Fiorucci, G.C., Caroli, D., Marchiaro, G., Novara, O., Leone, L., et Salmaso, S. (2000) An outbreak of febrile gastroenteritis associated with corn contaminated by *Listeria monocytogenes*. *New Engl. J. Med.* **342**: 1236–1241.
- Autio, T., Keto-Timonen, R., Lundén, J., Björkroth, J., et Korkeala, H. (2003) Characterisation of persistent and sporadic *Listeria monocytogenes* strains by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) and amplified fragment length polymorphism (AFLP). *Syst. Appl. Microbiol.* **26**: 539–545.
- Azizoglu, R.O. et Kathariou, S. (2010) Temperature-dependent requirement for catalase in aerobic growth of *Listeria monocytogenes* F2365. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**: 6998–7003.
- den Bakker, H.C., Warchocki, S., Wright, E.M., Allred, A.F., Ahlstrom, C., Manuel, C.S., et al. (2014) *Listeria floridensis* sp. nov., *Listeria aquatica* sp. nov., *Listeria cornellensis* sp. nov.,

- Listeria riparia* sp. nov. and *Listeria grandensis* sp. nov., from agricultural and natural environments. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **64**: 1882–1889.
- Ball, P. (2008) Water as an active constituent in cell biology. *Chem. Rev.* **108**: 74–108.
- Ballal, A., Basu, B., et Apte, S.K. (2007) The Kdp-ATPase system and its regulation. *J. Biosci.* **32**: 559–568.
- Ban, G.-H., Yoon, H., et Kang, D.-H. (2014) A comparison of saturated steam and superheated steam for inactivation of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium, and *Listeria monocytogenes* biofilms on polyvinyl chloride and stainless steel. *Food Control* **40**: 344–350.
- Baños, A., García-López, J.D., Núñez, C., Martínez-Bueno, M., Maqueda, M., et Valdivia, E. (2016) Biocontrol of *Listeria monocytogenes* in fish by enterocin AS-48 and *Listeria* lytic bacteriophage P100. *LWT - Food Sci. Technol.* **66**: 672–677.
- Barancelli, G. V, Camargo, T.M., Reis, C.M.F., Porto, E., Hofer, E., et Oliveira, C.A.F. (2011) Incidence of *Listeria monocytogenes* in cheese manufacturing plants from the northeast region of São Paulo, Brazil. *J. Food Prot.* **74**: 816–819.
- Bayles, D.O. et Wilkinson, B.J. (2000) Osmoprotectants and cryoprotectants for *Listeria monocytogenes*. *Lett. Appl. Microbiol.* **30**: 23–27.
- Becker, L.A., Cetin, M.S., Hutkins, R.W., et Benson, A.K. (1998) Identification of the gene encoding the alternative sigma factor σ^B from *Listeria monocytogenes* and its role in osmotolerance. *J. Bacteriol.* **180**: 4547–4554.
- Becker, L.A., Evans, S.N., Hutkins, R.W., et Benson, A.K. (2000) Role of σ^B in adaptation of *Listeria monocytogenes* to growth at low temperature. *J. Bacteriol.* **182**: 7083–7087.
- Begley, M., Gahan, C.G.M., et Hill, C. (2002) Bile stress response in *Listeria monocytogenes* LO28: adaptation, cross-protection, and identification of genetic loci involved in bile resistance. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 6005–6012.
- Begley, M., Sleator, R.D., Gahan, C.G.M., et Hill, C. (2005) Contribution of the three bile-associated loci, *bsh*, *pva*, and *btlB*, to gastrointestinal persistence and bile tolerance of *Listeria monocytogenes*. *Infect. Immun.* **73**: 894–904.
- Beney, L. et Gervais, P. (2001) Influence of the fluidity of the membrane on the response of microorganisms to environmental stresses. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **57**: 34–42.
- Beresford, M.R., Andrew, P.W., et Shama, G. (2001) *Listeria monocytogenes* adheres to many

- materials found in food-processing environments. *J. Appl. Microbiol.* **90**: 1000–1005.
- Bergholz, T.M., den Bakker, H.C., Fortes, E.D., Boor, K.J., et Wiedmann, M. (2010) Salt stress phenotypes in *Listeria monocytogenes* vary by genetic lineage and temperature. *Foodborne Pathog. Dis.* **7**: 1537–1549.
- Bergholz, T.M., Bowen, B., Wiedmann, M., et Boor, K.J. (2012) *Listeria monocytogenes* shows temperature-dependent and -independent responses to salt stress, including responses that induce cross-protection against other stresses. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**: 2602–2612.
- Bertsch, D., Rau, J., Eugster, M.R., Haug, M.C., Lawson, P.A., Lacroix, C., et Meile, L. (2013) *Listeria fleischmannii* sp. nov., isolated from cheese. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **63**: 526–532.
- Beumer, R.R., Te Giffel, M.C., Cox, L.J., Rombouts, F.M., et Abee, T. (1994) Effect of exogenous proline, betaine, and carnitine on growth of *Listeria monocytogenes* in a minimal medium. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 1359–1363.
- Bierne, H. et Cossart, P. (2007) *Listeria monocytogenes* surface proteins: from genome predictions to function. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **71**: 377–397.
- Billi, D. et Potts, M. (2002) Life and death of dried prokaryotes. *Res. Microbiol.* **153**: 7–12.
- Billi, D. et Potts, M. (2000) Life without water: responses of prokaryotes to desiccation. In, Storey, K.B. et Storey, J. (eds), *Environmental Stressors and Gene Responses*. Elsevier Science B V, Amsterdam, pp. 181–192.
- Booth, I.R. (2002) Stress and the single cell: intrapopulation diversity is a mechanism to ensure survival upon exposure to stress. *Int. J. Food Microbiol.* **78**: 19–30.
- Borezee, E., Pellegrini, E., et Berche, P. (2000) OppA of *Listeria monocytogenes*, an oligopeptide-binding protein required for bacterial growth at low temperature and involved in intracellular survival. *Infect. Immun.* **68**: 7069–7077.
- Borgnia, M.J. et Agre, P. (2001) Reconstitution and functional comparison of purified GlpF and AqpZ, the glycerol and water channels from *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**: 2888–2893.
- Borucki, M.K., Peppin, J.D., White, D., Loge, F., et Call, D.R. (2003) Variation in biofilm formation among strains of *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 7336–7342.
- Brett, M.S.Y., Short, P., et McLauchlin, J. (1998) A small outbreak of listeriosis associated with

- smoked mussels. *Int. J. Food Microbiol.* **43**: 223–229.
- Brøndsted, L., Kallipolitis, B.H., Ingmer, H., et Knöchel, S. (2003) *kdpE* and a putative RsbQ homologue contribute to growth of *Listeria monocytogenes* at high osmolarity and low temperature. *FEMS Microbiol. Lett.* **219**: 233–239.
- Brown, A.D. (1976) Microbial water stress. *Bacteriol. Rev.* **40**: 803–846.
- Burall, L.S., Simpson, A.C., Chou, L., Laksanalamai, P., et Datta, A.R. (2015) A novel gene, *lstC*, of *Listeria monocytogenes* is implicated in high salt tolerance. *Food Microbiol.* **48**: 72–82.
- De Buyser, M.-L., Dufour, B., Maire, M., et Lafarge, V. (2001) Implication of milk and milk products in food-borne diseases in France and in different industrialised countries. *Int. J. Food Microbiol.* **67**: 1–17.
- Cacace, G., Mazzeo, M.F., Sorrentino, A., Spada, V., Malorni, A., et Siciliano, R.A. (2010) Proteomics for the elucidation of cold adaptation mechanisms in *Listeria monocytogenes*. *J. Proteomics* **73**: 2021–2030.
- Carlton, R.M., Noordman, W.H., Biswas, B., de Meester, E.D., et Loessner, M.J. (2005) Bacteriophage P100 for control of *Listeria monocytogenes* in foods: genome sequence, bioinformatic analyses, oral toxicity study, and application. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **43**: 301–312.
- Carpentier, B. et Cerf, O. (2011) Review-Persistence of *Listeria monocytogenes* in food industry equipment and premises. *Int. J. Food Microbiol.* **145**: 1–8.
- Castro, H.P., Teixeira, P.M., et Kirby, R. (1995) Storage of lyophilized cultures of *Lactobacillus bulgaricus* under different relative humidities and atmospheres. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **44**: 172–176.
- Centers for Disease Control and Prevention (2011) Multistate outbreak of listeriosis associated with Jensen farms cantaloupe.
- Centers for Disease Control and Prevention (2008) Outbreak of *Listeria monocytogenes* infections associated with pasteurized milk from a local dairy.
- De Cesare, A., Mioni, R., et Manfreda, G. (2007) Prevalence of *Listeria monocytogenes* in fresh and fermented Italian sausages and ribotyping of contaminating strains. *Int. J. Food Microbiol.* **120**: 124–130.
- Cetin, M.S., Zhang, C., Hutkins, R.W., et Benson, A.K. (2004) Regulation of transcription of

- compatible solute transporters by the general stress sigma factor, σ^B , in *Listeria monocytogenes*. *J. Bacteriol.* **186**: 794–802.
- Chae, M.S. et Schraft, H. (2000) Comparative evaluation of adhesion and biofilm formation of different *Listeria monocytogenes* strains. *Int. J. Food Microbiol.* **62**: 103–111.
- Chaibenjawong, P. et Foster, S.J. (2011) Desiccation tolerance in *Staphylococcus aureus*. *Arch. Microbiol.* **193**: 125–135.
- Chambel, L., Sol, M., Fernandes, I., Barbosa, M., Zilhão, I., Barata, B., et al. (2007) Occurrence and persistence of *Listeria* spp. in the environment of ewe and cow's milk cheese dairies in Portugal unveiled by an integrated analysis of identification, typing and spatial-temporal mapping along production cycle. *Int. J. Food Microbiol.* **116**: 52–63.
- Chan, P.F., Foster, S.J., Ingham, E., et Clements, M.O. (1998) The *Staphylococcus aureus* alternative sigma factor σ^B controls the environmental stress response but not starvation survival or pathogenicity in a mouse abscess model. *J. Bacteriol.* **180**: 6082–6089.
- Chan, Y.C., Hu, Y., Chaturongakul, S., Files, K.D., Bowen, B.M., Boor, K.J., et Wiedmann, M. (2008) Contributions of two-component regulatory systems, alternative σ factors, and negative regulators to *Listeria monocytogenes* cold adaptation and cold growth. *J. Food Prot.* **71**: 420–425.
- Chasseignaux, E., Gérault, P., Toquin, M.T., Salvat, G., Colin, P., et Ermel, G. (2002) Ecology of *Listeria monocytogenes* in the environment of raw poultry meat and raw pork meat processing plants. *FEMS Microbiol. Lett.* **210**: 271–275.
- Chaturongakul, S. et Boor, K.J. (2004) RsbT and RsbV contribute to σ^B -dependant survival under environmental, energy, and intracellular stress conditions in *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 5349–5356.
- Chavant, P., Martinie, B., Meylheuc, T., Bellon-Fontaine, M.-N., et Hebraud, M. (2002) *Listeria monocytogenes* LO28: surfaces physicochemical properties and ability to form biofilms at différent temperatures and growth phases. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 728–737.
- Chen, J., Jiang, L., Chen, Q., Zhao, H., Luo, X., Chen, X., et Fang, W. (2009a) *lmo0038* is involved in acid and heat stress responses and specific for *Listeria monocytogenes* lineages I and II, and *Listeria ivanovii*. *Foodborne Pathog. Dis.* **6**: 365–376.
- Chen, M., Wu, Q., Zhang, J., Yan, Z., et Wang, J. (2014) Prevalence and characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from retail-level ready-to-eat foods in South China. *Food*

Control **38**: 1–7.

- Chen, Y.-Y., Wu, C.-C., Hsu, J.-L., Peng, H.-L., Chang, H.-Y., et Yew, T.-R. (2009b) Surface rigidity change of *Escherichia coli* after filamentous bacteriophage infection. *Langmuir* **25**: 4607–4614.
- Christiansen, J.K., Larsen, M.H., Ingmer, H., Søggaard-Andersen, L., et Kallipolitis, B.H. (2004) The RNA-binding protein Hfq of *Listeria monocytogenes*: role in stress tolerance and virulence. *J. Bacteriol.* **186**: 3355–3362.
- Christiansen, J.K., Nielsen, J.S., Ebersbach, T., Valentin-Hansen, P., Søggaard-Andersen, L., et Kallipolitis, B.H. (2006) Identification of small Hfq-binding RNAs in *Listeria monocytogenes*. *RNA* **12**: 1383–1396.
- Cleveland, J., Montville, T.J., Nes, I.F., et Chikindas, M.L. (2001) Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *Int. J. Food Microbiol.* **71**: 1–20.
- Corcoran, B.M., Ross, R.P., Fitzgerald, G.F., et Stanton, C. (2004) Comparative survival of probiotic lactobacilli spray-dried in the presence of prebiotic substances. *J. Appl. Microbiol.* **96**: 1024–1039.
- Costa, E., Usall, J., Teixidó, N., Garcia, N., et Viñas, I. (2000) Effect of protective agents rehydration media and initial cell concentration on viability of *Pantoea agglomerans* strain CPA-2 subjected to freeze-drying. *J. Appl. Microbiol.* **89**: 793–800.
- Cotter, P.D., Emerson, N., Gahan, C.G.M., et Hill, C. (1999) Identification and disruption of *lisRK*, a genetic locus encoding a two-component signal transduction system involved in stress tolerance and virulence in *Listeria monocytogenes*. *J. Bacteriol.* **181**: 6840–6843.
- Cotter, P.D., Gahan, C.G.M., et Hill, C. (2000) Analysis of the role of the *Listeria monocytogenes* F₀F₁-ATPase operon in the acid tolerance response. *Int. J. Food Microbiol.* **60**: 137–146.
- Cotter, P.D., Ryan, S., Gahan, C.G.M., et Hill, C. (2005) Presence of GadD1 glutamate decarboxylase in selected *Listeria monocytogenes* strains is associated with an ability to grow at low pH. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 2832–2839.
- Cox, L.J., Kleiss, T., Cordier, J.L., Cordellana, C., Konkel, P., Pedrazzini, C., et al. (1989) *Listeria* spp. in food processing, non-food and domestic environments. *Food Microbiol.* **6**: 49–61.
- Cruz, C.D. et Fletcher, G.C. (2011) Prevalence and biofilm-forming ability of *Listeria*

- monocytogenes* in New Zealand mussel (*Perna canaliculus*) processing plants. *Food Microbiol.* **28**: 1387–1393.
- Dalton, C.B., Austin, C.C., Sobel, J., Hayes, P.S., Bibb, W.F., Graves, L.M., et al. (1997) An outbreak of gastroenteritis and fever due to *Listeria monocytogenes* in milk. *New Engl. J. Med.* **336**: 100–105.
- Davis, R. et Mauer, L. (2010) Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy: a rapid tool for detection and analysis of foodborne pathogenic bacteria. *Curr. Res. Technol. Educ. Top. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2**: 1582–1594.
- Djordjevic, D., Wiedmann, M., et McLandsborough, L.A. (2002) Microtiter plate assay for assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 2950–2958.
- Donlan, R.M. (2002) Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg. Infect. Dis.* **8**: 881–890.
- Dorobantu, L.S., Goss, G.G., et Burrell, R.E. (2012) Atomic force microscopy: a nanoscopic view of microbial cell surfaces. *Micron* **43**: 1312–1322.
- Dreux, N., Albagnac, C., Carlin, F., Morris, C.E., et Nguyen-The, C. (2007a) Fate of *Listeria* spp. on parsley leaves grown in laboratory and field cultures. *J. Appl. Microbiol.* **103**: 1821–1827.
- Dreux, N., Albagnac, C., Federighi, M., Carlin, F., Morris, C.E., et Nguyen-the, C. (2007b) Viable but non-culturable *Listeria monocytogenes* on parsley leaves and absence of recovery to a culturable state. *J. Appl. Microbiol.* **103**: 1272–1281.
- Dreux, N., Albagnac, C., Sleator, R.D., Hill, C., Carlin, F., Morris, C.E., et Nguyen-the, C. (2008) Glycine betaine improves *Listeria monocytogenes* tolerance to desiccation on parsley leaves independent of the osmolyte transporters BetL, Gbu and OpuC. *J. Appl. Microbiol.* **104**: 1221–1227.
- Duché, O., Trémoulet, F., Glaser, P., et Labadie, J. (2002) Salt stress proteins induced in *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 1491–1498.
- Dufrêne, Y.F. (2014) Atomic force microscopy in microbiology: new structural and functional insights into the microbial cell surface. *MBio* **5**: e01363–14.
- Dunklin, E.W. et Puck, T.T. (1948) The lethal effect of relative humidity on air-borne bacteria. *J. Exp. Med.* **87**: 87–101.
- Dupont, S., Beney, L., Ritt, J.-F., Lherminier, J., et Gervais, P. (2010) Lateral reorganization of

- plasma membrane is involved in the yeast resistance to severe dehydration. *Biochim. Biophys. Acta* **1798**: 975–985.
- Dupont, S., Rapoport, A., Gervais, P., et Beney, L. (2014) Survival kit of *Saccharomyces cerevisiae* for anhydrobiosis. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **98**: 8821–8834.
- Dussurget, O., Cabanes, D., Dehoux, P., Lecuit, M., Buchrieser, C., Glaser, P., et Cossart, P. (2002) *Listeria monocytogenes* bile salt hydrolase is a PrfA-regulated virulence factor involved in the intestinal and hepatic phases of listeriosis. *Mol. Microbiol.* **45**: 1095–1106.
- Dussurget, O., Dumas, E., Archambaud, C., Chafsey, I., Chambon, C., Hébraud, M., et Cossart, P. (2005) *Listeria monocytogenes* ferritin protects against multiple stresses and is required for virulence. *FEMS Microbiol. Lett.* **250**: 253–261.
- Ellis, R.J. et Minton, A.P. (2003) Cell biology: join the crowd. *Nature* **425**: 27–28.
- Ericsson, H., Eklöw, A., Danielsson-Tham, M.-L., Loncarevic, S., Mentzing, L.-O., Persson, I., et al. (1997) An outbreak of listeriosis suspected to have been caused by rainbow trout. *J. Clin. Microbiol.* **35**: 2904–2907.
- Fenlon, D.R. (1985) Wild birds and silage as reservoirs of *Listeria* in the agricultural environment. *J. Appl. Bacteriol.* **59**: 537–543.
- Ferreira, A., O’Byrne, C.P., et Boor, K.J. (2001) Role of σ^B in heat, ethanol, acid, and oxidative stress resistance and during carbon starvation in *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 4454–4457.
- Ferreira, A., Sue, D., O’Byrne, C.P., et Boor, K.J. (2003) Role of *Listeria monocytogenes* σ^B in survival of lethal acidic conditions and in the acquired acid tolerance response. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 2692–2698.
- Fielder, F. (1988) Biochemistry of the cell surface of *Listeria* strains: a locating general view. *Infection* **16**: S92–S97.
- Finn, S., Handler, K., Condell, O., Colgan, A., Cooney, S., McClure, P., et al. (2013) ProP is required for the survival of desiccated *Salmonella enterica* serovar Typhimurium cells on a stainless steel surface. *Appl. Environ. Microbiol.* **79**: 4376–4384.
- Fleming, D.W., Cochi, S.L., MacDonald, K.L., Brondum, J., Hayes, P.S., Plikaytis, B.D., et al. (1985) Pasteurized milk as a vehicle of infection in an outbreak of listeriosis. *New Engl. J. Med.* **312**: 404–407.
- Fox, E., Hunt, K., O’Brien, M., et Jordan, K. (2011) *Listeria monocytogenes* in Irish Farmhouse

- cheese processing environments. *Int. J. Food Microbiol.* **145**: S39–S45.
- França, M.B., Panek, A.D., et Eleutherio, E.C.A. (2007) Oxidative stress and its effects during dehydration. *Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol.* **146**: 621–631.
- França, M.B., Panek, A.D., et Eleutherio, E.C.A. (2005) The role of cytoplasmic catalase in dehydration tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Stress Chaperones* **10**: 167–170.
- Fraser, K.R., Sue, D., Wiedmann, M., Boor, K., et O’Byrne, C.P. (2003) Role of σ^B in regulating the compatible solute uptake systems of *Listeria monocytogenes*: osmotic induction of *opuC* is σ^B dependent. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 2015–2022.
- Fredrickson, J.K., Li, S.W., Gaidamakova, E.K., Matrosova, V.Y., Zhai, M., Sulloway, H.M., et al. (2008) Protein oxidation: key to bacterial desiccation resistance? *ISME J.* **2**: 393–403.
- Freitag, N.E., Port, G.C., et Miner, M.D. (2009) *Listeria monocytogenes* - from saprophyte to intracellular pathogen. *Nat. Rev. Microbiol.* **7**: 623–628.
- Freitag, N.E., Rong, L., et Portnoy, D.A. (1993) Regulation of the *prfA* transcriptional activator of *Listeria monocytogenes*: multiple promoter elements contribute to intracellular growth and cell-to-cell spread. *Infect. Immun.* **61**: 2537–2544.
- Frye, D.M., Zweig, R., Sturgeon, J., Tormey, M., LeCavalier, M., Lee, I., et al. (2002) An outbreak of febrile gastroenteritis associated with delicatessen meat contaminated with *Listeria monocytogenes*. *Clin. Infect. Dis.* **35**: 943–949.
- Gambarin, P., Magnabosco, C., Losio, M.N., Pavoni, E., Gattuso, A., Arcangeli, G., et Favretti, M. (2012) *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat seafood and potential hazards for the consumers. *Int. J. Microbiol.* **2012**.
- Gandhi, M. et Chikindas, M.L. (2007) *Listeria*: a foodborne pathogen that knows how to survive. *Int. J. Food Microbiol.* **113**: 1–15.
- García, A.H. (2011) Anhydrobiosis in bacteria: from physiology to applications. *J. Biosci.* **36**: 939–950.
- García-Almendárez, B.E., Cann, I.K.O., Martin, S.E., Guerrero-Legarreta, I., et Regalado, C. (2008) Effect of *Lactococcus lactis* UQ2 and its bacteriocin on *Listeria monocytogenes* biofilms. *Food Control* **19**: 670–680.
- Gardan, R., Duché, O., Leroy-Sétrin, S., et Labadie, J. (2003) Role of *ctc* from *Listeria monocytogenes* in osmotolerance. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 154–161.
- Garmiri, P., Coles, K.E., Humphrey, T.J., et Cogan, T.A. (2008) Role of outer membrane

