



HAL
open science

Effets d'un traitement combinant hautes pressions et biopréservation sur l'inactivation et la reprise de croissance des spores de *Bacillus* et *Clostridium*

Chloé Modugno

► **To cite this version:**

Chloé Modugno. Effets d'un traitement combinant hautes pressions et biopréservation sur l'inactivation et la reprise de croissance des spores de *Bacillus* et *Clostridium*. Ingénierie des aliments. Université Bourgogne Franche-Comté, 2018. Français. NNT : 2018UBFCK072 . tel-02090561

HAL Id: tel-02090561

<https://theses.hal.science/tel-02090561v1>

Submitted on 4 Apr 2019

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

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

UNIVERSITE DE BOURGOGNE FRANCHE-COMTE

École doctorale Environnement-Santé

THESE

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

Discipline : Génie des Procédés Alimentaires

Chloé MODUGNO

Soutenue le : 19.12.18

EFFET D'UN TRAITEMENT COMBINANT HAUTES PRESSIONS ET BIOPRESERVATION SUR L'INACTIVATION ET LA REPRISE DE CROISSANCE DES SPORES DE *BACILLUS* ET *CLOSTRIDIUM*

Directeur de thèse :

Pr. Jean-Marie PERRIER-CORNET

Co – directrice de thèse :

Dr. Hélène SIMONIN

Jury :

Marie de Lamballerie	Professeure	GEPEA Nantes	Présidente du jury
Louis Coroller	Professeur	LUBEM Quimper	Rapporteur
Régine Talon	Directrice de recherche HDR	INRA, Clermont- Ferrand	Rapporteur
Véronique Broussolle	Directrice de recherche HDR	UMR SQPOV	Examineur
Jean-Marie PERRIER-CORNET	Professeur	Agrosup Dijon	Directeur de thèse
Hélène SIMONIN	Maître de conférences HDR	Agrosup Dijon	Co-directrice de thèse



*“Je ne perds jamais.
Soit je gagne, soit j’apprends.”*

Nelson Mandela

Remerciements

Je remercie le Professeur Laurent Beney de m'avoir accueillie au sein du laboratoire de l'UMR Procédés Alimentaires et Microbiologiques pendant ces 3 ans (et quelques mois) de thèse.

Je tiens à remercier le Professeur Louis Coroller et le Docteur Régine Talon d'avoir accepté la lourde tâche d'être mes rapporteurs de thèse.

Merci à l'Agence Nationale de la Recherche pour le financement de cette thèse ainsi qu'à l'ensemble des partenaires du projet BlacHP. Mention spéciale pour Stéphane André, qui s'est beaucoup impliqué dans la mise au point de certains protocoles de manipulation des spores.

Un énorme merci au Professeur Jean-Marie Perrier-Cornet et au Docteur Hélène Simonin pour avoir dirigé cette thèse. Jean-Marie, merci pour tes conseils éclairés, ton accessibilité et ta sympathie. Hélène, merci pour ton investissement sans faille, ta gentillesse et ta disponibilité. Merci à tous les deux pour la confiance que vous m'avez accordée et pour votre présence dans les moments compliqués.

Merci beaucoup à Esther, Pauline et Antoine dont les stages ont largement contribué à l'avancement de cette thèse.

J'exprime toute ma reconnaissance au Docteur Souhir Kmiha qui, par son investissement sans limites, a contribué à ouvrir cette thèse sur l'étude des spores thermorésistantes. Merci pour ta gentillesse, ta générosité et ta rigueur.

J'adresse aussi mes remerciements au Docteur Camille Loupiac pour son aide précieuse, son énergie et le savoir qu'elle a su me transmettre.

Un énorme merci aux Docteurs Laurence Dujourdy et Caroline Peltier pour m'avoir ouvert les portes de la chimiométrie. Merci encore pour votre aide !

Je tiens à remercier l'ensemble des membres de l'équipe Procédés Microbiologiques et Biotechnologies. Stéphane, merci pour ton investissement et pour ces TPs mémorables où tout a fonctionné (presque) comme dans les énoncés. Sylvie, merci pour ton aide et ta gentillesse. Mélanie, merci beaucoup de m'avoir épaulée dans la gestion de nos stagiaires rebelles. Florence, je te remercie pour tes nombreux coups de mains, tu m'auras sauvé de situations administratives délicates un bon nombre de fois. Shaliha, merci pour ta bonne humeur et tes anecdotes croustillantes. Pascale, merci pour ton optimisme, j'attends toujours ton feu vert

pour me faire baptiser... Sebastien et Alex, merci pour les bons moments que nous avons partagés.

Un merci tout particulier à mes colocataires du bureau 134 : Fifi, Audrey J., Audrey R., Cyril, Adeline, Aurore, Cécile. Merci pour votre soutien, nos fous-rires, nos excursions à la mer, dans la Drôme, au lac d'Arc sur Tille (mention spéciale pour Fifi), et j'en passe. Merci d'être tous aussi siphonnés les uns-que les autres et d'avoir fait de mon séjour au labo une grande cours de récré.

Mille mercis au Docteur Emilie Lang pour avoir réalisé la relecture et la mise en page de ce manuscrit.

Enfin, un grand merci à ma famille et au gros Ben pour leur soutien sans faille. Merci d'accepter mes choix tout comme mon pète au casque...

Symboles et abréviation

ADN : Acide désoxyribonucléique

AGFK: Asparagine, Glucose, Fructose et KCl

ANOVA : Analyse de la variance

ARN : Acide ribonucléique

ATP : Adénosine triphosphate

ATR : Réflectance totale atténuée

A_w : Activité de l'eau

Bodipy-C12 : Meso-phenyl-4,4'-difluoro-4-bora-3a,4adiaza-s-indacene

BHI : Brain Heart Infusion

CM : Complex Medium

CPA : Principal Component Analysis (Analyse en Composantes Principales)

DO₆₀₀ : Densité optique à 600 nm

DPA : Acide pyridine-2,6-dicarboxylique ou Acide dipicolinique

FLIM : Imagerie par durée de vie de fluorescence

FTIR : Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène

HCl : Chlorure d'hydrogène

HP : Hautes Pressions

LB : Luria Broth

MAL : Résidus δ -lactam muramiques

MES : 2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid

NAG : N-acétyl-glucosamine

NAM : N-acétyl-muramique

PBS : Tampon phosphate salin

pH : Potentiel hydrogène

SASP : « Small Acid Soluble Proteins » – Petites protéines solubles dans l'acide SG

ZnSe : Seleniure de Zinc

Table des matières

Introduction et problématique de la thèse	1
Synthèse bibliographique.....	5
1. L'inactivation des spores de <i>Bacillus</i> et <i>Clostridium</i> : un enjeu majeur pour l'industrie agroalimentaire	6
1.1. Structure et cycle de vie des endospores bactériennes.....	6
1.1.1. La sporulation : un processus complexe	6
1.1.2. Structure et propriétés de résistance des endospores	9
1.1.3. La germination.....	13
1.2. Les risques bactériologiques liés à la présence de spores dans les aliments..	16
1.2.1. Les espèces pathogènes du genre <i>Clostridium</i>	16
1.2.1.1. <i>Clostridium perfringens</i>	16
1.2.1.2. <i>Clostridium botulinum</i>	18
1.2.2. Le groupe <i>Bacillus cereus</i>	23
1.2.3. Les spores d'altération.....	25
2. Réponse des microorganismes aux procédés de traitement par hautes pressions.....	28
2.1. L'impact des hautes pressions sur les systèmes biologiques	28
2.1.1. Effet des hautes pressions sur la structure des biomolécules	28
2.1.2. L'inactivation de cellules végétatives par hautes pressions	30
2.2. Effets des hautes pressions sur les spores bactériennes	31
2.2.1. Effet d'un traitement à température modérée.....	31
2.2.1.1. Germination physiologique des spores soumises à de faibles niveaux de pression.....	31
2.2.1.2. Germination non physiologique des spores soumises à des pressions élevées.....	33
2.2.2. Inactivation des spores par un traitement combiné hautes pressions – haute température..	34
2.3. Hautes pressions et stratégie des barrières	35
2.3.1. Inactiver des spores par hautes pressions : la stratégie du « germer pour inactiver ».....	35
2.3.2. Combinaison hautes pressions – agents antimicrobiens	36
3. La biopréservation : effets sur les spores et voies d'optimisation	39
3.1. La biopréservation : une stratégie d'avenir pour la conservation des aliments (d'après Modugno <i>et al.</i> (2015) [183])	39
3.2. Application de la biopréservation aux spores bactériennes	45

3.2.1.	L'inhibition des spores par des bactériocines purifiées	45
3.2.2.	L'inhibition de flores sporulées par des cultures de bactérie protectrices : le cas des produits carnés et laitiers	48
3.3.	Effets de traitements combinés Hautes pressions – Bactériocines sur les endospores bactériennes.....	51

Chapitre 1

Impact des hautes pressions sur sa structure et l'effet antimicrobien de la bactériocine nisine

54

1.	Introduction et objectifs	55
2.	Effect of high pressure on the antimicrobial activity and secondary structure of the bacteriocin nisin	55
2.1.	Introduction.....	56
2.2.	Material and methods	57
2.2.1.	Effect of HP on the antimicrobial activity of nisin	57
2.2.2.	Effect of HP on the secondary structure of nisin	59
2.2.3.	Statistical analysis	60
2.2.4.	Molecular representation of nisin.....	60
2.3.	Results and discussion	61
3.	Conclusion et perspectives	67

Chapitre 2

Évaluation de l'effet de bactériocines sur l'inactivation de spore bactériennes par hautes pressions.....

68

1.	Introduction et objectifs	69
2.	High pressure sensitization of heat-resistant and pathogenic foodborne spores to nisin	69
2.1.	Introduction.....	70
2.2.	Material and methods	72
2.2.1.	Bacterial strains, growth and sporulation conditions	72
2.2.2.	Effect of nisin on spore cultivability	74
2.2.3.	HP treatments in buffer and measurement of germination	74
2.2.4.	HP treatment with nisin	75
2.2.5.	HP treatments in nutrient media	76
2.2.6.	Statistical analysis	76
2.3.	Results and discussion	77

2.3.1.	Effect of HP and nisin on spore inactivation in buffer	77
2.3.2.	Effect of HP and nisin on spore inactivation in nutrient media	79
2.3.3.	Effect of high pressure on spore inactivation and germination induction	82
2.4.	Conclusion	84
3.	Le cas des spores de <i>Clostridium</i> : effet de la pédiocine sur leur inactivation par un traitement en hautes pressions	84
3.1.	Introduction.....	84
3.2.	Matériel et méthodes	85
3.2.1.	Évaluation de la sensibilité de <i>Clostridium</i> sp. à la pédiocine.....	85
3.2.2.	Effet d'un traitement combiné HP – pédiocine sur l'inactivation des spores de <i>Clostridium</i> sp.....	86
3.3.	Résultats et discussion.....	86
4.	Conclusion et perspectives	89

Chapitre 3

Investigation des mécanismes d'action des hautes pressions sur les spores de *Bacillus subtilis*..... 90

1.	Introduction et objectifs	91
2.	Understanding the effects of high-pressure at moderate temperature on bacterial spores using synchrotron infrared spectroscopy.....	91
2.1.	Introduction.....	91
2.2.	Material and method.....	93
2.2.1.	Bacterial strains, growth and sporulation conditions	93
2.2.2.	HP treatments and control samples	93
2.2.3.	Effect of HP on <i>B. subtilis</i> spores inactivation, germination and sensitivity to nisin... ..	94
2.2.4.	Synchrotron FTIR microspectroscopy of bacterial spores	95
2.2.5.	Chemometrics tools.....	96
2.3.	Results	98
2.3.1.	Effect of HP on spore inactivation-germination and sensitivity to nisin .	98
2.3.2.	Analysis of lipid domain by FTIR microscopy.....	99
2.3.3.	Analysis of the amid domain by FTIR microscopy	100
2.4.	Discussion.....	102
3.	Conclusion et perspectives	106

Chapitre 4

Effet d'un traitement en hautes pressions sur les capacités antimicrobiennes d'une souche de bactérie lactique de biopréservation	107
.....	
1. Introduction	108
2. Matériel et méthodes	109
2.1. Effet d'un traitement HP sur une co-culture <i>Lc. lactis</i> – <i>B. subtilis</i>	109
2.2. Effet d'un traitement HP sur la synthèse de nisine par <i>Lc. lactis</i>	110
2.3. Analyses statistiques	111
3. Résultats et discussion	111
4. Conclusion et perspectives	116
Conclusion générale	117
Synthèse des résultats et perspectives	117
Références bibliographiques	123
Annexes	161

Table des illustrations

Table des figures

Figure 1 : Schéma simplifié du cycle de sporulation de <i>B. subtilis</i>	7
Figure 2 : Structure d'une endospore bactérienne.....	9
Figure 3 : Evolution de la viscosité de la membrane interne des spores au cours de la germination.....	12
Figure 4 : Les différentes phases de la germination des spores de <i>B. subtilis</i>	14
Figure 5 : Effet d'une infection à <i>C. perfringens</i> sur le tissu épithélial de l'intestin Coupe du tissu épithélial de l'anse iléale de lapin (coloration hématoxyline / éosine).	18
Figure 6 : Schéma simplifié de l'action de la neurotoxine botulique sur le fonctionnement de la jonction neuromusculaire (d'après Arnon <i>et al.</i> 2001) [74].....	20
Figure 7 : Répartition du nombre de foyers d'intoxications botuliques 2005 et 2015.....	22
Figure 8 : Représentation schématique de la dénaturation et de l'agrégation sous pression de l'EntA-im, protéine d'immunité bactérienne à l'entérotoxicine A.....	29
Figure 9 : Mécanismes de réponse des spores aux hautes pressions	32
Figure 10 : Classification des bactériocines en fonction de leurs caractéristiques discriminantes principales	42
Figure 11 : Mode d'action de deux bactériocines : la nisine et la sakacine P	43
Figure 12 : Croissance de <i>L. monocytogenes</i> seule (rouge) ou en co-culture avec <i>Carnobacterium divergens</i> V41 (bleu) et <i>Cr. divergens</i> V41C9, souche mutante non productrice de bactériocine (noir) dans du saumon fumé (d'après Richard <i>et al.</i> , 2003)[213].....	44
Figure 13 : Mécanismes hypothétiques de l'action de la nisine sur la membrane des spores en cours de germination.....	47
Figure 14 : Evolution des populations de et <i>C. perfringens</i> DSM 756 (A) et <i>Clostridium</i> sp. DSM 1985 (B) inoculés dans de la viande de porc hachée, avec ou sans souche protectrice de <i>L. plantarum</i> PCS20, avec ou sans nitrites (NO ₂ , 150 ppm).	50

Figure 15 : Effet d'une souche de <i>Lc. lactis</i> productrice de bactériocine sur le développement de spores de <i>C. beijerinckii</i>	50
Figure 16 : Effect of high pressure on the antimicrobial activity of nisin	61
Figure 17 : CD spectra of HP-treated and untreated nisin in solution in 0.02 M HCl (pH 2.8) or 0.1 M MES (pH 6.1).....	63
Figure 18 : FTIR (A) and second derivative (B) spectra of HP-treated and untreated nisin at pD 6.5 (equivalent pH: 6.1) HP treatment: 500 MPa – 20 °C – 10 min.....	64
Figure 19 : FTIR (A) and second derivative (B) spectra of HP-treated and untreated nisin at pD 3.5 (equivalent pH: 2.8)	64
Figure 20 : Impact of the nisin unfolding on its action on bacterial membranes adapted from Hsu <i>et al.</i> , (2004).....	66
Figure 21 : Schematic representation of the treatment processes of spores by HP in combination with nisin.	76
Figure 22 : Effect of nisin addition on high pressure inactivation of spores (500 MPa, 10 min), treatment in MES buffer.....	79
Figure 23 : Effect of nisin addition on high pressure inactivation of spores (500 MPa, 10 min), treatment in nutrient media	80
Figure 24 : Inactivated and germinated spores after HP treatment at 500 MPa – 10 min: comparison with the reduction of spore outgrowth provided by the addition of nisin during HP and into the recovery medium	83
Figure 25 : Effet de différentes concentrations en pédiocine sur la formation de halos d'inhibition sur des géloses inoculées avec <i>L. monocytogenes</i> (carrés orange) et des spores de <i>B. subtilis</i> (cercles rouges), <i>B. weihenstephanensis</i> (triangles noirs), <i>Clostridium</i> sp. (losanges bleus). 87	87
Figure 26 : Effet d'un traitement HP à 500 MPa ; 10 min en combinaison ou non avec de la pédiocine (80 mg/L), sur l'inactivation des spores de <i>Clostridium</i> sp.	88
Figure 27 : Schematic representation of light beam crossing the zinc selenide (ZnSe) ATR hemisphere (A) (inspired from Passot <i>et al.</i> (2015)) [312] and individual spore (blue crosses) and blank (green cross) selection.....	96

Figure 28: Effect of HP (500 MPa – 10 min – 50 °C or 20 °C) on the inactivation (dark grey, germination (light grey) and sensitization to nisin (black) of spores of <i>B. subtilis</i>	98
Figure 29: Principal component analysis (PCA) of infrared spectra obtained on control spore samples (germinated: green dots; dead: black dots; dormant: pink dots) and spores treated by HP at 500 MPa – 10 min at 50 °C (red dots) or 20 °C (blue dots) on the spectral region of lipids (3050 – 2800 cm ⁻¹)	99
Figure 30: Second derivative of the mean infrared spectra of control spore samples (germinated; dead; dormant) and spores treated by HP at 500 MPa – 10 min at 50 °C or 20 °C	100
Figure 31: Principal component analysis (PCA) of infrared spectra obtained on control spore samples (germinated: green dots; dead: black dots; dormant: pink dots) and spores treated by HP at 500 MPa – 10 min at 50 °C (red dots) or 20 °C (blue dots) on the spectral region of amid I and II (1800 – 1500 cm ⁻¹).	101
Figure 32: Second derivative of the mean infrared spectra (domain 1700 – 1580) of control spore samples (germinated; dead; dormant) and spores treated by HP at 500 MPa – 10 min at 50 °C or 20 °C	102
Figure 33: Effect of HP treatment at 500 MPa for 10 min at 50 °C (A) or 20 °C (B) on the spore physiological states and their sensitivity to further stress.....	105
Figure 34: Effet d'un traitement HP sur la reprise de croissance de <i>Lc. lactis</i> et des spores de <i>B. subtilis</i> en co-culture et en culture simple	112
Figure 35: Effet d'un traitement HP sur la reprise de croissance et synthèse de nisine par <i>Lc. lactis</i> BS 30	113

Table des tableaux

Tableau 1 : Les toxinotypes de <i>C. perfringens</i>	17
Tableau 2 : Groupes et caractéristiques principales des souches de <i>Clostridium</i> productrices de neurotoxines [69–72]	19
Tableau 3 : Principales caractéristiques des espèces du groupe <i>B. cereus</i>	24
Tableau 4 : Principales espèces de spores d'altération et produits concernés	26
Tableau 5 : Inactivation de différentes formes microbiennes suite à des traitements en hautes pressions.....	30
Tableau 6 : Effets de différentes bactériocines sur les spores	46
Tableau 7 : Effet de traitements combinés HP - bactériocines sur des spores	52
Tableau 8 : Culture, sporulation and enumeration conditions	73
Tableau 9 : Milieux gélosées et conditions d'incubation des souches	86
Table 10 : Main spectral region indicating specific protein and lipid spore structures.....	98

Introduction et problématique de la thèse

Qui était LUCA ?

Cette fameuse cellule, dernier ancêtre commun à tous les êtres vivants, donnerait enfin un point de départ à l'origine de la vie. Au fil des recherches, son portrait-robot se dessine et laisse enfin entrevoir les premières racines de l'arbre universel du vivant. Seulement voilà, Luca serait apparu il y a 3,8 milliards d'années, alors que des conditions cataclysmiques règnent à la surface de la Terre. L'absence d'oxygène, une température avoisinant les 90 °C et des pH extrêmes assuraient alors une sélection drastique des premières formes de vie [1,2]. Dans ces conditions, seule une cellule à la fois extrêmement robuste et évolutive pouvait alors tirer son épingle du jeu : la spore.

«So LUCA was a spore » : c'est à cette conclusion que mène une étude publiée en 2016 dans la revue *Nature* par l'équipe de Grand Jensen [3]. Cependant, si la résistance hors normes des spores bactériennes nous a sans-doute rendu service il y a quelques milliards d'années, il n'en demeure pas moins que cette capacité nous pose aujourd'hui certains problèmes. La robustesse de certaines souches sporulantes n'ayant d'égal que leur toxicité, leur persistance dans les aliments constitue en effet un risque considérable pour les consommateurs. En 2010, des espèces de genres *Clostridium* et *Bacillus* étaient en effet responsables de 80 % des cas de toxi-infections alimentaires recensées [4]. La structure unique des spores, disposée en multicouches concentriques autour d'un ADN compacté, leur permet de résister à une multitude de stress environnementaux. Tandis que certaines espèces résistent à la stérilisation UHT (Ultra Haute Température), d'autres survivent à des pressions de plus de 4 GPa, à une exposition prolongée aux rayonnements UV ou à une absence de nutriments pendant plusieurs millions d'années [5–8].

Afin de prévenir la multiplication des souches sporulantes dans les aliments, deux stratégies sont aujourd'hui majoritairement employées : l'application de traitements thermiques stérilisants, ou l'ajout de conservateurs. Si la première méthode permet d'inactiver efficacement les spores bactériennes (encore que...)[9], elle élimine aussi la majeure partie des qualités nutritionnelles et organoleptiques des produits traités. La seconde stratégie, bien qu'appliquée couramment sur des aliments hautement périssables, souffre de la mauvaise réputation liée aux effets potentiellement cancérigènes de certains conservateurs [10].

Dans ce contexte, la mise au point de nouveaux procédés de décontamination athermiques préservant à la fois la qualité des aliments et la santé du consommateur est devenue un enjeu réel pour l'industrie agroalimentaire. Des méthodes de décontamination dites « douces », telles que les traitements par rayonnements, l'usage de conservateurs d'origine naturelle ou de hautes pressions hydrostatiques, ont déjà fait leurs preuves sur des microorganismes végétatifs pathogènes. Cependant, leur efficacité sur les spores reste extrêmement faible, si bien que la seule stratégie restante pour les éliminer des manière « douce » reste la combinaison de plusieurs de ces procédés.

L'objectif de cette thèse vise ainsi à évaluer le potentiel la combinaison de deux traitements athermiques : les hautes pressions hydrostatiques (HP) et la biopréservation. Le traitement par HP, procédé déjà employé dans de nombreuses industries agroalimentaires, permet de traiter à basse température (< 30 °C) des aliments, tout en préservant leurs qualités nutritives et leur aspect « frais ».

La biopréservation, méthode dérivée de la fermentation, met en jeux les capacités de certaines bactéries à dominer la flore d'un produit alimentaire, notamment par le biais de la production de bactériocines. L'effet de ces deux procédés sur les spores a déjà été testé sur de nombreuses souches de spores, avec des résultats très variables. En effet, tandis que les barèmes de pression utilisés varient de 200 MPa à 600 MPa, à des températures allant de 20 °C à 90 °C, les concentrations en bactériocine peuvent varier du simple au décuple. Par ailleurs, la compatibilité de ces deux procédés et les mécanismes impliqués dans l'inactivation des spores n'ont jamais été clairement élucidés.

L'objectif de cette thèse est ainsi de répondre aux problématiques suivantes :

- Dans quelle mesure les procédés de traitement par HP et biopréservation sont-ils compatibles ?
- La combinaison de ces deux procédés permet-elle une inactivation efficace de souches pathogènes et d'altération ?
- Quels sont les mécanismes impliqués dans l'inactivation des spores par la combinaison de ces deux procédés ?

Ce mémoire de thèse est ainsi articulé autour de cinq parties.

Une étude bibliographique expose dans un premier temps l'état des connaissances disponibles sur la résistance des spores et les risques liés à leur persistance dans les aliments. Les principaux mécanismes de réponse des spores aux traitements par HP et biopréservation seront aussi développés.

L'objectif du premier chapitre est d'évaluer l'impact d'un traitement HP sur la structure et l'activité antimicrobienne d'une bactériocine : la nisine.

Le second chapitre est dédié à l'étude du potentiel de ces deux traitements combinés pour inactiver des spores pathogènes et d'altération dans des milieux nutritifs.

L'objectif du troisième chapitre est de comprendre comment le traitement HP peut sensibiliser des spores à d'autres traitement de décontamination. Les mécanismes mis en jeux ainsi que les différents états physiologiques des spores induits par un traitement HP seront ainsi étudiés.

Le dernier chapitre est enfin consacré à l'étude de l'évolution d'une population de spores soumises à un traitement combinant HP et biopréservation, par le biais d'une souche de bactérie lactique productrice de nisine.

Synthèse bibliographique

1. L'inactivation des spores de *Bacillus* et *Clostridium* : un enjeu majeur pour l'industrie agroalimentaire

1.1. Structure et cycle de vie des endospores bactériennes

La réponse à la question : “*Why it is that 100 °C is not sufficient to kill bacteria when much lower temperatures are sufficient to kill other living organisms*”, est à la base de la découverte des endospores bactériennes par Ferdinand Cohn en 1876. Suite à cette découverte, Robert Koch (prix Nobel de médecine 1905) décrivit pour la première le cycle de vie des spores de *Bacillus anthracis* en 1888 [11].

Depuis cette découverte, la recherche sur les multiples facettes de endospores bactériennes s'est amplifiée, jusqu'à l'obtention d'une connaissance poussée de leur cycle de vie et des structures à l'origine de leur résistance.

1.1.1. La sporulation : un processus complexe

Dans des conditions bien particulières, certaines bactéries peuvent entrer dans un processus de production d'une cellule de survie spécialisée : la spore (ou endospore). Ce processus est appelé sporulation. La majeure partie des bactéries sporulantes sont à Gram positif et appartiennent aux genres *Bacillus*, *Clostridium* et *Sporosarcina*. Quelques bactéries lactiques du genre *Sporolactobacillus* mais aussi certaines bactéries à Gram négatif du genre *Acetonebacter* sont aussi connues pour leur capacité à sporuler [3]. Ces dernières n'étant étudiées que de manière marginale, l'ensemble des informations détaillées dans la suite de ce chapitre ne concernera que les spores de bactéries à Gram positif.

L'entrée en sporulation d'une cellule est une étape complexe dont tous les intermédiaires ne sont encore pas encore connus. Si le principal facteur induisant la sporulation est le manque de nutriments, un nombre considérable d'autres signaux environnementaux et intercellulaires entrent dans le processus décisionnel d'initiation de la sporulation [12]. Chez *Bacillus subtilis*, ces signaux sont perçus par des kinases possédant des récepteurs spécifiques intramembranaires : KinA, KinB, KinC et KinD (**Figure 1, A**) [13]. Les stimuli perçus par chacun de ces récepteurs ne

sont pas bien connus, mais il apparaît que KinA est sensible au taux d'oxygène, au potentiel redox, à la lumière et à la concentration d'ATP intracellulaire [14].

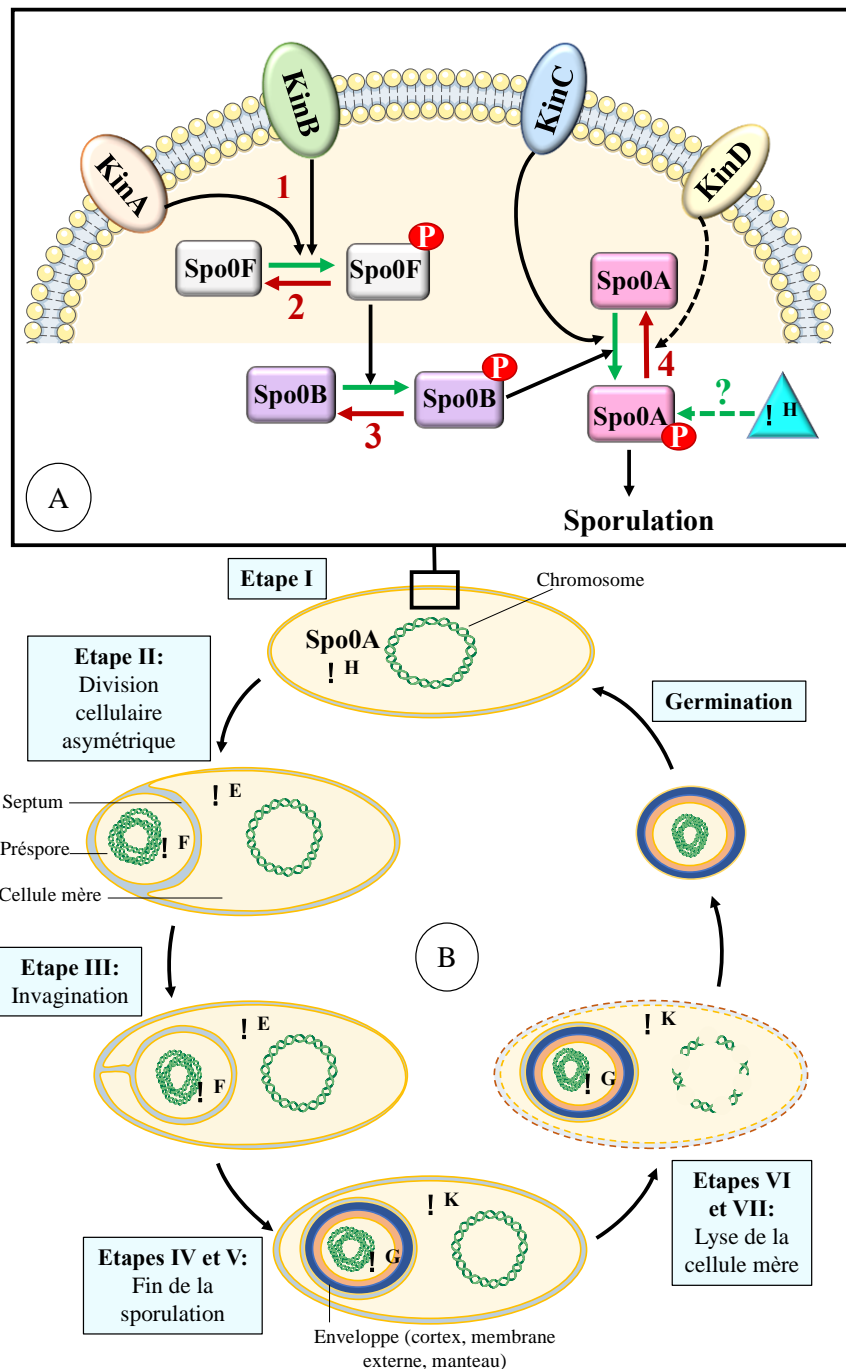


Figure 1 : Schéma simplifié du cycle de sporulation de *B. subtilis*

A : Activation de Spo0A par le système de phospho-relai. 1 : Régulation négative de KinA et KinB par l'intermédiaire de kinases. 2 et 3 : Systèmes déphosphorylation de Spo0B par un système de régulation négatif. 4 : déphosphorylation de Spo0A par KinD. Les flèches représentent des interactions certaines (flèches pleines) ou potentielles (pointillées). Flèches vertes : phosphorylation, flèches rouges : déphosphorylation.

B : Les différentes étapes du cycle de sporulation.

Lorsqu'un signal est perçu, KinA et KinB vont successivement transférer un groupement phosphate à deux intermédiaires protéiques : Spo0F et Spo0B.

Spo0B transfère ensuite son groupement phosphate au facteur de transcription Spo0A qui induit l'entrée en sporulation. Spo0A peut aussi être directement phosphorylé par KinC ou déphosphorylé par KinD. Ce transfert de phosphates via ce système dit de « phospho-relais » permet une régulation fine de l'entrée en sporulation, pour faire en sorte que ce processus coûteux en énergie ne soit utilisé qu'en ultime recours. Des systèmes de régulation négative sont ainsi adaptés à chaque intermédiaire de phosphorylation (**Figure 1, A**). Tandis qu'un haut niveau de phosphorylation de Spo0A induit une entrée en sporulation, des niveaux intermédiaires peuvent induire la formation de biofilms ou des processus de cannibalisme [13–15].

L'entrée en sporulation nécessite aussi l'activation d'un autre facteur de transcription σ^H impliqué dans l'initiation de la division asymétrique de la cellule. L'activation de σ^H n'est pas entièrement élucidée, mais semblerait intimement liée à celle de Spo0A [13]. Suite à l'activation de σ^H et Spo0A, le processus de division cellulaire est initié (**Figure 1, B**). L'ensemble des processus menant à l'initiation de la division cellulaire constituent l'étape I de la sporulation.

S'ensuit alors l'étape II de la sporulation, pendant laquelle la cellule mère se divise pour former un nouveau compartiment, par l'intermédiaire d'un septum de division propre au processus de sporulation.

À l'étape III, le nouveau compartiment créé est invaginé dans la cellule mère. La préspore nouvellement formée est alors entourée de trois membranes, dont la seconde a une orientation inversée, lui donnant un rôle important lors de la déshydratation de la future spore [16].