- lipopolysaccharides in the protection of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium from desiccation damage. *FEMS Microbiol. Lett.* **281**: 155–159.
- Gerhardt, P.N.M., Smith, L.T., et Smith, G.M. (2000) Osmotic and chill activation of glycine betaine porter II in *Listeria monocytogenes* membrane vesicles. *J. Bacteriol.* **182**: 2544–2550.
- Gerhardt, P.N.M., Smith, L.T., et Smith, G.M. (1996) Sodium-driven, osmotically activated glycine betaine transport in *Listeria monocytogenes* membrane vesicles. *J. Bacteriol.* **178**: 6105–6109.
- Gervais, P., Maréchal, P.A., et Molin, P. (1992) Effects of the kinetics of osmotic pressure variation on yeast viability. *Biotechnol. Bioeng.* **40**: 1435–1439.
- Ghosh, B.K. et Carroll, K.K. (1968) Isolation, composition, and structure of membrane of *Listeria monocytogenes*. *J. Bacteriol.* **95**: 688–699.
- Glaser, P., Frangeul, L., Buchrieser, C., Rusniok, C., Amend, A., Baquero, F., et al. (2001) Comparative genomics of *Listeria* species. *Science (80-.)*. **294**: 849–852.
- González, D., Vitas, A.I., Díez-Leturia, M., et García-Jalón, I. (2013) *Listeria monocytogenes* and ready-to-eat seafood in Spain: study of prevalence and temperatures at retail. *Food Microbiol.* **36**: 374–378.
- Gottlieb, S.L., Newbern, E.C., Griffin, P.M., Graves, L.M., Hoekstra, R.M., Baker, N.L., et al. (2006) Multistate outbreak of listeriosis linked to turkey deli meat and subsequent changes in US regulatory policy. *Clin. Infect. Dis.* **42**: 29–36.
- Goulet, V., Leclercq, A., Laurent, E., King, L., Chenal-Francisque, V., Vaillant, V., et al. (2012) Surveillance de la listériose humaine en France, 1999-2011. *Bull. Epidémiol. Hebd.*
- Goulet, V., Rocourt, J., Rebiere, I., Jacquet, C., Moyse, C., Dehaumont, P., et al. (1998) Listeriosis outbreak associated with the consumption of rillettes in France in 1993. *J. Infect. Dis.* **177**: 155–160.
- Goulet, V., de Valk, H., Pierre, O., Stainer, F., Rocourt, J., Vaillant, V., et al. (2001) Effect of prevention measures on incidence of human listeriosis, France, 1987-1997. *Emerg. Infect. Dis.* **7**: 983–989.
- Gram, L., Bagge-Ravn, D., Ng, Y.Y., Gymoese, P., et Vogel, B.F. (2007) Influence of food soiling matrix on cleaning and disinfection efficiency on surface attached *Listeria monocytogenes*. *Food Control* **18**: 1165–1171.

- Graves, L.M., Helsel, L.O., Steigerwalt, A.G., Morey, R.E., Daneshvar, M.I., Roof, S.E., et al. (2010) *Listeria marthii* sp. nov., isolated from the natural environment, Finger Lakes National Forest. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **60**: 1280–1288.
- Gruzdev, N., McClelland, M., Porwollik, S., Ofaim, S., Pinto, R., et Saldinger-Sela, S. (2012) Global transcriptional analysis of dehydrated *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**: 7866–7875.
- Guillet, C., Join-Lambert, O., Le Monnier, A., Leclercq, A., Mechai, F., Mamzer-Bruneel, M.F., et al. (2010) Human listeriosis caused by *Listeria ivanovii*. *Emerg. Infect. Dis.* **16**: 136–138.
- Guyot, S., Pottier, L., Hartmann, A., Ragon, M., Hauck Tiburski, J., Molin, P., et al. (2014) Extremely rapid acclimation of *Escherichia coli* to high temperature over a few generations of a fed-batch culture during slow warming. *Microbiol. Open* **3**: 52–63.
- Guzel-Seydim, Z.B., Greene, A.K., et Seydim, A.C. (2004) Use of ozone in the food industry. *LWT - Food Sci. Technol.* **37**: 453–460.
- Hain, T., Hossain, H., Chatterjee, S.S., Machata, S., Volk, U., Wagner, S., et al. (2008) Temporal transcriptomic analysis of the *Listeria monocytogenes* EGD-e σ^B regulon. *BMC Microbiol.* **8**: 20.
- Halter, E.L., Neuhaus, K., et Scherer, S. (2013) *Listeria weihenstephanensis* sp. nov., isolated from the water plant *Lemna trisulca* taken from a freshwater pond. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **63**: 641–647.
- Hansen, L.T. et Vogel, B.F. (2011) Desiccation of adhering and biofilm *Listeria monocytogenes* on stainless steel: survival and transfer to salmon products. *Int. J. Food Microbiol.* **146**: 88–93.
- Harvey, J., Keenan, K.P., et Gilmour, A. (2007) Assessing biofilm formation by *Listeria monocytogenes* strains. *Food Microbiol.* **24**: 380–392.
- Heir, E., Lindstedt, B.A., Røtterud, O.J., Vardund, T., Kapperud, G., et Nesbakken, T. (2004) Molecular epidemiology and disinfectant susceptibility of *Listeria monocytogenes* from meat processing plants and human infections. *Int. J. Food Microbiol.* **96**: 85–96.
- Héry, M., Binet, S., Gagnaire, F., Gerardin, F., Hecht, G., et Massin, N. (2003) Nettoyage et désinfection dans l'industrie agroalimentaire : évaluation des expositions aux polluants chimiques. *Doc. pour le médecin du Trav.* **95**: 333–350.
- Hibma, A.M., Jassim, S.A.A., et Griffiths, M.W. (1997) Infection and removal of L-forms of

- Listeria monocytogenes* with bred bacteriophage. *Int. J. Food Microbiol.* **34**: 197–207.
- Hingston, P.A., Piercey, M.J., et Hansen, L.T. (2015) Genes associated with desiccation and osmotic stress in *Listeria monocytogenes* revealed by insertional mutagenesis. *Appl. Environ. Microbiol.* **81**: 5350–5362.
- Hingston, P.A., Stea, E.C., Knøchel, S., et Hansen, T. (2013) Role of initial contamination levels, biofilm maturity and presence of salt and fat on desiccation survival of *Listeria monocytogenes* on stainless steel surfaces. *Food Microbiol.* **36**: 46–56.
- Holah, J.T., Taylor, J.H., Dawson, D.J., et Hall, K.E. (2002) Biocide use in the food industry and the disinfectant resistance of persistent strains of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli*. *J. Appl. Microbiol. Symp. Suppl.* **92**: 111S–120S.
- Holch, A., Webb, K., Lukjancenko, O., Ussery, D., Rosenthal, B.M., et Gram, L. (2013) Genome sequencing identifies two nearly unchanged strains of persistent *Listeria monocytogenes* isolated at two different fish processing plants sampled 6 years apart. *Appl. Environ. Microbiol.* **79**: 2944–2951.
- Van Houdt, R. et Michiels, C.W. (2010) Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface. *J. Appl. Microbiol.* **109**: 1117–1131.
- Huang, Y., Ells, T.C., et Hansen, L.T. (2015) Role of *sigB* and osmolytes in desiccation survival of *Listeria monocytogenes* in simulated food soils on the surface of food grade stainless steel. *Food Microbiol.* **46**: 443–451.
- Hubálek, Z. (2003) Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. *Cryobiology* **46**: 205–229.
- Iida, T., Kanzaki, M., Nakama, A., Kokubo, Y., Maruyama, T., et Kaneuchi, C. (1998) Detection of *Listeria monocytogenes* in humans, animals and foods. *J. Vet. Med. Sci.* **60**: 1341–1343.
- Ivanek, R., Gröhn, Y.T., et Wiedmann, M. (2006) *Listeria monocytogenes* in multiple habitats and host populations: review of available data for mathematical modeling. *Foodborne Pathog. Dis.* **3**: 319–336.
- Jacquet, C., Catimel, B., Brosch, R., Buchrieser, C., Dehaumont, P., Goulet, V., et al. (1995) Investigations related to the epidemic strain involved in the French listeriosis outbreak in 1992. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 2242–2246.
- Jones, D. (1988) The place of *Listeria* among gram-positive bacteria. *Infection* **16**: S85–S88.
- Jordan, K., Leong, D., et Álvarez-Ordóñez, A. (2015) *Listeria monocytogenes* in the Food

Processing Environment. Springer International Publishing.

- Joseph, B., Mertins, S., Stoll, R., Schär, J., Umesha, K.R., Luo, Q., et al. (2008) Glycerol metabolism and PrfA activity in *Listeria monocytogenes*. *J. Bacteriol.* **190**: 5412–5430.
- Kallipolitis, B.H. et Ingmer, H. (2001) *Listeria monocytogenes* response regulators important for stress tolerance and pathogenesis. *FEMS Microbiol. Lett.* **204**: 111–115.
- Kalmokoff, M.L., Austin, J.W., Wan, X.-D., Sanders, G., Banerjee, S., et Farber, J.M. (2001) Adsorption, attachment and biofilm formation among isolates of *Listeria monocytogenes* using model conditions. *J. Appl. Microbiol.* **91**: 725–734.
- Kardas, M., Gozen, A.G., et Severcan, F. (2014) FTIR spectroscopy offers hints towards widespread molecular changes in cobalt-acclimated freshwater bacteria. *Aquat. Toxicol.* **155**: 15–23.
- Kastbjerg, V.G. et Gram, L. (2009) Model systems allowing quantification of sensitivity to disinfectants and comparison of disinfectant susceptibility of persistent and presumed nonpersistent *Listeria monocytogenes*. *J. Appl. Microbiol.* **106**: 1667–1681.
- Katoh, H., Asthana, R.K., et Ohmori, M. (2004) Gene expression in the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC7120 under desiccation. *Microb. Ecol.* **47**: 164–174.
- Khroustalyova, G., Adler, L., et Rapoport, A. (2001) Exponential growth phase cells of the osmotolerant yeast *Debaryomyces hansenii* are extremely resistant to dehydration stress. *Process Biochem.* **36**: 1163–1166.
- Kim, S.H., Gorski, L., Reynolds, J., Orozco, E., Fielding, S., Park, Y.H., et Borucki, M.K. (2006) Role of *uvrA* in the growth and survival of *Listeria monocytogenes* under UV radiation and acid and bile stress. *J. Food Prot.* **69**: 3031–3036.
- Koch, A.L. (1984) Shrinkage of growing *Escherichia coli* cells by osmotic challenge. *J. Bacteriol.* **159**: 919–924.
- Kovačević, M., Burazin, J., Pavlović, H., Kopjar, M., et Piližota, V. (2013) Prevalence and level of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* sp. in ready-to-eat minimally processed and refrigerated vegetables. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **29**: 707–712.
- Kramarenko, T., Roasto, M., Meremae, K., Kuningas, M., Poltsama, P., et Elias, T. (2013) *Listeria monocytogenes* prevalence and serotype diversity in various foods. *Food Control* **30**: 24–29.
- Kuenne, C., Billion, A., Mraheil, M.A., Strittmatter, A., Rolf, D., Goesmann, A., et al. (2013)

- Reassessment of the *Listeria monocytogenes* pan-genome reveals dynamic integration hotspots and mobile genetic elements as major components of the accessory genome. *BMC Genomics* **14**: 47.
- Kuzmanović, J., Ašanin, R., Baltić, M., Mišić, D., Dimitrijević, M., Stojanović, M., et al. (2011) Presence of *Listeria* spp. in fish samples, fish products and sea products. *Acta Vet.* **61**: 193–203.
- Laksanalamai, P., Joseph, L.A., Silk, B.J., Burall, L.S., Tarr, C.L., Gerner-Smidt, P., et Datta, A.R. (2012) Genomic characterization of *Listeria monocytogenes* strains involved in a multistate listeriosis outbreak associated with Cantaloupe in US. *PLoS One* **7**: e42448.
- Lambertz, S.T., Nilsson, C., Brådenmark, A., Sylvén, S., Johansson, A., Jansson, L.M., et Lindblad, M. (2012) Prevalence and level of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods in Sweden 2010. *Int. J. Food Microbiol.* **160**: 24–31.
- Lang, E., Zoz, F., Iaconelli, C., Guyot, S., Alvarez-Martin, P., Beney, L., et al. (2016) Recovery estimation of dried foodborne pathogens is directly related to rehydration kinetics. *PLoS One* **11**: e0160844.
- Laroche, C., Beney, L., Marechal, P.A., et Gervais, P. (2001) The effect of osmotic pressure on the membrane fluidity of *Saccharomyces cerevisiae* at different physiological temperatures. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **56**: 249–254.
- Laroche, C., Simonin, H., Beney, L., et Gervais, P. (2005) Phase transitions as a function of osmotic pressure in *Saccharomyces cerevisiae* whole cells, membrane extracts and phospholipid mixtures. *Biochim. Biophys. Acta* **1669**: 8–16.
- Leclercq, A., Clermont, D., Bizet, C., Grimont, P.A.D., Le Flèche-Matéos, A., Roche, S.M., et al. (2010) *Listeria rocourtiae* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **60**: 2210–2214.
- Lemetais, G., Dupont, S., Beney, L., et Gervais, P. (2012) Air-drying kinetics affect yeast membrane organization and survival. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **96**: 471–480.
- Leslie, S.B., Israeli, E., Lighthart, B., Crowe, J.H., et Crowe, L.M. (1995) Trehalose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 3592–3597.
- Li, H., Bhaskara, A., Megalis, C., et Tortorello, M. Lou (2012) Transcriptomic analysis of *Salmonella* desiccation resistance. *Foodborne Pathog. Dis.* **9**: 1143–1151.
- Liu, D. (2006) Identification, subtyping and virulence determination of *Listeria monocytogenes*,

- an important foodborne pathogen. *J. Med. Microbiol.* **55**: 645–659.
- Liu, D., Lawrence, M.L., Ainsworth, A.J., et Austin, F.W. (2005) Comparative assessment of acid, alkali and salt tolerance in *Listeria monocytogenes* virulent and avirulent strains. *FEMS Microbiol. Lett.* **243**: 373–378.
- Loepfe, C., Raimann, E., Stephan, R., et Tasara, T. (2010) Reduced host cell invasiveness and oxidative stress tolerance in double and triple *csp* gene family deletion mutants of *Listeria monocytogenes*. *Foodborne Pathog. Dis.* **7**: 775–783.
- Lomonaco, S., Decastelli, L., Nucera, D., Gallina, S., Manila Bianchi, D., et Civera, T. (2009) *Listeria monocytogenes* in Gorgonzola: subtypes, diversity and persistence over time. *Int. J. Food Microbiol.* **128**: 516–520.
- Lomonaco, S., Nucera, D., et Filipello, V. (2015) The evolution and epidemiology of *Listeria monocytogenes* in Europe and the United States. *Infect. Genet. Evol.* **35**: 172–183.
- Long, M., Wang, J., Zhuang, H., Zhang, Y., Wu, H., et Zhang, J. (2014) Performance and mechanism of standard nano-TiO₂ (P-25) in photocatalytic disinfection of foodborne microorganisms – *Salmonella typhimurium* and *Listeria monocytogenes*. *Food Control* **39**: 68–74.
- Lou, Y. et Yousef, A.E. (1997) Adaptation to sublethal environmental stresses protects *Listeria monocytogenes* against lethal preservation factors. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 1252–1255.
- Lourenço, A., Neves, E., et Brito, L. (2009) Susceptibility of *Listeria monocytogenes* from traditional cheese-dairies to in-use sanitizers. *Food Control* **20**: 585–589.
- Lundén, J., Autio, T., Markkula, A., Hellström, S., et Korkeala, H. (2003) Adaptive and cross-adaptive responses of persistent and non-persistent *Listeria monocytogenes* strains to disinfectants. *Int. J. Food Microbiol.* **82**: 265–272.
- Lundén, J.M., Autio, T.J., et Korkeala, H.J. (2002) Transfer of persistent *Listeria monocytogenes* contamination between food-processing plants associated with a dicing machine. *J. Food Prot.* **65**: 1129–1133.
- Lundén, J.M., Autio, T.J., Sjöberg, A.M., et Korkeala, H.J. (2003) Persistent and nonpersistent *Listeria monocytogenes* in meat and poultry processing plants. *J. Food Prot.* **66**: 2062–2069.
- Lundén, J.M., Miettinen, M.K., Autio, T.J., et Korkeala, H.J. (2000) Persistent *Listeria monocytogenes* strains show enhanced adherence to food contact surface after short contact

- time. *J. Food Prot.* **63**: 1204–1207.
- Lyytikäinen, O., Autio, T., Maijala, R., Ruutu, P., Honkanen-Buzalski, T., Miettinen, M., et al. (2000) An outbreak of *Listeria monocytogenes* serotype 3a infections from butter in Finland. *J. Infect. Dis.* **181**: 1838–1841.
- MacDonald, P.D.M., Whitwam, R.E., Boggs, J.D., MacCormack, J.N., Anderson, K.L., Reardon, J.W., et al. (2005) Outbreak of listeriosis among Mexican immigrants as a result of consumption of illicitly produced Mexican-style cheese. *Clin. Infect. Dis.* **40**: 677–682.
- Madeo, M., O’Riordan, N., Fuchs, T.M., Utratna, M., Karatzas, K.A.G., et O’Byrne, C.P. (2012) Thiamine plays a critical role in the acid tolerance of *Listeria monocytogenes*. *FEMS Microbiol. Lett.* **326**: 137–143.
- Mahdavi, M., Jalali, M., et Kermanshahi, R.K. (2007) The effect of nisin on biofilm forming foodborne bacteria using microtiter plate method. *Res. Pharm. Sci.* **2**: 113–118.
- Makino, S.I., Kawamoto, K., Takeshi, K., Okada, Y., Yamasaki, M., Yamamoto, S., et Igimi, S. (2005) An outbreak of food-borne listeriosis due to cheese in Japan, during 2001. *Int. J. Food Microbiol.* **104**: 189–196.
- Manfreda, G., De Cesare, A., Stella, S., Cozzi, M., et Cantoni, C. (2005) Occurrence and ribotypes of *Listeria monocytogenes* in Gorgonzola cheeses. *Int. J. Food Microbiol.* **102**: 287–293.
- Marino, M., Braun, L., Cossart, P., et Ghosh, P. (1999) Structure of the InlB leucine-rich repeats, a domain that triggers host cell invasion by the bacterial pathogen *L. monocytogenes*. *Mol. Cell* **4**: 1063–1072.
- Mary, P., Ochin, D., et Tailliez, R. (1986) Growth status of rhizobia in relation to their tolerance to low water activities and desiccation stresses. *Soil Biol. Biochem.* **18**: 179–184.
- Mattimore, V. et Battista, J.R. (1996) Radioresistance of *Deinococcus radiodurans*: functions necessary to survive ionizing radiation are also necessary to survive prolonged desiccation. *J. Bacteriol.* **178**: 633–637.
- McClure, P.J., Roberts, T.A., et Otto Oguru, P. (1989) Comparison of the effects of sodium chloride, pH and temperature on the growth of *Listeria monocytogenes* on gradient plates and in liquid medium. *Lett. Appl. Microbiol.* **9**: 95–99.
- Melo, J., Andrew, P.W., et Faleiro, M.L. (2015) *Listeria monocytogenes* in cheese and the dairy environment remains a food safety challenge: the role of stress responses. *Food Res. Int.* **67**:

75–90.

- Mengaud, J., Ohayon, H., Gounon, P., Mège, R.M., et Cossart, P. (1996) E-cadherin is the receptor for internalin, a surface protein required for entry of *L. monocytogenes* into epithelial cells. *Cell* **84**: 923–932.
- Mereghetti, L., Quentin, R., Marquet-Van Der Mee, N., et Audurier, A. (2000) Low sensitivity of *Listeria monocytogenes* to quaternary ammonium compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 5083–5086.
- Meyer, B. (2003) Approaches to prevention, removal and killing of biofilms. *Int. Biodeterior. Biodegradation* **51**: 249–253.
- Meyer, C., Fredriksson-Ahomaa, M., Kleta, S., Ellerbroek, L., Thiel, S., et Märtilbauer, E. (2012) Occurrence of *L. monocytogenes* in ready-to-eat poultry products available on the German market. *Food Res. Int.* **48**: 944–947.
- Miettinen, H. et Wirtanen, G. (2006) Ecology of *Listeria* spp. in a fish farm and molecular typing of *Listeria monocytogenes* from fish farming and processing companies. *Int. J. Food Microbiol.* **112**: 138–146.
- Miettinen, M.K., Björkroth, K.J., et Korkeala, H.J. (1999) Characterization of *Listeria monocytogenes* from an ice cream plant by serotyping and pulsed-field gel electrophoresis. *Int. J. Food Microbiol.* **46**: 187–192.
- Mille, Y., Beney, L., et Gervais, P. (2005) Compared tolerance to osmotic stress in various microorganisms: towards a survival prediction test. *Biotechnol. Bioeng.* **92**: 479–484.
- Mille, Y., Beney, L., et Gervais, P. (2003) Magnitude and kinetics of rehydration influence the viability of dehydrated *E. coli* K-12. *Biotechnol. Bioeng.* **83**: 578–582.
- Mille, Y., Beney, L., et Gervais, P. (2002) Viability of *Escherichia coli* after combined osmotic and thermal treatment: a plasma membrane implication. *Biochim. Biophys. Acta* **1567**: 41–48.
- Miya, S., Takahashi, H., Ishikawa, T., Fujii, T., et Kimura, B. (2010) Risk of *Listeria monocytogenes* contamination of raw ready-to-eat seafood products available at retail outlets in Japan. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**: 3383–3386.
- Moll, G.N., Konings, W.N., et Driessen, A.J.M. (1999) Bacteriocins: mechanism of membrane insertion and pore formation. *Antonie Van Leeuwenhoek* **76**: 185–198.
- Montero, D., Boderó, M., Riveros, G., Lapierre, L., Gaggero, A., Vidal, R.M., et Vidal, M.

- (2015) Molecular epidemiology and genetic diversity of *Listeria monocytogenes* isolates from a wide variety of ready-to-eat foods and their relationship to clinical strains from listeriosis outbreaks in Chile. *Front. Microbiol.* **6**: 384.
- Moorhead, S.M. et Dykes, G.A. (2003) The role of the *sigB* gene in the general stress response of *Listeria monocytogenes* varies between a strain of serotype 1/2a and a strain of serotype 4c. *Curr. Microbiol.* **46**: 461–466.
- Mørretrø, T. et Langsrud, S. (2004) *Listeria monocytogenes*: biofilm formation and persistence in food-processing environments. *Biofilms* **1**: 107–121.
- Morgan, C.A., Herman, N., White, P.A., et Vesey, G. (2006) Preservation of micro-organisms by drying; A review. *J. Microbiol. Methods* **66**: 183–193.
- Nair, S., Derré, I., Msadek, T., Gaillot, O., et Berche, P. (2000) CtsR controls class III heat shock gene expression in the human pathogen *Listeria monocytogenes*. *Mol. Microbiol.* **35**: 800–811.
- Nelson, K.E., Fouts, D.E., Mongodin, E.F., Ravel, J., DeBoy, R.T., Kolonay, J.F., et al. (2004) Whole genome comparisons of serotype 4b and 1/2a strains of the food-borne pathogen *Listeria monocytogenes* reveal new insights into the core genome components of this species. *Nucleic Acids Res.* **32**: 2386–2395.
- Neuhaus, F.C. et Baddiley, J. (2003) A continuum of anionic charge: structures and functions of D-alanyl-teichoic acids in gram-positive bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **67**: 686–723.
- Nicholas, R., Dunton, P., Tatham, A., et Fielding, L. (2013) The effect of ozone and open air factor on surface-attached and biofilm environmental *Listeria monocytogenes*. *J. Appl. Microbiol.* **115**: 555–564.
- Nielsen, J.S., Lei, L.K., Ebersbach, T., Olsen, A.S., Klitgaard, J.K., Valentin-Hansen, P., et Kallipolitis, B.H. (2009) Defining a role for Hfq in Gram-positive bacteria: evidence for Hfq-dependent antisense regulation in *Listeria monocytogenes*. *Nucleic Acids Res.* **38**: 907–919.
- Nightingale, K.K., Schukken, Y.H., Nightingale, C.R., Fortes, E.D., Ho, A.J., Her, Z., et al. (2004) Ecology and transmission of *Listeria monocytogenes* infecting ruminants and in the farm environment. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 4458–4467.
- Nilsson, R.E., Ross, T., et Bowman, J.P. (2011) Variability in biofilm production by *Listeria monocytogenes* correlated to strain origin and growth conditions. *Int. J. Food Microbiol.*

150: 14–24.

- Nocker, A., Fernández, P.S., Montijn, R., et Schuren, F. (2012) Effect of air drying on bacterial viability: a multiparameter viability assessment. *J. Microbiol. Methods* **90**: 86–95.
- Norrish, R.S. (1966) An equation for the activity coefficients and equilibrium relative humidities in confectionery syrups. *Int. J. Food Sci. Technol.* **1**: 25–39.
- Norton, D.M., Mccamey, M.A., Gall, K.L., Scarlett, J.M., Boor, K.J., et Wiedmann, M. (2001) Molecular studies on the ecology of *Listeria monocytogenes* in the smoked fish processing industry. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 198–205.
- Norwood, D.E. et Gilmour, A. (1999) Adherence of *Listeria monocytogenes* strains to stainless steel coupons. *J. Appl. Microbiol.* **86**: 576–582.
- O’Driscoll, B., Gahan, C.G., et Hill, C. (1996) Adaptive acid tolerance response in *Listeria monocytogenes*: isolation of an acid-tolerant mutant which demonstrates increased virulence. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 1693–1698.
- Okada, Y., Okada, N., Makino, S., Asakura, H., Yamamoto, S., et Igimi, S. (2006) The sigma factor RpoN (σ^{54}) is involved in osmotolerance in *Listeria monocytogenes*. *FEMS Microbiol. Lett.* **263**: 54–60.
- Okutani, A., Okada, Y., Yamamoto, S., et Igimi, S. (2004) Overview of *Listeria monocytogenes* contamination in Japan. *Int. J. Food Microbiol.* **93**: 131–140.
- Olsen, K.N., Larsen, M.H., Gahan, C.G.M., Kallipolitis, B., Wolf, X.A., Rea, R., et al. (2005) The Dps-like protein Fri of *Listeria monocytogenes* promotes stress tolerance and intracellular multiplication in macrophage-like cells. *Microbiology* **151**: 925–933.
- Orgaz, B., Puga, C.H., Martínez-Suárez, J.V., et SanJose, C. (2013) Biofilm recovery from chitosan action: a possible clue to understand *Listeria monocytogenes* persistence in food plants. *Food Control* **32**: 484–489.
- Oulahal, N., Brice, W., Martial, A., et Degraeve, P. (2008) Quantitative analysis of survival of *Staphylococcus aureus* or *Listeria innocua* on two types of surfaces: polypropylene and stainless steel in contact with three different dairy products. *Food Control* **19**: 178–185.
- Pagadala, S., Parveen, S., Rippen, T., Luchansky, J.B., Call, J.E., Tamplin, M.L., et Porto-Fett, A.C.S. (2012) Prevalence, characterization and sources of *Listeria monocytogenes* in blue crab (*Callinectes sapidus*) meat and blue crab processing plants. *Food Microbiol.* **31**: 263–270.

- Parisi, A., Latorre, L., Fraccalvieri, R., Miccolupo, A., Normanno, G., Caruso, M., et Santagada, G. (2013) Occurrence of *Listeria* spp. in dairy plants in Southern Italy and molecular subtyping of isolates using AFLP. *Food Control* **29**: 91–97.
- Patchett, R.A., Kelly, A.F., et Kroll, R.G. (1992) Effect of sodium chloride on the intracellular solute pools of *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 3959–3963.
- Pereira, E. de J., Panek, A.D., et Eleutherio, E.C.A. (2003) Protection against oxidation during dehydration of yeast. *Cell Stress Chaperones* **8**: 120–124.
- Persson, E. et Halle, B. (2008) Cell water dynamics on multiple time scales. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**: 6266–6271.
- Pittman, J.R., Buntyn, J.O., Posadas, G., Nanduri, B., Pendarvis, K., et Donaldson, J.R. (2014) Proteomic analysis of cross protection provided between cold and osmotic stress in *Listeria monocytogenes*. *J. Proteome Res.* **13**: 1896–1904.
- Poirier, I., Maréchal, P.A., Richard, S., et Gervais, P. (1999) *Saccharomyces cerevisiae* viability is strongly dependant on rehydration kinetics and the temperature of dried cells. *J. Appl. Microbiol.* **86**: 87–92.
- Potts, M. (1994) Desiccation tolerance of prokaryotes. *Microbiol. Rev.* **58**: 755–805.
- Potts, M. (2001) Desiccation tolerance: a simple process? *Trends Microbiol.* **9**: 553–559.
- Prestrelski, S.J., Tedeschi, N., Arakawa, T., et Carpenter, J.F. (1993) Dehydration-induced conformational transitions in proteins and their inhibition by stabilizers. *Biophys. J.* **65**: 661–671.
- Price-Whelan, A., Poon, C.K., Benson, M. A., Eidem, T.T., Roux, C.M., Boyd, J.M., et al. (2013) Transcriptional profiling of *Staphylococcus aureus* during growth in 2 M NaCl leads to clarification of physiological roles for Kdp and Ktr K⁺ uptake systems. *MBio* **4**: e00407–13.
- Promadej, N., Fiedler, F., Cossart, P., Dramsi, S., et Kathariou, S. (1999) Cell wall teichoic acid glycosylation in *Listeria monocytogenes* serotype 4b requires *gtcA*, a novel, serogroup-specific gene. *J. Bacteriol.* **181**: 418–425.
- Pucciarelli, M.G., Bierne, H., et García-del Portillo, F. (2007) The cell wall of *Listeria monocytogenes* and its role in pathogenicity. In, Goldfine, H. et Sghen, H. (eds), *Listeria monocytogenes: Pathogenesis and Host response*. Springer US, New York, pp. 81–110.
- Raengpradub, S., Wiedmann, M., et Boor, K.J. (2008) Comparative analysis of the σ^B -dependent stress responses in *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* strains exposed to selected

- stress conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**: 158–171.
- Ragoonanan, V., Malsam, J., Bond, D.R., et Aksan, A. (2008) Roles of membrane structure and phase transition on the hyperosmotic stress survival of *Geobacter sulfurreducens*. *Biochim. Biophys. Acta* **1778**: 2283–2290.
- Raimann, E., Schmid, B., Stephan, R., et Tasara, T. (2009) The alternative sigma factor σ^L of *L. monocytogenes* promotes growth under diverse environmental stresses. *Foodborne Pathog. Dis.* **6**: 583–591.
- Ratani, S.S., Siletzky, R.M., Dutta, V., Yildirim, S., Osborne, J.A., Lin, W., et al. (2012) Heavy metal and disinfectant resistance of *Listeria monocytogenes* from foods and food processing plants. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**: 6938–6945.
- Rea, R., Hill, C., et Gahan, C.G.M. (2005) *Listeria monocytogenes* PerR mutants display a small-colony phenotype, increased sensitivity to hydrogen peroxide, and significantly reduced murine virulence. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 8314–8322.
- Rea, R.B., Gahan, C.G.M., et Hill, C. (2004) Disruption of putative regulatory loci in *Listeria monocytogenes* demonstrates a significant role for Fur and PerR in virulence. *Infect. Immun.* **72**: 717–727.
- Robichon, D., Gouin, E., Débarbouillé, M., Cossart, P., Cenatiempo, Y., et Héchard, Y. (1997) The *rpoN* (σ^{54}) gene from *Listeria monocytogenes* is involved in resistance to mesentericin Y105, an antibacterial peptide from *Leuconostoc mesenteroides*. *J. Bacteriol.* **179**: 7591–7594.
- Roche, S.M., Grepinet, O., Kerouanton, A., Ragon, M., Leclercq, A., Temoin, S., et al. (2012) Polyphasic characterization and genetic relatedness of low-virulence and virulent *Listeria monocytogenes* isolates. *BMC Microbiol.* **12**: 304.
- Roche, S.M., Velge, P., Bottreau, E., Durier, C., Marquet-van der Mee, N., et Pardon, P. (2001) Assessment of the virulence of *Listeria monocytogenes*: agreement between a plaque-forming assay with HT-29 cells and infection of immunocompetent mice. *Int. J. Food Microbiol.* **68**: 33–44.
- Rocourt, J. (1988) Taxonomy of the genus *Listeria*. *Infection* **16**: 89–91.
- Rocourt, J. et Seeliger, H.P.R. (1985) Distribution des espèces du genre *Listeria*. *Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene, Serie A: Medizinische Mikrobiologie, Infektionskrankheiten und Virologie*. **259**: 317–330.

- Rodríguez, E., Calzada, J., Arqués, J.L., Rodríguez, J.M., Nuñez, M., et Medina, M. (2005) Antimicrobial activity of pediocin-producing *Lactococcus lactis* on *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* O157:H7 in cheese. *Int. Dairy J.* **15**: 51–57.
- Ryan, S., Begley, M., Gahan, C.G.M., et Hill, C. (2009) Molecular characterization of the arginine deiminase system in *Listeria monocytogenes*: regulation and role in acid tolerance. *Environ. Microbiol.* **11**: 432–445.
- Sallen, B., Rajoharison, A., Desvarenne, S., Quinn, F., et Mabilat, C. (1996) Comparative analysis of 16S and 23S rRNA sequences of *Listeria* species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **46**: 669–674.
- Sant’Ana, A.S., Igarashi, M.C., Landgraf, M., Destro, M.T., et Franco, B.D.G.M. (2012) Prevalence, populations and pheno- and genotypic characteristics of *Listeria monocytogenes* isolated from ready-to-eat vegetables marketed in São Paulo, Brazil. *Int. J. Food Microbiol.* **155**: 1–9.
- Santivarangkna, C., Wenning, M., Foerst, P., et Kulozik, U. (2007) Damage of cell envelope of *Lactobacillus helveticus* during vacuum drying. *J. Appl. Microbiol.* **102**: 748–756.
- Schlech, W.F. (2000) Foodborne listeriosis. *Clin. Infect. Dis.* **31**: 770–775.
- Schlech, W.F., Lavigne, P.M., Bortolussi, R.A., Allen, A.C., Haldane, E.V., Wort, A.J., et al. (1983) Epidemic listeriosis - Evidence for transmission by food. *New Engl. J. Med.* **308**: 203–206.
- Schmid, B., Klumpp, J., Raimann, E., Loessner, M.J., Stephan, R., et Tasara, T. (2009) Role of cold shock proteins in growth of *Listeria monocytogenes* under cold and osmotic stress conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**: 1621–1627.
- Scotti, M., Monzó, H.J., Lacharme-Lora, L., Lewis, D.A., et Vázquez-Boland, J.A. (2007) The PrfA virulence regulon. *Microbes Infect.* **9**: 1196–1207.
- Senaratna, T., Mckersie, B.D., et Borochoy, A. (1987) Desiccation and free radical mediated changes in plant membranes. *J. Exp. Bot.* **38**: 2005–2014.
- Seveau, S., Pizarro-Cerda, J., et Cossart, P. (2007) Molecular mechanisms exploited by *Listeria monocytogenes* during host cell invasion. *Microbes Infect.* **9**: 1167–1175.
- Shen, Y., Naujokas, M., Park, M., et Ireton, K. (2000) InlB-dependent internalization of *Listeria* is mediated by the Met receptor tyrosine kinase. *Cell* **103**: 501–510.
- Shetty, A., McLauchlin, J., Grant, K., O’Brien, D., Howard, T., et Davies, E.M. (2009) Outbreak

- of *Listeria monocytogenes* in an oncology unit associated with sandwiches consumed in hospital. *J. Hosp. Infect.* **72**: 332–336.
- Shirkey, B., Kovarcik, D.P., Wright, D.J., Wilmoth, G., Prickett, T.F., Helm, R.F., et al. (2000) Active Fe-containing superoxide dismutase and abundant *sodF* mRNA in *Nostoc commune* (cyanobacteria) after years of desiccation. *J. Bacteriol.* **182**: 189–197.
- Silva, I.M.M., Almeida, R.C.C., Alves, M.A.O., et Almeida, P.F. (2003) Occurrence of *Listeria* spp. in critical control points and the environment of Minas Frescal cheese processing. *Int. J. Food Microbiol.* **81**: 241–248.
- Silva, S., Teixeira, P., Oliveira, R., et Azeredo, J. (2008) Adhesion to and viability of *Listeria monocytogenes* on food contact surfaces. *J. Food Prot.* **71**: 1379–1385.
- Simões, M., Simões, L.C., et Vieira, M.J. (2010) A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT - Food Sci. Technol.* **43**: 573–583.
- Simonin, H., Beney, L., et Gervais, P. (2007a) Cell death induced by mild physical perturbations could be related to transient plasma membrane modifications. *J. Membr. Biol.* **216**: 37–47.
- Simonin, H., Beney, L., et Gervais, P. (2007b) Sequence of occurring damages in yeast plasma membrane during dehydration and rehydration: Mechanisms of cell death. *Biochim. Biophys. Acta* **1768**: 1600–1610.
- Skandamis, P.N., Yoon, Y., Stopforth, J.D., Kendall, P.A., et Sofos, J.N. (2008) Heat and acid tolerance of *Listeria monocytogenes* after exposure to single and multiple sublethal stresses. *Food Microbiol.* **25**: 294–303.
- Sleator, R.D., Francis, G.A., O’Beirne, D., Gahan, C.G.M., et Hill, C. (2003a) Betaine and carnitine uptake systems in *Listeria monocytogenes* affect growth and survival in foods and during infection. *J. Appl. Microbiol.* **95**: 839–846.
- Sleator, R.D., Gahan, C.G., et Hill, C. (2001a) Identification and disruption of the *proBA* locus in *Listeria monocytogenes*: role of proline biosynthesis in salt tolerance and murine infection. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 2571–2577.
- Sleator, R.D., Gahan, C.G.M., et Hill, C. (2003b) A postgenomic appraisal of osmotolerance in *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 1–9.
- Sleator, R.D., Gahan, C.G.M., O’Driscoll, B., et Hill, C. (2000) Analysis of the role of *betL* in contributing to the growth and survival of *Listeria monocytogenes* LO28. *Int. J. Food Microbiol.* **60**: 261–268.