Lors de l'étape IV, le pH de la spore chute d'une unité et sa concentration en potassium diminue, induisant le début de sa déshydratation. Une accumulation de peptidoglycane entre la membrane interne et externe de la spore initie la formation du cortex et du manteau.

Entre les étapes IV et V, la formation du manteau externe de la spore est largement entamée. Durant la maturation (passage de l'étape V à VI), la spore se charge en cations divalents (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+}) [3,17,18]. Simultanément, la cellule

mère synthétise du DPA (acide dipicolinique ou acide pyridine-2,6-dicarboxylique) qui s'accumule dans la spore. Suite à sa déshydratation, la concentration en DPA de la spore excède sa limite de solubilité et des complexes Ca-DPA sont alors formés.

Au cours de l'étape VII, la cellule mère est lysée, libérant la spore mature.

Lors des différents stades de sporulation, les facteurs de transcription σ^E , σ^F , σ^G et σ^K sont aussi impliqués dans les changements morphologiques et physico-chimiques de la spore (**Figure 1, B**) [13,14]. Il est important de noter que des facteurs de transcription et de régulation impliqués dans le processus de sporulation induisent aussi la synthèse de toxines chez certaines espèces. C'est notamment le cas de *Clostridium perfringens*, dont la production d'entérotoxine est induite pendant la sporulation par les facteurs de transcription σ^E et σ^K [19]. Il en est de même pour *B. cereus* dont certains facteurs de virulence sont exprimés pendant les premiers stades de la sporulation [20].

1.1.2. Structure et propriétés de résistance des endospores

La résistance extrême des spores a autrefois alimenté la théorie de l'auto-génération et plus récemment celle de la panspermie (théorie selon laquelle l'origine de la vie sur Terre serait due à une contamination extraterrestre).

Les spores peuvent rester en état de dormance sur des périodes extrêmement longues, pouvant aller jusqu'à plusieurs centaines de millions d'années [21]. Ces propriétés de résistances sont dues à une structure unique en multicouches, véritable barrage aux stress environnementaux (**Figure 2**).

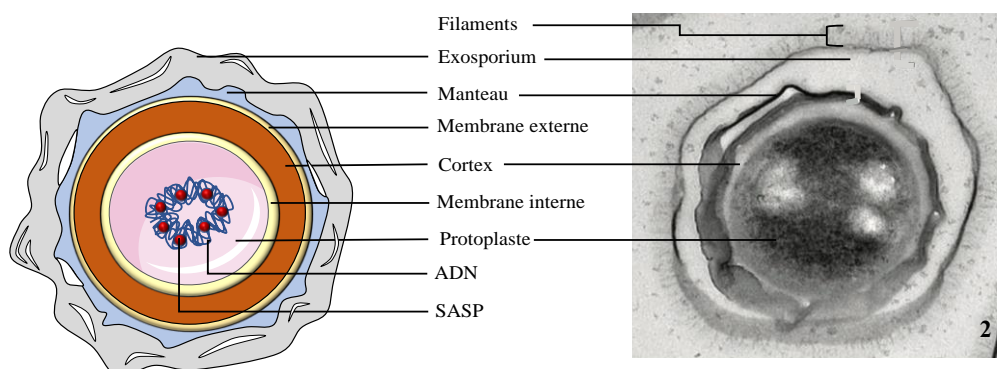


Figure 2 : Structure d'une endospore bactérienne

Gauche : Schéma de la structure d'une endospore bactérienne (l'échelle de taille n'est pas respectée pour l'ADN et les SASPs). Droite : Spore de *B. anthracis* en microscopie électronique à balayage. Photographie d'après Bozue *et al.* 2016 [22]

Voici, de la couche la plus externe à la plus interne, les principales caractéristiques de chacune des couches de la spore.

- **L'exosporium :**

Cette structure périphérique lâche est présente seulement chez certaines espèces du groupe *B. cereus sensu lato*, ainsi que chez certains *Clostridia*. Même si la structure de l'exosporium est spécifique à chaque souche, la présence d'une couche basale paracrystalline et de filaments périphériques est redondante chez la majorité des espèces (**Figure 2**) [18]. L'exosporium est composé majoritairement de protéines et de glycoprotéines, lui donnant un caractère fortement hydrophobe [18]. Il joue un rôle important dans l'adhésion des spores à des surfaces et des cellules, constituant ainsi un élément clé de la virulence de certaines espèces telles que *B. anthracis* [22]. Le grand nombre d'enzymes que contient l'exosporium (protéases, superoxyde dismutases et hydrolases) auraient aussi un rôle lors de la germination des spores [23].

- **Le manteau :**

Principalement constituée de protéines, le manteau représente 30 à 80 % de la teneur protéique totale de la spore. Sa structure lamellaire est composée de trois à six couches superposées dont les configurations protéiques et l'organisation varient pour des raisons encore inconnues [18,24]. Fonctionnellement, le manteau joue le rôle de barrière contre de grosses molécules telles que le lysozyme et protège la spore des bactériovores [24]. La présence de certaines enzymes telles que la superoxyde dismutase, la peroxyredoxine ou la chitinase font du manteau une structure « détoxifiante », protégeant les structures internes de la spore des agents biocides (peroxyde d'hydrogène, dioxyde de chlore, ozone, etc.) [24,25]. Les propriétés mécaniques du manteau permettent aux spores d'adhérer et de persister dans des environnements hostiles, comme par exemple sur les surfaces des usines agroalimentaires [26].

- **La membrane externe :**

Seuls quelques articles font références à cette membrane localisée juste sous le manteau de la spore. Si la présence de cette structure est nécessaire au bon déroulement de la sporulation, son rôle dans la résistance des spores dormantes n'a jamais été clairement élucidé. Le grand nombre d'enzymes qu'elle contient laisse

penser qu'elle pourrait potentiellement avoir un rôle lors de la germination des spores [27,28]. Elle ne semble cependant pas constituer une barrière de perméabilité, et ne joue pas de rôle dans la résistance thermique et chimique des spores [24].

- **Le cortex :**

Le cortex est en réalité subdivisé en deux couches : une fine couche en contact direct avec la membrane interne, appelée « paroi de la cellule germée », et une couche plus épaisse constituant le cortex à proprement parler. La différence entre ces deux couches est fonctionnelle : tandis que la paroi de la cellule germée constituera, comme son nom l'indique, la paroi de la future cellule végétative, le reste du cortex est lysé pendant la germination [29].

Le cortex est composé de peptidoglycanes, un polymère constitué d'une alternance de N-acétyl-glucosamine (NAG) et de N-acétyl-muramique (NAM). À la différence des peptidoglycanes des cellules végétatives, environ 50 % des résidus NAM du cortex des spores ne présentent pas de chaînes peptidiques et sont cyclisés pour former un résidu spécifique des spores : le δ -lactame muramique (MAL). De plus, comme la majeure partie des NAM restant ne présentent qu'un simple résidu de L-alanine en guise de chaîne latérale, seuls 3 % des NAM du cortex contiennent des chaînes latérales réticulées [24,29]. À l'inverse, la plus forte réticulation de la paroi de la cellule germée ainsi que l'absence de MAL assurent son maintien lors de la germination, pendant laquelle les enzymes lytiques du cortex hydrolysent les résidus MAL [29]. Le faible niveau de réticulation des peptidoglycanes du cortex a alimenté dans les années 1960 la théorie du cortex contractile, identifiant cette structure comme élément essentiel du maintien de la spore dans son état déshydraté. Lewis *et al.* (1960) expliquaient ainsi que la pression exercée par le cortex sur la membrane interne lors de la sporulation induisait une sortie d'eau allant à l'encontre de la pression osmotique provoquée par la concentration élevée de solutés dans le protoplaste [30]. Même si des études plus récentes ont démontré que le niveau de réticulation du cortex n'affectait pas l'état de déshydratation de la spore, cette structure reste néanmoins essentielle au maintien de l'état comprimé de la membrane interne [31][32]. Par ailleurs, le cortex contient aussi de nombreuses enzymes requises lors de la germination, telles que SleB et CwlJ (voir chapitre 1.1.3) [33].

- **La membrane interne :**

La membrane interne est souvent décrite comme l'une des clefs de la résistance des spores. Si sa composition lipidique est relativement similaire à celle de cellules végétatives, elle s'en distingue par des propriétés biophysiques remarquables [24]. Elle est en effet largement moins perméable, avec un coefficient de diffusion de l'eau variant de 1,2 à 2,4 m/s contre 50 à 300 m/s pour les cellules végétatives [34]. Cette propriété est due à un état particulièrement immobile des lipides, se trouvant de 1,3 à 1,6 fois plus comprimés que dans une membrane de cellule végétative [24]. De récentes études ont aussi rapporté un écart de viscosité important entre la membrane interne des spores (1000 cP) et la membrane des cellules végétatives (600 cP). Loison *et al.* (2013) ont ainsi montrés, à l'aide d'un marquage au Bodipy-C12 couplé à une analyse microscopique en temps de vie de fluorescence, que la viscosité de la membrane interne diminuait lors de la germination pour revenir au niveau de celle des cellules végétatives (**Figure 3**) [35].

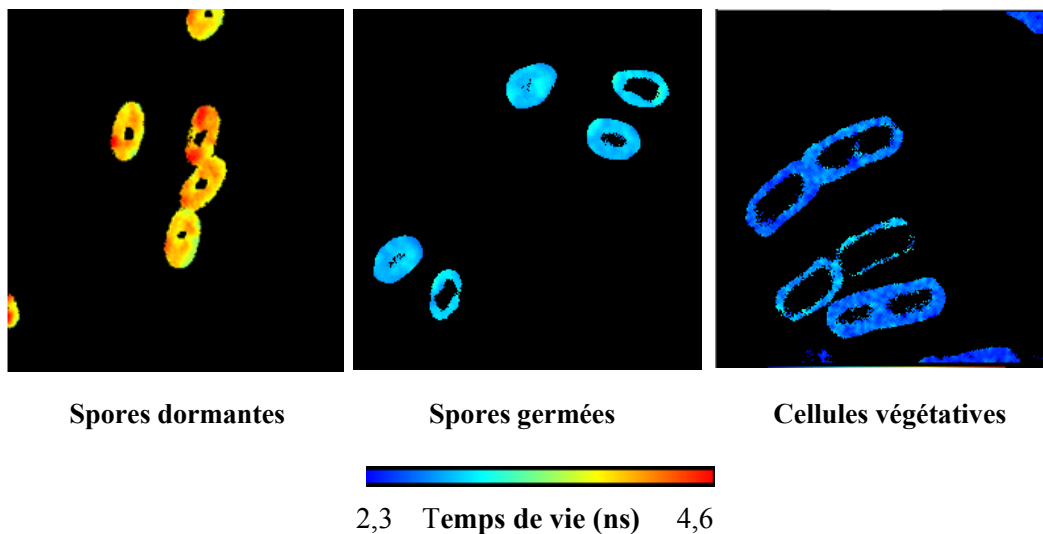


Figure 3 : Evolution de la viscosité de la membrane interne des spores au cours de la germination

La viscosité est représentée par le temps de vie de fluorescence de la sonde Bodipy-C12 insérée dans la membrane interne. Un temps de vie court correspond à une viscosité faible et réciproquement. D'après Loison *et al.* (2013) [35].

Les lipides de la membrane interne sont ainsi fortement organisés et leur micro-viscosité indique qu'ils se trouvent dans une phase gel [35,36]. Cette structure particulière de la membrane permet un maintien du protoplasme de la spore dans un

état fortement déshydraté, la protégeant ainsi de la dénaturation thermique.

Si la composition lipidique de la membrane interne est proche de celle des cellules végétatives, il n'en est pas de même pour sa composition protéique. La membrane interne comporte en effet toute une batterie de récepteurs de nutriments, ainsi que des protéines SpoVA spécifiques au transport de DPA non retrouvées dans les cellules végétatives [25].

- **Le protoplaste :**

Le protoplaste contient le matériel génétique de la spore (ADN, ARN, ribosomes, nucléotides) ainsi que la plupart des enzymes de la spore. L'état de déshydratation particulièrement poussé de ce compartiment est à l'origine de la dormance et de la résistance thermique des spores. La teneur en eau du protoplasme est environ 10 fois inférieure à celle du cytoplasme des bactéries, induisant une très faible mobilité des protéines (4 fois inférieure à celles des cellules végétatives) [16]. Contrairement à certains organismes vivants pouvant entrer dans un état de dormance (graines, tardigrade, levures), la très faible mobilité des composants du protoplasme ne serait pas due à l'établissement d'un état vitreux, mais à la présence en grande quantité de DPA. L'accumulation de cette molécule à une concentration largement supérieure à sa limite de solubilité, induisant sa précipitation au sein du protoplasme [24,34].

Une autre caractéristique du protoplasme est la présence en grande quantité de petites protéines solubles dans l'acide (SASPs, pour « Small Acid-Soluble Proteins »). Ces protéines sont complexées avec l'ADN de la spore et le saturent, le protégeant ainsi de nombreuses altérations (UV, dénaturations chimique et thermique), et lui donnant une forme circulaire [5,24,37]. Elles seront dégradées dans les tous premiers instants de la germination, libérant des acides aminés utilisés pour la synthèse de nouvelles protéines [38].

1.1.3. La germination

La germination d'une spore peut être induite par de nombreux facteurs, dépendant majoritairement de l'espèce concernée. Elle est souvent décrite comme l'ensemble des événements ayant lieu après l'induction et ne nécessitant pas d'énergie métabolique [16].

De nombreux stimuli tels que des acides aminés, des sucres, des ions ou

encore des sels biliaries sont susceptibles d'induire la germination des spores [39]. Chez *B. subtilis*, le processus de germination commence par la reconnaissance des nutriments par des récepteurs de germination (GRs), localisés au niveau de la membrane interne (**Figure 4**). Ces récepteurs sont composés des trois sous-unités, GerA, GerB et GerK, en interaction avec une autre protéine GerD, permettant leur cohésion au sein d'un ensemble appelé « germinosome » [33,40]. L'accession des nutriments à la membrane interne des spores pourrait être facilitée par une autre protéines GerP, dont le rôle exact reste encore à élucider [33].

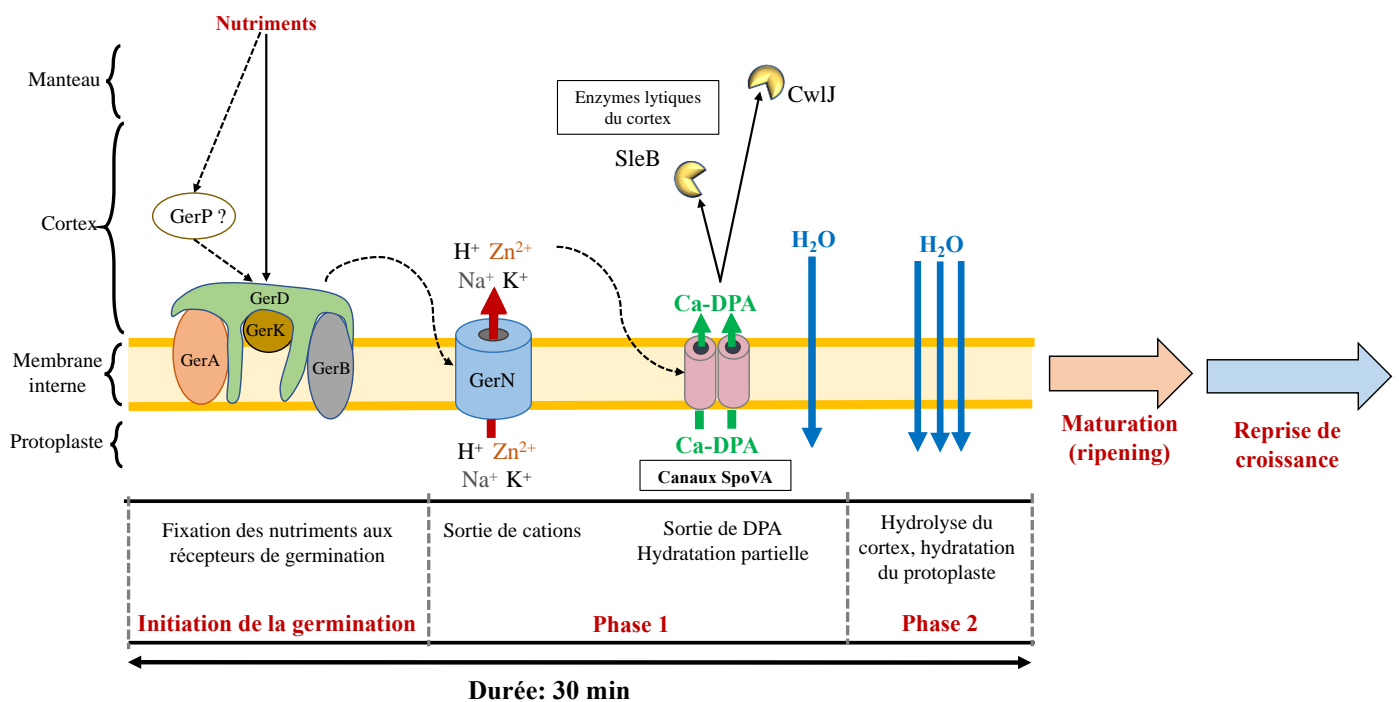


Figure 4 : Les différentes phases de la germination des spores de *B. subtilis*

Flèches pleines : induction ou interaction. Flèches en pointillés : induction ou interaction probable. D'après [33,38,40–44]

L'étape d'engagement de la spore dans le processus de germination, dit « commitment », est irréversible et se poursuit même si les nutriments sont retirés du milieu de croissance [45,46].

S'ensuit alors la phase I de germination, débutant par un relargage de cations (H^+ , Zn^{2+} , K^+) par l'intermédiaire d'un transporteur GerN, probablement couplé directement aux GRs [44]. Cette sortie d'ions est suivie d'une libération des complexes Ca-DPA de la spore, via les canaux SpoVA, dont l'une des sept sous unités

(SpoVAC) est un canal mécano-sensitif, libérant du DPA en cas de modification de la tension membranaire [42,47,48]. Cette sortie de DPA s'accompagne alors de l'initiation de la réhydratation du protoplaste, clôturant la phase I de germination. A la suite de cette phase I, la spore est de nouveau sensible à des traitements thermiques modérés (80 °C – 10 min) [49].

La phase II, ultime phase de la germination, commence par l'hydrolyse du cortex de la spore par les enzymes lytiques du cortex SleB et CwlJ, localisées principalement dans le manteau et le cortex des spores. Ces enzymes semblent être activées directement par la sortie du DPA mais aussi par la pression appliquée sur le cortex par le protoplaste en cours de réhydratation [33]. L'hydrolyse du cortex de la spore et sa réhydratation totale interviennent à la fin de cette phase II, marquant la perte de la biréfringence des spores ainsi que de leur résistance à la pression et à de nombreux agents chimiques et antimicrobiens [42,49]. Immédiatement après la seconde phase de germination, s'établit une phase dite de maturation (« ripening ») marquant la reprise de la synthèse protéique. Si peu de changements morphologiques interviennent lors de cette étape, la dégradation de certaines protéines, telles que les SASPs, combinée la traduction d'ARN déjà présents permettent la synthèse de nouvelles protéines [38,50].

L'étape de maturation est ensuite suivie de la reprise de croissance, ou « outgrowth », se traduisant par l'élongation de la spore et la reprise totale de son activité métabolique [38,39].

Si le processus de germination des spores du genre *Bacillus* est globalement bien connu, il n'en est pas de même pour les spores du genre *Clostridium*. Il semblerait en effet que la dégradation du cortex précède le relargage de DPA chez certaines espèces comme *C. perfringens* ou *C. difficile* [51,52]. Les protéines lytiques du cortex ainsi que les récepteurs de germination ont aussi des configurations protéiques différentes de celles de *B. subtilis* [39,51]. Par ailleurs, les étapes conduisant à l'activation des enzyme SleB et CwlJ ne sont pas encore identifiées [53].

Ainsi, la structure multicouche des spores constitue un véritable rempart aux stress environnementaux. Cette typicité unique dans le règne microbien est un obstacle de plus aux procédés de décontamination utilisés dans les industries agroalimentaires. La persistance de spores dans les aliments peut ainsi induire une réduction de leur durée de conservation et être le vecteur de nombreuses pathologies.

1.2. Les risques bactériologiques liés à la présence de spores dans les aliments

Parmi les 5,4 millions d'intoxications alimentaires recensées mondialement en 2010, 20 % étaient dus à *Staphylococcus aureus* et 80 % à des bactéries sporulantes [4]. Les trois espèces majoritairement incriminées sont *B. cereus*, *C. botulinum* et *C. perfringens*, avec des taux de mortalité pouvant aller jusqu'à 25 % [54]. Au-delà du risque sanitaire évident que constituent les bactéries sporulées, le risque écologique lié à la présence de spores d'altération est aussi bien réel. À l'heure où sept milliards d'êtres humains gaspillent jusqu'à 50 % des denrées alimentaires qu'ils produisent [55,56], la recherche sur les spores d'altération s'est intensifiée, avec 10 fois plus de publications parues en 2016 qu'en 2005 (donnée PubMed). Cette section vise ainsi à décrire les principaux groupes et espèces sporulantes à l'origine des risques sanitaires, économiques et écologiques.

1.2.1. Les espèces pathogènes du genre *Clostridium*

Le genre *Clostridium* regroupe des bactéries à Gram positif, généralement anaérobies strictes et mobiles, ayant la capacité de sporuler. Bien qu'il ait été constamment restructuré au cours des dernières décennies, la phylogénie des 204 espèces qui le composent aujourd'hui reste très hétérogène [57]. Si la plupart de ces espèces sont commensales ou colonisent les sols, certaines d'entre elles sont connues pour leur pathogénicité vis-à-vis de l'homme et des animaux. Des espèces comme *C. botulinum*, *C. haemolyticum*, *C. difficile*, *C. perfringens*, *C. septicum* ou *C. tetani*, sont ainsi impliquées dans des pathologies telles que le botulisme, la gangrène gazeuse, les entérites et dysenteries ou le tétanos [58]. Ces maladies, à une exception près, sont toutes infectieuses et invariablement liées à la production de toxines dans le tractus digestif. Seul le botulisme peut être induit par l'ingestion directe de la toxine botulique par le biais d'aliments contaminés.

Parmi toutes les espèces de *Clostridium*, *C. perfringens* et *C. botulinum* sont les plus fréquemment impliquées dans des cas d'intoxication alimentaires [4].

1.2.1.1. *Clostridium perfringens*

La variabilité des pathologies causées par *C. perfringens* est notamment due à la diversité des toxines produites par cette espèce. La production de quatre toxines

« majeures » α ; β ; ϵ ; ι , est à la base de la classification des souches de *C. perfringens* en cinq groupes (de A à E) (**Tableau 1**) [59]. Seize autres types de toxines peuvent aussi être produites, dont l'enterotoxine (dite CPE, pour « *Clostridium perfringens* enterotoxin »), une protéique cytotoxique de 35 kDa [59]. Les 1 à 5 % des souches de type A capables de produire de la CPE sont responsables de plus de 80 % des infections alimentaires liées à la consommation d'aliments contaminés.

Tableau 1 : Les toxinotypes de *C. perfringens*

Groupe	Toxine produite			
	α	β	ϵ	ι
A	+	-	-	-
B	+	+	+	-
C	+	+	-	-
D	+	-	+	-
E	+	-	-	+

La majorité des toxi-infections alimentaires liées à *C. perfringens* sont dues à la consommation de plats préparés à base de viandes. La sous-cuisson des matières premières contaminées induit une persistance des formes sporulées de *C. perfringens*, qui germent et se développent lors du refroidissement des plats. Les conditions de persistance et de développement des spores sont optimales dans le cas de préparation de grosses quantités de plats cuisinés, favorisant l'établissement des conditions anaérobies, propices au développement des spores. Par ailleurs, leur refroidissement plus lent que celui de petits volumes favorise la germination des spores et la multiplication des cellules végétatives. Ainsi, un maintien des plats préparés pendant quelques heures entre 50 °C et 30 °C rend alors possible la prolifération de *C. perfringens* au-delà du seuil critique de 10⁵ UFC/g, pour lequel un risque d'infection est possible [60,61].

Après la consommation de plats contaminés, les cellules végétatives de *C. perfringens* se multiplient et sporulent dans l'intestin. Lors de la sporulation, l'entérotoxine CPE est produite et accumulée dans la cellule mère, puis libérée dans l'intestin lors de l'externalisation de l'endospore mature [59]. Une fois dans l'intestin, la CPE interagit avec des protéines de la famille des claudines, responsables de l'établissement des jonctions serrées entre les entérocytes. Une fois liée aux claudines, la CPE induit successivement la formation de pores membranaires et la désolidarisation des entérocytes (**Figure 5**) [62]. La desquamation de la muqueuse

intestinale induite par l'action de la CPE est à l'origine de crampes abdominales, de diarrhées et de nausées. Ces symptômes apparaissent généralement entre 10 à 12 h après ingestion d'un plat contaminé et durent de 1 à 3 jours [61]. Même si les cas de complications restent marginaux, l'issue d'une l'entérite peut être fatale aux populations à risques. Des cas de mort subite de nourrissons infectés par une souche de *C. perfringens* productrice de CPE ont en effet été rapportés [60,63].

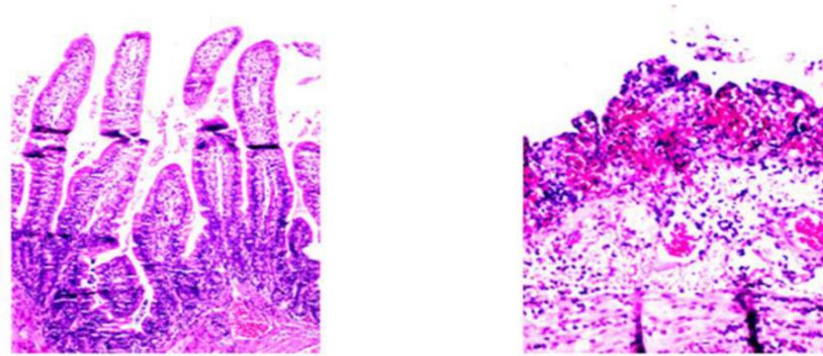


Figure 5 : Effet d'une infection à *C. perfringens* sur le tissu épithélial de l'intestin

Coupe du tissu épithélial de l'anse iléale de lapin (coloration hématoxyline / éosine). A : épithélium intact.

B : épithélium nécrosé suite à une infection par *C. perfringens*. D'après Sarker *et al.* (1999) [64]

En France, *C. perfringens* était le quatrième pathogène à l'origine du plus grand nombre de cas de toxiinfections alimentaires en 2015 (543 cas), derrière *Salmonella* spp., norovirus et *B. cereus* [65]. Le phénomène est de plus grande ampleur aux Etats-Unis, avec environ un million de cas annuels, laissant une ardoise de plus de 400 millions de dollars de pertes financières [66,67].

1.2.1.2. *Clostridium botulinum*

Dans les années 1950, l'espèce *C. botulinum* regroupait l'ensemble des bactéries connues pour leur production de neurotoxine botulique (BoNT). Les souches de *C. botulinum* étaient alors classées selon la nature sérologique de leur neurotoxine, réparties en sept groupes de A à G [68].

Dans les années 2000, une nouvelle classification prenant en compte les principales caractéristiques physiologiques (protéolyse et lipolyse) et génétiques (ARN 16S) a engendré une nouvelle répartition des souches de *Clostridium* en six nouveaux groupes (**Tableau 2**).

Tableau 2 : Groupes et caractéristiques principales des souches de *Clostridium* productrices de neurotoxines [69–72]

Caractéristiques de la souche	Groupe I	Groupe II	Groupe III	Groupe IV	Groupe V <i>C. butyricum</i>	Groupe VI <i>C. baratii</i>
Sérotype de la toxine	A, B, F	B, E, F	C, D	G	E	F
Souche la plus proche non productrice de toxine	<i>C. sporogenes</i>	ND	<i>C. novyi</i> , <i>C. haemolyticum</i>	<i>C. subterminale</i> , <i>C. proteolyticus</i> , <i>C. schimacherense</i>	<i>C. butyricum</i> atoxinogène	<i>C. baratii</i> atoxinogène
Protéolyse	+	-	-	+	-	-
Production de lipase	+	+	+	-	-	-
T° de croissance	Optimale	25-37 °C	37-40 °C	30-37 °C	30-37 °C	30-45 °C
	Minimale	10-12 °C	2,5-3 °C	15 °C	ND	10-15 °C
pH minimum de croissance	4,6	5	5,1	ND	4,8	3,7
Teneur en sel minimale inhibant la croissance	10 %	5 %	ND	6,50 %	ND	8,50 %
Thermistance des spores	D _{121 °C} = 0,20 min	D _{82,2 °C} = 1,35 – 3,92 min	D _{104 °C} = 0,1 – 0,9 min	D _{104 °C} = 0,8 – 1,12 min	D _{100 °C} < 0,1 min	ND
Type de botulisme	Humain, Animal (bétail)	Humain, Animal (bétail, poissons)	Animal (bétail), Humain (rare)	Humain (très rare)	Humain, Animal (oiseaux, poissons)	Humain
Vecteur principal	Viandes, légumes, poissons	Produits carnés et de la mer	Végétation en décomposition, charognes, invertébrés	Sols	Poissons et produits de la mer	Produits carnés

Les groupes V et VI sont constitués respectivement des souches *C. butyricum* et *C. baratii* productrices de neurotoxines botuliques, trop éloignées génétiquement pour pouvoir être classées dans l'espèce *C. botulinum* [68,69].

La toxine botulique est à ce jour considérée comme le poison le plus puissant jamais recensé, avec une DL₅₀ comprise entre 0,4 ng et 2,5 ng/kg de poids corporel

chez la souris et une dose létale comprise entre 70 ng et 70 µg pour un homme bien-portant de 70 kg [54,73].

Les toxines botuliques sont des protéines composées d'une chaîne longue (100 kDa) et d'une chaîne courte (50 kDa) reliées par un pont disulfure [74]. Leurs cibles sont les motoneurones sur lesquelles elles agissent en bloquant les transmissions nerveuses (**Figure 6**).

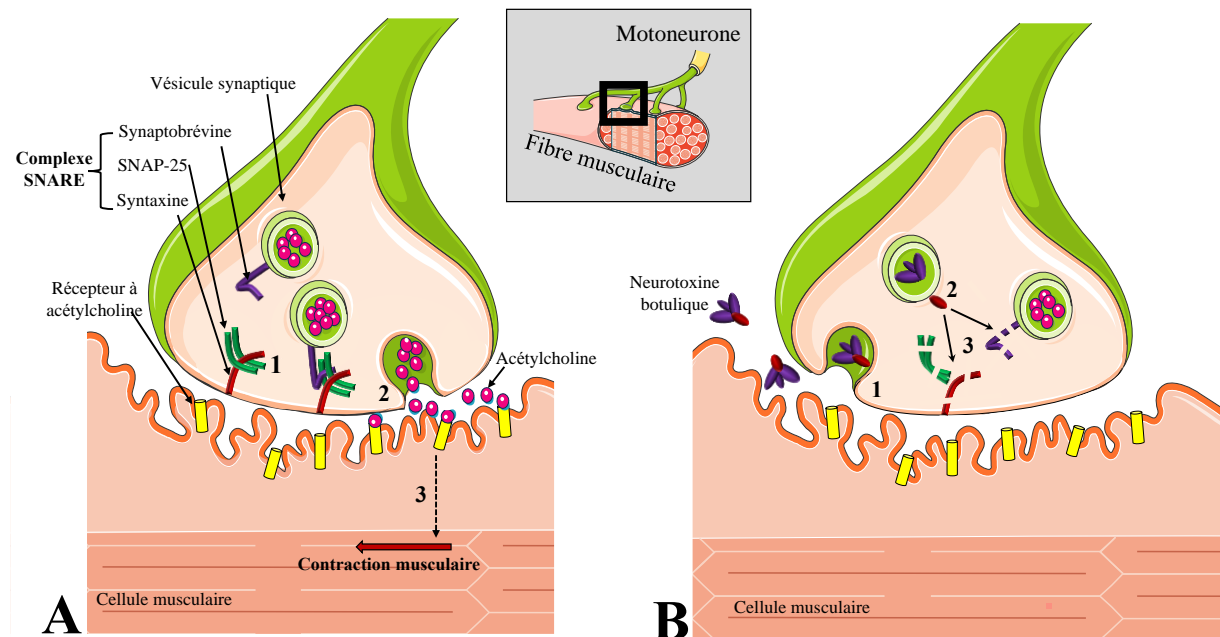


Figure 6 : Schéma simplifié de l'action de la neurotoxine botulique sur le fonctionnement de la jonction neuromusculaire (d'après Arnon *et al.* 2001) [74]

A : Fonctionnement normal d'une jonction neuromusculaire. **1 :** La vésicule synaptique transportant l'acétylcholine se fixe à la membrane plasmique du motoneurone par l'intermédiaire du complexe SNARE. **2 :** L'exocytose de l'acétylcholine dans l'espace synaptique est suivie de sa fixation sur les récepteurs à acétylcholine de la membrane des cellules musculaires. **3 :** La transduction du signal transmis par la fixation de l'acétylcholine à ses récepteurs induit la contraction musculaire.