- Sleator, R.D. et Hill, C. (2005) A novel role for the LisRK two-component regulatory system in listerial osmotolerance. *Clin. Microbiol. Infect.* **11**: 599–601.
- Sleator, R.D. et Hill, C. (2001) Bacterial osmoadaptation: the role of osmolytes in bacterial stress and virulence. *FEMS Microbiol. Rev.* **26**: 49–71.
- Sleator, R.D. et Hill, C. (2010) Compatible solutes: the key to *Listeria*'s success as a versatile gastrointestinal pathogen? *Gut Pathog.* **2**: 20.
- Sleator, R.D., Wouters, J., Gahan, C.G.M., Abee, T., et Hill, C. (2001b) Analysis of the role of OpuC, an osmolyte transport system, in salt tolerance and virulence potential of *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 2692–2698.
- Smith, J.L. (2004) The physiological role of ferritin-like compounds in bacteria. *Crit. Rev. Microbiol.* **30**: 173–185.
- Snapir, Y.M., Vaisbein, E., et Nassar, F. (2006) Low virulence but potentially fatal outcome-*Listeria ivanovii*. *Eur. J. Intern. Med.* **17**: 286–287.
- Soni, K.A., Nannapaneni, R., et Tasara, T. (2011) The contribution of transcriptomic and proteomic analysis in elucidating stress adaptation responses of *Listeria monocytogenes*. *Foodborne Pathog. Dis.* **8**: 843–852.
- Stack, H.M., Sleator, R.D., Bowers, M., Hill, C., et Gahan, C.G.M. (2005) Role for HtrA in stress induction and virulence potential in *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 4241–4247.
- Suárez, M., González-Zorn, B., Vega, Y., Chico-Calero, I., et Vázquez-Boland, J.A. (2001) A role for ActA in epithelial cell invasion by *Listeria monocytogenes*. *Cell. Microbiol.* **3**: 853–864.
- Swaminathan, B. et Gerner-Smidt, P. (2007) The epidemiology of human listeriosis. *Microbes Infect.* **9**: 1236–1243.
- Takahashi, H., Kuramoto, S., Miya, S., et Kimura, B. (2011) Desiccation survival of *Listeria monocytogenes* and other potential foodborne pathogens on stainless steel surfaces is affected by different food soils. *Food Control* **22**: 633–637.
- Thévenot, D., Delignette-Muller, M.L., Christieans, S., et Vernozy-Rozand, C. (2005) Fate of *Listeria monocytogenes* in experimentally contaminated French sausages. *Int. J. Food Microbiol.* **101**: 189–200.
- Tourdjman, M., Laurent, É., et Leclercq, A. (2014a) Listériose humaine: une zoonose d'origine

- alimentaire. *Rev. Francoph. des Lab.* **464**: 37–44.
- Tourdjman, M., Leroux, B., Leclercq, A., Laurent, E., Chenal-Francisque, V., King, L., et al. (2014b) Épidémie d'infections à *Listeria monocytogenes* liée à la consommation de brie au lait cru – France, 2012. *Saint-Maurice Inst. Veill. Sanit.* 15 p.
- de Valk, H., Vaillant, V., Jacquet, C., Rocourt, J., Le Querrec, F., Stainer, F., et al. (2001) Two consecutive nationwide outbreaks of Listeriosis in France, October 1999–February 2000. *Am. J. Epidemiol.* **154**: 944–950.
- van der Veen, S., Hain, T., Wouters, J.A., Hossain, H., de Vos, W.M., Abee, T., et al. (2007) The heat-shock response of *Listeria monocytogenes* comprises genes involved in heat shock, cell division, cell wall synthesis, and the SOS response. *Microbiology* **153**: 3593–3607.
- van der Veen, S., van Schalkwijk, S., Molenaar, D., de Vos, W.M., Abee, T., et Wells-Bennik, M.H.J. (2010) The SOS response of *Listeria monocytogenes* is involved in stress resistance and mutagenesis. *Microbiology* **156**: 374–384.
- Verheul, A., Russell, N.J., Hof, R.V.T., Rombouts, F.M., Abee, T., Rombouts, F.M., et Abee, T. (1997) Modifications of membrane phospholipid composition in nisin-resistant *Listeria monocytogenes* Scott A. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 3451–3457.
- Vogel, B.F., Hansen, L.T., Mordhorst, H., et Gram, L. (2010) The survival of *Listeria monocytogenes* during long term desiccation is facilitated by sodium chloride and organic material. *Int. J. Food Microbiol.* **140**: 192–200.
- Vogel, B.F., Huss, H.H., Ojeniyi, B., Ahrens, P., et Gram, L. (2001) Elucidation of *Listeria monocytogenes* contamination routes in cold-smoked salmon processing plants detected by DNA-based typing methods. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 2586–2595.
- Völker, U., Maul, B., et Hecker, M. (1999) Expression of the σ^B -dependent general stress regulon confers multiple stress resistance in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **181**: 3942–3948.
- Wang, J., Ray, A.J., Hammons, S.R., et Oliver, H.F. (2015) Persistent and transient *Listeria monocytogenes* strains from retail deli environments vary in their ability to adhere and form biofilms and rarely have *inlA* premature stop codons. *Foodborne Pathog. Dis.* **12**: 151–158.
- Watkins, J. et Sleath, K.P. (1981) Isolation and enumeration of *Listeria monocytogenes* from sewage, sewage sludge and river water. *J. Appl. Bacteriol.* **50**: 1–9.
- Watson, D., Sleator, R.D., Casey, P.G., Hill, C., et Gahan, C.G.M. (2009) Specific osmolyte transporters mediate bile tolerance in *Listeria monocytogenes*. *Infect. Immun.* **77**: 4895–

4904.

- Webb, H.K., Truong, V.K., Hasan, J., Crawford, R.J., et Ivanova, E.P. (2011) Physico-mechanical characterisation of cells using atomic force microscopy - Current research and methodologies. *J. Microbiol. Methods* **86**: 131–139.
- Weis, J. et Seeliger, H.P.R. (1975) Incidence of *Listeria monocytogenes* in nature. *Appl. Environ. Microbiol.* **30**: 29–32.
- Weller, D., Andrus, A., Wiedmann, M., et den Bakker, H.C. (2015) *Listeria booriae* sp. nov. and *Listeria newyorkensis* sp. nov., from food processing environments in the USA. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **65**: 286–292.
- Welsh, D.T. (2000) Ecological significance of compatible solute accumulation by microorganisms: from single cells to global climate. *FEMS Microbiol. Rev.* **24**: 263–290.
- Wemekamp-Kamphuis, H.H., Wouters, J.A., de Leeuw, P.P.L.A., Hain, T., Chakraborty, T., et Abee, T. (2004) Identification of sigma factor σ^B -controlled genes and their impact on acid stress, high hydrostatic pressure, and freeze survival in *Listeria monocytogenes* EGD-e. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 3457–3466.
- Wemekamp-Kamphuis, H.H., Wouters, J.A., Sleator, D., Gahan, C.G.M., Hill, C., Abee, T., et Sleator, R.D. (2002) Multiple deletions of the osmolyte transporters BetL, Gbu, and OpuC of *Listeria monocytogenes* affect virulence and growth at high osmolarity. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 4710–4716.
- Wirtanen, G. et Salo, S. (2003) Disinfection in food processing – efficacy testing of disinfectants. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* **2**: 293–306.
- Wonderling, L.D., Wilkinson, B.J., et Bayles, D.O. (2004) The *htrA* (*degP*) gene of *Listeria monocytogenes* 10403S is essential for optimal growth under stress conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 1935–1943.
- Xu, D., Li, Y., Zahid, M.S.H., Yamasaki, S., Shi, L., Li, J., et Yan, H. (2014) Benzalkonium chloride and heavy-metal tolerance in *Listeria monocytogenes* from retail foods. *Int. J. Food Microbiol.* **190**: 24–30.
- Zhang, C., Nietfeldt, J., Zhang, M., et Benson, A.K. (2005) Functional consequences of genome evolution in *Listeria monocytogenes*: the *lmo0423* and *lmo0422* genes encode σ^C and LstR, a lineage II-specific heat shock system. *J. Bacteriol.* **187**: 7243–7253.
- Zhu, K., Bayles, D.O., Xiong, A., Jayaswal, R.K., et Wilkinson, B.J. (2005) Precursor and

- temperature modulation of fatty acid composition and growth of *Listeria monocytogenes* cold-sensitive mutants with transposon-interrupted branched-chain α -keto acid dehydrogenase. *Microbiology* **151**: 615–623.
- Ziegelhoffer, E.C. et Donohue, T.J. (2009) Bacterial responses to photo-oxidative stress. *Nat. Rev. Microbiol.* **7**: 856–863.
- Ziuzina, D., Han, L., Cullen, P.J., et Bourke, P. (2015) Cold plasma inactivation of internalised bacteria and biofilms for *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli*. *Int. J. Food Microbiol.* **210**: 53–61.
- Ziuzina, D., Patil, S., Cullen, P.J., Keener, K.M., et Bourke, P. (2014) Atmospheric cold plasma inactivation of *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and *Listeria monocytogenes* inoculated on fresh produce. *Food Microbiol.* **42**: 109–116.

Annexes

Annexe 1 : Liste des publications et communication orales et écrites

Publications

F. Zoz, C. Iaconelli, E. Lang, H. Iddir, S. Guyot, C. Grandvalet, P. Gervais, L. Beney (2016) Control of relative air humidity as a potential means to improve hygiene on surfaces: a preliminary approach with *Listeria monocytogenes*. PLoS One 11, e0148418.

E. Lang, **F. Zoz**, C. Iaconelli, S. Guyot, P. Alvarez-Martin, L. Beney, J.M. Perrier-Cornet, P. Gervais (2016) Recovery estimation of dried foodborne pathogens is directly related to rehydration kinetics. PLoS One 11, e0160844.

E. Lang, C. Iaconelli, **F. Zoz**, S. Guyot, P. Alvarez-Martin, L. Beney, J.M. Perrier-Cornet, P. Gervais (2016) Drying parameters greatly affect the destruction of *Cronobacter sakazakii* and *Salmonella* Thyphimurium in standard buffer and milk" Accepté dans le journal Food Microbiology.

F. Zoz, C. Grandvalet, E. Lang, C. Iaconelli, P. Gervais, S. Guyot, L. Beney. "*Listeria monocytogenes* ability to survive desiccation: influence of serotype, origin, virulence and genotype". En soumission dans le journal International Journal of Food Microbiology.

Communications par poster

Forum des jeunes chercheurs, Dijon, France (Juin 2015) **F. Zoz**, S. Guyot, C. Grandvalet, P. Gervais, L. Beney. "Maîtrise de l'humidité relative pour contrôler la survie de *Listeria monocytogenes*".

Congrès européen de l'International Association of Food protection (IAFP), Cardiff, Pays de Galles (Avril 2015) **F. Zoz**, S. Guyot, C. Grandvalet, P. Gervais, L. Beney. "Use of relative humidity fluctuations to kill foodborne pathogen *Listeria monocytogenes*".

Congrès de la Société Française de Microbiologie (SFM), Paris, France (Mars 2015) **F. Zoz**, S. Guyot, C. Grandvalet, P. Gervais, L. Beney. "Maîtrise de l'humidité relative pour contrôler la survie de *Listeria monocytogenes*".

Congrès FoodMicro2014, Nantes, France (Septembre 2014) **F. Zoz**, S. Guyot, C. Grandvalet, P. Gervais, L. Beney. "Use of relative humidity fluctuations to kill foodborne pathogen *Listeria monocytogenes*".

Communications orales

Séminaire EcoSec, Maison Alfort, France (Juin 2016) **F. Zoz**, S. Guyot, C. Grandvalet, P. Gervais, L. Beney. "L'humidité relative de l'air: un paramètre clé pour l'hygiène des ateliers de production alimentaire".

Séminaire EcoSec, Clermont-Ferrand, France (Octobre 2015) **F. Zoz**, S. Guyot, C. Grandvalet, P. Gervais, L. Beney. "Décontamination microbienne des surfaces: évaluation du potentiel de l'humidité relative sur la destruction et la physiologie de *Listeria monocytogenes*".

Séminaire EcoSec, Dijon, France (Décembre 2014) **F. Zoz**, S. Guyot, C. Grandvalet, P. Gervais, L. Beney. "Influence de l'humidité relative sur la survie de *Listeria monocytogenes*".

Annexe 2 : Publication "Recovery estimation of dried foodborne pathogens is directly related to rehydration kinetics"



RESEARCH ARTICLE

Recovery Estimation of Dried Foodborne Pathogens Is Directly Related to Rehydration Kinetics

Emilie Lang^{1,2}, Fiona Zoz¹, Cyril Iaconelli¹, Stéphane Guyot¹, Pablo Alvarez-Martin², Laurent Beney¹, Jean-Marie Perrier-Cornet¹, Patrick Gervais^{1*}

1 Unité Mixte de Recherche—Procédés Alimentaires et Microbiologiques (UMR PAM), Université de Bourgogne Franche-Comté, AgroSup Dijon, 1, Esplanade Erasme, 21000, Dijon, France, **2** Novolyze, 50 rue de Dijon, 21121, Daix, France

* patrick.gervais@u-bourgogne.fr



OPEN ACCESS

Citation: Lang E, Zoz F, Iaconelli C, Guyot S, Alvarez-Martin P, Beney L, et al. (2016) Recovery Estimation of Dried Foodborne Pathogens Is Directly Related to Rehydration Kinetics. PLoS ONE 11(8): e0160844. doi:10.1371/journal.pone.0160844

Editor: Anderson de Souza Sant'Ana, University of Campinas, BRAZIL

Received: March 11, 2016

Accepted: July 26, 2016

Published: August 5, 2016

Copyright: © 2016 Lang et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: Agence Nationale de la Recherche et de la Technologie: The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. Novolyze provided support in the form of salaries for authors [EL and PAM] and had a role in decision to publish, but did not have any additional role in the study design, data collection and analysis, or preparation of the manuscript. The specific roles of these authors are articulated in the 'author contributions' section.

Abstract

Drying is a common process which is used to preserve food products and technological microorganisms, but which is deleterious for the cells. The aim of this study is to differentiate the effects of drying alone from the effects of the successive and necessary rehydration. Rehydration of dried bacteria is a critical step already studied in starter culture but not for different kinetics and not for pathogens. In the present study, the influence of rehydration kinetics was investigated for three foodborne pathogens involved in neonatal diseases caused by the consumption of rehydrated milk powder: *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Senftenberg and *Cronobacter sakazakii*. Bacteria were dried in controlled relative humidity atmospheres and then rehydrated using different methods. Our results showed that the survival of the three pathogens was strongly related to rehydration kinetics. Consequently, rehydration is an important step to consider during food safety assessment or during studies of dried foodborne pathogens. Also, it has to be considered with more attention in consumers' homes during the preparation of food, like powdered infant formula, to avoid pathogens recovery.

Introduction

Drying is an environmental and technological perturbation involving a water transfer from a liquid state to a gaseous state, following the a_w gradient which allows the transformation from a liquid to a solid and dried product. Water activity or a_w represents the available water for chemical and biochemical reactions and is theoretically comprised between 0 (no water) and 1 (pure water). During drying, the water activity of products is reduced, preventing bacterial growth and below an a_w of 0.6, no microorganisms can grow. This is the reason why drying is a common method used for the preservation of food products or microorganisms of technological interest such as lactic acid and probiotic bacteria. Several methods can be used to reduce a_w and, consequently, to dry food or microorganisms. Common drying processes are spray-drying, fluidized bed drying and freeze-drying [1,2] and are used to conserve dried food

Competing Interests: EL and PAM are employed by Novolyze. There are no patents, products in development or marketed products to declare. This does not alter the authors' adherence to all the PLOS ONE policies on sharing data and materials, as detailed online in the guide for authors.

products such as herbs, spices or milk. Moreover, drying has a deleterious effect on cells. Indeed, at the beginning of the drying process, evaporation of water causes an increase in the osmotic pressure of the extracellular medium and, consequently, provokes a large cellular water outflow from the cells creating then an osmotic stress which is damaging for cells [3]. Afterward, in the case of drying conducting to products of low a_w , the water removal from extracellular and intracellular media will provoke a direct exposition of cells to oxygen in the air which generates reactive oxygen species in cells and the accumulation of free radicals, creating oxidative stress [3,4]. Damages caused by this stress affect macromolecules and membranes [3,5–9]. Nevertheless, even if drying involves cellular injuries to bacterial cells, dried foods are non-sterilized foods [10] and a large range of microorganisms can survive drying such as fungi, like *Aspergillus* spores, bacteria, like *Salmonella* spp., and viruses, like Norovirus [10,11]. Some of them can be dangerous for consumers' health and this is the reason why a great deal of research is focused on the development of specific decontamination processes [12] for the purpose of achieving a minimal microbial load in dried food according to legal requirements and for consumer health protection.

Assessment of microbial survival in dried products involves a rehydration step that is necessary in the method to restore cellular activities, permitting to reach a physiological a_w . The influence of this step has already been studied for the optimization of preservation processes of lactic acid bacteria and flora with technological purpose in a dried form [1]. For example, Morgan *et al.* (2006) reviewed the impact of rehydration of freeze dried lactic acid bacteria and presented it as the final critical step for the revival of cells after drying. Nevertheless, the rehydration kinetics has not been investigated in foodborne pathogens. Moreover, this step has been neglected in the case of pathogens contaminating dried foods or environments. Accordingly, the current method for microbial safety assessment of dried food products is based on their rehydration in a liquid buffer before diluting and spreading for cultivability measurement. However, the rehydration mode, and particularly rehydration kinetics, could drastically impact the cultivability measurement and could lead to erroneous estimation of pathogenic bacteria. This may pose a risk for the consumer due to an underestimation of pathogenic bacteria. Moreover, dried foods are often rehydrated by the user and therefore the impact of rehydration could also directly impact food contamination and consumer health.

Low-moisture foods are not sterile, therefore they can be involved in foodborne outbreaks. For example, *Enterobacteriaceae*, such as *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enterica* and also *Cronobacter sakazakii*, are implicated in outbreaks linked low-moisture foods, such as spices, flour, powdered infant formula (PIF) or herbs [10,11,13,14]. Among bacteria found in dried food products, *Salmonella enterica* is one of the most represented foodborne bacteria every year across the world. Regarding *Cronobacter sakazakii*, even if incidence is low, it is involved in neonatal meningitis with a death rate up to 80%, hence the importance of assessing microbial contamination.

In the present study, we aimed to distinguish the effects of drying alone from the effects of the successive and necessary rehydration in order to investigate the effect of rehydration kinetics after drying on the survival of three pathogens: *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Senftenberg and *Cronobacter sakazakii*.

Materials and Methods

Bacterial strains

Salmonella enterica subspecies *enterica* serovar Typhimurium DT104 DSM 10506, *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar Senftenberg DT104 DSM 10062 and *Cronobacter sakazakii* CIP 103183T strains were used for this study. Bacteria were inoculated on Tryptic Soya Agar (TSA, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France) at 37°C (+/- 0.1°C) for 24 h,

subsequently five colonies of each bacterium were inoculated in 50 mL of Tryptic Soya Broth (TSB, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France) and incubated for 8 h at 37°C (\pm 0.1°C). Suspensions were then diluted in 50 mL of fresh TSB in order to adjust an Optical Density at 600 nm (OD_{600} , measured by using a Thermo Scientific, Spectronic 200, Villebon sur Yvette, France) of 0.01 (corresponding approximately to 10^6 CFU/mL) before incubation for 14 h at 37°C (\pm 0.1°C) to reach stationary growth phase cultures.

Drying conditions

Drying atmosphere. For the desiccation of the cellular suspensions, hermetic plastic boxes ($20 \times 13 \times 6$ cm) were used, with saturated salt solutions at the bottom which regulated the a_w and therefore the atmosphere RH. Saturated salt solution of lithium chloride, potassium acetate, potassium carbonate and magnesium nitrate (all from Sigma-Aldrich) were used to reach an a_w of 0.11, 0.25, 0.44 and 0.58, respectively, checked using an a_w -meter (\pm 0.003) (Aqualab, Dardilly, France). In the hermetic boxes, a_w permitted to maintain a RH of 11%, 25%, 44% and 58%, respectively, checked with RH sensors (\pm 0.5% RH) (Lascar, Radiospare, France). Internal atmospheres were stirred using a ventilator (Sunon, Radiospare, France) and all experiments were performed at room temperature.

Preparation of the initial cell suspension. The cell concentration of the stationary growth phase culture was checked and adjusted to 1×10^8 CFU/mL through the measurement of the OD_{600} . 25 mL of each culture were centrifuged (3,400 g, 10 min at 25°C, Eppendorf 5810 R, Montesson, France) and washed twice with an equal volume of PBS (Phosphate Buffered Saline, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France). In a final step, the supernatant was removed and cell pellets were suspended in 25 mL of PBS. The final bacterial number was checked by measuring OD_{600} . The final cells counts were determined by plating on TSA. Plates were incubated for 24 h at 37°C (\pm 0.1°C) and bacterial concentration was expressed in CFU/mL (Colony Forming Unit/mL).

Rehydration impact after different drying intensities

Drying and instantaneous rehydration. For each experiment, a droplet (10 μ L) of bacterial suspensions was spread in a thin layer onto a glass Petri dish (with 3 cm diameter) which was placed at 58%, 44%, 25% and 11% RH during 90 min. After the desiccation, cells were rehydrated by instantaneous (1 s) addition of 990 μ L of PBS ($a_w = 0.995$, checked using an a_w -meter) and homogenization by pipetting and using a cell scraper (Greiner, Les Ulis, France). Then, cells were diluted in PBS ($a_w = 0.995$) and counted by plating on TSA ($a_w = 0.995$) incubated for 24 h at 37°C (\pm 0.1°C) (Fig 1(A)).

Drying and rapid rehydration. Droplets (10 μ L) of same bacterial suspensions were dried in the same way as for instantaneous rehydration. After the drying, cells were rehydrated by addition of 990 μ L of concentrated PBS (noted cPBS, $a_w = 0.950$, checked using an a_w -meter) and homogenized by pipetting and using a cell scraper (Greiner, Les Ulis, France), corresponding to the first rehydration step. The use of cPBS ($a_w = 0.950$) resulted in the partial rehydration of bacterial cells up to an a_w of 0.950 (compared to PBS with $a_w = 0.995$) imposing a supplementary step before total rehydration of the bacterial cells at an a_w of 0.995. After 30 s, for the second step, dilution was performed in PBS ($a_w = 0.995$) and counted by plating on TSA ($a_w = 0.995$) incubated for 24 h at 37°C (\pm 0.1°C) (Fig 1(B)).

Drastic drying and slow rehydration rates

Droplets (10 μ L) of bacterial suspensions were spread in thin layer on glass. They were placed at 11% RH for 90 min, i.e. the more drastic drying condition. After the drying, cells were

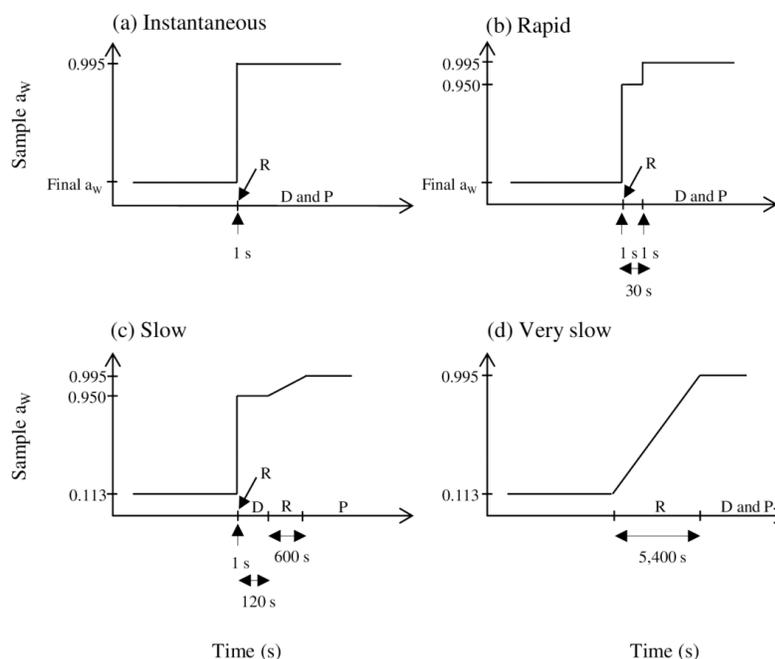


Fig 1. Scheme of different rehydration methods used in this study. (a) Instantaneous rehydration in PBS at 0.995 for 1 s. (b) Rapid rehydration in cPBS (concentrated PBS) at 0.950 (about 1 s), holding time at 0.950 for 30 s and diluting in PBS at 0.995 for 1 s before plating. (c) Slow rehydration in cPBS at 0.950 for 1 s and holding at 0.950 by diluting in cPBS for 2 min before plating during which ramp rehydration (i.e. a progressive evolution of rehydration level) occurred on Petri dishes for about 10 min to reach an a_w of 0.995. (d) Very slow rehydration by placing bacteria in a 100% RH atmosphere for 90 min before diluting and plating. R: Rehydration. D: Dilution. P: Plating. Even if only drying at an a_w of 0.11 was presented, rehydration presented in (a) and (b) were also performed to reach an a_w of 0.58, 0.44 and 0.25 in atmosphere RH at 58%, 44% and 25%.

doi:10.1371/journal.pone.0160844.g001

rehydrated by two other complementary methods: (i) a slow rehydration was performed such as previously in cPBS but the successive dilution were performed in cPBS to maintain bacteria at 0.950, 10 μ L of each dilution was dropped on a TSA plate with an $a_w = 0.995$ (see Fig 1(C) for the corresponding scheme). This drop on the TSA media involved then a linear increase of the cell suspension a_w (from 0.950 to 0.995). Cells were counted by plating on TSA incubated for 24 h at 37°C (+/- 0.1°C). The second complementary rehydration method is (ii) a very slow rehydration which was performed by placing dried bacteria in an atmosphere maintained at 100% RH (checked using an RH sensor) thanks to vapor transfer from distilled water at room temperature for 90 min permitting bacteria to reach an a_w of 0.995. Cells were then homogenized by pipetting and then counted by diluting in PBS ($a_w = 0.995$) and plating on TSA incubated for 24 h at 37°C (+/- 0.1°C) (see Fig 1(D) for the corresponding scheme).

Statistical analysis

The loss of cultivability was expressed in $\log_{10}(N/N_0)$, where N represents the bacterial concentration (CFU/mL) after the drying/rehydration cycle and N_0 represents the bacterial

concentration (CFU/mL) before stress, for each condition. All experiments were performed in completely independent triplicates, from independent subcultures and cultures. With the purpose of comparing the various results obtained in this study, first the variance homogeneity (F-test) was tested and then (if $p > 0.05$) an ANOVA or a t -test were performed. For significant ANOVA, Tukey's HSD (Honest Significant Difference) test was achieved. Analyses were performed on R software.

Results

Rehydration impact after different drying intensities

After drying at different RH, bacteria were rehydrated in two different manners: (i) instantaneous rehydration and (ii) rapid rehydration (Fig 1(A) and 1(B)). The loss of cultivability after drying and rehydration is represented in Fig 2. A significant difference was observed in bacteria survival with a significant effect of species (ANOVA, $p < 0.05$) and a highly significant effect of rehydration (ANOVA, $p < 0.01$).

Concerning *S. Typhimurium* (Fig 2(B)), the loss of cultivability was higher when instantaneous rehydration was used than when rapid rehydration was used. A significant difference ($p < 0.05$) was detected between both rehydration conditions after a drying at 11% RH, 44% RH and 58% RH. In the cases of *C. sakazakii* (Fig 2(A)) and of *S. Senftenberg* (Fig 2(C)), on the other hand, a significant difference ($p < 0.05$) was only observed in the 58% RH condition, with a more important loss of cultivability after an instantaneous rehydration than after a rapid rehydration.

Rehydration impact after a drastic drying

In order to explore the effect of rehydration kinetics, two supplementary types of slower rehydration were then performed after drying in drastic conditions (11% RH): (i) slow rehydration and (ii) very slow rehydration (Fig 1(C) and 1(D)). The data for loss of cultivability obtained with these new rehydration modes were compared with the previous results obtained with instantaneous and rapid rehydration in the same drying conditions (11% RH) and presented in Fig 3. A highly significant difference was observed for loss of cultivability in the four rehydration kinetics (ANOVA, $p < 0.001$).

For *S. Typhimurium* (Fig 3(B)), differences among loss of cultivability were observed using instantaneous, rapid, slow and very slow rehydration, with no difference between rapid and slow rehydration. A difference of 2 log was observed when comparing the two extreme rehydration modes: instantaneous and very slow rehydration. Regarding *S. Senftenberg* (Fig 3(C)), differences in loss of cultivability were observed in the different rehydration modes used in this study. Two groups were significantly different ($p < 0.05$), represented by the two fastest rehydration kinetics and the two slowest rehydration kinetics. The difference between the instantaneous and very slow rehydration modes represented 2.7 log. Concerning *C. sakazakii* (Fig 3(A)), results similar to those observed for *S. Senftenberg* were obtained. A difference of 1.25 log was noted between instantaneous and very slow rehydration.

Consequently, the rehydration kinetics was primarily responsible for the loss of cultivability obtained after a drying/rehydration cycle.

Discussion

These results obtained in our study clearly show that the inactivation usually and totally attributed to drying is in fact due to a combination of drying and of rehydration. This phenomenon has previously been observed in probiotics [15], lactic acid bacteria [16] or yeast [17,18].

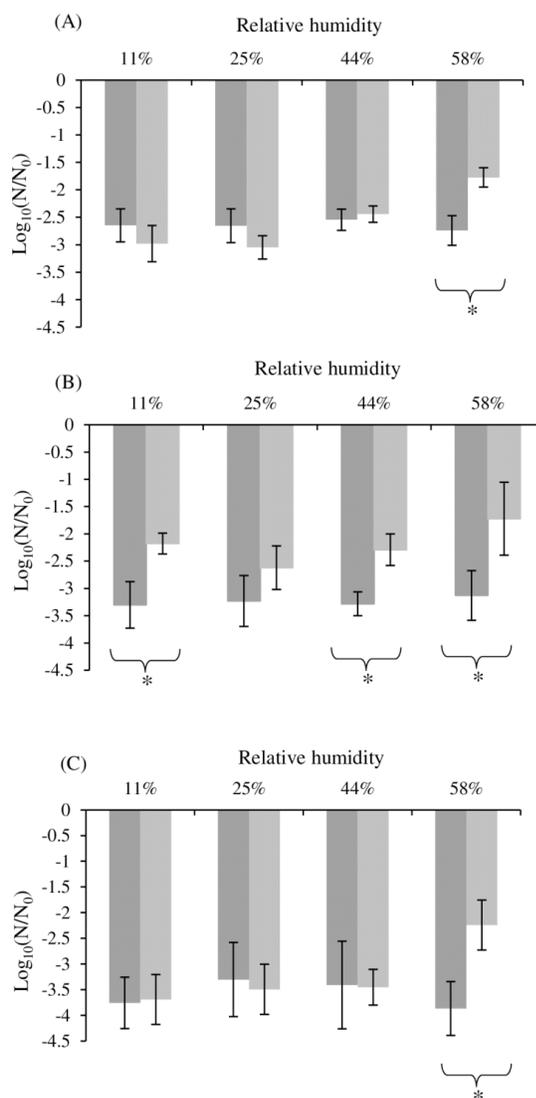


Fig 2. Impact of rehydration after drying on cultivability for *C. sakazakii* (A), *S. Typhimurium* (B) and *S. Senftenberg* (C). Dark grey represents the loss of cultivability obtained with instantaneous rehydration and light grey represents the loss of cultivability with rapid rehydration. Error bars represent SD calculated from triplicates and asterisks represent a significant difference between both conditions (*t*-test, $p < 0.05$). The corresponding dataset was presented in [S1 Table](#).

doi:10.1371/journal.pone.0160844.g002

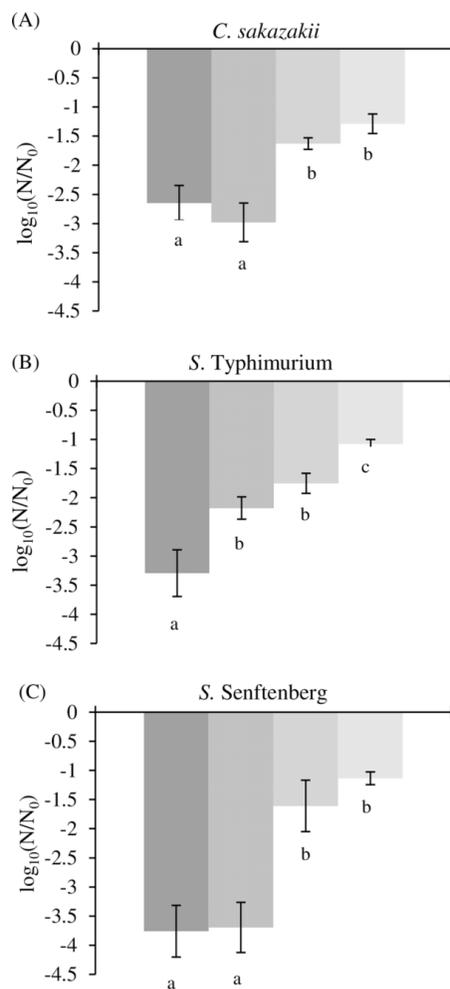


Fig 3. Comparison of four rehydration kinetics after 90 min of drying in an atmosphere at 11% RH for *C. sakazakii* (A), *S. Typhimurium* (B) and *S. Senftenberg* (C). The loss of cultivability obtained with instantaneous, rapid, slow and very slow rehydration is shown going from darker to lighter. Error bars represent SD calculated from independent triplicates. The letters represent a significant difference ($p < 0.05$) obtained with Tukey's HSD (Honest Significant Difference) test. The corresponding dataset was presented in [S2 Table](#).

doi:10.1371/journal.pone.0160844.g003

However, few studies have considered the rehydration of pathogens, such as in surface rehydration [19] or in model media [20]. In the present case, we could clearly assess the impact of rehydration on dried foodborne pathogens through the observed difference of loss of cultivability between the faster and slower rehydration modes. The slower the rehydration kinetics, the smaller the loss of cultivability was. Such a conclusion could raise two issues. The first one

concerns the rehydration performed in classical microbiological food analyses which is often similar to the instantaneous rehydration presented in this study. Indeed, the inactivation of microorganisms during this rehydration would lead to an underestimation of the pathogenic load present in the food and, therefore, to an increased risk for consumers' health. The second one concerns the different personal consumer practices in terms of dried food product rehydration which could also have important consequences on further pathogen survival in the rehydrated product.

Two phenomena occurring during the drying phase could possibly explain this significant loss of cultivability due to fast rehydration kinetics. One is the cell membrane folding followed by an intracellular vesiculation which occurs during drastic drying when water exits the cell swiftly. Plasma membrane vesiculation has already been observed and reported in previous work, both on yeasts and bacteria [9,18,20]. Indeed, this phenomenon leads to a decrease in the area of membrane. During fast rehydration, water rapidly enters the cell which tends to recover its original volume but the membrane ruptures because of its reduced surface. During the slow rehydration of cells, as used in this work, the internal vesicles would have time to reincorporate the membrane and so to prevent the cell from rupture. The other phenomenon which could be considered to explain our observations is related to osmotic solutes or active ion input in the cell during the first phase of drying [3,21,22]. This solute accumulation would involve a supplementary water input during the rehydration which leads to a greater cell volume than the initial one and so to cell rupture. Indeed, in case of instantaneous rehydration, this water input is not compensated by the simultaneous solute and ion output from the cell which have very slow rates of diffusion across the cell membrane (about 100-fold less than water) [23]. Compared to instantaneous rehydration, the rapid rehydration modes used in this study would give the cell time for these solutes or ions to exit and so to recover its initial volume after total rehydration [9]. It could be interesting to evaluate to what extent each phenomenon destroys the cells.

After drying followed by very slow rehydration, no significant differences were observed between loss of cultivability of *S. Typhimurium*, *S. Senftenberg* and *C. sakazakii*, which reached near 1 log for each species (Fig 3). Contrarily, with instantaneous rehydration, a significant difference was observed between the loss of cultivability of each specie, where *C. sakazakii* was more resistant than *S. Typhimurium* and *S. Senftenberg*. Until now, *C. sakazakii* has been known as an *Enterobacteriaceae* which is highly resistant to drying and more resistant than *Salmonella enterica* [10,22,24]. The results presented in this study suggest that the very slow rehydration mode erases the difference in loss of cultivability of the bacterial species. Consequently, it is possible to think that *C. sakazakii* is more resistant to rehydration than *S. enterica* and, consequently, not more resistant to drying by itself, maybe explaining by the different capsular properties of the strains.

Conclusions

Interestingly, the results presented in this study suggest that the impact of drying on the inactivation of pathogen is associated to rehydration kinetics. Indeed, instantaneous rehydration is responsible for the extend inactivation during the drying-rehydration process. Two hypotheses were proposed to understand the role of rehydration kinetics and it seems that appropriate management of rehydration and particularly fast rehydration could enhance the negative effects of drying/rehydration on pathogen cultivability. Rehydration is an important step when cultivability is assessed, impacting the estimation of bacterial contamination and consumer risk. In light of the above conclusions, rehydration after drying has to be normalized during routine microbial analyses in order to avoid underestimating the microbial load in dried food products. During food safety analyses, rehydration procedures need to be standardized.

Likewise, instructions for an optimal rehydration during the use of dried food have to be provided to the consumer. In the future, we suggest that rehydration has to be considered with more attention; further works would consider other foodborne pathogens and the influence of the nature of different dried food products.

Supporting Information

S1 Table. Logarithmic reduction of studied pathogens as function of instantaneous and rapid rehydration at four relative humidity levels (11%, 25%, 44% and 58% RH).
(XLSX)

S2 Table. Logarithmic reduction of studied pathogens as function of four rehydration mods (instantaneous, rapid, slow, and very slow) after drying at 11% RH for 90 min.
(XLSX)

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: EL PG SG JMPC PAM.

Performed the experiments: EL.

Analyzed the data: EL FZ CI PG SG JMPC PAM.

Contributed reagents/materials/analysis tools: EL FZ CI.

Wrote the paper: EL FZ CI SG PAM LB JMPC PG.

References

1. Morgan CA, Herman N, White PA, Vesey G. Preservation of microorganisms by drying; A review. *J Microbiol Methods*. 2006; 66: 183–193. doi: [10.1016/j.mimet.2006.02.017](https://doi.org/10.1016/j.mimet.2006.02.017) PMID: [16632005](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16632005/)
2. Ananta E, Volkert M, Knorr D. Cellular injuries and storage stability of spray-dried *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Int Dairy J*. 2005; 15: 399–409. doi: [10.1016/j.idairyj.2004.08.004](https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2004.08.004)
3. Potts M. Desiccation tolerance: A simple process? *Trends Microbiol*. 2001; 9: 553–559. doi: [10.1016/S0966-842X\(01\)02231-4](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(01)02231-4) PMID: [11825716](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11825716/)
4. Potts M. Desiccation tolerance of prokaryotes. *Microbiol Rev*. 1994; 58: 755–805. PMID: [7854254](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7854254/)
5. Beney L, Mille Y, Gervais P. Death of *Escherichia coli* during rapid and severe dehydration is related to lipid phase transition. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2004; 65: 457–464. doi: [10.1007/s00253-004-1574-x](https://doi.org/10.1007/s00253-004-1574-x) PMID: [15095024](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15095024/)
6. Lemetals G, Dupont S, Beney L, Gervais P. Air-drying kinetics affect yeast membrane organization and survival. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2012; 96: 471–480. doi: [10.1007/s00253-012-4014-3](https://doi.org/10.1007/s00253-012-4014-3) PMID: [22552899](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22552899/)
7. Beney L, Simonin H, Mille Y, Gervais P. Membrane physical state as key parameter for the resistance of the gram-negative *Bradyrhizobium japonicum* to hyperosmotic treatments. *Arch Microbiol*. 2007; 187: 387–396. doi: [10.1007/s00203-006-0203-8](https://doi.org/10.1007/s00203-006-0203-8) PMID: [17160674](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17160674/)
8. Billi D, Potts M. Life and death of dried prokaryotes. *Res Microbiol*. 2002; 153: 7–12. doi: [10.1016/S0923-2508\(01\)01279-7](https://doi.org/10.1016/S0923-2508(01)01279-7) PMID: [11881900](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11881900/)
9. Dupont S, Rapoport A, Gervais P, Beney L. Survival kit of *Saccharomyces cerevisiae* for anhydrobiosis. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2014; 98: 8821–8834. doi: [10.1007/s00253-014-6028-5](https://doi.org/10.1007/s00253-014-6028-5) PMID: [25172136](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25172136/)
10. Beuchat LR, Komitopoulou E, Beckers H, Betts RP, Bourdichon F, Fanning S, et al. Low-water activity foods: Increased concern as vehicles of foodborne pathogens. *J Food Prot*. 2013; 76: 150–172. doi: [10.4315/0362-028X.JFP-12-211](https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-12-211) PMID: [23317872](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23317872/)
11. Van Doren JM, Neil KP, Parish M, Gieraltowski L, Gould LH, Gombas KL. Foodborne illness outbreaks from microbial contaminants in spices, 1973–2010. *Food Microbiol*. 2013; 36: 456–464. doi: [10.1016/j.fm.2013.04.014](https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.04.014) PMID: [24010629](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24010629/)
12. Fine F, Gervais P. Thermal destruction of dried vegetative yeast cells and dried bacterial spores in a convective hot air flow: Strong influence of initial water activity. *Environ Microbiol*. 2005; 7: 40–46. doi: [10.1111/j.1462-2920.2004.00689.x](https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2004.00689.x) PMID: [15643934](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15643934/)

13. Garbowska M, Berthold-Pluta A, Stasiak-Róžańska L. Microbiological quality of selected spices and herbs including the presence of *Cronobacter* spp. *Food Microbiol.* 2015; 49: 1–5. doi: [10.1016/j.fm.2015.01.004](https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.01.004) PMID: [25846909](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25846909/)
14. Forsythe S. Powdered infant formula. In: Gurtler JB, Doyle MP, Kornacki JL, editors. *The microbiological safety of low water activity foods and spices.* London: Springer science+business media, LLC; 2014. pp. 177–211. doi: [10.1007/978-1-4939-2062-4](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2062-4)
15. Meng XC, Stanton C, Fitzgerald GF, Daly C, Ross RP. Anhydrobiotics: The challenges of drying probiotic cultures. *Food Chem.* 2008; 106: 1406–1416. doi: [10.1016/j.foodchem.2007.04.076](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.04.076)
16. Sinha RN, Shukla AK, Madan LAL, Ranganathan B. Rehydration of freeze-dried cultures of lactic streptococci. *J Food Sci.* 1982; 47: 668–669.
17. Trofimova Y, Walker G, Rapoport A. Anhydrobiosis in yeast: Influence of calcium and magnesium ions on yeast resistance to dehydration-rehydration. *FEMS Microbiol Lett.* 2010; 308: 55–61. doi: [10.1111/j.1574-6968.2010.01989.x](https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2010.01989.x) PMID: [20487021](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20487021/)
18. Simonin H, Beney L, Gervais P. Sequence of occurring damages in yeast plasma membrane during dehydration and rehydration: Mechanisms of cell death. *Biochim Biophys Acta—Biomembr.* 2007; 1768: 1600–1610. doi: [10.1016/j.bbamem.2007.03.017](https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2007.03.017)
19. Zoz F, Iaconelli C, Lang E, Iddir H, Guyot S, Grandvalet C, et al. Control of relative air humidity as a potential means to improve hygiene on surfaces: A preliminary approach with *Listeria monocytogenes*. *PLoS One.* 2016; 11: e0148418. doi: [10.1371/journal.pone.0148418](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148418) PMID: [26840373](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26840373/)
20. Mille Y, Beney L, Gervais P. Magnitude and kinetics of rehydration influence the viability of dehydrated *E. coli* K-12. *Biotechnol Bioeng.* 2003; 83: 578–582. doi: [10.1002/bit.10706](https://doi.org/10.1002/bit.10706) PMID: [12827699](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12827699/)
21. Gruzdev N, Pinto R, Sela Saldinger S. Persistence of *Salmonella enterica* during dehydration and subsequent cold storage. *Food Microbiol.* 2012; 32: 415–422. doi: [10.1016/j.fm.2012.08.003](https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.08.003) PMID: [22986208](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22986208/)
22. Alvarez-Ordóñez A, Broussolle V, Colin P, Nguyen-The C, Prieto M. The adaptive response of bacterial food-borne pathogens in the environment, host and food: implications for food safety. *Int J Food Microbiol.* 2015; 213: 99–109. doi: [10.1016/j.ijfoodmicro.2015.06.004](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.06.004) PMID: [26116419](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26116419/)
23. Beney L, Gervais P. Osmotic mass transfer in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand).* 2001; 47: 831–839.
24. Osaili T, Forsythe S. Desiccation resistance and persistence of *Cronobacter* species in infant formula. *Int J Food Microbiol.* 2009; 136: 214–220. doi: [10.1016/j.ijfoodmicro.2009.08.006](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.08.006) PMID: [19720413](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19720413/)