B : Arrêt du fonctionnement d'une jonction neuromusculaire induite par la présence de neurotoxine botulique. **1 :** Endocytose de la neurotoxine suite à sa reconnaissance par un récepteur membranaire spécifique. **2 :** Libération de la chaîne légère dans le cytosol du neurone et clivage des protéines du complexe SNARE. **3 :** La fusion de la vésicule synaptique est rendue impossible : la contraction musculaire s'arrête.

Dans le cas du fonctionnement normal des neurones, le signal neuronal induit un relargage de neurotransmetteur (l'acétylcholine) dans la jonction neuromusculaire, suivie d'une contraction musculaire (**Figure 6, A**). Le relargage de l'acétylcholine est permis par l'interaction d'un trio protéique appelé complexe SNARE (pour « Soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein Receptor »), induisant l'exocytose de la vésicule de transport de l'acétylcholine

(Figure 6, B). Lorsque la toxine botulique atteint le motoneurone, l'interaction de sa chaîne lourde avec un récepteur spécifique du neurone synaptique engendre son internalisation et le relargage de sa chaîne légère dans le cytosol neuronal. L'action enzymatique de la chaîne légère sur les protéines du complexe SNARE induit leur dégradation, se soldant par un arrêt de l'exocytose des vésicules de transport de l'acétylcholine et un blocage de la contraction musculaire [74,75].

Les principaux symptômes liés à l'ingestion de toxine botulique sont une paralysie des muscles de l'accommodation (vision floue, pupilles dilatées), des muscles buccaux (difficulté d'élocution) et une paralysie flasque de muscles moteurs (paralysies des membres et paraplégie) et respiratoires. Les symptômes peuvent durer de quelques jours à huit mois et la mortalité par insuffisance respiratoire peut varier de 5 à 25 % selon la rapidité de la prise en charge médicale [54].

Le botulisme humain est ainsi une affection neurologique rare mais grave, qui fait l'objet d'une déclaration obligatoire depuis 1986 [76]. Une fois déclarés, les cas de botulisme sont répartis en cinq catégories [77].

- **L'intoxication botulique :**

Elle est induite par l'ingestion de toxine botulique préformée dans des aliments. C'est le cas de botulisme le plus répandu chez les adultes. Cette maladie se déclare souvent sous une forme sévère nécessitant une hospitalisation en soins intensifs, dans certains cas des périodes allant jusqu'à 36 mois [76]. La durée de l'hospitalisation, les jours d'arrêt de travail, les séquelles et les éventuels décès liés à une intoxication botulique représentent un coût important pour la société, évalué par certains auteurs à plus de 1,3 million de dollars (US) par cas [78].

En France, sur la période allant de 2010 à 2012, plus de la moitié des personnes atteintes ont été hospitalisées et un décès est à déplorer [76]. Les foyers d'intoxication botulique sont majoritairement associés aux toxines de type A et B [54,79]. La **Figure 7** représente la répartition des produits à l'origine des foyers d'intoxications botuliques répertoriés par l'Institut de veille sanitaire (InVS) entre 2010 et 2015. Ainsi, 75 % des foyers étaient liés à la consommation de charcuteries ou de conserves de végétaux de fabrication familiale, les 25 % restant étant dus à des produits industriels,

majoritairement à base de viandes [76,80–82]. Le porc étant fréquemment porteur de *C. botulinum*, le jambon est traditionnellement responsable du botulisme en France [83]. De manière générale, il s'agit de botulisme de type B dont l'évolution clinique est modérée [76].

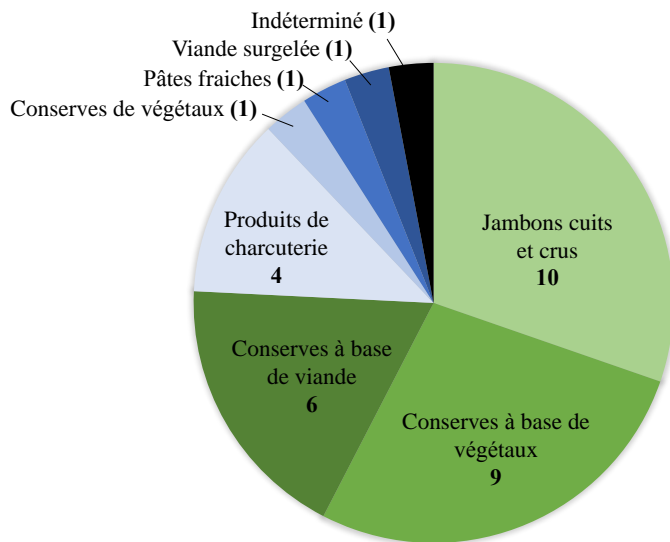


Figure 7 : Répartition du nombre de foyers d'intoxications botuliques 2005 et 2015

Nuances de bleu : produits d'origine industrielle. Nuances de vert : produits de fabrication familiale [76,80–82]

Des cas de botulismes de type E liés à la consommation de jambon ont aussi été observés, probablement dus à une contamination par du sel marin contenu dans la saumure [84].

- **Le botulisme infantile :**

Causée par l'ingestion de nourriture contaminée par des spores de *C. botulinum*, cette maladie est souvent décrite chez les enfants de moins d'un an. Une fois dans le tractus gastro-intestinal, les spores germent et produisent de la neurotoxine *in situ*. La germination et la prolifération des spores est ici permise par la faiblesse du microbiote infantile en cours de développement [54,85]. Les symptômes du botulisme infantile sont similaires à ceux de l'intoxication botulique (paralysie flasque, détresse respiratoire) et accompagnés par une constipation chronique. Certaines formes moins fulgurantes se traduisent aussi par un retard de croissance staturo-pondérale des jeunes enfants [86]. Bien que le sujet soit encore discuté, *C. botulinum* semble aussi être impliqué dans certains cas de morts subites de nourrissons.

Bohnel *et al.* ont ainsi montré que des souches neurotoxiques de *C. botulinum* étaient isolées dans 20 % des cas de décès inexplicables de nourrissons (étude régionale Allemande) [87].

Les abeilles sont un vecteur important de spores de *C. botulinum*, fréquemment isolés des produits issus de l'apiculture. Ainsi, la cause principale du botulisme infantile est l'introduction trop précoce du miel dans l'alimentation des nourrissons. [85]. Cependant, des études mentionnent aussi des cas de botulisme liés à la consommation de laits infantiles en poudre et d'herbes médicinales contaminées [88–90].

L'intoxication botulique et le botulisme infantile sont ainsi les principales maladies consécutives à la consommation de nourriture contaminée par des spores de *C. botulinum* ou de la toxine botulique. Trois autres formes marginales de botulisme sont aussi recensées :

- Le botulisme iatrogénique : lié à une injection excessive de toxine botulique dans le cadre d'un traitement médical ou cosmétique [91]
- Le botulisme par inhalation : développé pendant la seconde guerre mondiale comme arme biologique [92–94]
- Le botulisme par blessure, dû à la colonisation d'une plaie par des spores, consécutive à des injections de stupéfiants [95].

1.2.2. Le groupe *Bacillus cereus*

Le groupe *Bacillus cereus* (ou *Bacillus cereus sensu lato*) est composé de bactéries à Gram positif, mobiles, aérobies-anaérobies facultatives et sporulantes. Ce groupe comprend un nombre fluctuant d'espèces, toutes très proches phylogénétiquement et dont la classification est le fruit d'un perpétuel débat. A l'heure actuelle, huit espèces composent le groupe *B. cereus* : *B. cereus sensu stricto*, *B. anthracis*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides*, *B. cytotoxicus*, *B. weihenstephanensis* et *B. toyonensis* [96]. Quatre nouvelles espèces (*B. wiedmannii*, *B. bingmayongensis*, *B. gaemokensis* et *B. manliponensis*), isolées entre 2010 et 2016, sont dans l'attente d'une publication officielle pour intégrer le groupe *B. cereus* [97]. Les espèces du groupe *B. cereus* sont génétiquement très proches, si bien que la seule différence entre *B. cereus sensu lato* et *B. thuringiensis* est la présence du gène responsable de la production de cristaux parasporaux. Dans

les cas où ce gène est porté par un plasmide, sa perte engendre la requalification de *B. thuringiensis* en *B. cereus sensu lato* [98].

De ce fait, les méthodes standards (ISO 7932 et 21871) de détection et d'énumération de *B. cereus* ne permettent pas de faire la distinction entre toutes les espèces du groupe. Le rapport d'un cas de toxi-infection alimentaire causée par *B. cereus* peut donc concerner indifféremment l'une au l'autre de ces espèces [98,99]. En laboratoire, la distinction entre les espèces se fait au moyen de critères morphologiques et culturels dont les principaux sont décrits dans le **Tableau 3**.

Ainsi, sauf précision, ce chapitre fera référence à *B. cereus* pour désigner l'ensemble souches du genre *B. cereus* potentiellement responsables de toxi-infections alimentaires (**Tableau 3**).

Tableau 3 : Principales caractéristiques des espèces du groupe *B. cereus*

B. thurin. = *B. thuringiensis* ; *B. myco* = *B. mycoides* ; *B. pseudo* = *B. pseudomycoides* ; *B. weihenst.* = *B. weihenstephanensis* ; *B. toyo* = *B. toyonensis*

	<i>B. cereus</i>	<i>B. thurin.</i>	<i>B. myco.</i>	<i>B. pseudo.</i>	<i>B. cyto.</i>	<i>B. weihenst.</i>	<i>B. anthracis</i>	<i>B. toyon.</i>
T° de croissance mini et maxi (°C)	10 – 45	10 – 45	5 – 37	10 – 40	20 – 50	4 – 37	ND	10 – 45
Colonies rhyzoidales	-	-	+	+	-	-	-	-
Crystal parasporal	-	+	-	-	-	-	-	-
Hydrolyse de l'amidon	+	+	+	-	-	+	+	+
Croissance sans tryptophane	+	+	+	+	-	+	+	+
Impliqué dans des cas de toxi-infections alimentaires	oui	oui	non	non	non	oui	non	non
Caractéristiques particulières	ND	Utilisé comme insecticide (Bt)	ND	ND	ND	ND	Arme bactériologique (anthrax)	Probiotique animal (Toyocerin®)
Références	[100]	[100–102]	[100]	[100]	[100]	[100,103]	[100]	[104]

Deux types de symptômes peuvent être causés par l'ingestion de nourriture contaminés par *B. cereus* : le syndrome diarrhéique et le syndrome émétique.

Le syndrome émétique est causé par l'ingestion de céréulide, une toxine produite dans les aliments en début de la phase stationnaire de croissance de *B. cereus* [105,106]. Cette toxine est extrêmement thermorésistante puisque seule

une cuisson prolongée des aliments permet son activation (90 °C – 126 min). En se fixant sur des récepteurs du nerf vague, la toxine stimule le centre du vomissement du bulbe rachidien, induisant un réflexe émétique. La céréulide est aussi fortement toxique pour les mitochondries [106,107].

La plupart du temps, les cas d'intoxication à la céréulide sont liés à la consommation d'aliments à teneur élevée en amidon (pâtes, riz), favorisant la production de toxine émétique [106]. Les symptômes d'une intoxication à la céréulide apparaissent rapidement, de 30 min à 6 h après la consommation d'aliments contaminés. Dans de rares cas, des complications graves ont été rapportées, notamment chez des enfants et de jeunes adultes pour lesquels des lésions aux niveaux du foie, du cœur, des reins et du cerveau ont été rapportées [105,108].

Le syndrome diarrhéique est causé par l'ingestion de spores et/ou de cellules végétatives, suivie d'une production d'entérotoxines dans l'intestin.

Trois principales entérotoxines ont été associées au syndrome diarrhéique : l'hémolysine BL (HBL), l'entérotoxine non-hémolytique (Nhe) et la cytotoxine K (CytK). Ces trois toxines causent la formation de pores dans les membranes des entérocytes, induisant l'accumulation de fluides dans l'intestin. Cette toxi-infection alimentaire est liée à la consommation d'une grande variété de produits contaminés, dont des végétaux, des épices, des œufs et de nombreux produits carnés [105,106].

1.2.3. Les spores d'altération

Avec 3,3 milliards de tonnes de gaz à effet de serre émis chaque année, le gaspillage alimentaire mondial est le troisième plus grand pollueur de la planète, derrière la Chine et les Etats Unis [55]. Face à l'urgence de la situation, le parlement Européen a annoncé son intention de réduire de moitié le gaspillage alimentaire d'ici 2025 [56].

La présence de spores d'altération dans les produits alimentaires peut induire la non-conformité de lots entiers de marchandises et leur destruction avant même l'arrivée chez le consommateur.

Du fait de leur non-pathogénicité et du faible risque sanitaire que représentent les spores d'altération, leur étude est relativement restreinte comparée

à l'étendue des connaissances disponibles sur les spores de bactéries pathogènes [109,110].

Au niveau industriel, les procédés de maîtrise de la flore sporulée sont ainsi testés et validés sur des spores pathogènes. Cependant, bon nombre d'espèces altérantes ont des propriétés de résistance thermique supérieures à celles des espèces pathogènes [111]. Leur diversité étant considérable, les principales espèces de spores impliquées dans des processus d'altération des aliments sont décrites dans le **Tableau 4**. Par ailleurs, il est portant de noter que certaines spores d'altération peuvent aussi être des pathogènes opportunistes (**Tableau 4**).

Tableau 4 : Principales espèces de spores d'altération et produits concernés

* : pathogène opportuniste

Type	Espèces	Produits concerné	Altérations	Références
Thermophiles	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	Conserves de légumes non-acides	Acidification, odeur aigre	[110,112]
	<i>B. coagulans</i>	Conserves de légumes acides (pH 4) et lait concentré	Acidification, défaut d'arômes. Coagulation du lait	[113]
Psychro-tolérants	<i>C. putrefaciens</i> , <i>C. frigidicarnis</i> , <i>C. bowmanii</i>	Produits carnés réfrigérés emballés sous vide	Odeurs putrides, gonflement de l'emballage	[113,114]
	<i>B. mycoides</i> , <i>B. sphaericus</i>	Produit carnés sous vide, lait	Gonflement de l'emballage, acidification, coagulation	[113]
Mésophiles	<i>C. butyricum</i> , <i>C. pasteurianum</i> , <i>C. tyrobutyricum</i>	Fromages	Éclatement des meules, Acidification et défaut d'arômes	[113]
	<i>B. subtilis</i>	Pain, produits de panification	Décoloration de la croûte, aspects visqueux	[113,115]
	<i>B. pumilus</i> *	Lait	Acidification, défauts d'arômes	[116–118]
	<i>B. licheniformis</i> *	Lait	Défauts d'arômes	[116,119,120]
	<i>B. sporothermodurans</i>	Lait UHT	Non-stérilité du produit	[116,121,122]
Acidophiles	<i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i>	Jus de fruits et boissons acides	Défauts d'arômes	[121,123]

Conclusion

Les spores bactériennes sont des microorganismes dont la structure multicouche assure leur survie face à un large panel de stress environnementaux. La pathogénicité de certaines espèces telles que *B. cereus* et *C. botulinum*, ainsi que leur potentiel à altérer les aliments, constituent donc des risques majeurs pour la société, tant sur les plans sanitaires qu'écologique.

À l'heure actuelle, les stratégies utilisées par les industriels pour prévenir le développement des formes sporulées dans les aliments sont l'application de traitements thermiques de stérilisation ou l'utilisation de conservateurs. La stérilisation, bien que seul traitement garantissant l'inactivation des spores pathogènes, implique une cuisson des aliments, induisant d'importantes modifications de leur caractéristiques organoleptiques et nutritionnelles. Si tel n'est pas le cas des conservateurs, la législation Européenne tend à réduire leur utilisation, notamment à cause de l'effet potentiellement cancérigène de certains d'entre eux [10].

Parmi les nouveaux procédés de décontamination athermiques mis au point lors des vingt dernières années, le traitement HP est déjà largement utilisé en industrie. Cependant, des optimisations sont nécessaires afin d'assurer l'inactivation des formes bactériennes sporulées.

2. Réponse des microorganismes aux procédés de traitement par hautes pressions

Après les premiers traitements expérimentaux d'aliments par hautes pressions hydrostatiques (HP) au début du 20^e siècle, les industriels du secteur de l'agroalimentaire ont participé à la démocratisation de ce procédé, utilisé aujourd'hui sur une grande variété de produits (viandes, sauces, jus de fruits et de légumes, guacamole, etc.).

2.1. L'impact des hautes pressions sur les systèmes biologiques

2.1.1. Effet des hautes pressions sur la structure des biomolécules

Dans un fluide statique en équilibre thermodynamique, la pression est égale en tout point : c'est la pression isostatique ou hydrostatique. Par ailleurs, tout fluide possède la capacité de transmettre une force de façon intégrale et sans frottement. Ainsi, un solide immergé dans un fluide comprimé recevra de manière intégrale cette pression sur l'ensemble de sa surface, peu importe sa géométrie [124,125]. Lors d'une pressurisation, tout système répond au principe de Le Châtelier selon lequel « Lorsque des modifications apportées à un système en équilibre provoquent une évolution vers un nouvel état d'équilibre, cette évolution s'oppose aux perturbations qui l'ont engendrées et en modère l'effet ». Autrement dit, dans le cas de la compression d'un système, son évolution va dans le sens d'une réduction de son volume. Ainsi, l'application d'une pression hydrostatique à un aliment en réduit le volume sans en changer la forme.

À l'échelle moléculaire, cela se traduit par une modification des interactions distance-dépendantes entre les atomes, ayant des conséquences directes sur les liaisons faibles intra- et intermoléculaires. Les forces de van der Waals, les liaisons hydrogènes ainsi que les interactions hydrophobes et hydrophiles sont donc généralement favorisées par l'application de hautes pressions hydrostatiques [126].

Les **polysaccharides** dont la structure dépend principalement de l'établissement de liaisons faibles intramoléculaires peuvent être impactés par les hautes pressions. Dans le cas de l'amidon, l'application d'une pression supérieure à 500 MPa induit sa gélatinisation [127].

En modifiant les interactions faibles au sein des **protéines**, les HP peuvent aussi affecter fortement leurs structures secondaires, tertiaires et quaternaires. Sous pression, un premier dépliement partiel des protéines induit la formation d'un ou de plusieurs intermédiaires, pouvant être totalement dénaturés et/ou former des agrégats (**Figure 8**). L'issue de ce processus ainsi que sa réversibilité seront entièrement dépendantes du barème pression-température appliqué [128–131].

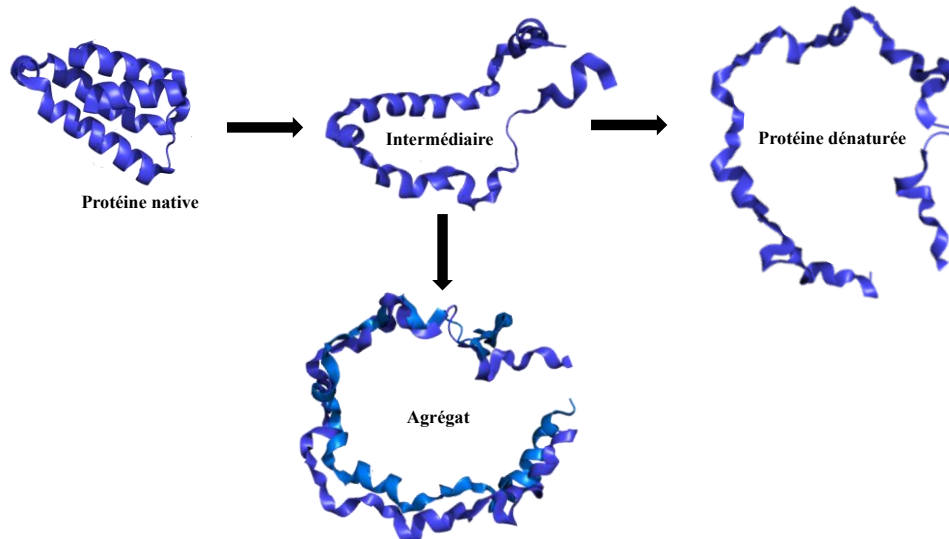


Figure 8 : Représentation schématique de la dénaturation et de l'agrégation sous pression de l'EntA-im, protéine d'immunité bactérienne à l'entérotoxicogène A

Données structurales de la protéine disponibles en ligne (Protein Data Bank <https://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=2BL7>). Modélisation effectuée sur PyMol (the PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0 Schrödinger, LLC).

Par conséquent, les traitements par HP peuvent être employés dans le but d'inactiver des enzymes responsables de l'altération des végétaux, et ainsi prolonger la durée de vie de produits tels que les jus de fruits et de légumes [129].

Les hautes pressions peuvent aussi avoir de nombreuses conséquences sur les lipides. Appliqués sur des matrices alimentaires, les traitements hyperbares peuvent favoriser l'initiation des réactions radicalaires d'oxydation des lipides. Une oxydation supplémentaire peut ainsi être observée lors du stockage de produits riches en acides gras polyinsaturés, comme les poissons gras par exemple [132]. Dans le cas des produits à très forte teneur en lipides, comme le chocolat, les huiles et les margarines, les HP favorisent la formation d'un réseau cristallin lipidique, induisant une amélioration de leurs propriétés plastique et thermique [133].

Au niveau des membranes biologiques, les HP induisent une diminution réversible de la fluidité membranaire, pouvant fragiliser les membranes et conduire à une dénaturation des protéines membranaires associées [134].

2.1.2. L'inactivation de cellules végétatives par hautes pressions

L'inactivation de microorganismes par hautes pressions est principalement attribuée aux dommages causés aux membranes et aux protéines de transport [135,136]. Cependant, les effets d'un traitement hyperbare dépendent du type de microorganisme (bactéries, levures, moisissures, virus), de leur forme (cellules végétative ou spores, bactéries à Gram négatif ou positif), du genre, de l'espèce, de la souche et de la phase de croissance. Le **Tableau 5** présente quelques données d'inactivation de microorganismes sous pression dans différentes matrices.

Tableau 5 : Inactivation de différentes formes microbiennes suite à des traitements en hautes pressions

* RL : réduction logarithmique de la flore initiale

Microorganismes	Souche et forme (cellules végétatives ou spores)	Barème de traitement	Matrice de traitement	RL*	Ref	
Levures	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	IFO 0304 (végétatives)	Viande de porc mixée	2	[137]	
		Isolée de jus d'agrumes (végétatives)	Jus d'orange	5	[138]	
		Isolée de jus d'agrumes (ascospores)	Jus d'orange	1		
	<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	ATCC 36947 (végétatives)	Jus de raisin	5	[139]	
		ATCC 36947 (ascospores)	Jus de raisin	0,5		
Bactéries à Gram négatif	<i>E. coli</i> O157:H7	NCTC 12079	Lait UHT	1	[140]	
			Poulet cru	2		
			Tampon phosphate	3		
	<i>Salmonella enterica</i>	Serovar Senftenberg 775W	372 MPa – 10 min – 23 °C	Tampon phosphate	2,5	[141]
				Poulet mixé	4	
				Tampon phosphate	2	
Bactéries à Gram positif	<i>Listeria monocytogenes</i>	NCTC 11994	Lait UHT	0	[140]	
			Poulet cru	1		
			Tampon phosphate	1		
Spores bactériennes	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	MG1363	Matrice mimant du lait	4	[142]	
	<i>C. perfringens</i>	SM101	Acide citrique 0.1 M	1,3	[143]	
	<i>C. sporogenes</i>	7955	Acide citrique 0.1 M	0,8	[143]	
	<i>B. cereus</i>	LMG6910	600 MPa – 30 min – 50 °C	Lait	7	[144]
600 MPa – 30 min – 30 °C			Lait	2.8		

La grande variabilité des barèmes de traitement utilisés rend difficile la comparaison des résultats d'inactivation fournis par la littérature. Comme le montre le **Tableau 5**, le choix de la matrice de traitement est important puisque certains produits tels que le lait ou la viande peuvent avoir un effet protecteur vis à vis des HP. Par ailleurs, l'ajout de solutés dépresseurs de l' a_w augmente considérablement la résistance des microorganismes tels que *Lc. lactis* ou *L. monocytogenes* [142,145].

La phase de croissance à laquelle les bactéries sont prélevées a aussi toute son importance. Mackey *et al.* (1995) ont ainsi montré qu'un traitement de 400 MPa pendant 10 min à 24 °C induisait une réduction de 1,3 log d'une population de *L. monocytogenes* en phase stationnaire de croissance, contre 7 log pour une population en phase exponentielle [146]. Malgré ces potentiels biais expérimentaux, il apparaît clairement que certains microorganismes résistent bien mieux que d'autres aux traitements hyperbares. Un classement par ordre de résistance croissante aux HP peut ainsi être établi :

Levures < Bactéries à Gram négatif < Bactéries à Gram positif < Endospores

2.2. Effets des hautes pressions sur les spores bactériennes

2.2.1. Effet d'un traitement à température modérée

Si les cellules végétatives sont fortement impactées par l'application d'un traitement hyperbare à température modérée (< 50 °C), les endospores bactériennes réagissent d'une toute autre manière. Celles-ci vont en effet être induites en germination, selon deux mécanismes dépendant du niveau de pression appliqué.

2.2.1.1. Germination physiologique des spores soumises à de faibles niveaux de pression

L'exposition de spores à des pressions comprises entre 100 et 400 MPa et à une température modérée (20 – 50 °C) provoque un changement de la configuration de leurs récepteurs de germination (GRs) (**Figure 9**). Les récepteurs ainsi modifiés induisent alors la cascade de réactions habituellement déclenchée par la présence de nutriments (**Section 1.1.3, Figure 4**) [147–149]. Chez *B. subtilis*, la germination des spores sous pression est d'avantage influencée par la nature des récepteurs que par leur nombre. La structure de GerA est ainsi plus sensible à la pression que celle de GerB ou de GerK [147].

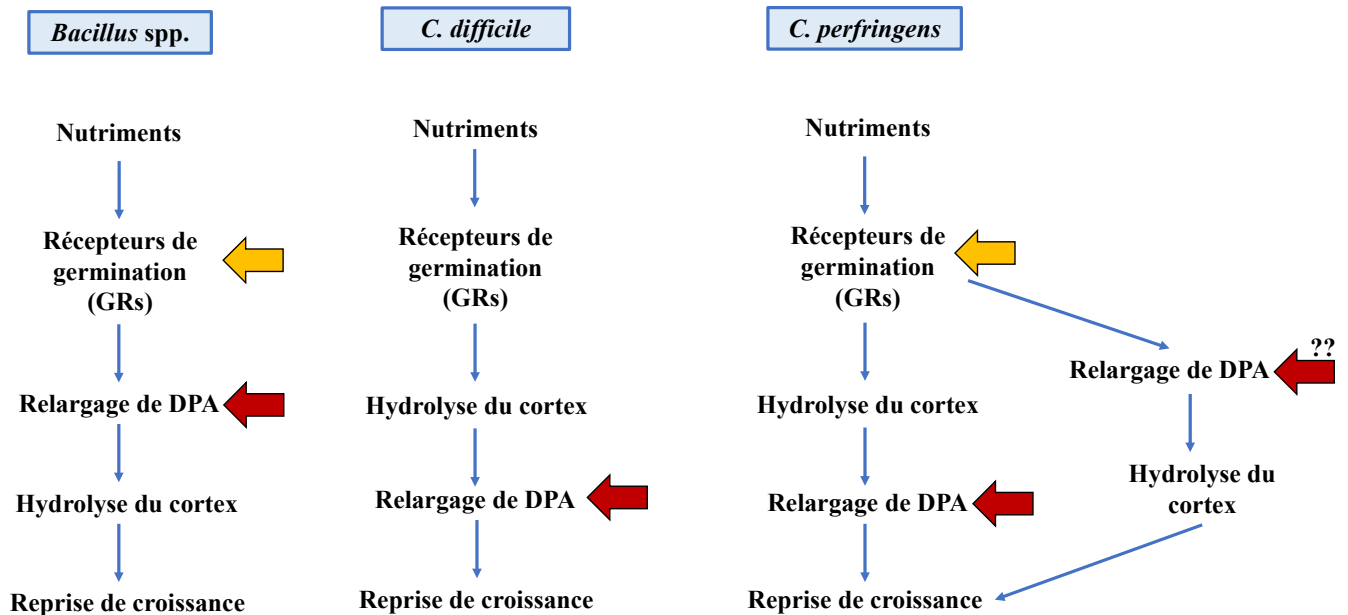


Figure 9 : Mécanismes de réponse des spores aux hautes pressions

Flèches jaunes : pressions inférieures 500 MPa ; Flèches rouges : pressions supérieures 500 MPa ; ?? : mécanisme hypothétique

Si la pression de traitement est supérieure à 550 MPa, le fonctionnement des enzymes lytiques du cortex est alors progressivement inhibé sous pression, induisant un blocage des spores en phase I de germination [150]. À l'inverse, des pressions inférieures permettent le passage de la spore en phase II de germination, aboutissant à une perte de la résistance des spores à la pression. Des auteurs ont ainsi observé une inactivation significative de spores soumises à des traitements longs (> 60 min) à pression modérée [148,151]. Cependant, des sous-populations de spores dites « super-dormantes », dont le nombre et/ou la diversité des GRs est faible, persistent après de tels traitements [152].

Chez les *Clostridium*, il semblerait que l'induction physiologique de la germination par les HP ne soit possible que pour certaines espèces comme *C. perfringens* [52] (**Figure 9**).

Les paramètres de sporulation ont une forte influence sur le taux de germination de spores exposées à ces gammes de pressions. De nombreuses études ont démontré qu'une température de sporulation supérieure de quelques degrés à la

température de croissance optimale de *B. subtilis* augmentait fortement sa vitesse de germination après un traitement HP [153,154]. Des températures de sporulation plus élevées induisent en effet une plus forte synthèse de GRs et une augmentation de la proportion d'acides gras insaturés des phospholipides membranaires. Ce changement de composition membranaire engendrerait une diminution de la fluidité et de la perméabilité de la membrane interne, réduisant la sensibilité des spores aux perturbations environnementales [153,155–157]. A l'inverse, certains auteurs ont également observé qu'une diminution de la température de sporulation pouvait aussi induire une augmentation de la résistance des spores aux HP, sur des espèces telles que *B. weihenstephanensis* ou *C. botulinum*. Dans ces cas, la diminution de la température de sporulation induirait une synthèse plus faible du nombre des récepteurs de germination, réduisant le taux de germination des spores sous pression [158–160]. D'autres facteurs tels que la concentration en cations divalents ainsi que le pH du milieu de sporulation sont aussi connus pour influencer le taux de germination de spores traitées en HP [158–160].

2.2.1.2. Germination non physiologique des spores soumises à des pressions élevées

L'application de pressions supérieures à 500 MPa induit une germination dite « non-physiologique » des spores, n'impliquant pas les récepteurs de germination. Dans ce cas, les HP provoquent directement une sortie de DPA du protoplaste de la spore [161]. Ce relargage est dû à l'action des HP sur les protéines SpoVA, responsables du transport de DPA lors de la germination et de la sporulation [162,163]. Chez *B. subtilis*, les protéines SpoVA sont composées de sept sous-unités dont SpoVAC, qui agit comme un canal mécano-sensitif, se déformant en cas de variation de tension membranaire ou de contrainte physique [47,48]. L'application de pressions supérieures à 550 MPa provoquerait ainsi une déformation de la sous-unité SpoVAC et une sortie de DPA, déclenchant la germination de la spore.

Cette germination « non physiologique » a aussi été observée chez *C. difficile* et *C. perfringens* (**Figure 10**) mais le déroulement précis des événements reste encore à élucider [52].

Ainsi, l'effet des HP sur les spores des genres *Bacillus* est relativement bien connu. Cependant, les études disponibles dans la bibliographie estiment que les

spores restées dormantes après un traitement en pression ont des caractéristiques phénotypiques et métaboliques similaires à celles de spores dormantes non traitées, ce qui n'a jamais été vérifié. Par ailleurs, des zones d'ombres persistent aussi quant à l'impact précis des HP sur les spores du genre *Clostridium*.

2.2.2. Inactivation des spores par un traitement combiné hautes pressions – haute température

Si les traitements hyperbares à température ambiante ne sont pas efficaces pour inactiver efficacement des spores, une pressurisation à des températures supérieures à 90 °C peut permettre la stérilisation d'aliments. La stérilisation assistée par hautes pressions (PATS, pour « Pressure Assisted Thermal Processing »), consiste ainsi à pressuriser des aliments à des températures supérieures à 90 °C pendant de courts laps de temps (< 5 min). L'augmentation rapide de la température du produit ainsi que son refroidissement après dépressurisation permettent d'inactiver jusqu'à 8 log de spores, tout en préservant les qualités organoleptiques et nutritionnelles des aliments [164]. Ahn *et al.* (2007) ont ainsi montré que l'application d'un traitement PATS à 700 MPa – 121 °C – 1 min permettait une inactivation supérieure à 8 log des spores de *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* dans de l'eau distillée [165]. De même, des traitements de 700 MPa – 105 °C pendant 5 et 20 min induisent des réductions de 5 et 6 log de spores de *Geobacillus stearothermophilus*, respectivement dans des œufs brouillés et des brocolis hachés [166,167].

Le mécanisme d'inactivation de spores par PATS se déroule en plusieurs étapes, impliquant dans un premier temps une levée de la dormance des spores, induites en germination par les hautes pressions, puis leur inactivation thermique dans un second temps [168].

Même si la stérilisation assistée par HP permet une inactivation significative des spores, ce procédé n'est pas encore applicable à l'échelle industrielle. En effet, les machines actuelles ne sont pas dimensionnées pour travailler sous la double contrainte température/pression. De plus ce traitement impose une cuisson du produit et réduit donc son intérêt par rapport à la stérilisation thermique. Actuellement, la combinaison des HP avec d'autres traitements athermiques reste donc l'unique alternative industrielle face à la résistance des spores à la pression.

2.3. Hautes pressions et stratégie des barrières

Pour inactiver des spores à des températures inférieures à 50 °C, les traitements par HP peuvent s'intégrer dans le concept de la technologie des barrières : le produit alimentaire n'est plus soumis à un traitement de conservation unique, mais à une succession de procédés de conservation moins agressifs. La combinaison de ces procédés permet d'amplifier de façon synergique leurs effets respectifs, en engendrant un minimum de modifications organoleptiques des aliments.

2.3.1. Inactiver des spores par hautes pressions : la stratégie du « germer pour inactiver »

Lors de leur processus de germination, les spores perdent leurs propriétés spécifiques de résistance (**Section 1.1.3**). La stratégie dite « germinate to inactivate » (germer pour inactiver) ou « activate to eradicate » (activer pour éradiquer) consiste ainsi à induire les spores en germination par un premier procédé, puis à les inactiver à l'aide d'un second traitement [163]. Plusieurs auteurs ont déjà démontré l'efficacité de cette stratégie sur des spores de *B. subtilis*, *B. cereus*, et *C. botulinum* et *C. perfringens*, dont l'inactivation par des traitements thermiques doux (< 60 °C) ou par irradiation aux UV a été favorisée par l'application préalable de traitements pro-germinants [169–171].

L'ajout de nutriments et de minéraux pro-germinants dans le milieu de traitement s'est ainsi révélé comme une alternative intéressante permettant d'inactiver des spores par HP à température modérée. Raso *et al.* (1998) ont en effet démontré qu'un traitement à 250 MPa – 25 °C – 15 min combiné à un ajout de 100 mM de L-alanine permettait d'inactiver 4,25 log des spores de *B. cereus* dans du lait, contre 2,89 log avec le traitement HP seul [172]. De même, l'ajout de 50 mM d'une mixture 1/1 (m/m) de chlorure de potassium (KCl) et de L – asparagine dans du poulet, suivie d'une incubation pendant 30 min à 55 °C, permettait une inactivation de 3 log des spores de *C. perfringens* par un traitement HP de 10 min – 586 MPa – 23 °C. L'incubation seule sans ajout de KCl et d'asparagine, suivie du même traitement HP n'induisait que 0,5 log d'inactivation de ces spores [173].

Ishimori *et al.* (2012) ont aussi démontré que la pressurisation à 200 MPa pendant 60 min à 45 °C de spores de *C. sporogenes* en suspension dans du tampon

phosphate additionné de 80 mM de cystéine induisait une réduction de 4 log, contre seulement 0,2 log sans cystéine [174].

De la même manière, l'ajout d'un prétraitement thermique peut permettre d'augmenter le taux d'inactivation des spores par un traitement hyperbare à température modérée. En effet, la modification de la configuration des GRs induite par la température améliorerait leur affinité pour les nutriments, augmentant ainsi le taux et la vitesse de germination des spores [163]. Une incubation de 30 min à 55 °C permet ainsi d'augmenter de 90 % l'inactivation des spores de *C. perfringens* par un traitement HP à 586 MPa – 10 min – 23 °C [174].

Ainsi, l'induction préalable de la germination des spores rend possible leur inactivation par un traitement HP. Cependant, sachant que certaines toxines peuvent être produites lors de la reprise de croissance des spores, induire leur germination augmente le risque de synthèse de toxine *in situ* dans les aliments et s'avère donc risqué si mal maîtrisé [105,106].

2.3.2. Combinaison hautes pressions – agents antimicrobiens

Quelques auteurs se sont penchés sur l'usage d'agents antimicrobiens comme moyens d'inactivation complémentaires au traitement HP.

L'ajout d'esters de sucrose (ou sucrose laurate), des tensioactifs à usage alimentaire (E473) et cosmétologique, a été testé à plusieurs reprises pour l'inactivation de spores dans diverses matrices. Stewart *et al.* (2000) ont ainsi démontré que l'ajout d'esters de sucrose à 0,1 % lors d'un traitement HP à 404 MPa pendant 15 min à 45 °C dans du tampon phosphate, puis dans le milieu de dénombrement permettait l'inactivation de 6 log des spores de *B subtilis* 168. Individuellement, ces deux procédés (HP et esters de sucrose) n'induisaient respectivement que 1 et 0 log d'inactivation seulement [175].

L'usage d'ester de sucrose à 0,1 % dans le milieu de pressurisation (392 MPa – 10 min – 45 °C) et de dénombrement a aussi permis l'inactivation de 5, 4,5 et 6 log des spores *B. cereus*, *B. coagulans* et *Alicyclobacillus* spp. traités dans de la nourriture infantile, du jus de tomates et du jus de pommes respectivement [176]. Ces deux études mettent l'accent sur l'importance de la présence des esters de sucres dans le milieu de recouvrement des spores traitées en HP pour qu'une action synergique soit observée. Si les mécanismes mis en jeux ne sont pas élucidés, les

auteurs émettent néanmoins l'hypothèse que les HP sensibiliseraient les spores aux esters de sucres. Cette sensibilisation ne serait pas forcément due à la germination des spores induites par la pression et serait réversible dans le cas où les spores seraient de nouveau transférées dans un milieu de recouvrement sans agent antimicrobien [175,176].

Certains auteurs ont aussi ajouté du lysozyme lors des traitements HP, avec des résultats pour le moins mitigés. Lopes-Pedemonte *et al.* (2003) ont ainsi démontrés que l'ajout de 22,4 mg de lysozyme par litre de lait lors de la fabrication de fromages de vache au lait cru permettait l'inactivation de 2 log des spores de *B. cereus* par un traitement séquentiel à 60 MPa – 210 min – 30 °C, puis 400 MPa – 15 min – 30 °C. Le même traitement sans lysozyme n'induisant qu'une inactivation de 1 log [177]. Sokolowka *et al.* (2011) ont cependant montré que 0,1 mg/L de lysozyme ne permettait pas d'améliorer l'inactivation des spores d'*Alicyclobacillus acidoterrestris* dans du jus de pomme traité à 200 MPa – 50 °C – 60 min puis 500 MPa – 50 °C – 20 min [178].

Alors que de nombreuses études ont pointé l'action synergique de la combinaison huiles essentielles – HP sur l'inactivation de bactéries végétatives, il est intéressant de noter que l'effet inverse a été observé sur des spores [179,180]. La présence d'huiles essentielles dans le milieu de pressurisation induit en effet une inhibition de la germination des spores, les protégeant ainsi du traitement hyperbare et d'autres procédés de décontamination pouvant être appliqués *a posteriori*. Parmi douze huiles essentielles testées en combinaison avec un traitement à 600 MPa – 10 min – 20 °C, Corthouts *et al.* (2016) ont démontré que seule l'huile essentielle de graine de carotte n'induisait pas une réduction du nombre de spores germées après le traitement [181]. De même, le carvacrol, un composé issu de l'huile essentielle d'origan, induit la protection des spores de *B. cereus* soumises à un traitement HP à 600 MPa – 5 min – 70 °C. Leur inactivation passe en effet de 2,5 log à 1 log avec la présence de carvacrol [182].

Conclusion

L'application d'un traitement hyperbare engendre de nombreuses modifications des propriétés fonctionnelles des molécules biologiques. Ces changements permettent l'inactivation des bactéries végétatives et des moisissures dans des produits alimentaires, tout en préservant leurs qualités organoleptiques et nutritionnelles.

Cependant, seule la combinaison du traitement HP avec d'autres procédés de décontamination peut à l'heure actuelle permettre l'inactivation des spores à des températures modérées. Dans ce contexte, la stratégie du « germinate to exterminate » est fréquemment citée. Néanmoins, la germination des spores étant un processus complexe à la chronologie parfois énigmatique, induire une population de spores en germination représenterait un risque considérable pour les industriels de l'agroalimentaire.

A l'inverse, la combinaison du traitement hyperbare avec des agents antimicrobiens se révèle efficace dans certaines conditions. Cependant, parmi les agents antimicrobiens testés à des températures modérées, seuls les esters de sucres (sucrose laurate) semblent avoir fait leurs preuves. Or, la demande croissante des consommateurs pour des aliments à teneur réduite en conservateurs chimiques constitue un obstacle à leur utilisation en combinaison avec des traitements hyperbares.

L'utilisation de bactéries protectrices ainsi que de leurs molécules antimicrobiennes en complément du traitement HP pourrait donc s'avérer être une alternative intéressante.

3. La biopréservation : effets sur les spores et voies d'optimisation

3.1. La biopréservation : une stratégie d'avenir pour la conservation des aliments (d'après Modugno *et al.* (2015) [183])

La biopréservation est une méthode de conservation des aliments consistant à inoculer sur un produit des souches de bactéries sélectionnées ayant un effet inhibiteur sur la flore indésirable qui pourrait s'y trouver. L'ajout direct du fermentât ou de molécules purifiées issues de ces bactéries protectrices est aussi considéré comme de la biopréservation par certains auteurs. Cette méthode de conservation « naturelle » permet de maîtriser la croissance de flores pathogènes ou d'altération dans des denrées alimentaires, tout en préservant leurs qualités organoleptiques et nutritionnelles [184].

Bien que le terme de biopréservation ait été introduit seulement dans les années 90, l'utilisation de certaines bactéries lactiques dans le but d'augmenter la durée de vie de denrées alimentaires était déjà utilisée au 11e siècle par des nomades turques, premier peuple à avoir laissé des traces écrites de l'« invention » du yaourt.

À l'origine de la fermentation spontanée de nombreux produits alimentaires, les bactéries lactiques ont un rôle clef dans la conservation et le développement des propriétés organoleptiques de produits fermentés tels que la charcuterie, la choucroute, les fromages ou le vin [185,186]. L'innocuité des bactéries lactiques utilisées traditionnellement est aujourd'hui reconnue par la FDA (Food and Drug Administration) et l'EFSA (Autorité européenne de sécurité des aliments) qui leur ont conféré respectivement les statuts GRAS (Generally Recognize As Safe) et QPS (Qualified Presumption of Safety). De plus, les capacités des bactéries lactiques à coloniser les aliments réfrigérés sous atmosphère protectrice et à en dominer la microflore en font des microorganismes à fort potentiel pour la biopréservation [187]. Cependant, bien que dérivée des méthodes ancestrales de fermentation, la biopréservation ne doit pas induire de modification des caractéristiques organoleptiques des produits traités. Pour cela, elle s'intègre dans le concept de la technologie des barrières : le produit alimentaire n'est plus soumis à un traitement

de conservation unique (pasteurisation, congélation, fermentation) mais à une succession de procédés de conservation plus « doux » et moins agressifs pour le produit. La combinaison de ces procédés permet d'amplifier de façon synergique leurs effets respectifs sans engendrer de modifications organoleptiques du produit [188]. Parmi ces procédés, la réfrigération et le conditionnement sous atmosphère protectrice peuvent être associés à de la biopréservation, notamment dans le cadre de la conservation de produits de la mer comme des crevettes décortiquées ou du saumon fumé [189].

Les bactéries lactiques regroupent actuellement treize genres bactériens: *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Carnobacterium*, *Oeconoccus*, *Weissella*, *Aerococcus*, *Tetragenococcus* et *Vagococcus* [190]. Leur capacité à dominer la microflore d'un aliment résulte de deux phénomènes :

- **La production d'agents antimicrobiens :**

Un des atouts technologiques majeur des bactéries lactiques réside dans leur capacité à métaboliser les sucres en acides organiques. Outre le fait de contribuer au développement de la texture et de la saveur d'aliments fermentés tels que la choucroute ou le saucisson sec, cette production d'acides organiques faibles (lactate, citrate, acétate), induit une chute du pH des matrices alimentaires, conduisant à l'inhibition de souches pathogènes telles *S. enterica*, *E. coli* O157:H7 et *C. sporogenes* [191–193].

De plus, des composés volatiles aromatiques synthétisés par des souches de *Lc. lactis* lors de la fabrication de produits tels que le vin, la bière ou les fromages, ont aussi des propriétés antimicrobiennes [194]. Parmi ces composés, le diacétyle et l'acéthaldéhyde (ou éthanal) ont un effet inhibiteur sur la croissance de bactéries pathogènes et d'altération comme *S. aureus* et *Pseudomonas fluorescens* [195,196].

Enfin, en condition d'aérobiose, la plupart des bactéries lactiques synthétisent du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) ayant notamment un effet antimicrobien sur *S. aureus* et *E. coli* [197–199].

D'autres composés tels que la reuterine et la reutericycline, synthétisés par *Lb. reuteri*, possèdent aussi une forte activité anti-listeria dans certains produits alimentaires comme le saumon fumé [200,201].

Cependant, la plupart de ces composés ont un fort impact sur les qualités organoleptiques des produits fermentés. L'enjeu initial de la biopréservation étant de conserver les propriétés organoleptiques initiales des aliments, il convient donc d'en limiter la concentration dans les produits finis.

Les souches sélectionnées pour la biopréservation des aliments sont ainsi, pour la plupart, des bactéries lactiques productrices d'agents antimicrobiens n'engendrant pas de transformation des matrices alimentaires : les bactériocines.

Les bactériocines sont des peptides d'origine ribosomique ayant généralement une activité antimicrobienne directe vis-à-vis d'espèces bactériennes phylogénétiquement proches des espèces productrices [202]. Selon leur configuration spatiale, leur mode d'action et de synthèse, plusieurs classifications de ces bactériocines ont été proposées. Même si la plupart des auteurs s'accordent sur l'existence de deux classes majeures de bactériocines : les lanthionines (classe I) et les non-lanthionines (classe II), l'existence des classes III et IV et de certaines ramifications des classes I et II reste fortement discutée [187,203–205]. Un schéma récapitulant l'ensemble de ces classes est présenté **Figure 10**.

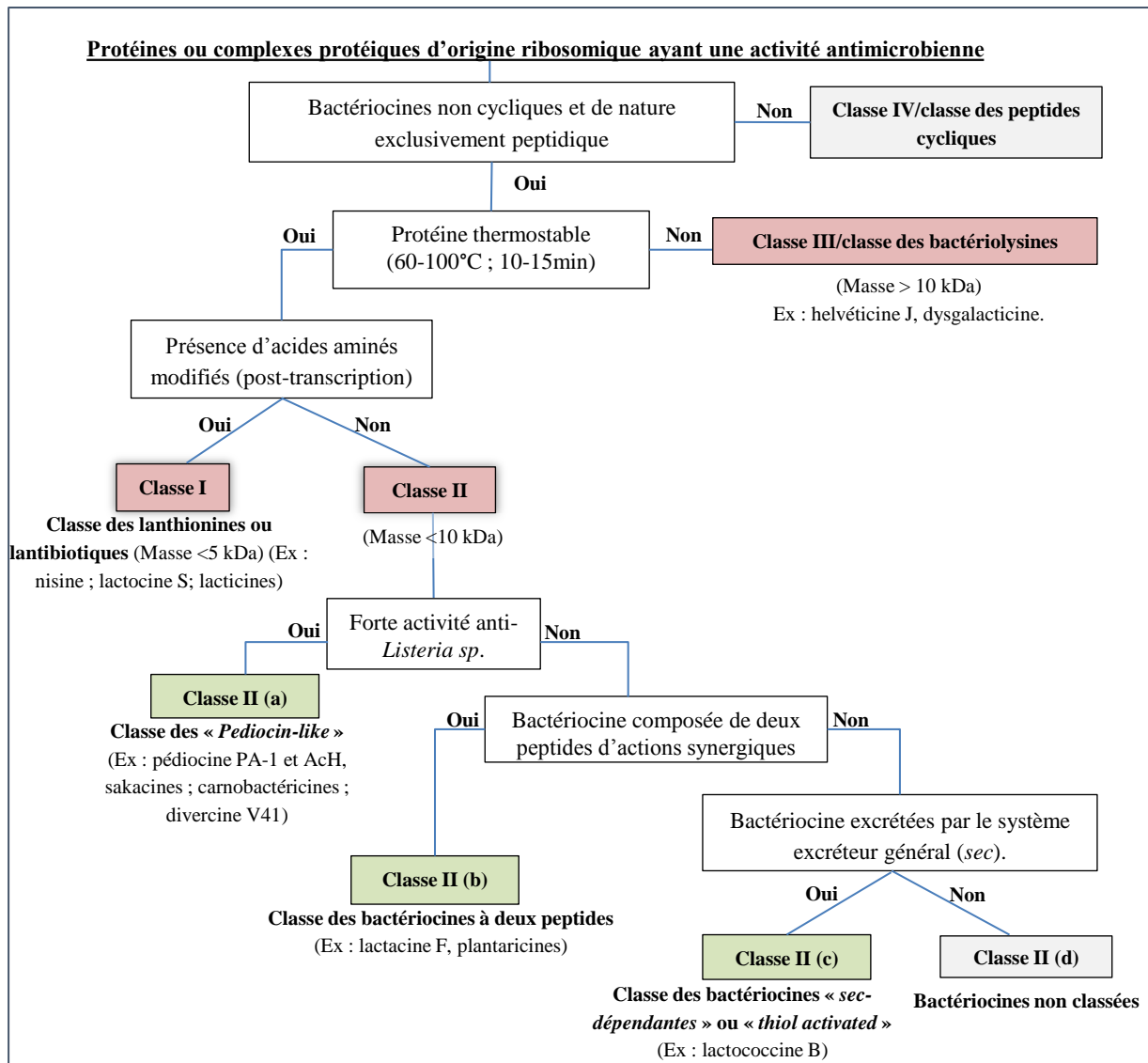


Figure 10 : Classification des bactériocines en fonction de leurs caractéristiques discriminantes principales

En rouge : classes principales ; en vert : sous classes ; en gris : classes dont l'existence reste discutée [187,203–205]

Les bactériocines des classes I et II agissent sur les bactéries à Gram positif en créant des pores dans leur membrane et en fragilisant leur paroi [204,206,207]. Le mécanisme d'action de la nisine (classe I) et de la sakacine P (classe II) sont schématisés **Figure 11**.

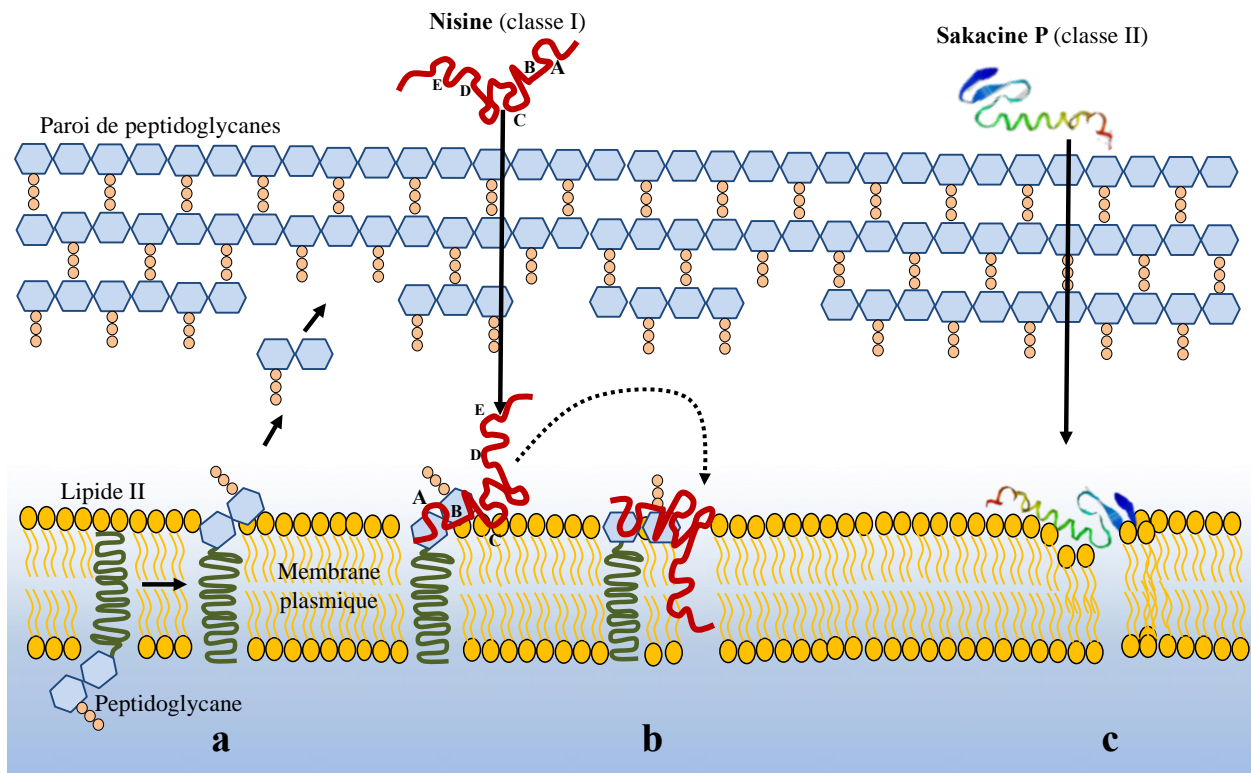


Figure 11 : Mode d'action de deux bactériocines : la nisine et la sakacine P

- a :** Synthèse normale d'une paroi de bactérie à Gram positif : le lipide II permet la translocation des peptidoglycanes de l'espace intracellulaire vers la paroi bactérienne ;
- b :** Action de la nisine sur le lipide II : les anneaux lanthionine A B et C interagissent avec l'acide N-acetylmuramique du lipide II. Une flexion de la molécule induit la pénétration des anneaux D et E dans la membrane, formant un pore [204] ;
- c :** Mode d'action de la sakacine P : la partie hydrophobe de la sakacine s'insère dans la bicouche lipidique tandis que les résidus hydrophiles restent en surface [206].

La nisine, petit peptide de 34 acides aminés, est composée de cinq anneaux lanthionines résultant de modifications post-transcriptionnelles. L'interaction des anneaux A B et C situés au niveau de l'extrémité N-terminale, avec le lipide II des membranes bactériennes induit la formation de pores et la perturbation de la synthèse de la paroi cellulaire. Cette bactériocine, portant le numéro d'additif E234, est la seule dont l'usage est autorisé dans les aliments. Sa forme commerciale la plus employée est le Nisaplin® (Danisco) dans lequel elle est en mélange à 2,5 % avec du chlorure de sodium (90 %), des protéines et des sucres (7,5 %). Ce produit est utilisé entre autres pour augmenter la date limite de consommation de sauces salade, de fromages et d'œufs liquides [208–211].

Les bactériocines peuvent aussi être intégrées aux aliments sous forme de fermentats en poudre, contenant les bactéries productrices inactivées et leurs métabolites. De nombreux brevets portant sur l'usage de fermentats contenant de la pédiocine comme conservateur à usage alimentaire ont été déposés aux USA et en Europe [212].

Enfin, elles peuvent être produites *in situ* par l'intermédiaire de souches productrices. Cette méthode permet une réduction durable de la flore pathogène dans des produits alimentaires. Par exemple, il a été montré que la production de divergicine V41 par la souche *Carnobacterium divergens* V41 permet l'inhibition de la croissance de *L. monocytogenes* dans du saumon fumé pendant plus d'un mois [213] (**Figure 12**).

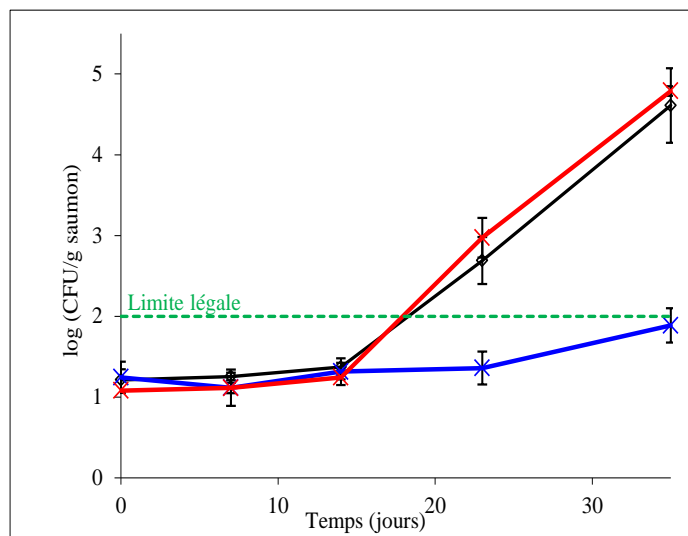


Figure 12 : Croissance de *L. monocytogenes* seule (**rouge**) ou en co-culture avec *Carnobacterium divergens* V41 (**bleu**) et *Cr. divergens* V41C9, souche mutante non productrice de bactériocine (**noir**) dans du saumon fumé (d'après Richard *et al.*, 2003)[213].

- **La compétition microbienne et nutritionnelle :**

L'action des bactéries lactiques sur les flores pathogènes et d'altération n'est pas uniquement le fruit de l'action antimicrobienne de leurs métabolites. En effet, d'autres mécanismes impliquant des compétitions nutritionnelles et microbiennes sont aussi mis en jeu. Ainsi, Jameson décrit en 1962 l'inhibition de la croissance d'une souche bactérienne par une autre souche sans l'intervention d'agents antimicrobiens [214]. Ce phénomène, dit effet Jameson, est en définitive une course

aux ressources nutritionnelles entre plusieurs espèces bactériennes. Quand les ressources arrivent à épuisement, la compétition est terminée et la croissance de chaque espèce s'arrête [215]. Plusieurs auteurs ont apporté des exemples de cette compétition entre une flore pathogène et des cultures endogènes ouensemencées dans diverses matrices alimentaires telles que du lait [216], de la viande de porc [217] et des produits de la mer [218].

Cornu *et al.* (2011) ont ainsi démontré que la colonisation de tranches de bacon fumé par une microflore de bactéries lactiques permettait de maintenir la population de *L. monocytogenes* sous le seuil de 4,5 log pendant 20 jours à 8 °C. Sans cette microflore, *L. monocytogenes* atteint 8 log en 15 jours dans les mêmes conditions [217].

Les nombreux mécanismes d'action des bactéries lactiques à l'encontre de bactéries pathogènes et d'altération ainsi que l'image « naturelle » de la biopréservation en font un procédé à fort potentiel pour la conservation des aliments. Cependant, les études traitant de l'effet de flores protectrices sur les formes sporulées restent marginales. De même, de nombreuses zones d'ombres persistent quant aux mécanismes d'action des bactériocines sur les spores.

3.2. Application de la biopréservation aux spores bactériennes

3.2.1. L'inhibition des spores par des bactériocines purifiées

Si les mécanismes d'action des bactériocines sur les cellules végétatives sont bien connus, l'état des connaissances est bien plus maigre concernant leurs effets sur les spores.

Parmi l'ensemble des bactériocines ayant un effet antimicrobien sur des cellules végétatives, seul un panel assez réduit possède une action sporostatique ou sporicide (**Tableau 6**).

Tableau 6 : Effets de différentes bactériocines sur les spores

Bactériocines	Spore	Matrice	Concentration en bactériocine	Effet sur les spores		Autres remarques	Références
				Dormantes	Germées		
Nisine	<i>A. acidoterrestris</i>	Jus de fruit	6,25 – 600 UI/mL	Sporostatique	ND	Spores plus sensibles que les végétatives (MIC spores < MIC végétatives)	[219,220]
	<i>B. licheniformis</i>	Lait	25 UI/mL	Aucun	Sporostatique	Inhibe la reprise de croissance des spores	[221]
	<i>B. sporothermodurans</i>	Lait	50 UI/mL	Aucun	Sporostatique	Réduit le taux de germination et inhibe la reprise de croissance des spores	[222]
	<i>C. botulinum</i>	BHI	1000–10000 UI/mL	Pro-germinant	Sporostatique	Observation d'isolats résistants à la nisine dont les membranes sont plus rigides que les souches non résistantes	[223]
	<i>C. difficile</i>	Eau	3,2 UI/mL	Aucun	Sporostatique	Inhibe la reprise de croissance des spores	[224]
	<i>B. cereus</i>	BHI	1 – 50 UI/mL	Sporostatique	ND	Réduit le taux de germination	[225]
	<i>B. cereus</i>	Tryptone à 1 % (m/m)	0,2 – 0,5 mg/L eq. 200 – 500 UI/mL	Aucun	Sporostatique	L'interaction de la nisine avec des groupements sulfhydriles de la membrane interne inhibe la reprise de croissance des spores	[226,227]
<i>B. anthracis</i>	BHI	10 µM	Aucun	Sporostatique	La nisine bloque la reprise de croissance des spores <i>via</i> une interaction avec les lipides II et prévient l'établissement du métabolisme oxydatif	[228,229]	
Enterocine AS48	<i>A. acidoterrestris</i>	Jus de fruit	2,5 mM	Sporicide	ND	Dégradation des couches externes de la spore	[230]
	<i>B. licheniformis</i>	Jus de pomme	3 mM	Sporicide	ND	L'effet de la bactériocine dépend du milieu de traitement	[231]
		Cidre	3 mM	Aucun	Sporicide		[231]
<i>B. cereus</i>	BHI	5 – 10 mM	Aucun	Sporicide	Inhibe la sporulation et la production d'entérotoxine	[232]	
Thuricine H	<i>B. cereus</i>	BHI – Tampon Tris	10 mM	Aucun	Sporicide	Inhibe les spores en germination	[233]

L'effet de la nisine sur les spores a été étudié à maintes reprises, avec des résultats parfois contradictoires selon le protocole expérimental utilisé (souche, matrice de traitement, concentration). Néanmoins, l'ensemble des auteurs s'accordent sur le fait que cette bactériocine a une action sporostatique sur les spores dont la germination aurait été initiée. Plusieurs mécanismes hypothétiques ont été proposés afin d'expliquer l'interaction de la nisine avec la spore.

La première hypothèse, émise par Morris *et al.* (1981; 1984), indique que la protéine interagirait avec des groupements sulfhydriles présents sur la membrane interne des spores, accessibles une fois la germination initiée (**Figure 13**). Cette interaction induirait une modification des propriétés membranaires des spores ainsi qu'une dépolarisation, inhibant la reprise de croissance. [226,227].

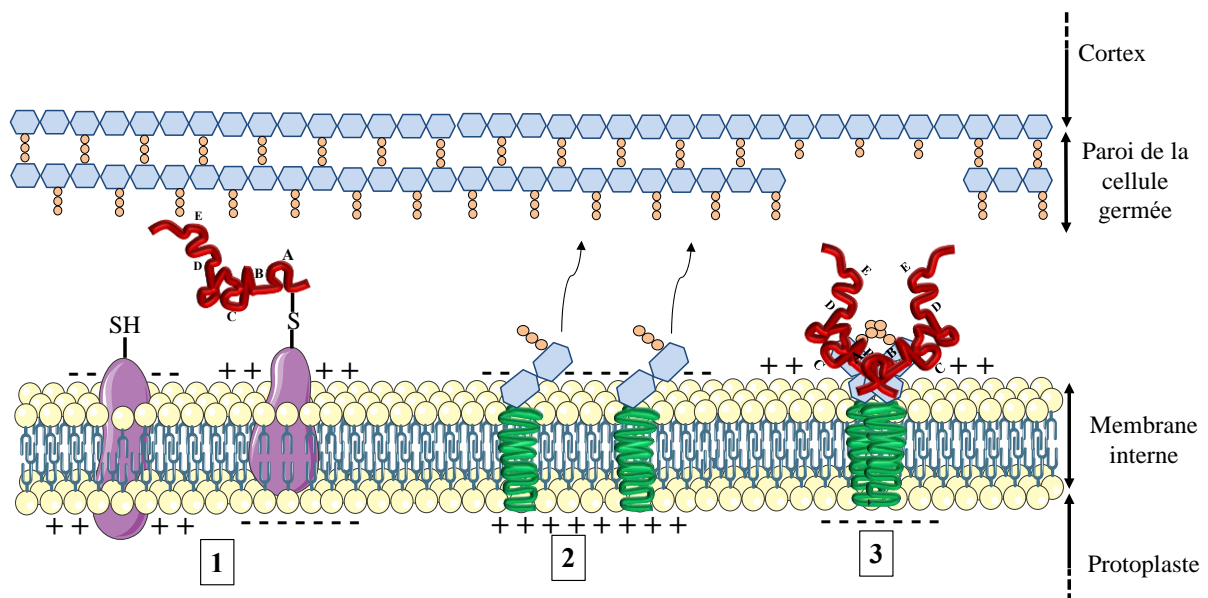


Figure 13 : Mécanismes hypothétiques de l'action de la nisine sur la membrane des spores en cours de germination

- 1 : Les déhydroalanines se lient par une réaction de Michael aux groupes sulfhydriles d'une protéine membranaire. Cette liaison covalente induit un changement de configuration de la protéine, entraînant une dépolarisation de la membrane.
- 2 : Synthèse normale de la paroi de la spore lors de la reprise de croissance : les lipides II assurent la translocation des peptidoglycanes du protoplaste vers l'espace extracellulaire.
- 3 : Les molécules de nisine se lient aux lipides II, induisant leur regroupement, un arrêt de la synthèse de la paroi et une dépolarisation membranaire.