Annexe 3 : Publication "Drying parameters greatly affect the destruction of *Cronobacter sakazakii* and *Salmonella* Typhimurium in standard buffer and milk"

Food Microbiology 62 (2017) 82–91



Contents lists available at ScienceDirect

Food Microbiology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/fm

Drying parameters greatly affect the destruction of *Cronobacter sakazakii* and *Salmonella* Typhimurium in standard buffer and milk



Emilie Lang^{a, b}, Cyril Iaconelli^a, Fiona Zoz^a, Stéphane Guyot^a, Pablo Alvarez-Martin^b, Laurent Beney^a, Jean-Marie Perrier-Cornet^a, Patrick Gervais^{a, *}

^a UMR PAM A 02.102 Procédés Alimentaires et Microbiologiques, Université de Bourgogne Franche-Comté/AgroSup Dijon, 1, Esplanade Erasme, 21000 Dijon, France

^b Novolyze, 50 Rue de Dijon, 21121 Daix, France

ARTICLE INFO

Article history:
Received 7 December 2015
Received in revised form
8 February 2016
Accepted 2 October 2016
Available online 5 October 2016

Keywords:
Salmonella Typhimurium
Cronobacter sakazakii
Cultivability
Milk
Drying conditions

ABSTRACT

Salmonella Typhimurium and *Cronobacter sakazakii* are two foodborne pathogens involved in neonatal infections from milk powder and infant formula. Their ability to survive in low-moisture food and during processing from the decontamination to the dried state is a major issue in food protection. In this work, we studied the effects of the drying process on *Salmonella* Typhimurium and *Cronobacter sakazakii*, with the aim of identifying the drying parameters that could promote greater inactivation of these two foodborne pathogens. These two bacteria were dried under different atmospheric relative humidities in milk and phosphate-buffered saline, and the delays in growth recovery and cultivability were followed. We found that water activity was related to microorganism resistance. *C. sakazakii* was more resistant to drying than was *S. Typhimurium*, and milk increased the cultivability and recovery of these two species. High drying rates and low final water activity levels (0.11–0.58) had a strong negative effect on the growth recovery and cultivability of these species. In conclusion, we suggest that effective use of drying processes may provide a complementary tool for food decontamination and food safety during the production of low-moisture foods.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Salmonella enterica is a Gram-negative, facultative anaerobic, motile, nonspore-forming bacterium that causes human salmonellosis. It is a major pathogen in the food industry and is highly represented in outbreaks across the world, with nearly 100,000 cases reported every year in the European Union. Because of 10^5 – 10^{10} cells in adults and few microorganisms in young children and elderly people (10–100 cells) cause illness, the bacterium is important in food safety and the food industry, and must be eliminated from food products (Bhunia, 2008; Gomez et al., 1997). *Cronobacter sakazakii*, another Gram-negative, facultative anaerobic, motile, and nonspore-forming bacterium, is considered an opportunistic pathogen that can cause severe infections such as meningitis, bacteremia, and necrotizing enterocolitis in infants. However, the infective dose is not well defined and the incidence of this bacterium is largely underestimated. Death rates in

Cronobacter infections are up to 80% and *Cronobacter sakazakii* contamination is another important issue for the infant formula industry (Yan et al., 2012).

In recent years, some reported cases have involved the presence of these two pathogens in infant formula or milk powder (Beuchat et al., 2013). Milk is pasteurized and then spray-dried to provide the low water activity (a_w) of 0.35–0.25 needed to preserve the nutritional, organoleptic, and microbial qualities over time (Beuchat et al., 2013). However, milk contamination can occur during the transfer to spray-drying and during handling of dried milk (Podolak et al., 2010). This is reflected by outbreaks involving *Cronobacter* spp., such as 3 cases in 1986 in Iceland, 4 cases in 1988 in the USA, 12 cases in 1998 in Belgium, 11 cases in 2001 in the USA, 3 cases in 2004 in France, 2 cases in 2008 in USA, and 4 cases in 2011 in USA. Examples of outbreaks involving *Salmonella enterica* include 3000 cases in 1976 in Trinidad, 76 cases in 1986 in the UK, 141 cases in 2005 in France, 42 cases in 2008 in Spain, and 16 cases in 2012 in Russia. These outbreaks involved contamination of powdered infant formula or milk powder, which are low-moisture foods (Beuchat et al., 2013; CDC, 2012, 2009; Finn et al., 2013;

* Corresponding author.
E-mail address: patrick.gervais@u-bourgogne.fr (P. Gervais).

Forsythe, 2014; Institut de veille sanitaire, 2006).

These two bacteria are found in a large range of food products and in the food industry environment (Beuchat et al., 2013; Friedemann, 2007; Iversen and Forsythe, 2004; Jaradat et al., 2009; Van Doren et al., 2013; Yan et al., 2012). a_w is a thermodynamic parameter that reflects the water availability in the environment and can affect every system involving water such as the biochemical, biological, and physiological reactions. Bacteria have many active mechanisms, involving the activation of several resistance pathways, including sugar and amino acid accumulation, scavenger enzyme production, DNA repair, and other protein production processes, to resist dehydration caused by a change in environmental conditions, including preventing or repairing damage (Alvarez-Ordóñez et al., 2015; Billi and Potts, 2002; Deng et al., 2012; Feeney and Sleator, 2011; Gruzdev et al., 2011; Howells et al., 2002; Potts, 2001, 1994; Spector and Kenyon, 2012).

Passive physical reactions take place as water exits cells during drying. The osmotic pressure increases during the first decrease in a_w through to the end of the liquid state, and oxidative stress may occur in response to the cell's exposure to an oxygen-containing atmosphere (Dupont et al., 2014). Below an a_w threshold of ~0.90, active bacterial responses no longer occur because of the low molecular mobility and bacterial metabolism (Billi and Potts, 2002; Potts, 2001, 1994). The preserved molecules needed for bacterial metabolism and cell viability may differ according to the damage caused. Thus, determining the viability by measuring cultivability may be a restrictive way to evaluate bacterial functionality after drying (Lesn et al., 2000; Spector and Kenyon, 2012).

Microorganisms are more resistant to the thermal decontamination process when in the dried state compared with the liquid state (Arroyo et al., 2012; Fine and Gervais, 2005; Laroche and Gervais, 2003; Laroche et al., 2005; Rychlik and Barrow, 2005; Skandamis et al., 2008). This particular resistance is largely attributed to the low molecular mobility (Farakos et al., 2013; Lian et al., 2015), and also to the cross-protection occurring during the transition to the dried state (Finn et al., 2013; Gruzdev et al., 2011; Shen and Fang, 2012). Inactivation of pathogens in low- a_w food is too complicated for accurate prediction because of the complex effects on cultivability (Fine et al., 2005; Finn et al., 2013). Because the drying process is involved in causing bacterial death, drying may be a potential kill step during the handling of dried products.

Because of the danger for infants and the difficulty in eliminating, in dried state, bacterial pathogens such as *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium and *Cronobacter sakazakii*, the drying process is an important step in the control of these pathogens. From this perspective, this study aimed to understand the effects of drying parameters on these two pathogens. Three parameters were controlled: drying substrate, atmospheric relative humidity (RH), and final a_w . To observe the effects of drying on bacterial cells, cultivability after treatment was measured and the growth delay and cell recovery capacity were estimated. This provided an indirect measure of the deleterious effects on and repairable damage to the bacteria.

2. Materials and methods

2.1. Bacteria species

Salmonella enterica subspecies *enterica* serovar Typhimurium DT104 DSM 10506 and *Cronobacter sakazakii* CIP 103183T species were used. All cultures were stored in Tryptic Soy Broth (TSB, Sigma-Aldrich) with 20% glycerol (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France) at $-80\text{ }^\circ\text{C}$. For resuscitation, bacteria were inoculated on Tryptic Soya Agar (TSA, Sigma-Aldrich) at $37\text{ }^\circ\text{C}$ for 24 h and were placed for a maximum of one month at $4\text{ }^\circ\text{C}$. Five colonies

of each bacterium were collected in 50 mL of TSB and incubated for 8 h at $37\text{ }^\circ\text{C}$. Suspensions were then diluted in 50 mL of new TSB to reach an optical density (OD) of 0.01 at 600 nm. Cultures in stationary growth phase were obtained after 14 h at $37\text{ }^\circ\text{C}$.

2.2. Drying conditions

2.2.1. Drying atmosphere

Hermetic boxes were used to dry the cellular suspensions. Saturated salt solutions were placed at the bottom to regulate the a_w and the atmospheric RH. Lithium chloride, potassium acetate, potassium carbonate, and sodium bromide (all from Sigma-Aldrich) were used in sufficient quantity to observed salt crystals in 100 mL of distilled water, corresponding to a height of 2 cm in the bottom of the hermetic boxes. Their respective a_w values were 0.11, 0.25, 0.44, and 0.58, which corresponded to RH values of 11%, 25%, 44%, and 58%, respectively (Greenspan, 1977). The atmosphere was maintained under convection using a ventilator (Sunon, Radiospare, France) as described in previous work (Lemetais et al., 2012). All experiments were performed at room temperature (near $25\text{ }^\circ\text{C}$).

2.2.2. Drying kinetics of PBS and milk by following the weight loss

The drying of phosphate-buffered saline (PBS, Sigma-Aldrich) and whole milk from milk powder that was rehydrated by following the manufacturer instructions (10% w/v, 26% fat, Regilait, Saint-Martin-Belle-Roche, France) was monitored by measuring the weight loss over time. The weight was measured with a precision balance ($\pm 0.0003\text{ g}$) (Sartorius, Aubagne, France). The measured weight loss followed the first-order law (Eq. (1)). Using the reduction in the sum of squares scores between the experimental curve and the model (*fminsearch* function in Matlab R2012a), we estimated three variables: a , K , and τ . These provided a characterization of the drying rate.

$$w_t = a + K \exp\left(\frac{-t}{\tau}\right) \quad (1)$$

where w_t (g) represents the weight at time t (s), a represents the dried weight (g), K represents the initial water weight (g), and τ is the time constant (s). The initial drying rates were calculated as a derivation of w_t at $t = 0$ s.

Because only water evaporated, this loss of weight was translated into water content (grams of water per gram of dried material), and its relationship with the sorption curve of PBS or milk was used to evaluate the a_w evolution of the sample during drying. The PBS sorption curve was obtained by measuring the water content corresponding to several a_w values. The milk desorption curve was based on an equation given in a previous work (Langová et al., 2012), which allowed us to calculate the water content corresponding to each a_w value.

2.2.3. Preparation of the initial cellular suspension

Cell concentration was adjusted to 10^8 colony-forming units (CFU)/mL by measuring OD_{600} and according to calibration curves showing the link between OD_{600} and cell concentration in CFU/mL. Twenty-five-milliliter cultures were centrifuged ($3400 \times g$, 10 min at $25\text{ }^\circ\text{C}$) and washed twice with an equal volume of PBS. The supernatant was removed, and the cell pellet was resuspended in 25 mL of PBS. The final bacterial number was recorded as the number of CFU by plate counting on TSA (24 h, $37\text{ }^\circ\text{C}$).

2.2.4. Drying in PBS

Droplets (10 μL containing around 10^6 bacterial cells) of bacterial suspension were spread in a small glass dish to obtain an estimated 14 μm height layer, and the dish was placed inside a box

for a given time (4.5, 15, 45, 90, 180, or 840 min). After drying, the cells were rehydrated by the addition of 990 μL of PBS and homogenized by pipetting and using a cell scraper (Greiner, Les Ulis, France) permitting to suspend the initial dropped bacteria (containing around 10^6 living and dead bacterial cells).

2.2.5. Drying in milk

The cell suspension was concentrated by centrifugation to obtain a concentration of 10^9 CFU/mL. This concentrated suspension was diluted in milk to obtain a concentration of 10^8 CFU/mL. The same protocol was applied to 10 μL of contaminated milk as described above (section 2.2.4.).

2.3. Drying effects on bacterial cells

2.3.1. Effects of drying on the loss of cultivability

After drying under different conditions and on different substrates, cells were recovered and CFU were determined by plate counting on TSA medium after 24 h at 37 °C. The result was compared with the initial bacterial concentration and expressed as $\log(N/N_0)$, where N represents the CFU of stressed bacteria and N_0 represents the CFU of the initial bacterial suspension.

2.3.2. Effects on growth recovery capacity

2.3.2.1. Growth curves of dehydrated–rehydrated bacteria. The bacterial growth kinetics before and after the drying process were assessed and compared for *Salmonella* Typhimurium and *Cronobacter sakazakii*. A 0.5 mL aliquot of the bacterial suspension at a concentration of 10^2 CFU/mL of cultivable cells was transferred to 9.5 mL of TBS and incubated at 37 °C. The OD_{600} was measured every hour for 20 h.

2.3.2.2. Calculation of the delay in growth recovery. To determine the growth delay induced strictly by the drying process, an adjustment of the measured points of bacterial growth to a sigmoid curve was performed (Iaconelli et al., 2015) (Eq. (2)). Using the reduction in the sum of squares scores between the experimental curve and the model (*fminsearch* function in Matlab R2012a), three representative variables of the growth kinetics were calculated: OD_{max} , b , and r .

$$OD_t = \frac{OD_{max}}{(1 + b \exp(-rt))} \quad (2)$$

where OD_t represents the OD at time t (h), OD_{max} represents the OD of the stationary growth phase, and b and r (h^{-1}) are constants.

μ_{max} and the inflexion point (t_{inflex}) were then calculated as shown in Eqs. (3) and (4), respectively.

$$\mu_{max} = \max(OD'_t) \quad (3)$$

$$t_{inflex} = \frac{\ln(|a|)}{r} \quad (4)$$

where μ_{max} (h^{-1}) represents the maximum growth rate, and t_{inflex} (h) represents the inflexion time of the growth curves.

The time to detect bacterial population was estimated as the time corresponding to the intersection between the tangent to the inflexion point, which had μ_{max} as the slope, and the abscissa axis.

Finally, to compare the previously calculated time to detect bacterial population for each bacterial species and each treatment, the time delay of growth recovery was normalized as shown in Eq. (5):

$$t_{delay} = t_{d(D)} - t_{d(C)} \quad (5)$$

where t_{delay} (h) is the resulting calculated time delay of growth recovery, $t_{d(D)}$ (h) is the time to detect bacterial population calculated from the growth curve for dried bacteria, and $t_{d(C)}$ (h) is the time to detect bacterial population calculated from the growth curve for fresh culture. Because we designed this experiment for cultivable cells, we used this method to estimate the repairable damage.

2.4. Statistical analysis

All experiments were performed in triplicate. To compare the results obtained in this study, the variance homogeneity (F-test) was tested and then, if $P > 0.05$, an ANOVA or t -test was applied using R software (R Development Core Team, 2008). In the case of significant ANOVA, a Tukey's HSD (Honest Significant Difference) test was performed to observe significant difference among conditions.

3. Results

Our study focused on the effects of drying on *S. Typhimurium* and *C. sakazakii* cultivability and growth recovery capacity. Our results are presented in three parts: loss of bacterial cultivability as a function of drying time, loss of bacterial cultivability as a function of a_w evolution, and delay in bacterial growth recovery as a function of the initial drying rate and final a_w .

3.1. Evolution of the loss of *S. Typhimurium* and *C. sakazakii* cultivability as a function of drying time

3.1.1. Drying in PBS

The loss of *S. Typhimurium* and *C. sakazakii* cultivability during drying was assessed at different atmospheric RHs (11%, 25%, 44%, and 58% RH) and over time (4.5, 15, 45, 90, 180, and 840 min) in PBS. A significant difference was observed in the loss of bacterial cultivability, with significant effects of time and species (ANOVA, $P < 0.05$). The loss of cultivability always decreased during drying (Fig. 1). This decrease was nonlinear for both species for all conditions, and two phases were observed.

The first phase of loss of cultivability decrease was sharp, as observed between 0 and 45 min at all atmospheric RHs for *S. Typhimurium* and *C. sakazakii*. For *S. Typhimurium*, this decrease represented -3.2 log at 11%, -3.0 log at 25%, -3.3 log at 44%, and -2.7 log at 58% RH. For *C. sakazakii*, this decreased represented -1.6 log at 11%, -2.2 log at 25%, -2.3 log at 44%, and -1.9 log at 58% RH.

The second phase corresponded to a slow decrease and stabilization of the loss of cultivability (Fig. 1), and occurred between 45 min and the end of the treatment. For *S. Typhimurium*, stabilization was observed near -3.9 log at 11%, -4.0 log at 25%, -4.0 log at 44%, and -4.0 log at 58% RH. For *C. sakazakii*, stabilization was observed near -2.7 log at 11%, -3.0 log at 25%, -3.0 log at 44%, and -2.6 log at 58% RH. In general, *C. sakazakii* was less sensitive to drying than *S. Typhimurium*, and the difference was 1.0 log for all drying conditions.

These results indicate that the decrease in the loss of cultivability during drying versus time was substantial and nonlinear.

3.1.2. Drying in milk

The loss of *S. Typhimurium* and *C. sakazakii* cultivability during milk drying was assessed in the same conditions as in the experiments using PBS. A significant difference was observed in bacteria

cultivability, with a significant effect of time (ANOVA, $P < 0.05$). No effect of species was detected, and this decrease was nonlinear for both species in all conditions. As in the drying in PBS, two phases were observed (Fig. 1).

The first phase of cultivability decrease was sharp and was observed between 0 and 45 min at all atmospheric RHs for both bacterial species. For *S. Typhimurium*, this decrease represented -1.0 log at all RHs, excepted at 11% RH where decrease represented -1.1 log. For *C. sakazakii*, the loss of cultivability represented -1.0 log at 11% and 25%, -0.9 log at 44%, and -0.7 log at 58% RH. The second phase was a slow decrease and stabilization of cultivability, which occurred between 45 min and the end of drying. For *S. Typhimurium*, stabilization near -1.3 log at all RHs was observed. For *C. sakazakii*, stabilization occurred near -1.2 log at 11%, -1.4 log at 25%, -1.4 log at 44% and -1.3 log at 58% RH. The two phases of the loss of *C. sakazakii* and *S. Typhimurium* cultivability exhibited the same behavior as observed for drying.

We compared the effects of milk and PBS (Fig. 1) to examine the effect of the substrate on drying efficiency. ANOVA showed a highly significant ($P < 0.001$) effect of the drying substrate on cultivability for both species. Cultivability of both species was always higher in milk than in PBS. For both media, the loss of cultivability was nonlinear. Contrary to PBS, treatment in milk did not exhibit a species effect during drying.

3.2. Evolution of the loss of *S. Typhimurium* and *C. sakazakii* cultivability as function of the a_w evolution

The nonlinearity observed for all drying conditions presented in Fig. 1 showed that time could not explain the decrease in cultivability for both species and for both substrates. To relate the loss of pathogen cultivability to the a_w evolution during drying, the drying kinetics were examined under the different conditions by following the loss of water weight at 58%, 44%, 25%, and 11% RH over time. The time constants of water loss systems τ and the initial drying rates were calculated as a first-order system for each condition to provide information about the drying kinetics (Table 1). Water content was determined from the weight loss at each time of measurement. Using the milk and PBS sorption curves (Fig. 2) reported from previous work (Langová et al., 2012) and established in this study, respectively, we expressed the loss of cultivability as a function of the a_w evolution during drying (Fig. 3).

3.2.1. Evolution of the loss of PBS and milk weights during drying

In the classical modeling of the weight loss during drying as a first-order system (Eq. (1)), the weight loss for time τ (min) (Table 1) and time 5τ (min) represents 63% and 99% of the total weight loss, respectively. ANOVA showed that these τ values differed significantly ($P < 0.05$) as function of the atmospheric RH and the drying substrate. Using this model, in the PBS condition, 28.1, 25.2, 21.1, and 15.1 min were required to lose 99% (corresponding to 5τ) of the maximum weight loss at 58%, 44%, 25%, and 11% RH, respectively. In this analysis, 58% RH provided the slowest rate and 11% RH the fastest rate. Similarly, 25.8, 23.3, 18.3, and 9.0 min were required to lose 99% of the maximum loss of milk weight at 58%, 44%, 25%, and 11% RH, respectively. Similar observations were made for the initial rate of drying (Table 1).