Plus récemment, Gut *et al.* (2008, 2011) ont proposé que l'effet sporostatique de la nisine serait due à l'interaction des anneaux lanthionines A, B et C de la nisine avec les lipides II des spores. Cependant, à la différence du mécanisme observé sur

les cellules végétatives, cette réaction n'induirait pas la formation de pores mais une dépolarisation membranaire, empêchant la reprise du métabolisme oxydatif [228,234]. Par ailleurs, il a aussi été démontré que l'interaction des anneaux A, B et C de la nisine avec les lipides II engendrerait leur regroupement et leur relocalisation vers des portions membranaires non propices à la synthèse de paroi [235]. Cet arrêt de la translocation des peptidoglycanes pourrait ainsi arrêter le processus d'expansion de la paroi de la spore germée (**Figure 13**).

Si ces deux hypothèses sont à l'heure actuelle les deux seules pistes permettant d'expliquer l'action de la nisine sur les spores, il reste à noter qu'elles ne s'excluent pas. En effet, l'interaction de la bactériocine avec les lipides II suggère que la spore a repris une activité anabolique, synonyme d'un état avancé de la reprise de croissance. A l'inverse, la liaison covalente de la nisine avec les groupements sulfhydriles ne nécessite pas forcément une reprise du métabolisme et pourrait avoir lieu dès les stades les plus précoces de la germination.

Contrairement à la nisine, l'enterocine AS-48 synthétisée par *Enterococcus faecalis* A-48-32 peut exercer, selon l'espèce, une activité sporicide sur des spores germées ou dormantes (**Tableau 6**). En s'adsorbant en surface des groupements membranaires chargés négativement, cette bactériocine endommage la membrane interne des spores, induisant leur inactivation [236].

3.2.2. L'inhibition de flores sporulées par des cultures de bactérie protectrices : le cas des produits carnés et laitiers

Si les bactériocines peuvent inhiber durablement la reprise de croissance de spores dans des matrices alimentaires, leur usage dans certains produits à base de viande reste parfois problématique. En effet, certaines bactériocines telles que la nisine et la pédiocine seraient inactivées par interaction avec des glutathions de la viande ou avec la matière grasse de certains produits laitiers [237–240]. De plus, en cas d'ajout dans des produits d'origine animale, l'effet antimicrobien de bactériocines a tendance à diminuer au cours du temps, pour devenir nul au bout de quelques jours de stockage [239,241,242].

A l'inverse, l'inoculation directe de souches productrices de bactériocines permet de maintenir l'effet de la biopréservation sur le long terme. De plus, l'usage d'un cocktail de souches de bactéries lactiques permet aussi d'élargir le spectre

antimicrobien et de rendre la biopréservation efficace sur les bactéries à Gram négatif dans du jambon et de la viande de bœuf crue [243–246].

Dans les produits carnés réfrigérés tels que le jambon cuit, l'ajout de nitrites a longtemps été l'unique solution pour se prémunir du développement des spores du genre *Clostridium*. La mauvaise presse de ce conservateur, due à ses effets potentiellement cancérigènes sur le tractus gastro-intestinal, pousse les industriels à se tourner vers d'autres solutions de conservation [10,247]. Assez récemment, la recherche s'est donc orientée vers la sélection de souches de bactéries protectrices permettant d'inhiber la croissance de flores sporulées dans des produits carnés. Ainsi, suite au screening de 181 souches de bactéries lactiques issues de produits carnés frais et réfrigérés, Jones *et al.* (2008) ont pu isoler deux souches de *Lb. casei* et une souche de *Lc. lactis* ayant une activité inhibitrice vis à vis de *C. estertheticum*, une spore responsable de l'altération des viandes [248]. De même, Nieto-Lozano *et al.* (2006) ont démontré qu'une souche commerciale de *Pediococcus acidilactici* (Chr. Hansen) pouvait produire suffisamment de bactériocine pour inhiber totalement la croissance d'une population de *C. perfringens* dans du jambon cru stocké à 4 °C pendant 10 jours. Sans cette bactériocine, dont la nature n'est pas précisée, la population de *C. perfringens* a augmenté de 1 log pendant le même laps de temps [249].

Plus récemment, Di Gioia *et al.* (2016) ont testé l'antagonisme d'une souche protectrice de *Lb. plantarum* vis à vis des formes végétatives de *C. perfringens* et de *Clostridium* sp. (souche proche de *C. botulinum* type E) dans de la viande de porc hachée. L'effet antimicrobien de *Lb. plantarum* a ensuite été comparé à celui obtenu suite à l'ajout de 150 ppm de nitrites. Les résultats (**Figure 14**) indiquent que, même si l'ajout de nitrites induit l'inhibition la plus drastique de la croissance des deux souches de *Clostridium*, l'inoculation de *Lb. plantarum* permet de maintenir les deux populations à des niveaux proche de 1 log/g après 9 jours d'incubation à 22 °C [250].

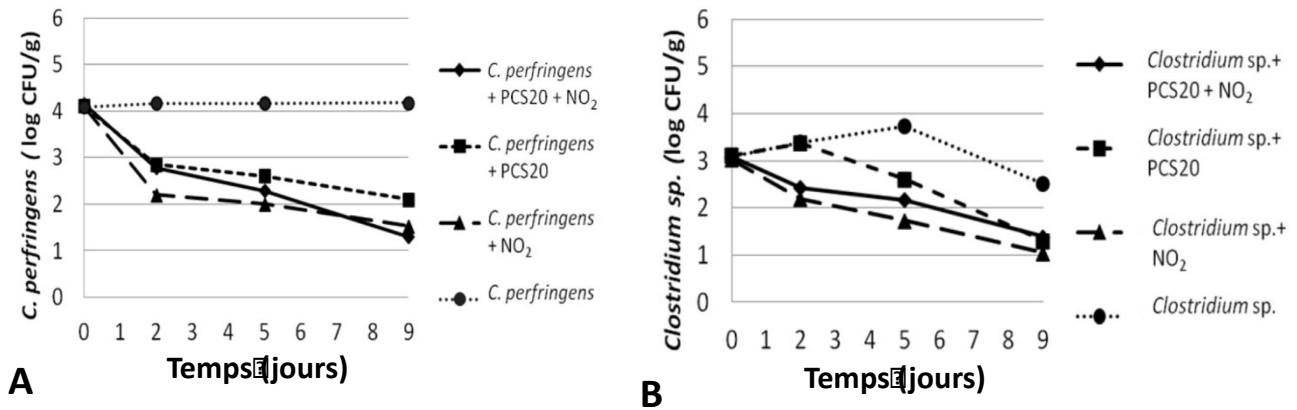


Figure 14 : Evolution des populations de *C. perfringens* DSM 756 (A) et *Clostridium* sp. DSM 1985 (B) inoculés dans de la viande de porc hachée, avec ou sans souche protectrice de *L. plantarum* PCS20, avec ou sans nitrites (NO₂, 150 ppm). D'après Gioia *et al.* 2016)

Les bactéries lactiques productrices de bactériocines ont aussi été testées comme culture starter lors de la production de fromages. Il a ainsi été démontré que les spores de *C. beijerinckii* responsables d'altération de fromages pouvaient être efficacement inhibées par une souche de *Lc. lactis* productrice d'une bactériocine, la lacticine 481. L'inoculation de cette souche protectrice au début de la fermentation des fromages permet d'éviter la production de composés volatils indésirables par *C. beijerinckii* et le gonflement des meules (**Figure 15**) [251].



Figure 15 : Effet d'une souche de *Lc. lactis* productrice de bactériocine sur le développement de spores de *C. beijerinckii*

1 - Fromage au lait de brebis avec *C. beijerinckii* INIA 63 (A) et *Lc. lactis* subsp. *lactis* INIA 415-2 (B) après 120 jour d'affinage à 12 °C.

2 - Fromages inoculés avec *C. beijerinckii* INIA 63 et une souche mutante de *Lc. lactis* subsp. *lactis* INIA 415-2 non productrice de bactériocine (C) ou la souche non mutée productrice de lacticine 481 (D). Les fromages sont ici disposés sur un milieu contenant une souche de *Lc. buchneri* sensible à la lacticine. D'après Garde *et al.* (2011) [244].

De même, lors du procédé de production de Kasseri, un fromage au lait de brebis, l'inoculation d'une culture starter de *Streptococcus macedonicus* permet d'inhiber complètement la reprise de croissance de spores de *C. tyrobutyricum*. Dans ce cas, c'est la production de macédocine par *Streptococcus* qui inhibe la germination et le développement des cellules végétatives pendant les étapes de fermentation et d'affinage (120 jours) [252].

Certaines souches de bactéries lactiques peuvent ainsi permettre l'inhibition durable d'une population de bactéries sporulées. Le panel d'études portant sur ce sujet reste cependant restreint et, concernant les produits carnés, aucune d'entre elles n'aborde directement l'inhibition de spores dormantes par des bactéries lactiques. Les souches cibles sont en effet inoculées à l'état de bactéries végétatives, forme la plus sensible aux bactériocines et autres stress environnementaux [250].

Par le biais d'une application directe de bactériocines ou par l'intermédiaire de souches de bactéries protectrices, la biopréservation peut donc être un atout réel pour faire face au développement de spores dans des matrices alimentaires. Néanmoins, la plus grande partie des bactériocines produites par des bactéries lactiques ont un effet sporostatique. Leur usage, ainsi que celle de flores protectrices, est donc majoritairement préventif. Ainsi, dans le but d'inactiver durablement des spores dans des produits alimentaire, la combinaison de la biopréservation avec un traitement HP peut s'avérer être une bonne stratégie.

3.3. Effets de traitements combinés Hautes pressions – Bactériocines sur les endospores bactériennes.

Une petite dizaine d'études portant sur l'inactivation de spores par la combinaison HP – bactériocines sont aujourd'hui recensées. Cependant, seule une minorité d'entre elles rapporte l'effet de cette combinaison pour des températures de traitement inférieures à 60 °C et potentiellement applicables industriellement (**Tableau 7**).

Tableau 7 : Effet de traitements combinés HP - bactériocines sur des spores

Spores	Traitement HP	Bactériocine	Matrice	Effet	Réf
<i>C. sporogenes</i> , <i>C. perfringens</i> , <i>C. tertium</i> , <i>C. laramie</i>	345 MPa – 60 °C – 5 min	Mix 3:7 de pédiocine Ach et nisine A à 5000 UA/mL	Roast beef	Prolongation de la durée de conservation à 12 °C de 14 à 28 jours (traitement indépendant vs traitements combinés)	[253]
<i>A. acidoterrestris</i>	200 MPa – 50 °C – 45 min	Nisine : 250 UI/mL	Jus de pomme	Inactivation totale de la population de spores (>6 log)	[178]
<i>B. subtilis</i> , <i>B. cereus</i> (4 souches)	500 MPa – 40 °C – 5 min – un ou deux cycles	500 UI/mL	Lait	- Inactivation après un cycle de traitement HP avec nisine : <i>B. subtilis</i> : 6,5 log ; <i>B. cereus</i> : ND; - Après deux cycles : <i>B. subtilis</i> : 8 log ; <i>B. cereus</i> : entre 4 et 8 log selon la souche	[254]
<i>B. subtilis</i> , <i>C. sporogenes</i>	404 MPa – 45 °C – 15 min	<i>B. subtilis</i> : 1 UI/mL <i>C. sporogenes</i> : 10 UI/mL présente pendant le traitement HP et/ou dans le milieu de dénombrement	Tampon McIlvaine à pH 6	- Nisine présente uniquement pendant le traitement HP : <i>B.</i> <i>subtilis</i> : -0,5 log, <i>C. sporogenes</i> : pas d'inactivation; - Nisine présente pendant et après HP : <i>B. subtilis</i> : -4 log; <i>C. sporogenes</i> : - 2,5 log	[175]
<i>B. sporothermodurans</i>	472 MPa – 53 °C – 5 min	121 UI/mL	Eau distillée	Inactivation : 5 log	[255]

De manière générale, l'ensemble des auteurs s'accordent à dire que l'inactivation des spores par ce procédé dépend fortement de la matrice de traitement, de la souche bactérienne et de la concentration en nisine utilisée. De ce fait, la grande variabilité des barèmes de traitement exposés dans la littérature rend difficile la comparaison des résultats obtenus.

Néanmoins, il reste à noter que la combinaison de ces deux procédés peut avoir un effet hautement synergique, comme démontré par Sokołowska *et al.* (2012). En effet alors qu'un traitement HP seul (200 MPa – 50 °C – 45 min) induit l'inactivation de 4 log des spores d' *Alicyclobacillus aciditerrestris*, l'ajout de 250 UI/mL de nisine dans le milieu de traitement induit l'inactivation totale de la population de spores (< 6 log) [178].

La majorité des auteurs s'accordent à dire que l'inactivation des spores par la combinaison de ces deux procédés s'explique par l'effet pro-germinant du traitement HP, rendant les spores sensibles aux bactériocines [175,236]. Cependant, cette hypothèse n'a encore jamais été clairement démontrée.

Conclusion

Les cultures de bactéries protectrices, via la production d'agents antimicrobiens et la compétition nutritionnelle, permet ainsi une inhibition de la flore pathogène de produits alimentaires hautement périssables. Par ailleurs, l'image « naturelle » de la biopréservation auprès des consommateurs en fait un procédé à fort potentiel pour la conservation des aliments.

Les bactériocines sécrétées par des flores de biopréservation préviennent aussi de manière durable la reprise de croissance de spores et leur développement dans des produits laitiers et carnés. Cependant, l'effet bactériostatique de certaines bactériocines peut s'estomper avec le temps, laissant de nouveau la possibilité aux spores de se développer.

La combinaison d'un traitement par HP avec l'ajout de bactériocines dans les matrices alimentaires peut permettre une inactivation synergique et conséquente (< 6 log) des spores. En effet, l'effet pro-germinant du traitement HP permet l'action de bactériocines telles que la nisine, actives seulement sur les spores germées. Cependant, les bactériocines sont, pour la plupart, des peptides dont l'activité dépend entièrement de leur structure. Or, certains barèmes de traitement HP peuvent induire une modification transitoire ou définitive de la structure de certaines protéines. Il serait ainsi intéressant d'évaluer la stabilité différentes bactériocines sous pression, afin d'évaluer la compatibilité de ces deux méthodes de décontamination.

Chapitre 1

Impact des hautes pressions sur sa structure et l'effet antimicrobien de la bactériocine nisine

1. Introduction et objectifs

De nombreuses études focalisées sur l'effet d'un traitement combiné HP-nisine sur une large variété de microorganismes sont disponibles dans la littérature. Cependant, aucune d'entre elles ne mentionne la compatibilité de ces deux traitements. En effet, il a été maintes fois démontré que les traitements HP pouvaient impacter fortement la structure des protéines. L'action antimicrobienne de la nisine étant entièrement liée à sa structure secondaire, il apparaît donc important d'évaluer l'impact d'un traitement hyperbare sur son pouvoir antimicrobien.

Ainsi, l'objectif premier de ce chapitre est de quantifier l'effet d'un traitement HP à température modérée sur l'activité antimicrobienne de la nisine, et de comprendre les mécanismes structuraux mis en jeu.

2. Effect of high pressure on the antimicrobial activity and secondary structure of the bacteriocin nisin

Published in Innovative Food Science and Emerging Technologies

Chloé MODUGNO, Camille LOUPIAC, Antoine BERNARD, Audrey JOSSIER, Fabrice NEIERS, Jean-Marie PERRIER-CORNET, Hélène SIMONIN

Abstract

Effect of high pressure (HP) treatment on the antimicrobial properties and the structure of nisin was evaluated. Nisin solutions at pH 2.8 or 6.1 were treated by HP at 500 MPa – 10 min – 20 °C and their antimicrobial potency was determined. It appeared that HP clearly impacted the antimicrobial activity of nisin, with respective activity loss of 22.5% and 49.9% at pH 2.8 and 6.1. Structural analysis of nisin by circular dichroism and Fourier transform-infrared spectroscopies revealed that the decrease of nisin antimicrobial activity was likely due to the unfolding of the protein induced by HP. A loss of nisin α -turns structure, particularly significant at neutral pH, was linked to the drastic drop in antimicrobial activity, as these structures are implicated in the nisin interaction with the bacterial membrane.

2.1. Introduction

Nisin is a bacteriocin produced by certain strains of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, exhibiting a broad spectrum of inhibitory activity against Gram-positive bacteria [256]. Due to its natural origin and its nontoxicity toward humans, this antimicrobial peptide is a matter of interest for the food industry. Nisin is composed of 34 amino acids of which 13 are involved in post-translational modifications, inducing the formation of five ring-like structures [257,258]. By targeting the lipid II of vegetative forms of Gram-positive bacteria, nisin disrupts the transglycosylation leading to pore formation in the cell membrane and inhibition of the cell wall biosynthesis. Nisin also inhibits the outgrowth of germinated bacterial spores by preventing the establishment of a membrane potential and oxidative metabolism [228]. Although nisin can act on the cell membrane of Gram-positive bacteria, Gram-negative bacteria are generally resistant since the outer membrane blocks the access of nisin to the cytoplasmic membrane. Similarly, the thick condensed membrane of dormant spores seems to protect them from nisin action.

Because high pressure treatment (HP) is known for inducing sublethal damages to the cell membrane, this non-thermal process has been combined many times with nisin. For example, Black *et al.* (2005) showed that a reduction of 8 log of *Escherichia coli* in milk was achieved by combining a HP treatment at 400 MPa for 5 min at 20 °C with 500 IU/ml of nisin [259]. Under similar conditions, the independent effects of HP and nisin induced 5.19 ± 0.86 and 0 log-cycle reduction, respectively. However, Lee *et al.* (2003), did not find any synergy between HP (300 MPa; 3.3 min; 5 °C) and nisin (20 mg, equivalent to 640 IU/mL), as such combination tested on *E. coli* showed the same degree of inactivation as HP alone [260]. Numerous studies also reported a high synergy between HP and nisin on the inactivation of bacterial spores [222,255,261]. Nevertheless, strong variations of spore inactivation are observed, depending on the pH and the food matrices treated. Moreover, authors found that the addition of nisin after HP induces higher *Bacillus coagulans* spores inactivation than nisin addition only during HP [175,262]. Therefore, if the combination of nisin with HP is efficient to improve the inactivation of Gram-positive bacteria, it also permits the inactivation of nisin-resistant Gram-negative bacteria and spores.

Because nisin was shown to be stable at high temperature, it is generally assumed that HP have also no effect on the antimicrobial activity of nisin [263]. However, until now, no study can be found on this subject. The structure of nisin is responsible for its antimicrobial activity, as a lanthionine ring on its N-terminus directly interacts with the bacterial cell membrane [264]. It is well known that pressure above 300 MPa can affect the secondary structure of proteins and peptides. Therefore, HP treatment could potentially affect the antimicrobial properties of nisin [128].

Nisin is the only bacteriocin allowed as a food additive (E234) and can be added at a concentration ranging from 120 to 500 IU/g, depending on the product (EFSA, 2006). Since the HP treatment is increasingly used at an industrial scale, it is important to examine the effect of HP on nisin activity.

In this study, the effect of HP on the antimicrobial activity and the structure of nisin were investigated at two different pH. Nisin was treated by HP at 500 MPa for 10 min at 20 °C in aqueous solutions at pH 2.8 and 6.1. Change in the antimicrobial activity was evaluated using a quantitative agar diffusion method and possible induction of secondary structure changes were investigated by infrared and circular dichroism (CD) spectroscopies.

2.2. Material and methods

2.2.1. Effect of HP on the antimicrobial activity of nisin

- **Preparation of nisin solutions**

Nisin stock solutions of 1000 IU/mL were prepared by diluting 0.1 g of nisin powder (nisin at 2.5% in balance sodium chloride and milk sugars, Sigma Aldrich, France) into 80 mL of 0.02 M HCl at pH 2.8 (Sigma Aldrich, France) or into 80 mL of 0.1 M 2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid (MES) buffer at pH 6.1 (Sigma Aldrich, France). The stock solutions in MES buffer and HCl were centrifuged 5 min at 11200 g – 25 °C (Eppendorf 5810 R, Montesson, France) and the supernatants were 10-fold diluted in 0.1 M MES or 0.02 M HCl, respectively. Nisin solutions of 100 IU/mL in MES or HCL were thus obtained.

A volume of 0.5 mL of each nisin solution was heat-sealed into polyethylene pouches (polyethylene transfer pipet, Dominique Dutscher) for the HP treatment.

The protein purity of the nisin powder used in this study was previously checked by denaturing gel electrophoresis on 8 to 16% acrylamide gel (Novex™ 8 – 16% Tris-Glycine Mini Gels, WedgeWell™ format, 12-wells) performed in Tris-SDS buffer (Sigma Aldrich, France).

- **HP treatment**

HP tests were performed in a Top Industrie 700 MPa vessel (France) with a double-walled metal pressure chamber of 20 cm³. Water was used as the pressure-transmission fluid. The internal temperature of the pressure chamber was maintained by a water bath (Minisat 240, Huber, Germany) connected to the double wall of the pressure chamber and monitored by a Pt100 thermocouple (Omega, USA). The temperature of the water bath was set in order to limit the adiabatic heating to 5 °C above the desired temperature set point. The pressure and the temperature during the HP treatment were recorded using instruNet World (iW) software. The compression rate was 3 MPa/s and the decompression was nearly instantaneous (< 3 s). Nisin pouches were placed in HP vessel 5 min before treatment in order to let the temperature equilibrate and treated at 500 MPa for 10 min at 20 °C.

- **Estimation of the antimicrobial activity of a nisin solution**

The activity of HP treated samples was determined by a quantitative agar diffusion method using *Micrococcus flavus* DSM 1790 as a nisin-sensitive strain, as described by Tramer and Fowler [265]. Briefly, standard curves of nisin (0 – 100 IU/mL) were plotted using stock solutions of 1000 IU nisin/mL prepared by diluting nisin powder into 0.1 M MES or 0.02 M HCl as described in the **Section 2.1.1**. The stock solutions in HCl and MES were filtered at 0.2 µm (filter: cellulose acetate, Sartorius, France) and serially diluted in sterile HCl or MES, respectively. The diluted solutions were randomized into 9 mm holes bored into an assay medium previously inoculated with *M. flavus* DSM 1790. After 48 h of incubation at 30 °C, the diameters of the inhibition-zones were measured. The nisin concentrations were then plotted against the inhibition-zone diameters. The following standard curves were obtained (with D corresponding to diameter of the inhibition-zone (mm) and [Nisin] to the nisin activity in IU/mL):

Standard curve for nisin in solution in 0.1 M MES:

$$[\text{Nisin}]_{\text{MES}} = 18.02 (D - 9) ; R^2=0,97$$

Standard curve for nisin in solution in 0.02 N HCl:

$$[\text{Nisin}]_{\text{HCl}} = 21.79 (D - 9) ; R^2=0,97$$

These equations are only valid for the concentration range 0 – 100 IU/mL, where the relation between the inhibition-zone diameter and the nisin concentration is linear.

The activity of HP-treated nisin samples was determined in the same conditions as the standard solutions. The average of three inhibition-zone diameters for each sample was used to calculate nisin concentrations using calibration curves.

2.2.2. Effect of HP on the secondary structure of nisin

- **Circular dichroism spectroscopy (CD)**

Nisin solutions at 1.2 g/L were prepared by diluting nisin powder (Sigma Aldrich, France) in 0.02 M HCl or 0.1 M MES. Solutions were dialyzed against the same diluents (MES or HCl) with Pur-A-Lyzer™ Mega 1000 dialysis kit (1 kDa molecular weight cutoff) (Sigma Aldrich, France). A volume of 0.5 mL of the dialyzed nisin solutions was heat-sealed into polyethylene pouches and treated by HP as described in **Section 2.1.2**. After treatment, solutions were centrifuged 5 min at 11200 g – 25 °C (Eppendorf 5810 R, Montesson, France) and the supernatants were analyzed by CD.

CD spectra were recorded between 185 and 260 nm for each of the above solutions at room temperature in a quartz cell (path length: 0.1 mm) with a spectropolarimeter JASCO J-815 (Jasco, Lisses, France). Data were collected every 0.5 nm with a scan speed of 50 nm/min. The CD spectra of the diluents (0.02 HCl or 0.1 M MES) were recorded and subtracted from the spectra of the respective nisin solution to compensate for background scattering. The spectra were smoothed using the OriginPro 8 software. Each spectra presented is the average of 15 scans.

- **Fourier transform-infrared spectroscopy (FTIR)**

In order to remove the strong interfering absorption of water in the mid infrared region, the residual water of the nisin powder was exchanged against deuterium oxide (D₂O).

Nisin solution at 3.6 g/L was prepared by diluting nisin powder into D₂O (Sigma Aldrich, France). This solution was then frozen overnight at -20 °C and freeze-dried (FreeZone 18, Labconco, Kansas City, USA).

Lyophilized exchanged nisin powder was then re-suspended into 0.02 M deuterium chloride (DCl) in solution in D₂O or in 0.1 M MES-D₂O buffer (final nisin concentration: 3.6 g/L). The pD of the MES-D₂O buffer and the DCl were measured with a standard pH electrode and the measured value was corrected according to the following formula: $pD = pH + 0.4$ [266]. The pD of nisin in solution DCl and MES-D₂O buffer pD were 3.2 and 6.5 respectively.

The nisin solutions were then heat-sealed into polyethylene pouches and treated by HP, as described in **Section 2.1.2**. After treatment, the solutions were centrifuged 5 min at 11200 g at 25 °C (Eppendorf 5810 R, Montesson, France) and the supernatants analyzed by FTIR spectroscopy.

FTIR measurements were performed in a Bruker vector 22 spectrometer (Bruker, Champs sur Marne, France). Spectra were collected in absorbance mode and each spectrum is the result of the average of 128 scans (resolution: 4 cm⁻¹). After background subtraction, spectra were baselines-corrected and normalized. The second derivatives of the normalized and corrected spectra were calculated in order to identify any changes in the secondary structure of the protein. All spectra manipulations were performed using the OriginPro 8 software.

2.2.3. Statistical analysis

All experiments were performed 3 times independently. For each analysis, untreated nisin samples were used as controls. The effect of HP on the antimicrobial activity of nisin solutions was evaluated for each sample by analysis of variance (ANOVA) using XLStat software (Addinsoft, Paris, France). Significance was evaluated when p-value was equal or under 0.05. In this case, a Tukey's HSD (Honest Significant Difference) test was performed to observe significant difference among conditions.

2.2.4. Molecular representation of nisin

The structural data of the nisin-lipid II complex were imported from the Protein Data Bank (PDB) [264]. The PDB file was loaded on the PyMol software (the PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0 Schrödinger, LLC), converted into a VRML file and exported to Blender software for 3D modelling (Blender 3D, Version 2.77, www.blender.org). The unfolding of the molecule was made by increasing arbitrarily the dihedral angles of the β -turns of 20%.

2.3. Results and discussion

Nisin in solution in 0.1 M MES (pH 6.1) or in 0.02 M HCl (pH 2.8) was treated or not by HP at 500 MPa for 10 min at 20 °C. The activity of HP-treated and untreated nisin solutions was determined by a quantitative agar diffusion method. Results are shown in **Figure 16**.

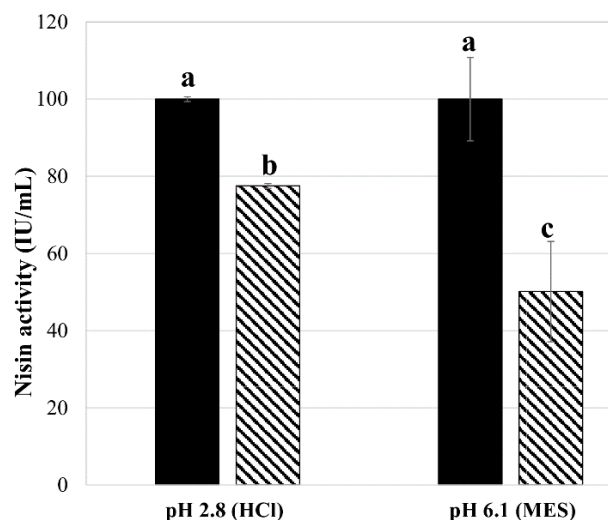


Figure 16 : Effect of high pressure on the antimicrobial activity of nisin

Nisin in solution in 0.02 M HCl (pH 2.8) or 0.1 M MES (pH 6.1) was treated by HP at 500 MPa – 20 °C – 10 min and its antimicrobial activity was determined by quantitative agar diffusion method using *Micrococcus flavus* DSM 1790. Black bars: nisin activity before HP. Stripped bars: nisin activity after HP. 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.

It can be noticed that the pH does not influence the initial antimicrobial activity of nisin, as equivalent activities were observed at pH 6.1 and 2.8. If many studies showed that nisin is generally more efficient in acidic environments, some papers also showed similar antimicrobial activity at low and neutral pH [267,268]. Indeed, while the stability of nisin is enhanced at low pH, it is also known that its interaction with the bacterial cytoplasmic membrane is reduced in acidic environments [269]. However, direct comparison among studies dealing with nisin antimicrobial activity is complicated by the diversity of the protocols used. Indeed, a wide range of target microorganisms are used, such as *Listeria monocytogenes*, *E. coli*, *Salmonella* Thyphimurium or *Micrococcus flavus* [265,267,268]. As well, the composition of the diffusion medium used to evaluate the nisin activity varies from one study to another. As the nisin activity is strongly related to its interaction with other molecules, this factor could interact with the final activity measured.

After the HP treatment, the activity of nisin solutions decreased significantly to reach 77.5 IU/mL for nisin in HCl and 50.1 IU/mL in MES. Therefore, the

antimicrobial activity of nisin is less impacted by HP at pH 2.8 (22.5% activity loss) than at pH 6.1 (49.9% activity loss). Similar results were obtained after autoclaving nisin solutions (121 °C – 15 min), showing that nisin was more stable at pH 3 (< 5% activity loss), while a marked decrease in activity was noticed at lower or higher pH [263]. The better conservation of nisin activity at low pH could be due to the fact that both solubility and stability of nisin are negatively correlated to the pH [270]. It is well known that the antimicrobial activity of nisin is due to its particular secondary structure, as a lanthionine ring on its C-terminus directly interacts with the bacterial cell membrane [204]. In order to better understand how nisin is impacted by HP, the protein secondary structure was studied through CD and FTIR spectra analysis.

The CD spectra are presented in **Figure 17**. At pH 2.8, the CD spectra of the untreated nisin displayed a single minimum at 200 nm and a slight shoulder at 188 nm. At pH 6.1, two minima at 198 nm and 187 nm were observed. The intensity of the absorption observed around 200 nm was the typical signature of the random coil structure of nisin, whereas the absorption around 187 nm was most typical of β -structure of proteins, and particularly β -turns [271–273]. Therefore, it seems likely that nisin was randomly coiled at pH 2.8, with a slight persistence of some β -turns, while these last structures were more developed at pH 6.1. These observations are in line with previous works showing an increase of the β -structure of nisin at neutral pH [271–273]. The highest nisin activity, generally observed at pH 5.5, was thus attributed to the optimum coexistence of the β -structure and the random coiling of the protein [267,268,271].