As τ and the initial drying rates decreased with the increasing drying atmospheric RH, the loss of cultivability could be expressed as function of the a_w evolution of the substrate.

3.2.2. Loss of *S. Typhimurium* and *C. sakazakii* cultivability as function of the corresponding substrate a_w level

As previously described, milk and PBS desorption curves (Fig. 2) and a_w evolution differed substantially. For instance, to reduce

from an a_w of 0.99 to 0.80, the water content decreased from 99% to 78%. In milk, for the same a_w change, the water content decreased from 99% to 20%. Consequently, we have expressed the loss of cultivability as a function of a_w , as shown in Fig. 3.

For drying in PBS, three phases were observed for all conditions and in both species. The first phase of the decrease in cultivability was observed between an a_w of 0.99 and 0.90 at all atmospheric RHs for both species. When comparing the different RH atmospheres of drying for *S. Typhimurium*, the loss of cultivability for drying at 0.90 a_w was estimated as -1.4 log at 11%, 24%, and 58% RH and at -2.5 log at 44% RH. For *C. sakazakii*, at the same drying level, the values were estimated as -0.8 log, -1.2 log, -2.0 log, and -1.5 at 11%, 25%, 44%, and 58% RH, respectively. These results suggest that the initial drying rate was substantial and that the rate corresponding to 44% RH was the more deleterious for the cultivability of both species. The second phase was a slow linear decrease, which represented a smaller loss of cultivability. We found that the change in cultivability as a function of a_w was more linear than as a function of time in PBS for the smallest a_w (0.11 and 0.25). For drying in milk, the same assessment can be done for both bacteria. When expressing the loss of cultivability as a function of a_w , at the end of drying, the loss of cultivability remained greater in milk than in PBS. The third phase corresponded to a stationary phase in which a_w was constant (last point in Fig. 3).

3.3. Effects of drying on growth recovery capacity of cultivable cells

Growth curves of both species before and after different drying levels in milk and in PBS were obtained by following the OD_{600} , after rehydration and inoculation in TSB. This allowed us to evaluate the effects of different drying conditions on bacterial cells by comparing the times to detect bacterial population for dehydrated–rehydrated bacterial cells. The supplementary time to detect bacterial population, as an estimate of growth recovery capacity, was estimated for all atmospheric RHs of drying. We evaluated the effects of the initial drying rate to reach an a_w of 0.90 (Table 2) and of the final a_w (Table 3) on the delay in growth recovery at the same cultivable bacterial concentration. This provided an estimation of the reversible injury caused by drying. It should be noted that we reported results obtained in all conditions to the control and then compared among them. Statistical analyses were performed to determine whether the tested conditions differed significantly from the control.

3.3.1. Effects of the initial drying kinetics

For all drying conditions corresponding to 11%, 25%, 44%, and 58% RH, the supplementary times to detect bacterial population after drying until an a_w of 0.90 are shown in Table 2. In the first part of drying, the decreases in cultivability were severe for each species (Fig. 3). These results allowed us to compare the effects of the initial drying rate on the capacity of the bacteria to repair the injuries and to regrow.

The initial drying rates for each condition were previously calculated in milligrams of water per minute, and are expressed in a_w units per minute through the translation of water weight in a_w using the sorption curves (Table 1). To extend this analysis to drying in PBS and milk, the initial drying rate at 11% RH was called rate 1 and corresponded to -29.9×10^{-4} and -7.30×10^{-4} a_w units per minute for PBS and milk, respectively. Similarly, 25% RH was called rate 2 and corresponded to -26.1×10^{-4} and -7.28×10^{-4} a_w units per minute, 44% RH was called rate 3 and corresponded to -25.2×10^{-4} and -7.27×10^{-4} a_w units per minute, and 58% RH was called rate 4 and corresponded to -11.2×10^{-4} and -7.26×10^{-4} a_w units per minute, respectively. The initial drying rate was substantially influenced by the drying substrate,

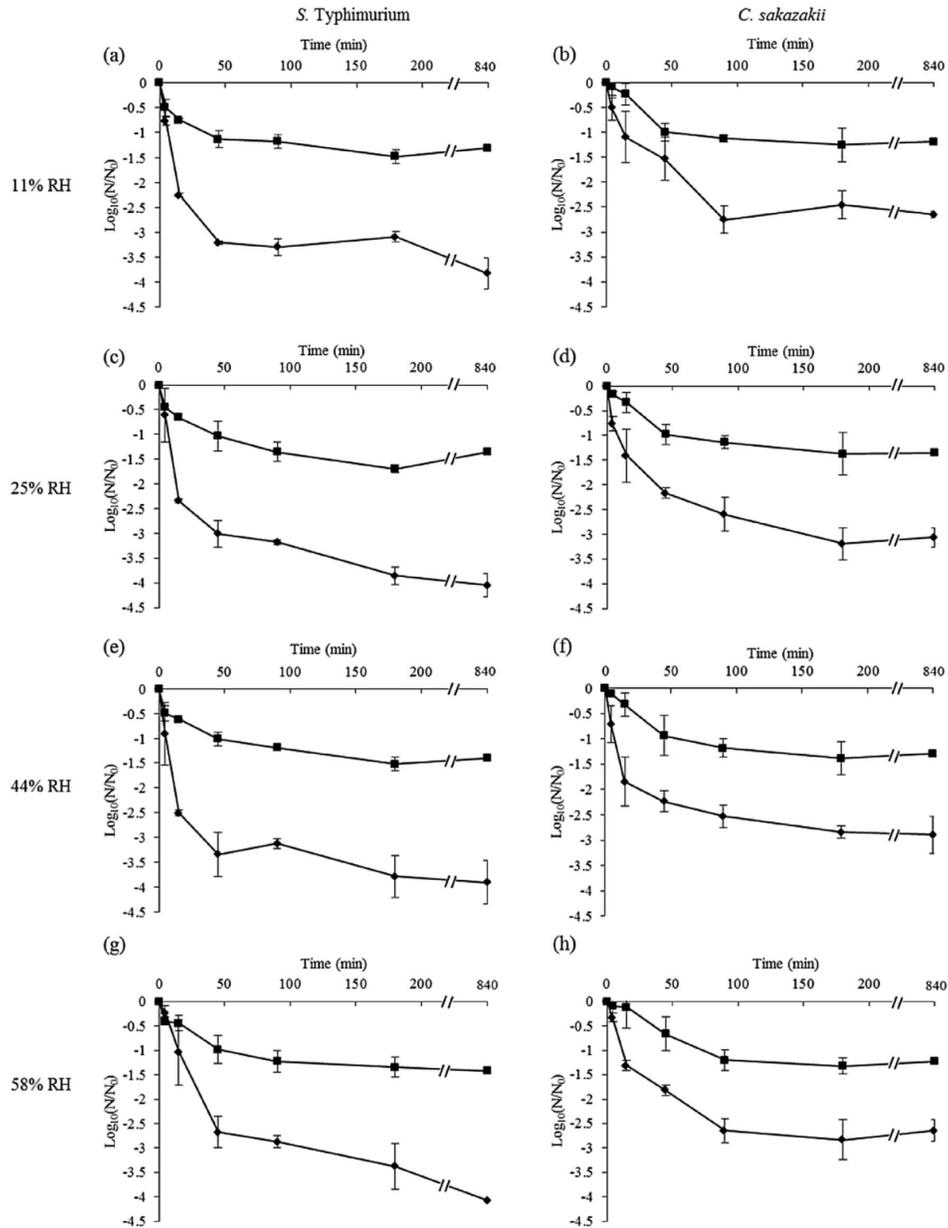


Fig. 1. Loss of *S. Typhimurium* and *C. sakazakii* cultivability as a function of drying time in four atmospheres. The initial bacterial concentration was 10^8 CFU/mL, and the method detection limit was about -4.5 log. Squares and diamonds represent the results in milk and PBS, respectively. (a) *S. Typhimurium* dried at 11% RH; (b) *C. sakazakii* dried at 11% RH; (c) *S. Typhimurium* dried at 25% RH; (d) *C. sakazakii* dried at 25% RH; (e) *S. Typhimurium* dried at 44% RH; (f) *C. sakazakii* dried at 44% RH; (g) *S. Typhimurium* dried at 58% RH; (h) *C. sakazakii* dried at 58% relative humidity. Error bars represent standard deviations obtained from triplicates.

and the drying kinetics of PBS was faster than the drying kinetics of milk.

In the control, no supplementary times to detect bacterial population were observed in milk, but some differences were observed in PBS. For *S. Typhimurium*, significant differences (t -test,

$P < 0.05$) from the control were observed for the initial rates 1 (11% RH) and 2 (25% RH) and corresponded to +1.6 h and +0.9 h of supplementary time to detect bacterial population. As shown in Fig. 3, to reach an a_w of 0.90, the most damaging condition was initial rate 3 (44% RH). For *C. sakazakii*, initial rates 1, 2, and 3

Table 1
Calculated time constants for weight loss τ and the initial drying rates for the loss of water weight ($\text{mg}\cdot\text{min}^{-1}$) for each drying condition for PBS and milk substrates.

Atmospheric RH	PBS		Milk	
	τ (min)	Initial rate ($\text{mg}\cdot\text{min}^{-1}$)	τ (min)	Initial rate ($\text{mg}\cdot\text{min}^{-1}$)
11%	3.0 (± 0.08) ^{ab}	-3.00 (± 0.12) ^{ab}	1.8 (± 0.27) ^b	-5.46 (± 1.32) ^b
25%	4.2 (± 0.69) ^{ab}	-2.82 (± 1.02) ^{ab}	3.7 (± 0.94) ^{ab}	-3.06 (± 1.20) ^{ab}
44%	5.0 (± 0.15) ^{ab}	-2.58 (± 0.30) ^a	4.7 (± 0.95) ^{ab}	-2.04 (± 0.54) ^a
58%	5.6 (± 0.17) ^a	-1.80 (± 0.06) ^a	5.2 (± 0.95) ^a	-1.98 (± 0.72) ^a

Numbers in parentheses are the standard deviations obtained from independent triplicates.

The letters represent a significant difference ($p < 0.05$) obtained with Tukey's HSD (Honest Significant Difference) test, independently for τ and for initial rates.

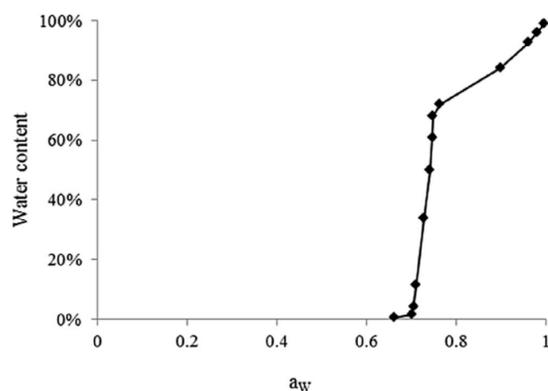


Fig. 2. Sorption curves of PBS at 20 °C expressed with water content as function of a_w .

showed significant differences (t -test, $P < 0.05$) in growth recovery capacity from the control: +3.0 h, +1.5 h, and +1.2 h of delay.

3.3.2. Effects of the final drying level

The supplementary times to detect bacterial population after drying at the final a_w values of 0.11, 0.25, 0.44, and 0.58 are shown in Table 3. The final a_w represents the equilibrium a_w for each drying condition. These results permitted us to compare the effects of the final a_w of drying on the capacity of bacteria to repair damage.

Regarding all drying final a_w values, supplementary times to detect bacterial population were observed in PBS but not in milk. Comparison of these supplementary delays (Table 3) in growth recovery with the supplementary delays in growth recovery obtained after drying to an a_w of 0.90 for both species (Table 2) showed no differences at 11% RH but differences for other atmospheric RHs. The increases in pathogen delay recovery were greater during the first step of drying, which reached an a_w of 0.90, than during the following step to reach the final a_w . For example, for *C. sakazakii*, the increase in delay was about +1.2 h for the first 0.10 a_w decrease (to reach 0.90) and about +1.7 h for the last 0.46 a_w decrease (to reach 0.44). Consequently, the increase in delay of growth recovery was not proportional to the decrease in a_w .

Also, milk and PBS had different effects on the supplementary time to detect bacterial population.

4. Discussion

In this study, we used several approaches to evaluate the effects of drying conditions on *S. Typhimurium* and *C. sakazakii*. Cultivability was used as an estimate of viability and deleterious damage, and growth recovery capacity was used to evaluate the injury to

cultivable cells. The main reason for this approach was to determine whether the substrate a_w could explain the loss of pathogen cultivability as a function of the a_w evolution during drying. Table 4 summarizes the effects of drying on both species.

For the two substrates tested, the first cultivability decrease and delay in recovery were compared. Upon reaching an a_w of 0.90 in PBS, the cultivability of *S. Typhimurium* decreased suddenly and reversible damage occurred at the lowest RH conditions (25% and 11% RH) of drying (Table 4). This shows the initial drying kinetics. At the beginning of drying (until an a_w of 0.90), evaporation of water causes an increase in osmotic pressure and solute concentration in the extracellular medium and a large cellular water outflow from the cells; the kinetics of these processes affects the cells (Potts, 2001). For both substrates, the desiccation stress provokes an osmotic stress due to the loss of intracellular water increasing solute or ion concentrations in the cell. In PBS, this osmotic stress is due to an increase in salt concentration. Even if the bacteria could adapt, damage caused by this stress affects macromolecules and membranes (Beney et al., 2004; Lemetais et al., 2012; Potts, 2001). These modifications can be irreversible and may decrease cultivability. However, they can also be reversible but require repair mechanisms before the cells can develop and grow, which would explain the supplementary time to detect bacterial population observed in this study caused by the presence of injured cells (Xu et al., 2015; Zhou et al., 2011). In terms of the cultivability of *S. Typhimurium*, the effects of the kinetics were more deleterious at 44% and 58% than at 25% and 11% RH (Table 1), and the supplementary delay of growth recovery occurred earlier for the faster kinetics (at 11% and 25% RH) than for the slower kinetics (at 44% and 58% RH) in PBS (Table 4). Nevertheless, if growth recovery delay does not increase as the cultivability decreases, the damage occurring during drying can be deleterious or irreversible. Damage induced by exposure to air at 44% and 58% RH was irreversible; in contrast, at 25% and 11% RH the damage was reversible (Table 4). *C. sakazakii* is known to be more resistant than *S. Typhimurium* (Dancer et al., 2009; Osaili and Forsythe, 2009), which we also found in our study of cultivability in PBS (Table 4).

Taken together, the available information suggests that, depending on the substrate, the choice of the initial drying rate is crucial for inducing a maximum first cultivability decrease and causing irreversible damage to pathogenic cells.

For all drying conditions, loss of cultivability became slower after 45min or after reaching an a_w of 0.90 in PBS. After the first loss of water and around an a_w of 0.90, cells began to be exposed to the atmosphere. The water removal in extracellular and intracellular media generates reactive oxygen species in cells and the accumulation of free radicals (Potts, 2001, 1994), which can promote structural protein modifications, damage to cellular molecule aggregations, and membrane lipid bilayer disruption (Beney et al., 2007; Billi and Potts, 2002; Dupont et al., 2010; Lemetais et al., 2012). For *S. Typhimurium*, the growth recovery capacity was affected at a final a_w of 0.11, 0.25, and 0.44 but not at 0.58 (Table 4).

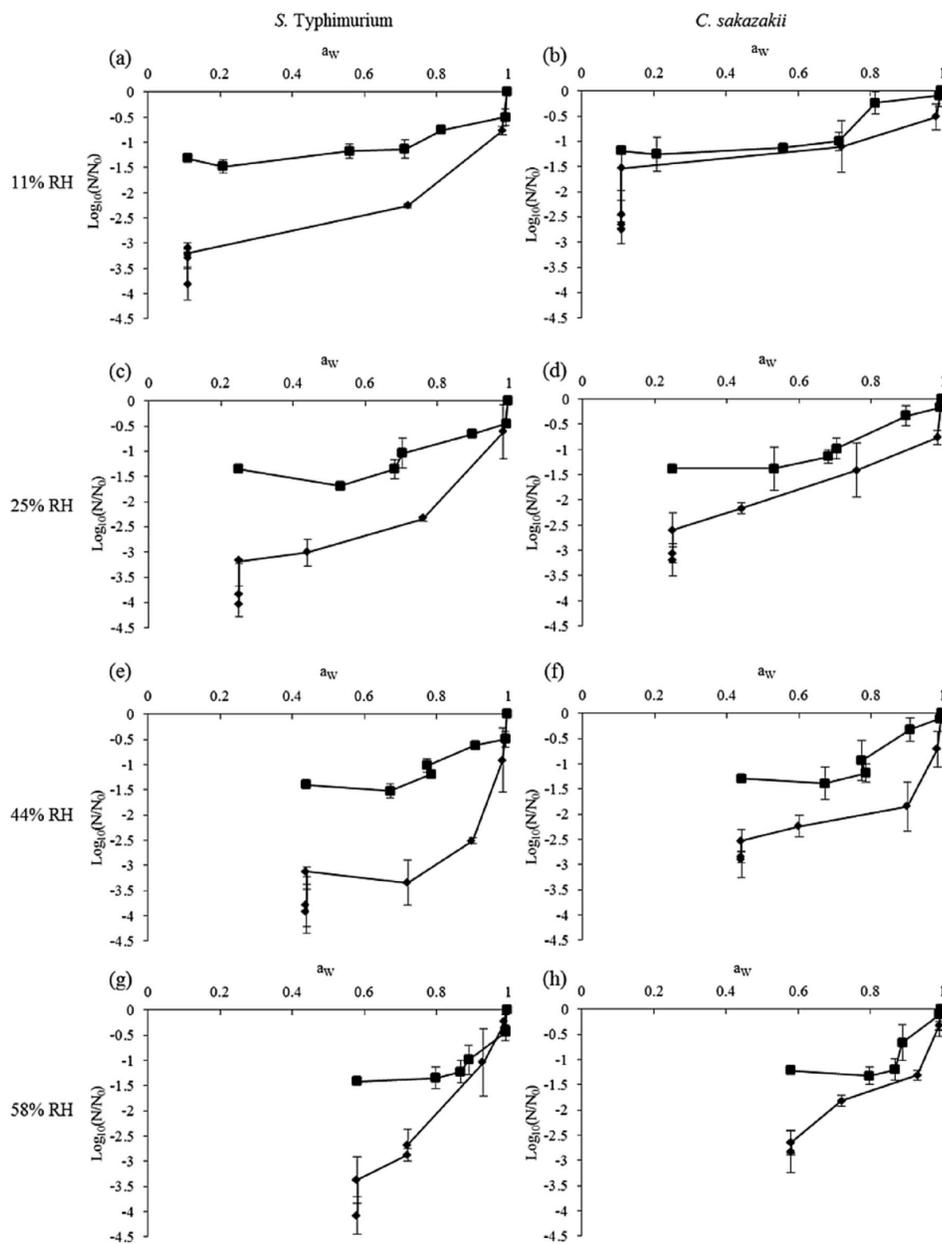


Fig. 3. Loss of *S. Typhimurium* and *C. sakazakii* cultivability during drying in air equilibrated at four relative humidity (RH) levels as a function of the calculated suspension a_w . The initial bacterial concentration was 10^8 CFU/mL and the method detection limit was about -4.5 log. Squares: drying in milk; diamonds: drying in PBS. (a) *S. Typhimurium* dried at 11% RH; (b) *C. sakazakii* dried at 11% RH; (c) *S. Typhimurium* dried at 25% RH; (d) *C. sakazakii* dried at 25% RH; (e) *S. Typhimurium* dried at 44% RH; (f) *C. sakazakii* dried at 44% RH; (g) *S. Typhimurium* dried at 58% RH; (h) *C. sakazakii* dried at 58% RH. Error bars represent SDs obtained from triplicates.

This suggests that the oxidation during drying depends on the a_w range. This has been shown for lipid oxidation, which depends on the a_w and is maximal at 0.60, decreases to 0.40, and increases again to 0.10 at a lower level than at 0.60 (Karel, 1980).

In both drying levels at 11% RH in PBS, to reach a_w levels of 0.90

and 0.11 (Table 4), no differences were observed between species for the delay in growth recovery, but differences were observed for cultivability. Subsequently, modifications caused by the slow phase of drying may have generated such irreversible damage. In an extreme drying such as drying to an a_w of 0.11, the water removal

Table 2
Comparison of supplementary time to detect bacterial population of species desiccated in PBS and milk submitted to different initial drying rates to reach an a_w of 0.90.¹

Species	Substrate	Supplementary time to detect bacterial population obtained after drying at different initial drying rates to reach an a_w of 0.90			
		Rate 1 ²	Rate 2 ³	Rate 3 ⁴	Rate 4 ⁵
<i>S. Typhimurium</i>	PBS	+1.6 h (± 0.6) ^{ab}	+0.9 h (± 0.4) ^{bc}	+0.1 h (± 0.5) ^c	+0.2 h (± 0.2) ^c
	Milk	+0.3 h (± 0.1) ^c	+0.2 h (± 0.1) ^c	+0.4 h (± 0.3) ^c	+0.2 h (± 0.4) ^c
<i>C. sakazakii</i>	PBS	+3.0 h (± 0.5) ^a	+1.5 h (± 0.4) ^{abc}	+1.2 h (± 0.7) ^{bc}	+0.3 h (± 0.4) ^c
	Milk	+0.2 h (± 0.5) ^c	+0.1 h (± 0.1) ^c	+0.2 h (± 0.3) ^c	+0.1 h (± 0.6) ^c

Rehydration was performed in PBS and, after, cells were inoculated in TSB and incubated at 37 °C. The supplementary time to detect bacterial population is an expression of the difference between desiccated bacteria and undessicated bacteria. Numbers in parentheses are the standard deviations obtained from independent triplicates. The letters represent a significant difference ($p < 0.05$) obtained with Tukey's HSD (Honest Significant Difference) test.