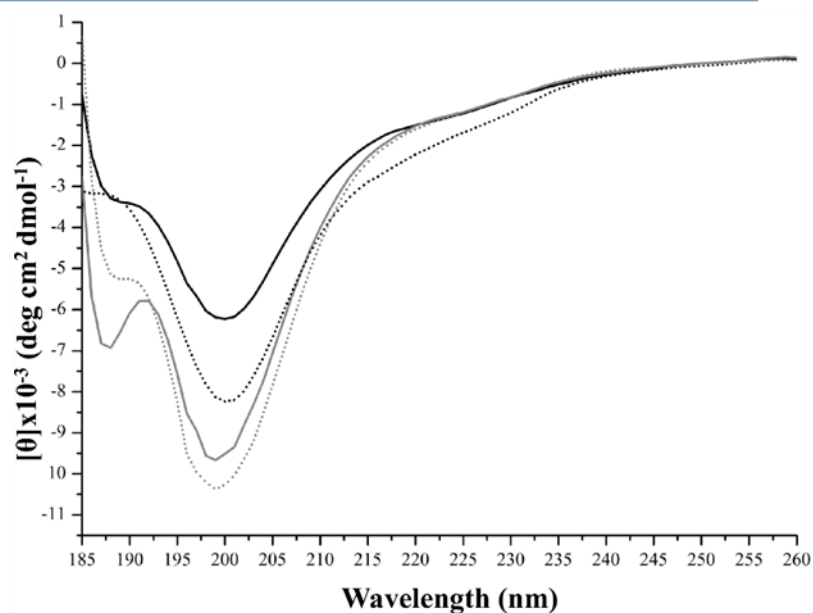


Figure 17 : CD spectra of HP-treated and untreated nisin in solution in 0.02 M HCl (pH 2.8) or 0.1 M MES (pH 6.1)

HP treatment: 500 MPa – 20 °C – 10 min. Solid black line: untreated nisin in solution at pH 2.8. Dotted black line: HP-treated nisin in solution at pH 2.8. Solid grey line: untreated nisin in solution at pH 6.1.

Dotted grey line: HP-treated nisin in solution at pH 6.1.

Regarding the CD spectra of the nisin treated by HP, it can be noticed that the intensity of the absorption around 188 nm was definitely attenuated, both at pH 2.8 and 6.1. Conversely, a clear increase in the intensity of the absorption near 200 nm was visible at the two pH. These features seem to indicate that the pressure treatment impacted the secondary structure of nisin, by reducing the development of β -structures and promoting the unfolding of the proteins.

The secondary structure of nisin was also analyzed by FTIR spectra measurement. The spectra corresponding to amide bands of nisin and their second derivative are presented on **Figures 18** and **19**. The use of the second derivative spectra allows more specific identification of small absorption peaks which are not resolved in the original spectrum [274].

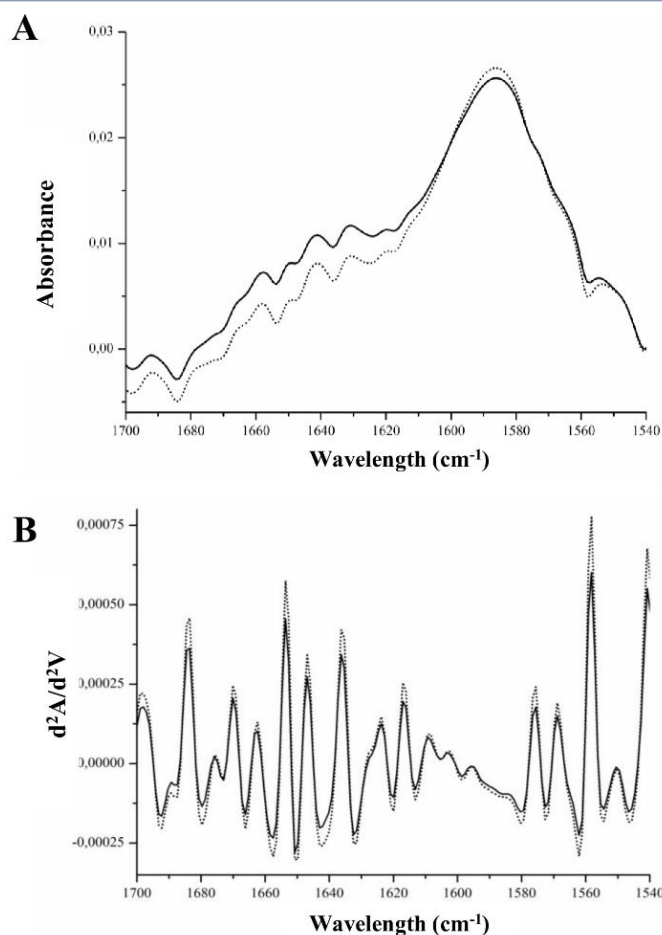


Figure 18 : FTIR (A) and second derivative (B) spectra of HP-treated and untreated nisin at pD 6.5 (equivalent pH: 6.1)

HP treatment: 500 MPa – 20 °C – 10 min. Solid line: untreated nisin. Dotted line: HP-treated nisin.

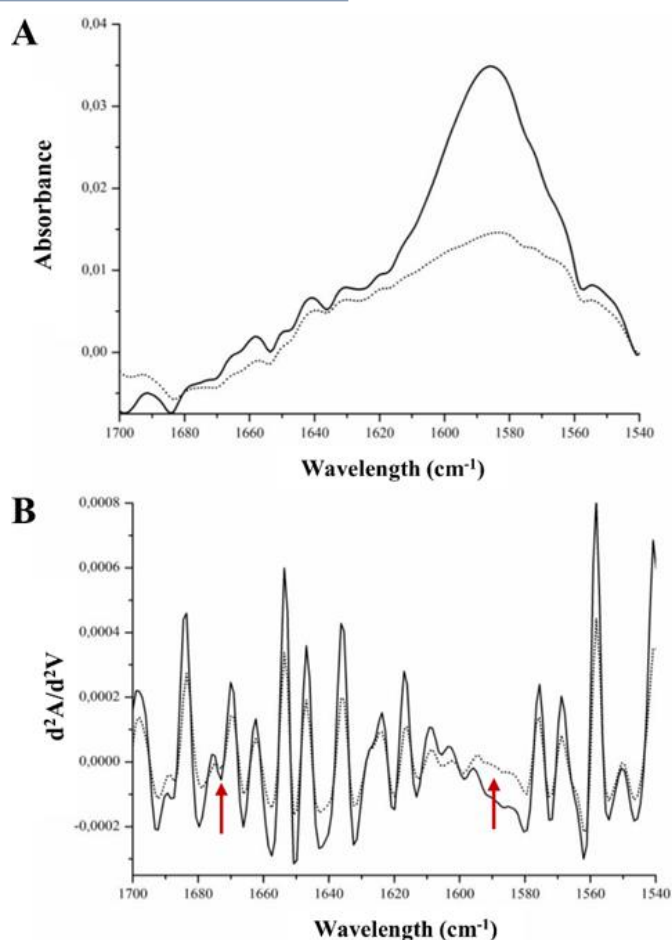


Figure 19 : FTIR (A) and second derivative (B) spectra of HP-treated and untreated nisin at pD 3.5 (equivalent pH: 2.8)

HP treatment: 500 MPa – 20 °C – 10 min. Solid line: untreated nisin. Dotted line: HP-treated nisin.

Regarding the absorption and second derivative spectra of nisin in DCl (**Figure 18**), no significant differences were observed between the spectra of treated and untreated samples. However, the second derivative spectra of HP-treated nisin in MES-D₂O (**Figure 19**) displayed a major shift at $1672 \pm 2 \text{ cm}^{-1}$. This can also be observed on the absorption spectra which displayed a global curve change between 1700 and 1650 cm^{-1} . The band at 1672 cm^{-1} has previously been associated to β -turns in the nisin molecule, indicating that such shift could correspond to changes in the β -structure of the protein [275]. A shift in the spectral region 1600 – 1580 cm^{-1} can also be noticed. If these frequencies, as a part of the Amide II mode, are hardly

attributable to particular structural changes, such shift could nevertheless confirm a structural modification of the nisin secondary structure [276,277].

These last findings were consistent with the results obtained by CD spectra analysis indicating that HP induced modification of the secondary structure of nisin at pH 6.1, mainly localized on the β -structure level.

At neutral pH, nisin contains five β -turns corresponding to its five lanthionine rings (**Figure 20, A**) [204,264]. In the presence of lipid II of Gram-positive bacteria, the β -turns of the N-terminal structure are involved in the formation of a cage-like structure, in which the N-acetylmuramic acid (MurNAc) of the lipid II is linked to nisin via intermolecular hydrogen bonds (**Figure 20, A, B**). The presence of a flexible hinge region induces the embedding of nisin C-terminal into the bacterial membrane, resulting in pore formation [264]. We assume that the unfolding of the β -turns could impact the nisin functionality in two ways. First, the unfolding of the N-terminal β -turns could lead to an alteration of the cage-like structure, increasing the distance between the MurNAc and the N-terminal backbone amides. The condition for the establishment of hydrogen bonds would not be favorable anymore, resulting in a poor linkage of nisin to the lipid II (**Figure 20, D**).

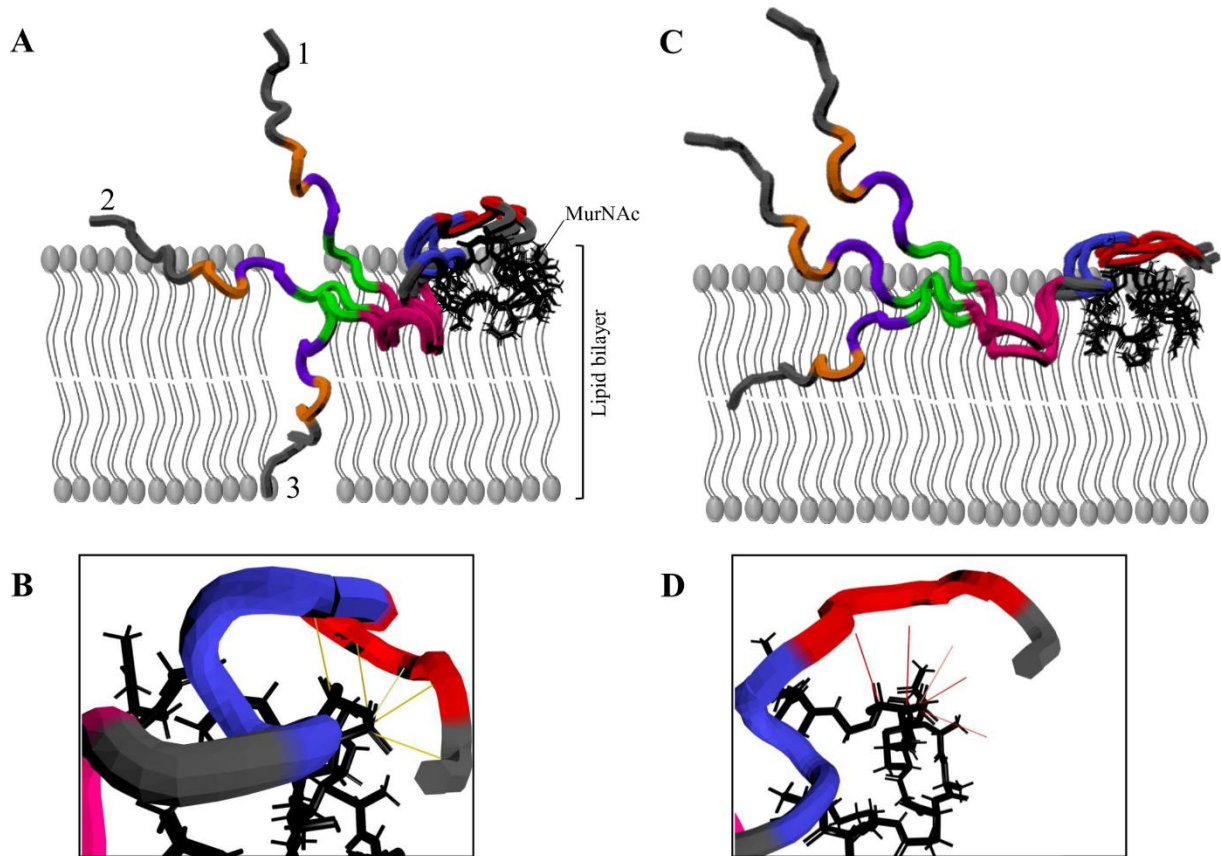


Figure 20 : Impact of the nisin unfolding on its action on bacterial membranes adapted from Hsu *et al.*, (2004)

(A) Nisin lipid II complex in a bacterial membrane. The red, blue, pink, purple and orange parts of nisin represent the 5 lanthionine rings and correspond to the β -turns of the protein. The green colored fraction represents the flexible hinge. 1: nisin binding to the MurNAc; 2: flexion of the hinge region and embedding of nisin C-terminus in the lipid bilayer; 3: pore formation.

(B) Intramolecular hydrogen bonds between the N-terminal amino-acids of the nisin cage-like structure and the MurNAc. The yellow lines represents the hydrogen bonds.

(C) Embedding of the HP-unfolded nisin in the lipid bilayer.

(D) Nisin cage-like structure after its unfolding by HP. The red lines represents the hydrogen bonds between the MurNAc and nisin before its unfolding by HP.

The figures were generated using PyMOL (<https://pymol.org/2/>) and Blender (www.blender.org).

Secondly, the unfolding of the C-terminal rings would lead to a lower flexibility of the hinge region and a lower nisin penetration into the phospholipid bilayer, preventing the pore formation (**Figure 20, C**).

Finally, this study confirmed that the nisin structure is fully pH-dependent. In acidic conditions, the protein did not exhibit particular secondary structure, while neutral environment (pH around 6) favored the formation of β -turns [267,268,271]. If this last configuration has been shown to provide a highest antimicrobial activity to nisin, the presence of β -turns makes the protein more sensitive to HP processing,

which is known for inducing the unfolding of proteins [128]. The activity loss (22.5% and 49.9% at pH 2.8 and 6.1) due to HP treatment should be taken into account regarding the legislation toward nisin addition in food products. As the treatment dwell times used in the food industry vary from 3 to 10 min, studying the impact of shorter HP treatments on the nisin activity would also be of great interest.

Acknowledgments

Ariane Vanvi is thanked for the kindly proofreading of this manuscript.

Fundings

This work is a part of the project ANR-14-CE20-0004, funded by the French Agence Nationale de la Recherche (ANR). This work is also supported by the Conseil Régional de Bourgogne through the plan d'actions régional pour l'innovation (PARI ALIM+) and the European Union through the PO FEDER-FSE Bourgogne 2014/2020 program.

3. Conclusion et perspectives

Cette étude simple mais menée ici pour la première fois a ainsi permis de montrer qu'un traitement HP à 500 MPa pouvait impacter fortement l'effet antimicrobien de la nisine. Des pertes d'activité respectives de 22 % et 50 % ont en effet été observées après 10 minutes de traitement à 20 °C et à pH 2.8 ou 6.1. Cette diminution d'activité serait due à l'impact du traitement HP sur la structure des anneaux lanthionine de la nisine, assurant son interaction avec les membranes cellulaires. La prise en compte de la perte de l'activité de la nisine engendrée par l'application d'un traitement hyperbare pourrait ainsi permettre d'ajuster au mieux sa concentration afin que son effet antimicrobien perdure après le traitement HP.

Chapitre 2

Évaluation de l'effet de bactériocines sur l'inactivation de spore bactériennes par hautes pressions

1. Introduction et objectifs

La nisine est actuellement la seule bactériocine dont l'usage est autorisé dans les aliments (conservateur E234). De nombreux auteurs ont ainsi testé l'effet de la combinaison nisine-HP sur l'inactivation de spores bactériennes. Cependant, les concentrations de nisine employées varient de 0,1 UI/mL à 1000 UI/mL et les barèmes de traitement HP sont parfois éloignés de ceux utilisables en industrie. L'objectif de ce chapitre est ainsi d'évaluer l'effet d'un traitement combinant des concentrations légales de nisine à des barèmes de traitement HP « réalistes ». Les mécanismes impliqués dans l'inactivation des spores par ces deux procédés seront aussi recherchés.

2. High pressure sensitization of heat-resistant and pathogenic foodborne spores to nisin

Under review in International Journal of Food Microbiology

Chloé MODUGNO, Souhir KMIHA, Hélène SIMONIN, Chedia AOUADHI, Esther DIOSDADO CAÑIZARES, Emilie LANG, Stéphane ANDRÉ, Slah MEJRI, Abderrazak MAAROUFI, Jean-Marie PERRIER-CORNET

Abstract

Today, there is no effective non-thermal method to inactivate unwanted bacterial spores in foods. High-Pressure (HP) process has been shown to act synergistically with moderate heating and the bacteriocin nisin to inactivate spores but the mechanisms have not been elucidated. The purpose of the present work was to investigate in depth the synergy of HP and nisin on various foodborne spore species and to bring new elements of understandings.

For this purpose, spores of *Bacillus pumilus*, *B. sporothermodurans*, *B. licheniformis*, *B. weihenstephanensis*, and *Clostridium* sp. were suspended in MES buffer, in skim milk or in a liquid medium simulating cooked ham brine and treated by HP at 500 MPa for 10 min at 50 °C or 20 °C. Nisin (20 or 50 IU/mL) was added at three different points during treatment: during HP, during and or in the plating

medium of enumeration. In the latter two cases, a high synergy was observed with the inhibition of the spores of *Bacillus* spp.. The evaluation of the germinated fraction of *B. subtilis* spores after HP revealed that this synergy was likely due to the action of nisin on HP-sensitized spores, rather than on HP-germinated spores. Thus, the combination of nisin and HP can lead to *Bacillus* spp. spore inhibition at 20°C. And Nisin can act on HP-treated spores, even if they are not germinated.

This paper provides new information about the inhibition of spores by the combination of HP and nisin. The high synergy observed at low temperature has not been reported yet and could allow food preservation without the use of any thermal process.

Keywords

Bacillus, *Clostridium*, psychrotrophic, highly-heat-resistant, germination

2.1. Introduction

When exposed to unfavorable environmental conditions, several bacterial species, mostly *Bacillus* and *Clostridia*, can enter a metabolically dormant state by forming endospores. Endospores (here after called “spores”) have exceptional resistance properties against high temperatures, radiation, desiccation, pressure and toxic chemicals. They can survive under starvation for years before germinating and forming vegetative cells again.

Spore-forming bacteria play an important role in food spoilage and foodborne disease. They may be responsible for product defects or spoilage in a variety of food products, leading to substantial economic losses in the food chain and food waste [278]. High-heat treatments, such as sterilization or Ultra-High-Temperature (UHT) treatments, are needed to inactivate spores in food products. Such treatments are usually effective to reduce spores to sufficiently low numbers; however, various species of sporeformers, such as *Bacillus sporothermodurans*, can survive commercial wet heat sterilization [9,279]. In addition, non-sterilized and low-acid food, such as refrigerated ready-to-eat-food, can be contaminated by bacterial spores, namely, from psychrotrophic species such as non-proteolytic *Clostridium botulinum* species [280]. Consequently, preservative ingredients are often required to ensure their safety.

The high-pressure (HP) process is used worldwide as an alternative to heat pasteurization or as an additional decontamination step in packaged food products. However, similar to many inactivation technologies, HP alone is not effective on bacterial spore destruction [162]. If HP at a temperature lower than 50 °C can hardly inactivate spores, it has long been known that HP initiates germination of the spores of *Bacillus sp.* and *Clostridium sp.* when applied between 200 – 400 MPa [149,281].

Inactivation of spores by HP can be achieved by combining HP with other so-called non-thermal hurdles, such as biopreservation [236]. Biopreservation refers to extending the storage life and enhancing the safety of foods using protective cultures and/or their antibacterial products [282]. There are few studies on the potential of biopreservation against spore-forming bacteria [236]. Nisin is one of the few bacteriocins known to be able to inhibit spores. Nisin is produced by certain strains of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, exhibiting a broad spectrum of inhibitory activity against Gram positive bacteria [256].

HP has been shown to act synergistically with nisin to inactivate spore-forming bacteria of various species. In the abundant literature on the subject, the experimental conditions tested are very different from one study to another. The tested species are different; the nisin concentrations are not always expressed in the same units and vary from 0.2 to more than 2000 IU / mL. Finally, the contact between spores and nisin is not performed under the same conditions. In most studies reporting a synergy, nisin is added at concentrations ranging from 120 to 500 IU/mL to the spore suspension before a combined heat and HP treatment [178,253–255,283]. Rare studies were interesting in adding nisin in the spore recovery medium after HP. Lopez-Pedemonte et al. (2003) show that adding nisin at 15600 UI/mL in two-pressure-cycle-HP treated cheeses increased the inactivation of *Bacillus cereus* and inhibited the regrowth for 15 days [284]. And Roberts and Hoover (1996) found that an HP treatment (400 MPa, 70 °C and low pH) renders spores of *Bacillus coagulans* more sensitive to nisin present in the recovery medium [262].

The objective of the present work was to investigate the effect of the combination of HP and nisin on the inactivation of relevant food pathogenic and spoilage spore species in nutrient media to clarify the conditions allowing the

synergy. *Bacillus sporothermodurans*, *B. pumilus*, and *B. licheniformis* were chosen for their high resistance to temperature and their frequent implication in UHT and raw milk spoilage [116,117,122]. *Clostridium* sp. and *B. weihenstephanensis* were chosen regarding their potential pathogenicity and ability to contaminate meat products and for growing at refrigerated temperatures [79,285].

For this purpose, low nisin concentrations (≤ 50 IU/mL), which highlight the synergy, were added to the spore suspensions during HP treatments at 20 and 50 °C and/or after treatment in the recovery medium to identify when inhibition occurs. Furthermore, without this being proved, it is generally admitted that HP germination is the underlying mechanism of the synergy between nisin and HP. Thus, our aim was also to clarify whether spore germination is necessary for the action of nisin on HP treated spores.

2.2. Material and methods

2.2.1. Bacterial strains, growth and sporulation conditions

Bacillus weihenstephanensis KBAB4 (provided by the Institut National de Recherche Agronomique, Unité SQPOV, Avignon, France), *Bacillus licheniformis*, *Bacillus pumilus* (both isolated from UHT Tunisian milk), *Bacillus sporothermodurans* (isolated from raw Tunisian milk) and *Clostridium* sp. *botulinum* type E-like DSM 1985 were used as target strains in this study. As reported on the DSMZ website, this late strain is, based on partial 16S rDNA sequence, closely related to *Clostridium botulinum* type E, strain ATCC 23387 [286].

Table 8 presents the conditions applied to produce the bacterial spores used in this study.

For *Bacillus* species, cultures were obtained by inoculating 2-3 fresh colonies into 50 mL of nutrient broth. After incubation (see **Table 8**), 0.4 mL of the culture was spread on sporulation Petri dishes (\emptyset : 145 mm; h: 20mm).

Sporulation was monitored by phase contrast microscopy and spores were harvested when more than 95% of phase bright spores were observed. Spores were harvested by flooding the agar plates with cold sterile distilled water and scraping the agar surface with a sterile cell spreader. Spore suspensions were then centrifuged (3600 g, 15 min, 4 °C) and spores were suspended in 0.2 μ m filtrated 70% ethanol (filter: cellulose acetate, Sartorius, France; ethanol: Elvetec, France) for 1 h to inactivate

vegetative cells [287]. Spores were then washed three times by successive centrifugation (3600 g, 15 min, 4 °C) and suspension in sterile distilled water at 4 °C. Spores were enumerated by CFU determination on their respective enumeration media (EM). The concentration of the final spore suspensions was standardized at 10^8 CFU/mL for the *B. subtilis* strains and 10^7 for the other strains. Suspensions were stored at 4 °C for a maximum of one month.

Tableau 8 : Culture, sporulation and enumeration conditions

Strain	Culture		Sporulation		Enumeration	
	Medium	Incubation	Medium	Incubation	Medium	Incubation
<i>B. sporothermodurans</i>	BHI vit ^a	37 °C – 24 h	CMA ^d	37 °C – 7 days	BHI vit + agar ^a	37 °C – 24 h
<i>B. licheniformis</i>	BHI vit ^a	37 °C – 24 h	CMA ^d	37 °C – 7 days	BHI vit + agar ^a	37 °C – 24 h
<i>B. pumilus</i>	BHI vit ^a	37 °C – 24 h	CMA ^d	37 °C – 7 days	BHI vit + agar ^a	37 °C – 24 h
<i>B. weihenstephanensis</i>	CM ^b	30 °C until 0.4 < OD ₆₀₀ < 0.6	CMA ^d	30 °C – 7 days	BCP ^g	30 °C – 48 h
<i>Clostridium sp.</i>	LYBHI ^c	30 °C – 24h	VSFR ^e	30 °C – 1 month	VSFR ^e	30 °C – 48 h

a: **BHI vit**: Brain Heart Infusion (Sigma Aldrich, France) 37 g/L supplemented with 1 mg/L of vitamin B12 (Sigma Aldrich, France) [122]. **BHI vit + agar**: BHI vit supplemented with 15 g/L of agar (Biokar, France). Final pH: 7.2 ±0.2.

b: **CM** (Complex Medium): meat extract (Biokar, France) 10 g/L; yeast extract (Biokar, France) 2 g/L, MnSO₄ (Sigma Aldrich, France) 0.04 g/L [279].

c: **LYBHI**: Brain Heart Infusion (Sigma Aldrich, France) 37 g/L, supplemented with 5 g/L of yeast extract (Biokar, France), 5 g/L of hemin (Sigma Aldrich, France), 1 g/L of cellobiose (Sigma Aldrich, France), 1 g/L of Maltose (Sigma Aldrich, France); 0.5 g/L of L-cysteine (Sigma Aldrich, France). pH was adjusted at 7.4 before autoclaving.

d: **CMA** (Complex Medium Agar): CM supplemented with 15 g/L of agar (Biokar, France).

e: **VSFR**: meat liver glucose agar with 2 g/L yeast extract (Biokar, France). Final pH: 7.4±0.2.

f: **LB**: Luria Broth (Sigma-Aldrich, France).

g: **BCP**: Bromocresol Purple Dextrose Tryptone Agar (Biokar, France). Final pH: 7.0±0.2.

For *Clostridium sp.*, a subculture was obtained by adding 0.1 mL of stock cultures previously stored at -80 °C, to 9 mL of LYBHI (**Table 8**) in an anaerobic Hungate tube incubated for 24 h at 30 °C. A culture was then obtained by diluting 0.5 mL of the subculture into 10 mL of fresh LYBHI in an anaerobic Hungate tube. After incubation, 0.2 mL of this culture was inoculated into sporulation Petri dishes (**Table 8**) for sporulation. After one month at 30 °C under anaerobic conditions, the spores were harvested, purified and enumerated as previously described for the *Bacillus* spp. strains. The concentration of the final spore suspensions was

standardized at 10^7 CFU/mL. Suspensions were stored at 4 °C for a maximum of one month.

2.2.2. Effect of nisin on spore cultivability

Nisin stock solution in 0.02 mol/L HCl was prepared from nisin powder (106 IU/g, Sigma-Aldrich, France) and sterilized by 0.2 µm filtration (cellulose acetate, Sartorius, France). Nisin stock solution was stored at 4 °C for a maximum of one week until use. The nisin level of the stock solution was confirmed by a plate diffusion assay using *Micrococcus flavus* DSM 1790, as described by Tramer and Fowler [265]. Following a protocol adapted from Stewart *et al.* (2000), nisin stock solution was added to tempered agar enumeration medium (**Table 8**) to achieve final concentrations ranging from 0 IU/mL to 200 IU/mL [175]. Spore suspensions were serially diluted and plated on their respective enumeration medium supplemented with nisin (**Table 8**). Plates were incubated for 48 h (temperatures indicated in **Table 8**) and colonies were counted. The spore cultivability was plotted against the nisin concentration and concentrations inducing less than -1.5 log (CFU/mL) spore count reduction were selected for the treatment combining HP and nisin. Therefore, 50 IU/mL was chosen as the nisin concentration for all *Bacillus* spp. and 20 IU/mL was chosen for *Clostridium* sp.

2.2.3. HP treatments in buffer and measurement of germination

HP tests were performed in a Top Industrie 700 MPa vessel (France) with a double-walled metal pressure chamber of 20 cm³ (working temperature: -20 °C / 90 °C). Water was used as the pressure-transmission fluid. The internal temperature of the pressure chamber was maintained by a water bath (Minisat 240, Huber, Germany) connected to the double wall of the pressure chamber and monitored by a Pt100 thermocouple (Omega, USA). The temperature of the water bath was set in order to limit the adiabatic heating to +5 °C above the desired temperature set point. The pressure and the temperature during the HP treatment were recorded using instruNet World (iW) software. The compression rate was 3 MPa/s and the decompression was nearly instantaneous (< 3 s).

Samples were prepared by a 90% dilution of initial spore suspensions into 0.11 mol/L 2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid (MES) buffer at pH 6.1 (Sigma Aldrich, France) in order to reach a final concentration of approximately

10^7 CFU/mL for *Bacillus* spp. and 10^6 CFU/mL for *Clostridium* sp.. MES buffer was chosen because its pH varies only slightly with temperature and pressure ($\Delta pK_a/\text{°C} = -0.011$; pH varies from 5.5 to 6.5 between 10 and 1000 MPa at 25 °C) [288]. 0.5 mL of each spore suspensions in MES was heat-sealed into polyethylene pouches. For each strain, zero-time samples were taken to determine the initial concentration of spores before treatment.

Pouches were placed in HP vessel 5 min before treatment in order to let the temperature equilibrate. Samples were treated at 500 MPa for 10 min, at 20 °C or 50 °C and immediately immersed in iced water.

After treatment, samples were divided in two equal volumes. The first volume was serially diluted and plated on their respective enumeration media (**Table 8**) for CFU determination. The second volume was treated at 80 °C for 10 min in a water bath in order to inactivate germinated spores, before being plated on enumeration media. The fraction of spores induced in germination by HP was calculated as the difference between the logarithmic counts of in pressure- and heat-treated (NHPT) and pressure-treated (NHP) portions of the samples ($\log_{10}(\text{NHPT}) - \log_{10}(\text{NHP})$).

2.2.4. HP treatment with nisin

Immediately before HP treatment, spore suspensions were diluted to approximately 10^7 CFU/mL for *Bacillus* spp. and 10^6 CFU/mL for *Clostridium* sp. in MES buffer supplemented or not with nisin at 50 UI/mL or 20 UI/mL for *Bacillus* spp. and *Clostridium* sp. respectively. Right after the HP treatment, spore suspensions were centrifuged at 11200 g for 5 min at 4 °C and spores were re-suspended in PBS (phosphate buffered saline, Sigma-Aldrich, France). Spores were then plated both on their respective EM (**Table 8**), and on EM supplemented with nisin at concentrations ranging from 0 to 50 IU/mL (**Figure 21, A**). After 48 h of incubation (see temperatures in **Table 8**), colonies were counted. As a control for the effect of nisin alone, non-HP-treated samples were plated on EM + nisin.

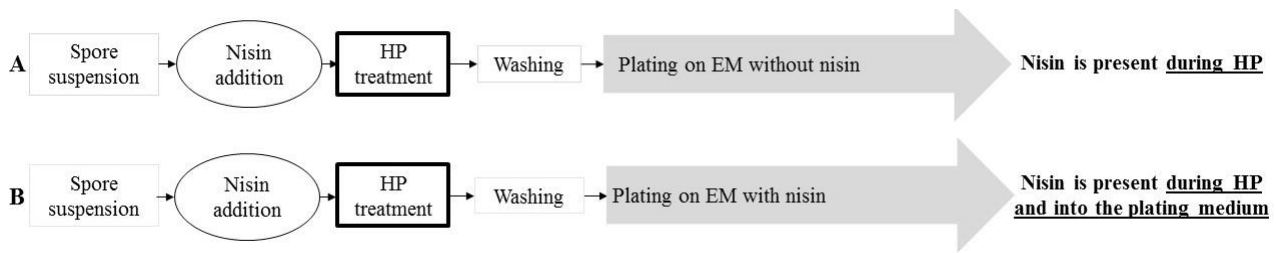


Figure 21 : Schematic representation of the treatment processes of spores by HP in combination with nisin

A: Nisin is present only during the HP treatment (plating on EM+0 IU/mL of nisin), or during HP and into the plating medium (plating on EM+20 or 50 IU/mL of nisin). B: Spores are treated by HP, stored at 4 °C and plated on EM supplemented with nisin.

2.2.5. HP treatments in nutrient media

UHT skim milk (Lactel, Lactalis, France) was used as a nutrient media for HP treatment of *B. pumilus*, *B. sporothermodurans* and *B. licheniformis* strains.

For *B. weihenstephanensis* and *Clostridium* sp., a liquid medium was formulated to suit the physicochemical properties of cooked ham brine (pH, aw, sugars and salt contents). The composition of this Medium Modelling Ham (MMH) was adapted from the composition of typical organic ham brine. The MMH is composed of: 17.6 g/L of sodium chloride (Sigma Aldrich, France); 10 g/L of peptone from porcine heart (Sigma-Aldrich, France); 5 g/L of autolytic yeast extract (Biokar, France); 2.3 g/L of D-lactose monohydrate (Sigma-Aldrich, France); 0.7 g/L of Sucrose (Sigma-Aldrich, France); 0.11 mol/L MES buffer qs 1 L (Sigma-Aldrich). The pH was adjusted to 6.1 before autoclaving.

Nitrites, which are usually added as preservatives in ham brine were omitted, in order to focus only on the effects of high pressure and nisin on spores.

For HP treatment without nisin, spores were suspended in their respective nutrient media (MMH for *B. weihenstephanensis* and *Clostridium* sp.; skim milk for *B. pumilus*, *B. sporothermodurans* and *B. licheniformis*), treated by HP at 500 MPa at 50 °C or 20 °C for 10 min and plated on EM for CFU determination.