1. Obtained with different atmospheres.
2. Initial drying rate corresponding to drying at 11% RH.
3. Initial drying rate corresponding to drying at 25% RH.
4. Initial drying rate corresponding to drying at 44% RH.
5. Initial drying rate corresponding to drying at 58% RH.

Table 3
Comparison of supplementary time to detect bacterial population for bacteria desiccated in PBS and milk submitted to drying to reach different final a_w levels.

Species	Substrate	Supplementary time to detect bacterial population after drying at different final a_w			
		0.11 ¹	0.25 ²	0.44 ³	0.58 ⁴
<i>S. Typhimurium</i>	PBS	+1.1 h (± 0.9) ^{ab}	+1.7 h (± 0.7) ^{ab}	+1.4 h (± 1.1) ^{ab}	+0.6 h (± 0.9) ^b
	Milk	+0.2 h (± 0.3) ^b	+0.1 h (± 0.1) ^b	+0.9 h (± 0.1) ^b	+0.3 h (± 0.3) ^b
<i>C. sakazakii</i>	PBS	+2.7 h (± 0.5) ^{ab}	+2.6 h (± 0.8) ^{ab}	+2.9 h (± 1.1) ^a	+1.1 h (± 0.4) ^{ab}
	Milk	+0.2 h (± 0.1) ^b	+0.3 h (± 0.1) ^b	+0.1 h (± 0.2) ^b	+0.1 h (± 0.5) ^b

Rehydration was performed in PBS and, after, cells were inoculated in TSB and incubated at 37 °C. The supplementary time to detect bacterial population is an expression of the difference between desiccated bacteria and undessicated bacteria. Numbers in parentheses are the standard deviations obtained from independent triplicates. The letters represent a significant difference ($p < 0.05$) obtained with Tukey's HSD (Honest Significant Difference) test.

1. Represents the final a_w obtained through drying at 11% RH.
2. Represents the final a_w obtained through drying at 25% RH.
3. Represents the final a_w obtained through drying at 44% RH.
4. Represents the final a_w obtained through drying at 58% RH.

can affect protein structure irreversibly, as shown by Leslie et al. (Leslie et al., 1995) who found a correlation between the loss of cultivability and protein denaturation during drying. Protein denaturation can also affect the integrity of the plasma membrane, which comprises proteins and lipids (Lemetais et al., 2012). In the same way, with the decrease from an a_w of 0.90 to 0.44, injury occurred at 44% RH for *S. Typhimurium*, and this was accompanied by a very slow decrease in cultivability.

Our findings indicate that the final a_w after drying is an important parameter in determining the extent of irreversible damage and, at the same, the kinetics used to cross an oxidative a_w range can promote the loss of bacterial cultivability *in situ*.

In addition, as shown at final water activity for all drying in PBS,

a decrease in cultivability occurred during maintaining at 0.11, 0.25, 0.44 or 0.58. This information is in accordance with the literature; the storage at low water activity is known to be deleterious for bacterial cells (Himathongkham et al., 1999; Lin and Beuchat, 2007).

In our study, the cultivabilities of both bacteria were preserved during drying in milk compared with drying in PBS, which shows a strong protective effect of milk (Fig. 2). This may be explained by the difference between the PBS and milk desorption curves. The PBS desorption curve has a sigmoid form with a large decrease in a_w for a small loss of water content until an a_w of 0.72, which is the saturation a_w of PBS. Unlike PBS, the milk desorption curve presents a tangential form with a slow decrease in a_w for a large loss

Table 4
Effects of drying on the loss of cultivability and delay in growth recovery for both species in two substrates.

Species	Substrate	Loss of cultivability								Delay of growth recovery							
		Initial drying rate ^a				From 0.90 to final drying level ^b				Initial drying rate ^a				From 0.90 to final drying level ^b			
		Rate 1	Rate 2	Rate 3	Rate 4	0.11 ^c	0.25 ^d	0.44 ^e	0.58 ^f	Rate 1	Rate 2	Rate 3	Rate 4	0.11 ^c	0.25 ^d	0.44 ^e	0.58 ^f
<i>S. Typhimurium</i>	PBS	+	+	+++	++	+++	+++	+	++	++	+	-	-	-	+	+	-
	Milk	+	+	+	++	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>C. sakazakii</i>	PBS	+	+	+++	++	+++	+++	+	++	+++	++	+	-	-	+	++	+
	Milk	+	+	+	++	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-

- and + refer to the effects of drying on the loss of cultivability and the delay in growth recovery related to the two phases of drying in different conditions.

^a To reach an a_w of 0.90 in the different atmospheric RHs, see Table 2.

^b From 0.90 to the final drying level (0.11, 0.25, 0.44, and 0.58) in different atmospheric RH.

^c Represented the final a_w obtained through drying at 11% RH.

^d Represented the final a_w obtained through drying at 25% RH.

^e Represented the final a_w obtained through drying at 44% RH.

^f Represented the final a_w obtained through drying at 58% RH.

of water content until an a_w of 0.80 (Fig. 2). Milk is used for bacterial protection in freeze-drying and spray-drying processes because of its glassy properties and its composition (Morgan et al., 2006; Pehkonen et al., 2008). Disaccharides at high concentrations are protective against drying and freeze-drying, and lactose has a protective effect on cultivability in lactic acid bacteria (Shrestha et al., 2007). Milk also comprises proteins and phospholipids, and these two components may provide supplementary targets for oxidation, which might reduce the extracellular oxidative effects on these cells. These properties of milk may explain the preservation of both bacteria species during drying (Shrestha et al., 2007). Additionally, loss of cultivability was less important in milk than in PBS, and the surviving cells did not display any reversible damage when dried in milk and displayed only minor reversible damage when dried in PBS (Table 4). This suggests the existence of different subpopulations with different sensitivities to drying (Lianou and Koutsoumanis, 2013, 2011; Zhou et al., 2011).

Considering that milk erased the bacterial species effect, we suggest that the drying substrate, and more precisely the pathogen–substrate pairing, is a major parameter implicated in the loss of bacterial cultivability during drying.

5. Conclusion

Different drying parameters (kinetics, atmospheric RH, bacterial species, and food substrates) affected the loss of bacteria cultivability. The growth recovery capacity was critically influenced by the first step of drying, which represented the first loss of water to an a_w of about 0.90 and involved osmotic stress. As the drying rate increased, the loss of cultivability and the extent of repairable damage decreased. Bacterial cultivability and growth recovery were also influenced by the second phase of drying but to a lesser extent, which could be related to an oxidative stress mainly due to the prolonged contact between air and cells. Our results indicate that the drying conditions are important for cell resistance and can be controlled to maximize the death of pathogens. The a_w seems provide information for the monitoring and control of pathogenic microorganisms during drying. If used appropriately, drying may provide a complementary tool to ensure food safety. However, further research is needed before developing applications. The effects of drying parameters on bacterial viability should be studied in other pathogens, for different food substrates, and in association with various decontamination processes. Further testing in industrial conditions is also needed.

Acknowledgement

This work was supported by the Association Nationale de la Recherche et de la Technologie (France, grant number: 2012/1631) and Novolyze (France), which are gratefully acknowledged.

References

- Alvarez-Ordóñez, A., Broussolle, V., Colin, P., Nguyen-The, C., Prieto, M., 2015. The adaptive response of bacterial food-borne pathogens in the environment, host and food: implications for food safety. *Int. J. Food Microbiol.* 213, 99–109. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.06.004>.
- Arroyo, C., Cebrían, G., Condón, S., Pagán, R., 2012. Development of resistance in *Cronobacter sakazakii* ATCC 29544 to thermal and nonthermal processes after exposure to stressing environmental conditions. *J. Appl. Microbiol.* 112, 561–570. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.05218.x>.
- Beney, L., Mille, Y., Gervais, P., 2004. Death of *Escherichia coli* during rapid and severe dehydration is related to lipid phase transition. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 65, 457–464. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-004-1574-x>.
- Beney, L., Simonin, H., Mille, Y., Gervais, P., 2007. Membrane physical state as key parameter for the resistance of the gram-negative *Bradyrhizobium japonicum* to hyperosmotic treatments. *Arch. Microbiol.* 187, 387–396. <http://dx.doi.org/10.1007/s00203-006-0203-8>.
- Beuchat, L.R., Komitopoulou, E., Beckers, H., Betts, R.P., Bourdichon, F., Fanning, S., Joosten, H.M., Ter Kuile, B.H., 2013. Low-water activity foods: increased concern as vehicles of foodborne pathogens. *J. Food Prot.* 76, 150–172. <http://dx.doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-12-211>.
- Bhunia, A.K., 2008. *Salmonella enterica*. In: Heldman, D.R. (Ed.), *Foodborne Microbial Pathogens*. Springer science+business media, LLC, New-York, pp. 201–216.
- Billi, D., Potts, M., 2002. Life and death of dried prokaryotes. *Res. Microbiol.* 153, 7–12. [http://dx.doi.org/10.1016/S0923-2508\(01\)01279-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0923-2508(01)01279-7).
- CDC, 2012. CDC Update: Investigation of Cronobacter Infections Among Infants in the United States [WWW Document]. URL <http://www.cdc.gov/cronobacter/investigation.html> (Accessed 1 April 2016).
- CDC, 2009. *Cronobacter* Species Isolation in Two Infants - New Mexico, 2008 [WWW Document]. URL <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5842a3.htm> (Accessed 1 April 2016).
- Dancer, G.L., Mah, J.H., Rhee, M.S., Hwang, I.G., Kang, D.H., 2009. Resistance of *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) to environmental stresses. *J. Appl. Microbiol.* 107, 1606–1614. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04347.x>.
- Deng, X., Li, Z., Zhang, W., 2012. Transcriptome sequencing of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis under desiccation and starvation stress in peanut oil. *Food Microbiol.* 30, 311–315. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2011.11.001>.
- Dupont, S., Beney, L., Ritt, J.F., Lherminier, J., Gervais, P., 2010. Lateral reorganization of plasma membrane is involved in the yeast resistance to severe dehydration. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* 1798, 975–985. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbame.2010.01.015>.
- Dupont, S., Rapoport, A., Gervais, P., Beney, L., 2014. Survival kit of *Saccharomyces cerevisiae* for anhydrobiosis. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 8821–8834. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-014-6028-5>.
- Farakos, S.M.S., Frank, J.F., Schaffner, D.W., 2013. Modeling the influence of temperature, water activity and water mobility on the persistence of *Salmonella* in low-moisture foods. *Int. J. Food Microbiol.* 166, 280–293. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.07.007>.
- Feeney, A., Sleator, R.D., 2011. An in silico analysis of osmotolerance in the emerging gastrointestinal pathogen *Cronobacter sakazakii*. *Bioeng. Bugs* 2, 260–270. <http://dx.doi.org/10.4161/bbug.2.5.17238>.
- Fine, F., Ferret, E., Gervais, P., 2005. Thermal properties and granulometry of dried powders strongly influence the effectiveness of heat treatment for microbial destruction. *J. Food Prot.* 68, 1041–1046.
- Fine, F., Gervais, P., 2005. Thermal destruction of dried vegetative yeast cells and dried bacterial spores in a convective hot air flow: strong influence of initial water activity. *Environ. Microbiol.* 7, 40–46. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1462-2920.2004.00689.x>.
- Finn, S., Condell, O., McClure, P., Amézquita, A., Fanning, S., 2013. Mechanisms of survival, responses, and sources of *Salmonella* in low-moisture environments. *Front. Microbiol.* 4, 1–15. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2013.00331>.
- Forsythe, S., 2014. Powdered infant formula. In: Gurtler, J.B., Doyle, M.P., Kornacki, J.L. (Eds.), *The Microbiological Safety of Low Water Activity Foods and Spices*. Springer, London, pp. 177–211. <http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4939-2062-4>.
- Friedemann, M., 2007. *Enterobacter sakazakii* in food and beverages (other than infant formula and milk powder). *Int. J. Food Microbiol.* 116, 1–10. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.12.018>.
- Gomez, T.M., Motarjemi, Y., Miyagawa, S., Käferstein, F.K., Stöhr, K., 1997. Foodborne salmonellosis. *Lancet* 50, 81–89. [http://dx.doi.org/10.1016/0140-6736\(90\)92844-8](http://dx.doi.org/10.1016/0140-6736(90)92844-8).
- Greenspan, L., 1977. Humidity fixed points of binary saturated aqueous solutions. *J. Res. Natl. Bur. Stand. A- Phys. Chem.* 81A, 89–96.
- Gruzdev, N., Pinto, R., Sela, S., 2011. Effect of desiccation on tolerance of *Salmonella enterica* to multiple stresses. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 1667–1673. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.02156-10>.
- Himathongkham, S., Nuanualsuwan, S., Riemann, H., 1999. Survival of *Salmonella enteritidis* and *Salmonella typhimurium* in chicken manure at different levels of water activity. *FEMS Microbiol. Lett.* 172, 159–163. [http://dx.doi.org/10.1016/S0378-1097\(99\)00033-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-1097(99)00033-6).
- Howells, A.M., Bullifent, H.L., Dhaliwal, K., Griffin, K., García de Castro, A., Frith, G., Tunnacliffe, A., Titball, R.W., 2002. Role of trehalose biosynthesis in environmental survival and virulence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Res. Microbiol.* 153, 281–287. [http://dx.doi.org/10.1016/S0923-2508\(02\)01321-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0923-2508(02)01321-9).
- Iaconelli, C., Lemetais, G., Kechaou, N., Chain, F., Bermúdez-Humarán, I.G., Langella, P., Gervais, P., Beney, L., 2015. Drying process strongly affects probiotics viability and functionalities. *J. Biotechnol.* 214, 17–26. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2015.08.022>.
- Institut de veille sanitaire, 2006. Infections à *Enterobacter sakazakii* associées à la consommation d'une préparation en poudre pour nourrissons [WWW Document]. URL http://opac.invs.sante.fr/doc_num.php?explnum_id=4937 (Accessed 12 July 2015).
- Iversen, C., Forsythe, S., 2004. Isolation of *Enterobacter sakazakii* and other *Enterobacteriaceae* from powdered infant formula milk and related products. *Food Microbiol.* 21, 771–777. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2004.01.009>.
- Jaradat, Z.W., Ababneh, Q.O., Saadoun, I.M., Samara, N.A., Rashdan, A.M., 2009. Isolation of *Cronobacter* spp. (formerly *Enterobacter sakazakii*) from infant food, herbs and environmental samples and the subsequent identification and confirmation of the isolates using biochemical, chromogenic assays, PCR and 16S rRNA sequ. *BMC Microbiol.* 9, 225–236. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2180-9-225>.

- Karel, M., 1980. Lipid oxidation, secondary reactions and water activity of foods. In: Simic, M.G., Karel, M. (Eds.), *Autoxidation in Food and Biological Systems*. Springer Science+Business Media, LLC, pp. 191–206.
- Langová, J., Stencl, J., Vlášek, V., 2012. Water sorption isotherms of skimmed milk powder within the temperature range of 5–20 °C. *Acta Univ. Agric. Silv. Mendel. Brun.* LX 225–230.
- Laroche, C., Fine, F., Gervais, P., 2005. Water activity affects heat resistance of microorganisms in food powders. *Int. J. Food Microbiol.* 97, 307–315. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.04.023>.
- Laroche, C., Gervais, P., 2003. Unexpected thermal destruction of dried, glass bead-immobilized microorganisms as a function of water activity. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 3015–3019. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.69.5.3015-3019.2003>.
- Lemetais, G., Dupont, S., Beney, L., Gervais, P., 2012. Air-drying kinetics affect yeast membrane organization and survival. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 96, 471–480. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-012-4014-3>.
- Leslie, S.B., Israeli, E., Lighthart, B., Crowe, J.H., Crowe, L.M., 1995. Trehalose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 3592–3597.
- Lesn, J., Berthet, S., Binard, S., Rouxel, A., Humbert, F., 2000. Changes in culturability and virulence of *Salmonella* Typhimurium during long-term starvation under desiccating conditions. *Int. J. Food Microbiol.* 60, 195–203. [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00311-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00311-1).
- Lian, F., Zhao, W., Yang, R., Tang, Y., Katiyo, W., 2015. Survival of *Salmonella* enteric in skim milk powder with different water activity and water mobility. *Food Control* 47, 1–6. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.06.036>.
- Lianou, A., Koutsoumanis, K.P., 2013. Strain variability of the behavior of foodborne bacterial pathogens: a review. *Int. J. Food Microbiol.* 167, 310–321. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.09.016>.
- Lianou, A., Koutsoumanis, K.P., 2011. Effect of the growth environment on the strain variability of *Salmonella enterica* kinetic behavior. *Food Microbiol.* 28, 828–837. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2010.04.006>.
- Lin, L.-C., Beuchat, L.R., 2007. Survival of *Enterobacter sakazakii* in infant cereal as affected by composition, water activity, and temperature. *Food Microbiol.* 24, 767–777. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2007.02.001>.
- Morgan, C.A., Herman, N., White, P.A., Vesey, G., 2006. Preservation of microorganisms by drying: a review. *J. Microbiol. Methods* 66, 183–193. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2006.02.017>.
- Osaili, T., Forsythe, S., 2009. Desiccation resistance and persistence of *Cronobacter* species in infant formula. *Int. J. Food Microbiol.* 136, 214–220. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.08.006>.
- Pehkonen, K.S., Roos, Y.H., Miao, S., Ross, R.P., Stanton, C., 2008. State transitions and physicochemical aspects of cryoprotection and stabilization in freeze-drying of *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG). *J. Appl. Microbiol.* 104, 1732–1743. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03719.x>.
- Podolak, R., Enache, E., Stone, W., Black, D.G., Elliott, P.H., 2010. Sources and risk factors for contamination, survival, persistence, and heat resistance of *Salmonella* in low-moisture foods. *J. Food Prot.* 73, 1919–1936.
- Potts, M., 2001. Desiccation tolerance: a simple process? *Trends Microbiol.* 9, 553–559. [http://dx.doi.org/10.1016/S0966-842X\(01\)02231-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0966-842X(01)02231-4).
- Potts, M., 1994. Desiccation tolerance of prokaryotes. *Microbiol. Rev.* 58, 755–805.
- R Development Core Team, 2008. R: a Language and Computing, *Statistical Computing [WWW Document]*. R Found. Stat. Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0.
- Rychlik, I., Barrow, P.A., 2005. *Salmonella* stress management and its relevance to behaviour during intestinal colonisation and infection. *FEMS Microbiol. Rev.* 29, 1021–1040. <http://dx.doi.org/10.1016/j.femsre.2005.03.005>.
- Shen, S., Fang, F.C., 2012. Integrated stress responses in *Salmonella*. *Int. J. Food Microbiol.* 152, 75–81. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.04.017>.
- Shrestha, A.K., Howes, T., Adhikari, B.P., Bhandari, B.R., 2007. Water sorption and glass transition properties of spray dried lactose hydrolysed skim milk powder. *LWT - Food Sci. Technol.* 40, 1593–1600. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2006.11.003>.
- Skandamis, P.N., Yoon, Y., Stopforth, J.D., Kendall, P.A., Sofos, J.N., 2008. Heat and acid tolerance of *Listeria monocytogenes* after exposure to single and multiple sublethal stresses. *Food Microbiol.* 25, 294–303. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2007.10.008>.
- Spector, M.P., Kenyon, W.J., 2012. Resistance and survival strategies of *Salmonella enterica* to environmental stresses. *Food Res. Int.* 45, 455–481. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2011.06.056>.
- Van Doren, J.M., Neil, K.P., Parish, M., Gieraltowski, L., Gould, L.H., Gombas, K.L., 2013. Foodborne illness outbreaks from microbial contaminants in spices, 1973–2010. *Food Microbiol.* 36, 456–464. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2013.04.014>.
- Xu, Y.Z., Métris, A., Stasinopoulos, D.M., Forsythe, S.J., Sutherland, J.P., 2015. Effect of heat shock and recovery temperature on variability of single cell lag time of *Cronobacter turicensis*. *Food Microbiol.* 45, 195–204. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2014.04.003>.
- Yan, Q.Q., Condell, O., Power, K., Butler, F., Tall, B.D., Fanning, S., 2012. *Cronobacter* species (formerly known as *Enterobacter sakazakii*) in powdered infant formula: a review of our current understanding of the biology of this bacterium. *J. Appl. Microbiol.* 113, 1–15. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05281.x>.
- Zhou, K., George, S.M., Métris, A., Li, P.L., Baranyi, J., 2011. Lag phase of *Salmonella enterica* under osmotic stress conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 1758–1762. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.02629-10>.