In the case of HP treatment with nisin, the bacteriocin was present during and after the HP treatment, as described on the **Figure 21 A**.

2.2.6. Statistical analysis

All experiments were performed 3 times independently. The effect of the factors on spore inactivation after HP treatments was evaluated for each strain by

analysis of variance (ANOVA) using R software [289]. Significance was evaluated when p-value was equal or under 0.05. In this case, a Tukey's HSD (Honest Significant Difference) test was performed to observe significant difference among conditions.

In the case of HP treatment in combination with nisin, the sum of the independent effects of HP and nisin was compared with the effect of the treatment combining HP and nisin. When the effect of the combined treatments was significantly higher than the addition of the two independent effects, a synergy was admitted.

A Student's t-test using a 5% level of significance ($p < 0.05$) was used to detect differences between the sum of the HP-germinated and inactivated spores fractions, and the total inactivation provided by the application of nisin during and after HP.

2.3. Results and discussion

2.3.1. Effect of HP and nisin on spore inactivation in buffer

Spores were suspended in MES buffer and treated with nisin. Nisin concentrations used were 50 IU/mL for *Bacillus* spp. and 20 IU/mL for *Clostridium* sp.

As summarized in **Figure 21**, nisin was added at different stages of treatment, creating two groups of samples:

- Nisin present only during HP (plating on EM without nisin)
- Nisin present during HP and added into the plating medium at the same concentration.

The results obtained are shown in **Figure 22**. The effect of nisin alone on the spores (striped bars) represents the inhibition of spores by only plating on the EM + nisin. As expected, nisin at 50 IU/mL and 20 IU/mL induced approximately 1 log inhibition of *Bacillus* spp. and *Clostridium* sp. spores respectively (that is what the nisin concentration was determined for). Regarding the effect of HP alone, it can be noticed that pressure resistance of spores is strongly related to the temperature of the treatment. While spores treated at 20 °C did not show any significant inactivation (<1 log for all the strains), the viability of the spores of *B.*

weihenstephanensis and *B. pumilus* processed at 50 °C was strongly affected (approx. 4 log inactivation for the two strains).

Spores of psychrotrophic species, such as *Clostridium sp.* and *Bacillus weihenstephanensis* are poorly heat-resistant [71,159] while *Bacillus pumilus*, *Bacillus licheniformis* and *Bacillus sporothermodurans* are highly heat-resistant spores isolated from UHT milk [116]. Our results confirm the absence of a link between thermo- and baroresistance according to what has been reported in the rare literature on the subject [290,291]. Three groups of spore species clearly appear according to their baroresistance at a temperature ≤ 50 °C, in order of increasing baroresistance: *B. weihenstephanensis*; *B. pumilus* > *B. licheniformis*; *B. sporothermodurans* > *Clostridium sp.* It is well known that inactivation by HP beyond 400 MPa was related to the germination induction during HP treatment and the subsequent resistance loss. At this pressure level, this induction was thought to be driven through spoVA channel activation and Ca-DPA release in *B. subtilis* (Reineke et al. 2013). The *B. subtilis* spoVA proteins are composed of 7 subunits, including the SpoVAC subunit, which has recently been identified as a mechanical stress sensitive channel for DPA release [48]. *B. pumilus* and *B. licheniformis* also have genes from the same spoVA subunits as *B. subtilis* [143] but it is not known for the other two species of *Bacillus* studied here. Moreover, the lytic enzymes of the cortex can be denatured by HP at 500 MPa, which consequently inhibits the second stage of germination [148]. Thus, baroresistance differences could be attributed to varying sensitivities of DPA spoVA channels and lytic enzymes of the cortex in different *Bacillus* species. Regarding *Clostridium* spores, there are important differences in the germination mechanisms of *Bacillus* spores and certain *Clostridium* species. HP has recently been shown to cause the release of DPA by some *Clostridium* species [281]. However, our results show that the effect of HP up to 600 MPa (results not shown) at moderate temperature on the inactivation of *Clostridium sp.* remains low. This corresponds to what is already reported in the literature on *C. botulinum* type E [292].

When nisin was present during HP, a slightly significant increase in spore inactivation was found at 20 °C and 50 °C for *B. sporothermodurans* and *B. licheniformis* ($p < 0.01$). In comparison with the effects of HP alone, the addition of nisin during HP provided a 1 log supplementary inactivation for both strains. Nisin

addition during HP also provided a significant and synergistic increase in the inactivation of *B. pumilus* only at 20 °C (inactivation: 2.5 log; $p < 0.001$). In contrast, nisin addition during HP did not significantly improve *B. weihenstephanensis* and *Clostridium sp.* inactivation, regardless of the temperature. The same applied for *B. pumilus* at 50 °C. However, the presence of nisin during HP and into the plating medium induced a significant, synergistic effect on the reduction of the outgrowth of *B. sporothermodurans*, *B. licheniformis* and *B. weihenstephanensis*, both at 20 °C and 50 °C ($p < 0.001$). For *Clostridium sp.* treated at 50 °C and *B. pumilus* treated at 20 °C, a significant further reduction in spore outgrowth was provided by nisin addition during HP and into the plating medium ($p < 0.01$), resulting in the addition of the independent effects of HP and nisin.

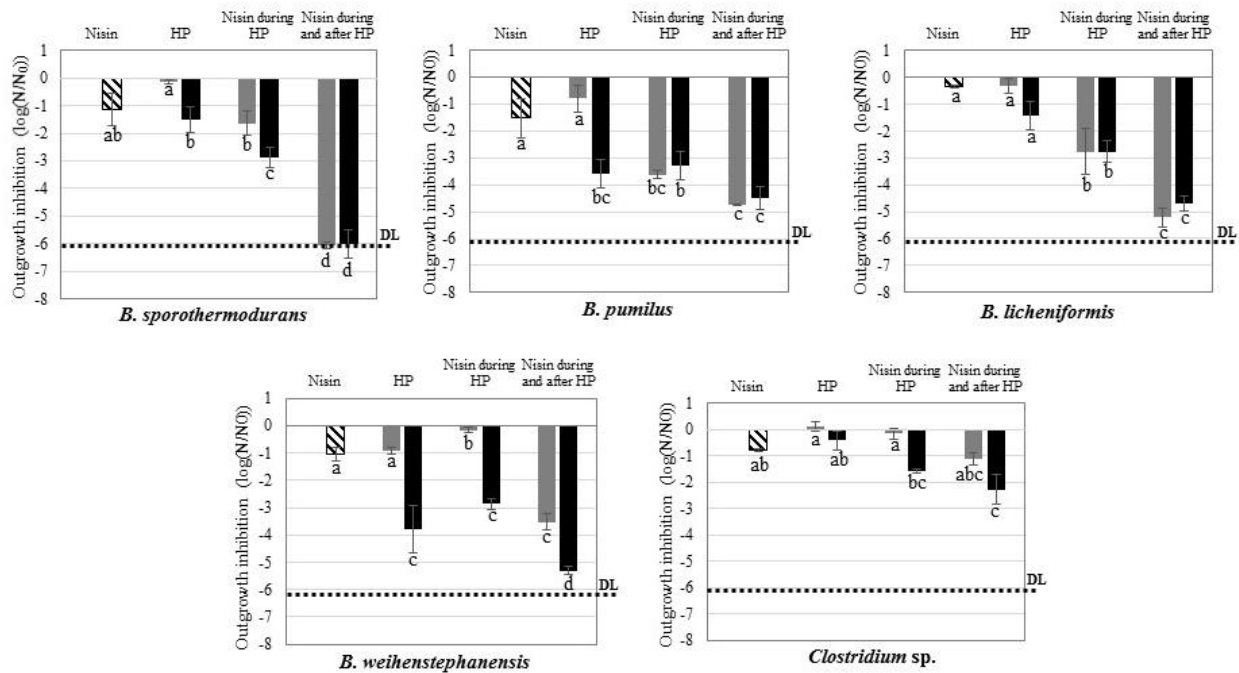


Figure 22: Effect of nisin addition on high pressure inactivation of spores (500 MPa, 10 min), treatment in MES buffer

Nisin concentrations: 50 IU/mL for *Bacillus* spp. 20 IU/mL for *Clostridium* sp. Striped bars: effect of nisin alone; Grey bars: effect of HP treatment at 20 °C; Black bars: effect of HP treatment at 50 °C. DL: Detection limit. 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.

2.3.2. Effect of HP and nisin on spore inactivation in nutrient media

B. licheniformis, *B. pumilus*, and *B. sporothermodurans* in suspension in skim milk and *B. weihenstephanensis*, and *Clostridium sp.* in suspension in MMH were

treated by HP at 500 MPa for 10 min at 20 °C or 50 °C. Nisin was added to the spore suspensions just before HP treatment to reach 20 IU/mL for *Clostridium* sp. and 50 IU/mL for *Bacillus* spp. to simulate the presence of nisin in HP-treated food products, nisin was also added into the plating medium. Results are shown in **Figure 23**.

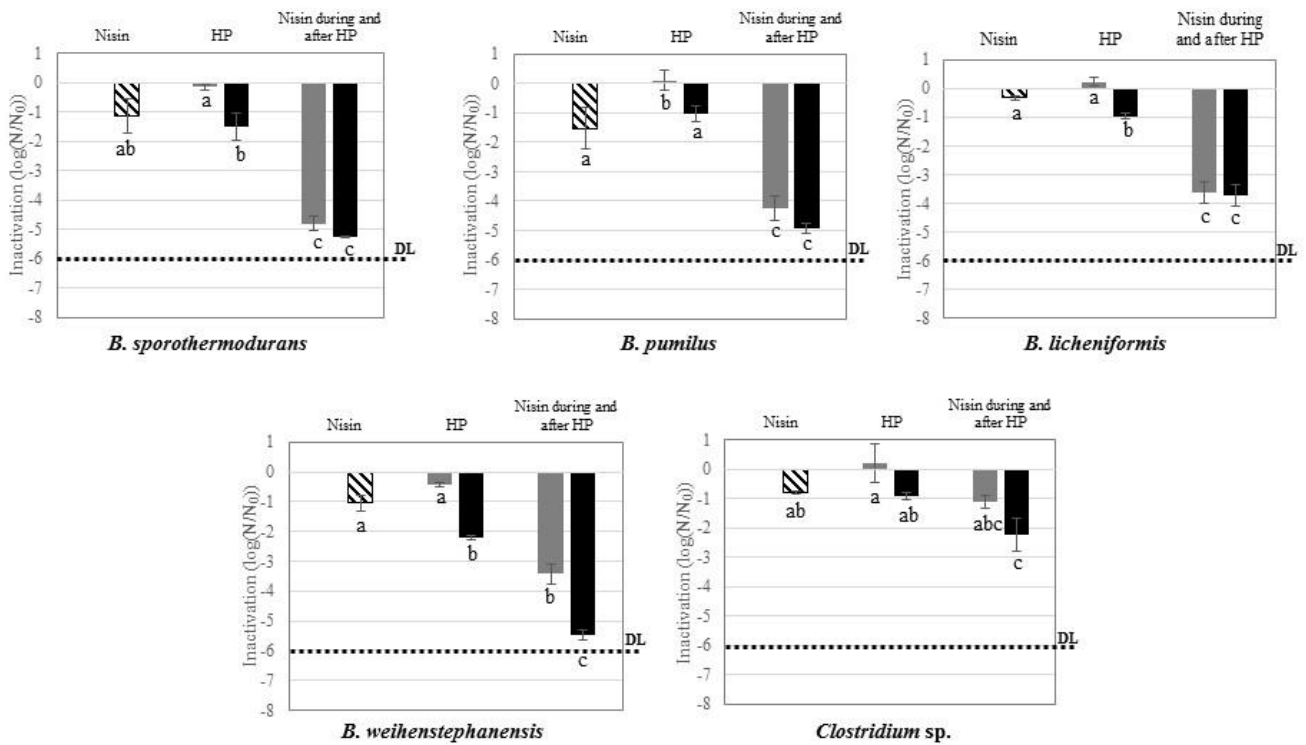


Figure 23 : Effect of nisin addition on high pressure inactivation of spores (500 MPa, 10 min), treatment in nutrient media

Spores of *B. weihenstephanensis* and *Clostridium* sp. were treated in MMH; spores of *B. sporothermodurans*; *B. pumilus* and *B. licheniformis* were treated in milk. Nisin concentrations: 50 IU/mL for *Bacillus* spp. 20 IU/mL for *Clostridium* sp. Striped bars: effect of nisin alone; Grey bars: effect of HP treatment at 20 °C; Black bars: effect of HP treatment at 50 °C. DL: Detection limit. 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.

First, regarding the effect of HP alone, we noticed that inactivation was reduced when spores were treated in nutrient media, in comparison with the inactivation obtained after HP treatment in MES buffer. This reduction was significant for *B. pumilus* and *B. weihenstephanensis* at 50 °C for which the inactivation was reduced by 2.5 log and 2 log respectively. The protective effect of MMH on *B. weihenstephanensis* could be due to the presence of sodium chloride and sugars, inducing lower water activity (MMH a_w : 0.97) [164]. A slight protective effect

was also noticed for spores treated in milk. A possible explanation for this may be the natural baroprotective effect of milk, due to its high content in calcium and magnesium [293,294].

Second, combination of HP and nisin gave similar results in nutrient media and in buffer. Indeed, a significant, synergistic effect was obvious for all the strains when nisin was present during HP and in the plating medium ($p < 0.001$), except for *Clostridium* sp. However, the outgrowth inhibition of *Bacillus* spp. was lower than after HP treatments in buffer. Particularly, the inhibition of *B. licheniformis* at 20 °C was significantly reduced from -5 log in buffer to -3.5 log in milk ($p < 0.01$). This could be due to nisin adsorption on milk proteins, resulting in a decrease in its antimicrobial activity [295].

Nevertheless, a high synergy was found in both buffer and nutrient media for *B. sporothermodurans*, *B. pumilus*, *B. licheniformis* and *B. weihenstephanensis*, leading to a reduction of spore outgrowth of over 4 logs for all the *Bacillus* spp. strains.

Recovery of *Bacillus* and *Clostridium* spore growth was inhibited in the presence of nisin [236,296]. The inhibitory effect of nisin occurred rapidly (< 5 min) after the initiation of germination. It appeared that nisin prevented spores from becoming metabolically active by disrupting the establishment of their membrane potential [228]. Nisin binds to lipid II for both spores and vegetative cells, but for spores, this is not sufficient to induce membrane pore formation and thus inhibits growth recovery [229]. The formation of pores could also be due to the binding of nisin to the thiol groups of membrane proteins which become accessible only at the time of spore germination [227]. It is thus commonly admitted that the synergy between HP and nisin is due to the action of nisin on HP-germinated spores which appeared more sensitive to nisin than spore germinated in growth medium. Some authors also hypothesized HP-induced physical damages to the spore outer layers (coat and cortex) allow nisin molecules access to their site of action without germination [255]. We thus measured the number of HP-germinated spores to clarify whether spore germination is a necessary condition to the action of nisin on HP treated spores.

2.3.3. Effect of high pressure on spore inactivation and germination induction

We hypothesized that spores, whose germination was initiated by HP, became sensitive to nisin. We thus measured the HP-induced germination rate of the spores. Spores of *B. licheniformis*, *B. pumilus*, *B. sporothermodurans*, and *B. weihenstephanensis* in suspension in MES buffer were treated by HP at 500 MPa for 10 min at 50 °C or 20 °C. Spores induced in germination (at least first stage) after HP were immediately inactivated at 80 °C for 10 min. **Figure 24** presents the HP-inactivated spore fraction (dark grey bars), the HP-germinated spores fraction (light grey bars) and the total spore inhibition provided by the addition of nisin during HP and into the plating medium (black bars). The cumulated inactivation (dark and light grey bars) represent the inactivation obtained after pressure and temperature treatments.

First, the major phenomenon observed after HP at 50 °C is the spore HP inactivation, while the germination without HP-inactivation represented less than 1 log for all the strains. In contrast, after HP treatment at 20°C, a large proportion of spores was germinated and not inactivated by HP.

Second, the cumulative HP-inactivated and germinated spore fraction is significantly lower than the total inhibition provided by the treatment combining HP and nisin for all the strains, except *B. pumilus* and *B. licheniformis* at 50 °C ($p < 0.05$). For these two strains, the spores inactivated by the combination of HP and nisin were equivalent those inactivated by a combination of HP and thermal treatment.

First of all, HP-germinated but not inactivated population of spores will be completely sensitive to nisin which is not so obvious in considering the concentration of nisin used. In cultivation medium, such concentration does not inhibit the outgrowth of germinated spore at least for 90% of spore population (see **Figures 1** and **2** with nisin alone). Sensitization to nisin after HP certainly implies other HP induced alterations than simple permeabilization of spore membrane (with or without SpoVA mediation). Such alterations are irreversible because nisin sensitization persists after treatment and does not inhibit spore development in absence of nisin at least for the population which resists to HP-treatment.

With the hypothesis that heat treatment after HP (80°C, 10 min.) inactivates all the HP induced-germinated spores, the results presented in **Figure 24** clearly

indicate that nisin sensitization do not simply comes from spores induced in germination by HP. Thus, HP induced a modification or an alteration of the spores which sensitized spores to nisin without necessarily inducing germination.

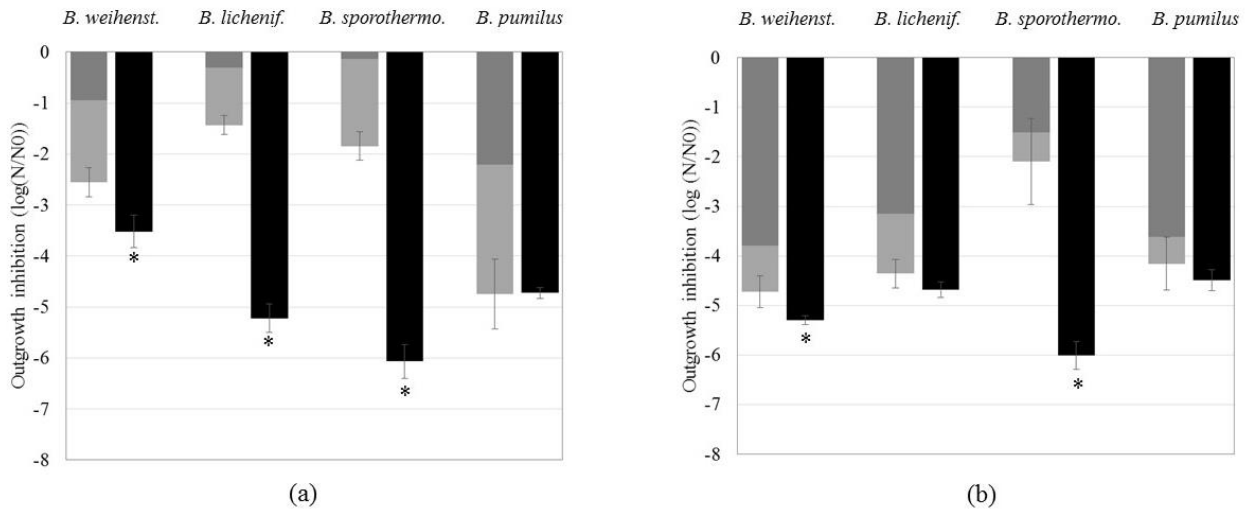


Figure 24: Inactivated and germinated spores after HP treatment at 500 MPa – 10 min: comparison with the reduction of spore outgrowth provided by the addition of nisin during HP and into the recovery medium

Dark grey: HP-inactivated spores fraction; light grey: HP-germinated (heat sensitive) spores fraction; black: inhibition of spore outgrowth induced by the nisin addition during HP and into the plating medium. (a): HP processed at 50 °C; (b): HP processed at 20 °C. Error bars represent SD calculated from triplicates and asterisks represent a significant difference between the sum of HP-inactivated and HP-germinated spore fractions, and the total outgrowth inhibition provided by nisin application during HP and into the plating medium HP (t-test, $p < 0.05$).

HP could target spore coat or cortex. Rare studies show that spores with a damaged cortex are more sensitive to nisin [256,297]. Functionally, the spore coat constitutes an initial barrier to large molecules, such as peptidoglycan-lytic enzymes, which would otherwise have access to the spore cortex [24]. The spore coat has also been identified as a critical resistance layer against many chemicals, especially oxidizing agents, such as nitrogen peroxide, ozone, chlorine and hypochlorite. In contrast, smaller molecules, such as the spore germinants, must presumably pass through this barrier. Nisin is a cationic peptide with a molar weight of 3300 Da, and its potential interaction with the spore coat is unknown.

Finally, the inhibition of spores by nisin after HP could be due to the modification of the properties of some inner membrane proteins, resulting in a better binding of nisin to sulfhydryl groups. Indeed, HP acts generally by promoting the unfolded form of the proteins, which are less voluminous than the native form.

Pressures between 100 MPa and 500 MPa have been shown to increase the number and reactivity of sulfhydryl groups by unfolding the protein structure and exposing the interior sulfhydryl groups [298,299].

2.4. Conclusion

This work reports an important sporostatic effect of combining an HP treatment at 500 MPa and the addition of nisin into the recovery medium for several food-borne *Bacillus* species. The inhibition is significant even if the HP treatment is carried out at 20 °C and with a concentration of nisin as lower as 50 IU/ml while the regulatory concentration in Europe is 120 to 500 IU/mL. Furthermore, we demonstrated that the inhibition of growth shown by the combination of HP and nisin does not need that spores are induced in germination by HP. The underlying mechanism needs further investigation, which is currently underway with *Bacillus subtilis* to bring new elements of understanding.

Fundings

This work is a part of the project ANR-14-CE20-0004, funded by the French Agence Nationale de la Recherche (ANR). This work is also supported by the Conseil Régional de Bourgogne through the plan d'actions régional pour l'innovation (PARI ALIM+) and the European Union through the PO FEDER-FSE Bourgogne 2014/2020 program.

Conflict of Interest

None of the authors declare a conflict of interest.

3. Le cas des spores de *Clostridium* : effet de la pédiocine sur leur inactivation par un traitement en hautes pressions

3.1. Introduction

Si la combinaison HP – nisine permet d'inactiver certaines spores du genre *Bacillus*, les résultats présentés dans la section précédente indiquent qu'un tel traitement reste inefficace sur les spores de *Clostridium* sp. *botulinum* type E

like. Afin de trouver un moyen d'inactiver ces spores par HP, l'usage d'une bactériocine d'une classe différente de celle de la nisine a ainsi été testé. Dans cet objectif, la pédiocine a été choisie pour son appartenance à la classe II-a des bactériocines dites « Pediocin-like », regroupant les bactériocines ayant une forte activité anti-*Listeria* [204]. Leur mécanisme d'action sur les membranes des cellules végétatives à Gram positif diffère de celui de la nisine. En effet, plutôt que de cibler les lipides II, les bactériocines de classe II s'insèrent dans les membranes grâce à l'interaction de leur partie hydrophile avec les têtes polaires des phospholipides membranaires [300].

A l'heure actuelle, aucune publication ne traite de l'effet de la pédiocine sur les spores de *Clostridium*, en particulier dans le cas d'un usage combiné avec un traitement HP. Le but de cette étude complémentaire a donc été dans un premier temps d'évaluer la sensibilité des spores de *Clostridium* sp. *botulinum* type E like à la pédiocine. L'effet de la combinaison de cette bactériocine et d'un traitement HP sur l'inactivation de ces spores a ensuite été testé.

3.2. Matériel et méthodes

3.2.1. Évaluation de la sensibilité de *Clostridium* sp. à la pédiocine.

La sensibilité des spores de *Clostridium* sp. *botulinum* type E like DSM 1985 a été comparée à celle des spores de *B. subtilis* PS533 et *B. weihenstephanensis* KBAB4, ainsi qu'à celle de *Listeria monocytogenes* ATCC 7644. Cette dernière souche a été ici utilisée pour sa sensibilité reconnue à la pédiocine [300,301].

Des suspensions à 10^7 UFC/mL de spores de *B. subtilis*, *B. weihenstephanensis* et *C. botulinum* type E like ont été produites suivant le protocole décrit dans le chapitre 2.2.1 précédent. Pour *L. monocytogenes*, une culture a été obtenue suivant le protocole décrit par Zoz *et al.* (2016) [302]. Cette culture a ensuite été centrifugée (3600g – 10 min – 25 °C) et re-suspendue à une concentration finale de 10^7 UFC/ mL dans du tampon phosphate (Sigma-Aldrich, France).

2 mL de chacune de ces suspensions ont ensuite été étalées sur leur milieu gélosé respectif (**Tableau 9**) préalablement coulés dans de grandes boîtes de Pétri (diamètre 150 mm). Après séchage (5 min à l'air ambiant) et stockage à 4 °C pendant 1h, des trous de 9 mm de diamètre ont été creusés à l'aide d'un emporte-pièce dans chacune de ces géloses.

Tableau 9: Milieux gélosés et conditions d'incubation des souches

	Milieu gélosé	Incubation
<i>B. subtilis</i>	LB, 15g/L (Luria Broth, Sigma-Aldrich, France) + agar type E, 15 g/L (Biokar, France)	24 h – 37 °C
<i>B. weihenstephanensis</i>	BCP (Biokar, France)	48 h – 30 °C
<i>C. botulinum</i>	VSFR (Biokar, France)	48 h – 30 °C en anaérobie
<i>L. monocytogenes</i>	TSA (Sigma-Aldrich, France)	48 h – 37 °C

Dans le même temps, des solutions de pédiocine concentrées à 0 ; 5 ; 10 ; 20 ; 40 ; 60 et 80 mg/L ont été préparées en diluant une solution mère à 100 g/L (Sigma-Aldrich France) dans du tampon MES (0,1 M, Sigma-Aldrich, France).

Des volumes de 50 µL de chacune des solutions de pédiocine ont ensuite été déposés aléatoirement dans les trous des géloses. Après incubation (voir **Tableau 9**) les diamètres d'inhibition autour des trous ont été mesurés et rapportés à la concentration initiale de la solution de pédiocine utilisée.

3.2.2. Effet d'un traitement combiné HP – pédiocine sur l'inactivation des spores de *Clostridium* sp.

Une suspension de spores de *Clostridium* sp. (10^8 UFC/mL) dans de l'eau distillée a été diluée au 1/10^e dans du tampon MES à 0,11M supplémenté ou non avec 80 mg/L de pédiocine (Sigma-Aldrich, France). Ces suspensions de spores avec et sans pédiocine ont ensuite été traitées par HP à 500 MPa pendant 10 min, à 50 °C ou 20 °C, comme décrit paragraphe 2.2.3 précédent.

Immédiatement après traitement, les suspensions de spores ont été diluée dans du tampon phosphate puis étalées sur du milieu VSFR (Biokar, France) supplémenté avec 8 mg/L de pédiocine. Après incubation à 30 °C pendant 48 h en anaérobie les colonies ont été dénombrées.

Des suspensions non traitées par HP ou traitées par HP et dénombrés sans pédiocine ont été utilisées comme témoins des effets indépendants de la pédiocine et du traitement HP.

3.3. Résultats et discussion

La sensibilité relative des spores de *Clostridium* sp. à la pédiocine a été comparée à celle de *B. subtilis*, *B. weihenstephanensis* et *L. monocytogenes*. L'effet de

plusieurs concentrations en pédiocine sur la taille de halos d'inhibition mesurés sur des géloses inoculées avec ces 4 souches de bactéries est présentée **Figure 25**.

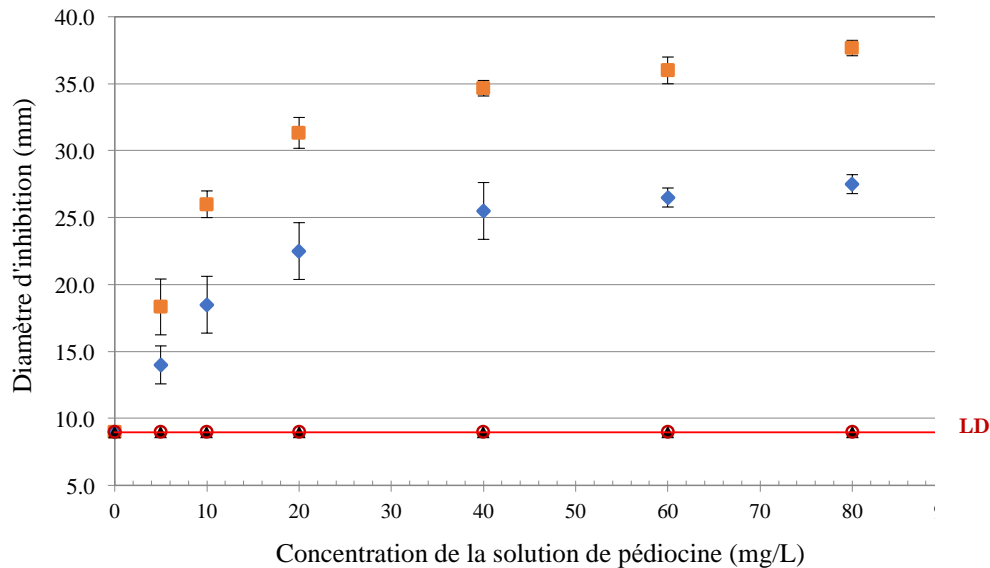


Figure 25 : Effet de différentes concentrations en pédiocine sur la formation de halos d'inhibition sur des géloses inoculées avec *L. monocytogenes* (carrés orange) et des spores de *B. subtilis* (cercles rouges), *B. weihenstephanensis* (triangles noirs), *Clostridium sp.* (losanges bleus)

LD : limite de détection des halos d'inhibition. Les barres d'erreur représentent les écarts types calculés à partir de trois répétitions indépendantes.

La sensibilité de *Clostridium sp.* semble donc largement supérieure à celles de spores de *Bacillus spp.*. Des résultats similaires ont été rapportés par Meghrouis *et al.* (1999), démontrant une plus forte sensibilité des spores de *Clostridium spp.* (*C. butyricum*, *C. perfringens*, *C. sporogenes*, *C. tyobutyricum*) à la pédiocine, par rapport à certaines espèces telles que *B. stearothermophilus* et *B. subtilis* [303].

Tout d'abord, ces résultats confirment que la souche de *L. monocytogenes* a une sensibilité accrue à la pédiocine, des halos d'inhibition étant observées dès les plus faibles concentrations testées (5 mg/L). Une réponse similaire est observée sur les spores de *Clostridium sp.*, avec toutefois une sensibilité moins marquée que la souche témoin de *L. monocytogenes*. Il apparaît cependant que, pour toutes les concentrations testées, aucun halo d'inhibition n'est mesuré pour les deux souches de spores de *Bacillus spp.*

La pédiocine semble ainsi avoir un effet antimicrobien marqué sur les spores de *Clostridium* sp.. La combinaison de cette bactériocine avec un traitement HP pourrait ainsi permettre une inactivation significative de ces spores. Dans cette optique, de la pédiocine (80 mg/L) a été ajoutée au milieu de traitement des spores ainsi que dans leur milieu dénombrement. Les résultats obtenus après une pressurisation à 500 MPa pendant 10 min à 20 °C ou 50 °C sont présentés **Figure 26**.

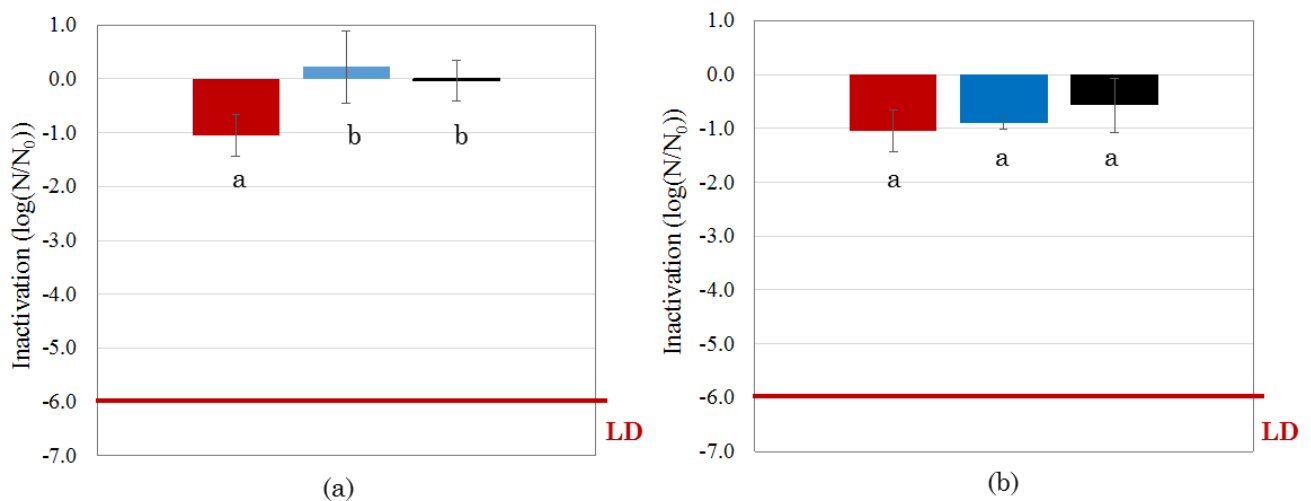


Figure 26 : Effet d'un traitement HP à 500 MPa ; 10 min en combinaison ou non avec de la pédiocine (80 mg/L), sur l'inactivation des spores de *Clostridium* sp.. (a) : Traitement HP à 20 °C ; (b) Traitement HP à 50 °C

Barres rouges : effet de la pédiocine seule; Barres bleues : effet du traitement HP seul; Barres noires : effet de les deux traitements combinés. LD : limite de détection ; Les barres d'erreur représentent les écarts types calculés à partir de 3 répétitions indépendantes. Des lettres différentes sont signe d'une différence significative entre deux valeurs ($p < 0.05$, test de Tukey).

Concernant les spores traitées à 50 °C (**Figure 26, (b)**), la combinaison du traitement HP avec la pédiocine n'induit aucune inactivation supplémentaire par rapport aux deux traitements indépendants (-1 log).

A l'inverse, les deux traitements appliqués à 20 °C (**Figure 26, (a)**) semblent avoir un effet antagoniste puisqu'aucune inactivation n'est observée, alors que l'application de pédiocine seule induisait une réduction d'un log la population de spores.

Aucune étude similaire ne permet de comparer ces résultats. Cependant, des auteurs ont aussi démontré que la combinaison des traitements HP avec certains agents antimicrobiens pouvait avoir un effet antagoniste sur l'inactivation des

spores. Hofstetter *et al.* (2013) ont ainsi observé que la reutéricycline, un acide antimicrobien synthétisé par *Lb. reuteuri* induisait une augmentation de la fluidité membranaire des spores de *C. sporogenes* et *C. beijerinckii*. L'ajout de reutéricycline pendant un traitement HP contrebalancerait la rigidification membranaire imposée par la pression, limitant ainsi l'inactivation des spores par ce procédé [296].

4. Conclusion et perspectives

Ainsi, l'application d'un traitement HP permet de sensibiliser les spores de *Bacillus* spp. à la nisine. Ajoutée dans le milieu de recouvrement, cette bactériocine permet ainsi d'inhiber durablement leur reprise de croissance, même si leur germination n'a pas été préalablement initiée par le traitement HP.

Si tel n'est pas le cas pour les spores de *Clostridium* sp., la substitution de la nisine par de la pédiocine ne permet pas non plus leur inactivation, même pour une température de traitement de 50 °C. La recherche d'une autre bactériocine ou d'un autre agent antimicrobien pouvant potentialiser l'action des HP s'avérerait donc utile dans ce cas.

Concernant les spores de *Bacillus* spp., bien que des hypothèses aient été émises pour expliquer leur sensibilisation à la nisine par les HP, les mécanismes impliqués restent à élucider. Les protéines membranaires deviennent-elles plus accessibles à la nisine ? L'intégrité de la membrane interne des spores est-elle altérée par le traitement HP ?

Le chapitre suivant vise ainsi à identifier et comprendre les mécanismes impliqués dans cette sensibilisation des spores par un traitement HP.

Chapitre 3

Investigation des mécanismes d'action des hautes pressions sur les spores de *Bacillus subtilis*

1. Introduction et objectifs

L'application d'un traitement HP permet de sensibiliser des spores de *Bacillus* spp. à la nisine. Cette sensibilisation ne semble pas uniquement liée à l'induction de la phase I de la germination, puisque des spores non inactivées par un traitement thermique deviennent sensibles à cette bactériocine après un traitement HP. Il est donc possible que des phases plus précoces de la germination ou que d'autres mécanismes soient impliqués dans cette sensibilisation des spores par HP. L'objectif de cette étude est donc d'identifier les mécanismes précis de l'action des HP sur une population de spores. Une étude structurale par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) a ainsi été menée à l'échelle de l'individu sur une population de spores traitée en HP. Cette technique, mise au point pour la première fois sur des spores bactériennes, a été mise à disposition par la ligne SMIS du Synchrotron Soleil.

2. Understanding the effects of high-pressure at moderate temperature on bacterial spores using synchrotron infrared spectroscopy

For publication in *Frontiers in Microbiology*

Chloé MODUGNO, Caroline PELTIER, Hélène SIMONIN, Laurence DUJOURDY, Francesco CAPITANI, Christophe SANDT, Jean-Marie PERRIER-CORNET

2.1. Introduction

High pressure (HP) process is the most widely used non-thermal processing for the stabilization of commercial foods. By reducing the microbial load, this process extends the food shelf-life while responding to the consumers' demand for freshly prepared foods with high sensory and nutritional quality [137,140,141,304,305]. Industrial HP machines are currently designed to treat foods at pressures up to 700 MPa at ambient or refrigerated temperatures, ensuring a full inactivation of foodborne pathogens, spoilage microorganisms and deteriorative enzymes [140,141]. However, the persistence of bacterial spores is the Achilles' heel of this process, as

Clostridium botulinum, *Bacillus cereus* and other pathogenic and alteration species can easily resist and multiply after the treatment [306].

When submitted to HP process at moderate temperature ($< 50\text{ }^{\circ}\text{C}$), bacterial spores are induced in germination by two different processes, depending on the pressure level applied. While moderate HP ($< 400\text{ MPa}$) induces spore germination by triggering the germinant receptors (GRs) located in the inner membrane of spore, HP above 500 MPa induces GRs-independent germination by triggering dipicolinic acid (DPA) release from the spore core [33,307,308]. Since spores are germinated, they lose their inherent resistance and can be then inactivated by other inactivation process [49,259]. Therefore, the hurdle strategy consists in inactivating bacterial spores by combining HP with other non-thermal processing. However, a recent study showed that the application of the bacteriocin nisin on spores treated by HP resulted in the inactivation of germinated and non-germinated spores [309]. The authors hypothesized that more than inducing spores in germination, HP sensitized them by another pathway.

In order to investigate whether or not the germination process is involved in the spore sensitization to further stresses such as nisin addition, a method using Fourier-transform infrared (FTIR) microspectroscopy was used. Indeed, FTIR spectroscopy is a powerful analytical method to characterize cell metabolism and biochemical properties of biomolecules such a lipid, proteins, nucleic acids, etc. This method has already been used on spores by some authors, bringing new knowledge about species-related biochemical composition or about the effect of HP process on their structural properties [310,311]. However, these studies have been conducted on bulk samples, providing a single average spectrum which characterizes millions of spores. Microspectroscopy coupled with the synchrotron light as source of infrared photons was used in this study to explore the heterogeneity of the spore population. The main objective of our study was therefore to use the high spatial resolution of FTIR technology in order to identify accurately the physiological changes imposed by HP treatment at moderate temperature ($< 50\text{ }^{\circ}\text{C}$).

2.2. Material and method

2.2.1. Bacterial strains, growth and sporulation conditions

Bacillus subtilis PS533 (provided by the Department of Molecular, Microbial, and Structural Biology, University of Connecticut Health Center, USA) was used for this study.

For sporulation, cultures were obtained by inoculating 2-3 fresh colonies into 50 mL of nutrient broth. After incubation (see **Table 9**), 0.4 mL of the culture was spread on sporulation Petri dishes. Sporulation was monitored by phase contrast microscopy and spores were harvested when more than 95% of phase bright spores were observed. Spores were harvested by flooding the agar plates with cold sterile distilled water and scraping the agar surface with a sterile cell spreader. Spore suspensions were then centrifuged (3600 g, 15 min, 4 °C) and spores were suspended in 0.2 µm filtrated 70% ethanol (filter: cellulose acetate, Sartorius, France; ethanol: Elvetec, France) for 1 h to inactivate vegetative cells [287]. Spores were then washed three times by successive centrifugation (3600 g, 15 min, 4 °C) and suspension in sterile distilled water at 4 °C. Spores were enumerated by CFU determination on LB medium (Luria Broth, Sigma-Aldrich, France). The concentration of the final spore suspensions was standardized at 10⁹ CFU/mL for the *B. subtilis*, frozen overnight at -80 °C and freeze-dried (FreeZone 18, Labconco, Kansas City, USA). Spore crops were stored at 4 °C for a maximum of one month until use.

2.2.2. HP treatments and control samples

HP tests were performed in a Top Industrie 700 MPa vessel (France) with a metal pressure chamber of 7 cm³ (working temperature: -20 °C / 120 °C). Water was used as the pressure-transmission fluid. The internal temperature of the pressure chamber was controlled by flooding the pressure chamber in a water bath (Minisat 240, Huber, Germany). In order to limit the adiabatic heating during compression, the compression rate was set to 3 MPa/s. The decompression was nearly instantaneous (< 3 s).

The lyophilized spore stock was suspended into 0.11 mol/L 2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid (MES, Sigma Aldrich, France) to obtain final suspension of approximatively 10⁷ CFU/mL (Sigma Aldrich, France). MES buffer was chosen because its pH varies only slightly with temperature and pressure

($\Delta pK_a/^\circ C = -0.011$; pH varies from 5.5 to 6.5 between 10 and 1000 MPa at 25 °C) (Bruins *et al.* 2007). 0.5 mL of each spore suspensions in MES was heat-sealed into polyethylene pouches (polyethylene transfer pipet, Dominique Dutscher).

Pouches were placed in HP vessel 5 min before treatment in order to let the temperature equilibrate. Samples were treated at 500 MPa for 10 min, at 20 °C or 50 °C centrifuged at 11200 g for 5 min at 4 °C and suspended in distilled water.

As control, germinated spores were obtained by suspending lyophilized spores into LB medium (Luria Broth, 15 g/L, Sigma-Aldrich, France) to a final concentration of 10^7 CFU/mL. Spores samples in LB were incubated for 45 min at 37 °C and washed twice by successive centrifugations at 11200 g for 5 min at 4 °C and resuspensions in sterile distilled water.

In order to obtain inactivated spores, lyophilized spores were suspended in sterile distilled water at a final concentration of 10^7 CFU/mL and treated in a dry bath (ref) at 121 °C for 30 min. Inactivated spore samples were then centrifuged at 11200 g for 5 min at 4 °C and suspended in sterile distilled water.

All the samples were stored at 4 °C for a maximum of 30 min until analysis.

2.2.3. Effect of HP on *B. subtilis* spores inactivation, germination and sensitivity to nisin

B. subtilis spores were treated by HP as described in paragraph 2.2.2. After treatment, samples were divided into three equal volumes. The first volume was serially diluted and plated on LB medium (Luria Broth, 15 g/L, Sigma-Aldrich, France; Bacteriological Agar Type E, 15g/L, Biokar, Bauvais, France) for CFU determination. The second volume was plated on LB medium supplemented with 50 IU/mL of nisin (Sigma-Aldrich, France), following a protocol described by Modugno *et al.* (submitted) [309]. The third volume was treated at 80 °C for 10 min in a water bath in order to inactivate germinated spores, before being serially diluted and plated on LB Petri dishes for enumeration. The fraction of spores induced in germination by HP was calculated as the difference between the logarithmic counts of in pressure- and heat-treated (N_{HPT}) and pressure-treated (N_{HP}) portions of the samples ($\log_{10}(N_{HPT}) - \log_{10}(N_{HP})$).

A control sample for the effect of nisin alone was made by plating non HP-treated spores samples on LB medium supplemented with nisin.

2.2.4. Synchrotron FTIR microspectroscopy of bacterial spores

The effect of HP on spores was monitored with synchrotron FTIR microspectroscopy.

Synchrotron infrared microscopy was performed on the SMIS beamline at the SOLEIL Synchrotron Facility (Saint Aubin, France), as previously described by Passot *et al.* (2015) [312]. Briefly, spectra were recorded on a continuum XL microscope (ThermoFisher Scientific, Villebon sur Yvette, France) coupled to a Nicolet 5700 FT-IR spectrometer (ThermoFisher Scientific). The microscope includes a motorized sample stage and a liquid nitrogen-cooled mercury cadmium tellurid (MCT-A) detector. It operates in confocal mode with dual apertures and uses a x32 infinity-corrected Schwarzschildtype Reflachromat objective and a matching x32 condenser with the same numerical aperture. Individual spectra were acquired at 4 cm⁻¹ spectral resolution, with 256 co-added scans encompassing the mid-IR region from 4000 to 400 cm⁻¹. The microscope is also equipped with a mercury lamp source, dichroic cubes and emission filters, allowing infrared and fluorescent measurement.

Spores treated by HP were washed twice in deionized water to remove the MES buffer and 2 µL of the suspension was deposited on the base of an IR transparent zinc-selenide (ZnSe) 4 mm diameter attenuated total reflectance (ATR) hemispherical internal reflection element (refractive index: n=2.4; ISIP Optics Corp., Latvia)[312]. The sample drop was dried for 5 min under a slight air flow at room temperature. The hemisphere was then deposited under the microscope, its base facing a glass slide. Single bacterial spores were localized using the visible objective (**Figure 29**). For each sample treated by HP, 50 spores were selected and their IR-spectra were recorded. For Control samples, 25 spectra were recorded. Moreover, three free-spore zones were located and selected as a background infrared signal (**Figure 27**).

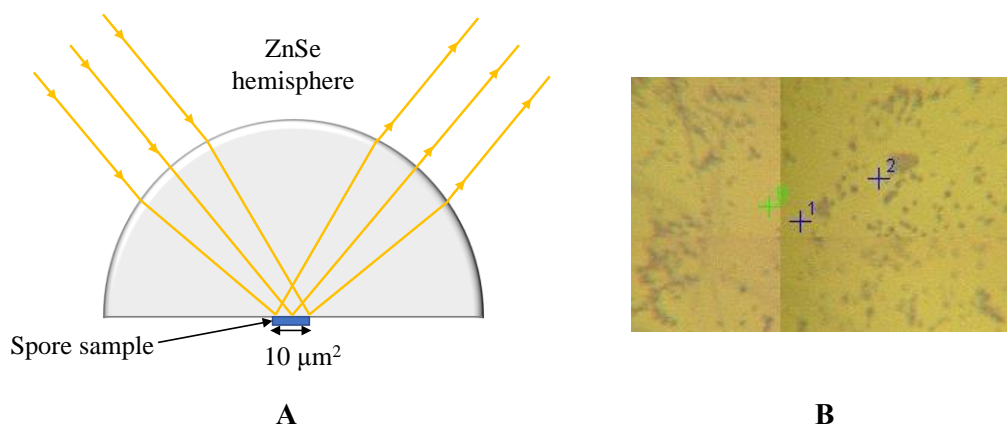


Figure 27 : Schematic representation of light beam crossing the zinc selenide (ZnSe) ATR hemisphere (A) (inspired from Passot *et al.* (2015)) [312] and individual spore (blue crosses) and blank (green cross) selection

The ATR mode was chosen to improve the spatial resolution, in order to focus on single spores. Due to the high refractive index of ZnSe, the area scanned with ATR element was approximately $10 \mu\text{m}^2$. This high resolution was obtained without compromising the spatial resolution of the infrared signal thanks to the synchrotron infrared radiation [312].

2.2.5. Chemometrics tools

- **Preprocessing**

Mathematical pretreatments are necessary in order to eliminate experimental biases in spectral data. The classical preprocessing techniques are baseline correction, normalization, derivatives and smoothing [313,314].

Combinations of these techniques were computed in this order: baseline correction (for reducing systematic variation from background signal), Savitsky-Golay (SG) filters (for reducing the amount of random variation such as noise) and normalization (in order to remove systematic variation associated with the total amount of the sample). With SG pretreatment, each point is replaced by a smoothed estimate obtained from a local polynomial regression. This pretreatment can be applied on the raw data, but on spectrum derivatives (1st or 2nd) too. The choice of two parameters is required: w corresponding to the window size in polynomial smoothers, and p the polynomial order. In this study, the optimal window size and polynomial order were obtained with $w = 13$ and $p = 3$.

All these analyses were computed using R 3.3.2 [289]. The package ‘prospectr’ [315] was used for Savitsky-Golay and the package ‘hyperSpec’ [316] was used for the other pretreatments.

- **Data reduction**

A single FTIR spectrum is represented by 1867 variables (IR region from 400 to 4000 cm^{-1}). From the whole spectra, it was observed that the two most informative parts were found from 2800 – 3050 cm^{-1} and 1500 – 1800 cm^{-1} corresponding respectively to the lipid and the protein zones. In order to keep only useful information, these regions were pretreated separately.

- **Principal component analysis (PCA)**

Principal component analysis (PCA) is widely used as exploratory chemometric tool and allows a reduction of variables while providing projections of data in a new space explaining variance among the data set. The new axes obtained are called principal components (PCs), which are constructed with linear combinations of the original variables, in order to keep the most variance in the first PCs. Here, the variables are the different wavelengths. They are consequently numerous and can be ordered. In contrast with usual PCA – where loadings can be represented with a correlation circle –, the loadings are here represented with a curve presenting the value of the loading on the PC (ordinate) according to the wavelength (abscissa). Thus, each PC is related to a curve which can be interpreted like a spectrum [317]. The positives and negatives peaks observed on these spectra correspond to the spectral zones involved in the discrimination of the spectra. PCA was performed using R (3.3.2) (prcomp function in stats package). The best data separation was obtained using baseline correction following by SG ($w = 13$, $p = 3$), 2nd derivative and normalization.

PCA were performed on the spectra of HP treated spores at 50 °C or 20 °C and on germinated, dormant and germinated spores (control samples) and processed on the lipid (3050 – 2800 cm^{-1}) and on the amid regions (1800 – 1500 cm^{-1}). Some of them correspond to well-known IR spectral region associated to the spectral features of the considered spore clusters. These IR spectral regions identified as indicator of specific protein and lipid structure are summed up in **Table 10**.

Table 10: Main spectral region indicating specific protein and lipid spore structures

Domain	Spectral band cm ⁻¹	Assignment	References
Lipid	2965 – 2960	CH ₃ asymmetric stretching band	[311,318]
	2920	CH ₂ asymmetric stretching band	[319–321]
	2855 – 2852	CH ₂ symmetric stretching band	[319–321]
Amid	1665 – 1660	α -helix	[311,318,322]
	1630 – 1620	β -sheets	

2.3. Results

2.3.1. Effect of HP on spore inactivation-germination and sensitivity to nisin

The inactivation, germination and sensitivity to nisin of *B. subtilis* spores were evaluated after HP treatment at 500 MPa for 10 min at 50 °C or 20 °C. Results are presented on **Figure 28**. While HP treatment and nisin alone induced less than 1.5 log inactivation, the application of nisin after HP (whether at 50 °C or 20 °C) induced the inactivation of the whole spore population (7 log). If the HP treatment conducted at 50 °C induced the germination of 2 log (99%) of the “non-HP inactivated” spores, the germination observed after HP treatment at 20 °C is weaker (0.2 log i.e. 47%).

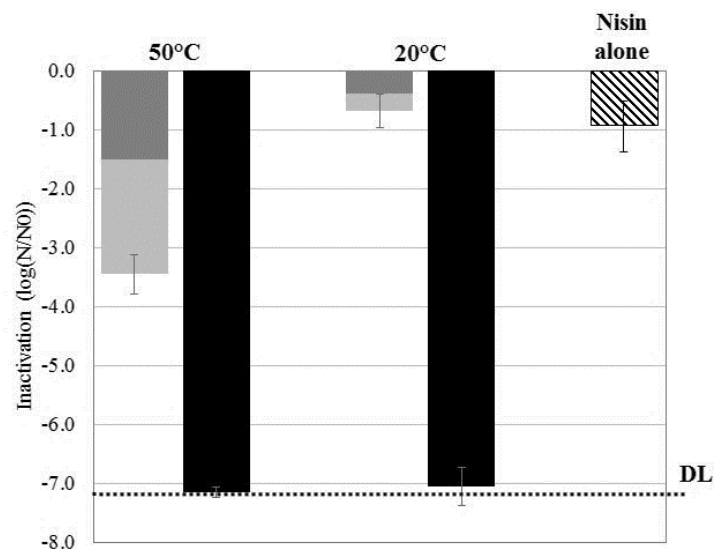


Figure 28: Effect of HP (500 MPa – 10 min – 50 °C or 20 °C) on the inactivation (dark grey, germination (light grey) and sensitization to nisin (black) of spores of *B. subtilis*.

Striped bar represents the effect of nisin alone on spore inactivation. DL: detection limit.

2.3.2. Analysis of lipid domain by FTIR microscopy

The PCA for the spectral region of lipids is presented on **Figure 29 A**. First of all, regardless of the control samples, the PCA score plot shows a clear cluster separation between spores treated by HP at 50 °C (HP₅₀) and the ones treated at 20 °C (HP₂₀). The HP₅₀ and germinated spore clusters are clearly overlapping, showing high similarity between these two groups. Conversely, the sample clustering of HP₂₀ spores shows 3 distinctive groups named Gr1, Gr2 and Gr3, respectively and presents heterogeneous and unique properties, one part of the population being close to the germinated spores (Gr2), another part presenting similarities with dormant spores (Gr1).

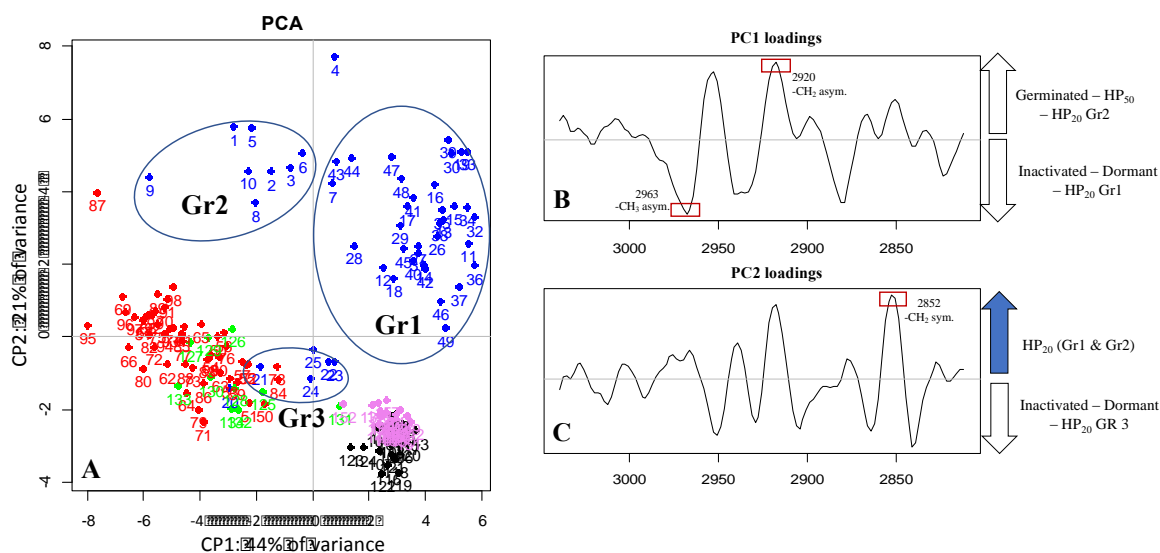


Figure 29: Principal component analysis (PCA) of infrared spectra obtained on control spore samples (germinated: green dots; dead: black dots; dormant: pink dots) and spores treated by HP at 500 MPa – 10 min at 50 °C (red dots) or 20 °C (blue dots) on the spectral region of lipids (3050 – 2800 cm⁻¹)

A: Principal component 1 (PC1) vs. principal component 2 (PC2) score plots in the spectral regions of lipids (3050-2800 cm⁻¹); **B:** Loading plot of PC1; **C:** Loading plot of PC2.

The loading plot of PC1 (**Figure 29 B.**) isolates the Gr2; HP₅₀ and germinated spore clusters from Gr1, inactivated and dormant spores. The major contribution to the spectral variation between these groups arose from the wavelength related to the C-H asymmetric stretching of CH₃ (2963 cm⁻¹) and CH₂ (2920 cm⁻¹). Regarding the second derivative spectra of the CH₃ stretching band (**Figure 30 A**), a marked downshift of 3 cm⁻¹ is observed for Gr2; HP₅₀ and germinated spectra.

The loading plot of PC2 (**Figure 29, C.**) isolates Gr1 and Gr2 from the other samples and reveals that Gr1 and Gr2 groups are both correlated to the C-H symmetric stretching band of the CH₂ alkyl group (2852 cm⁻¹) [318]. The loading plot of PC2 reveals that Gr1 and Gr2 groups are both correlated to the C-H symmetric stretching band of the CH₂ alkyl group (2852 cm⁻¹) [318]. The second derivative of the mean infrared spectra of the CH₂ alkyl group spectral bands contributing to the spectral variation observed between HP₂₀ Gr1&Gr2 and the other groups is presented on **Figure 30**. While a negative peak is visible on the spectra all the groups except for HP₂₀ Gr1 and Gr2 for which positive peaks are present. These peaks seem likely due to a shift of the band presents at 2862 cm⁻¹.

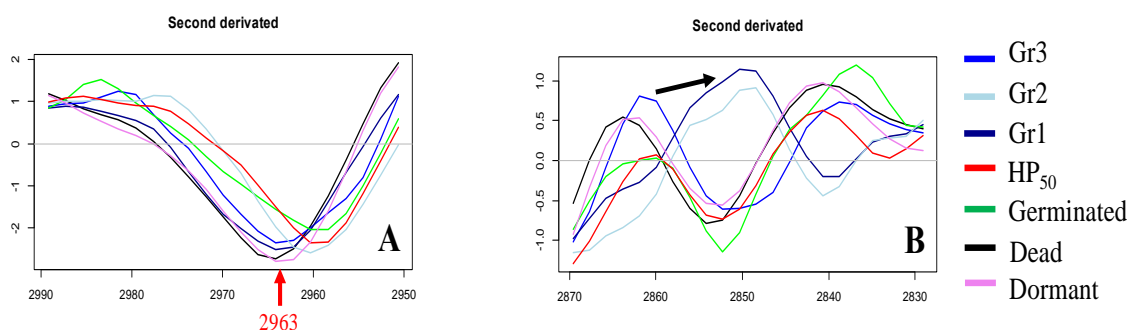


Figure 30: Second derivative of the mean infrared spectra of control spore samples (germinated; dead; dormant) and spores treated by HP at 500 MPa – 10 min at 50 °C or 20 °C

A: Second derivative spectra on the spectral domain 2950 – 2990 cm⁻¹; B: Second derivative spectra on the spectral domain 2870 – 2830 cm⁻¹.

The ambiguous position of the Gr3 cluster, relatively close to the origins of both the PC1 and PC2 score plots, gives poor information about its spectral characteristics. Nonetheless, the loading plot of PC2 indicates that Gr3 spectra displayed similar spectral contributions as inactivated and dormant spore clusters.

2.3.3. Analysis of the amid domain by FTIR microscopy

The 3 groups of HP₂₀ spores identified on the lipid domain were kept and selected again on the PCA performed on the amid domain (1800 – 1500 cm⁻¹), presented on the **Figure 31**. Regarding the loading plot of PC1 and PC2 (**Figure 31, B, C**), the major contribution to the spectral variation between germinated, HP₅₀, HP₂₀-Gr2 spores and other groups arose from the wavelength related to α -helix (1660 cm⁻¹) and β -sheets (1620 cm⁻¹).

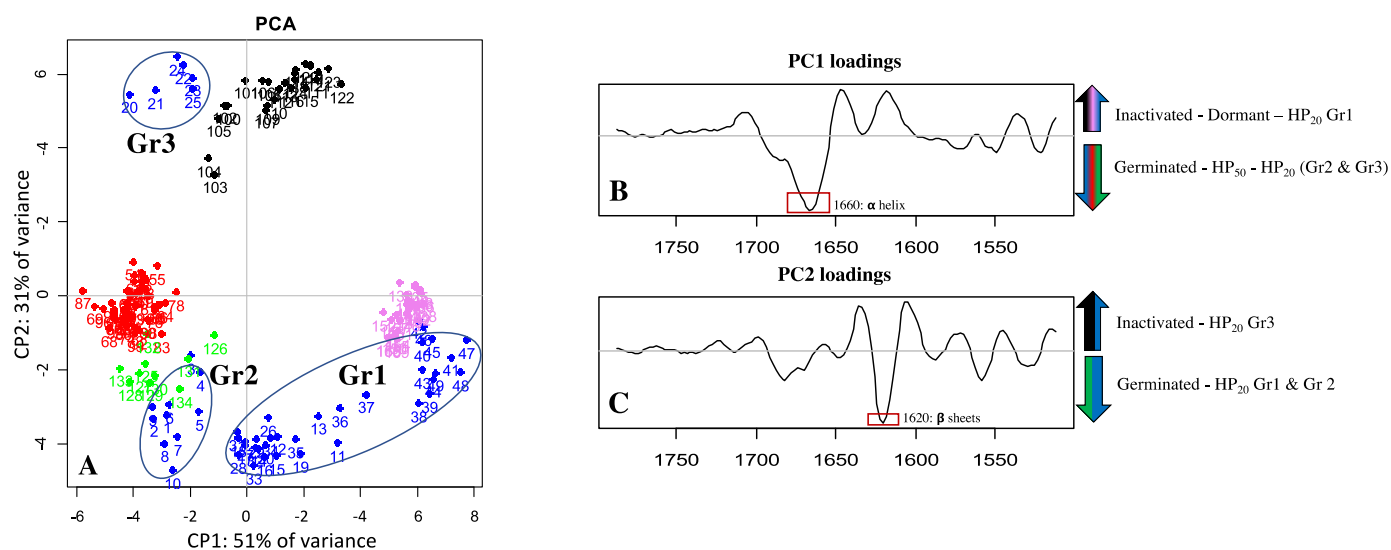


Figure 31: Principal component analysis (PCA) of infrared spectra obtained on control spore samples (germinated: green dots; dead: black dots; dormant: pink dots) and spores treated by HP at 500 MPa – 10 min at 50 °C (red dots) or 20 °C (blue dots) on the spectral region of amid I and II (1800 – 1500 cm⁻¹).

A: Principal component 1 (PC1) vs. principal component 2 (PC2) score plots in the spectral regions of amid I and II (1800 – 1500 cm⁻¹); B: Loading plot of PC1; C: Loading plot of PC2.

The analysis of the **Figure 31 A** and **B** indicates high similarities between the amid properties of the HP₅₀, HP₂₀ Gr2 and germinated spores. Conversely, higher cell dispersion was observed within the HP₂₀ Gr1 group, one part presenting similar features as dormant spores and the other one approaching germinated spores. According to the PC2 loading plot, spores of the group 3 (Gr3) seem here presenting similar amid properties as dead spores.

Regarding the loading plot of PC1 and PC2 (**Figure 31, B, C**), the major contribution to the spectral variation between germinated, HP₅₀, HP₂₀-Gr2 spores and other groups arose from the wavelength related to α -helix (1665 cm⁻¹) and β -sheets (1630 – 1620 cm⁻¹).

The second derivative spectra on the amid domain of the control samples (germinated, inactivated, dormant spores) and the three groups of HP₂₀ are presented on **Figure 32**. While the band corresponding to α -helix is centered around 1660 cm⁻¹ on the spectra of dormant and HP₂₀ Gr1 spores, a clear shift of this band toward 1654 cm⁻¹ is observed on spectra of germinated, HP₅₀ and HP₂₀ Gr2&3 spores. The band located at 1620 cm⁻¹ also bring the information that Gr3 and inactivated

spores spectra present similar feature, as a sharp negative peak is only observed for these two spectra.

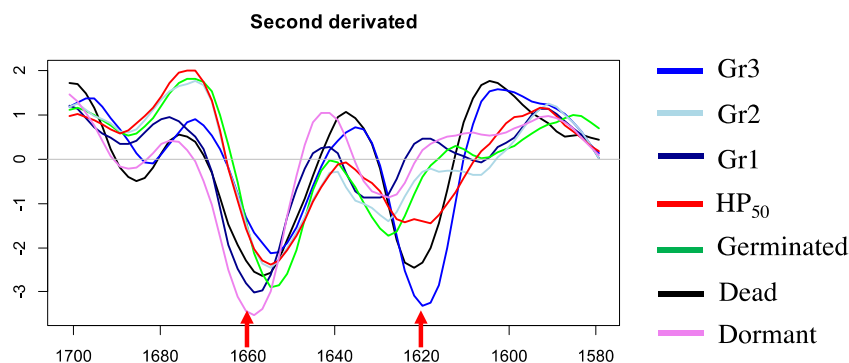


Figure 32: Second derivative of the mean infrared spectra (domain 1700 – 1580) of control spore samples (germinated; dead; dormant) and spores treated by HP at 500 MPa – 10 min at 50 °C or 20 °C

2.4. Discussion

Spore germination is associated to the recovery of a wide range of stress, such as heat, high pressure or the presence of antimicrobial agents [33]. Therefore, it is thought that the synergy between HP and other processes on spores inactivation is due to the inactivation of spores which have been first induced in germination by HP. Results presented in **Figure 28** indicated that this hypothesis could be validated in the case where spores were processed at 50 °C. Indeed, a large part of the spore population was germinated before its subsequent inactivation by nisin. However, this is not the case after HP-treatment conducted at 20 °C. While a weak proportion of the spore population was germinated, the whole spore population was subsequently inactivated by nisin. This finding indicates that spore germination is not the only mechanism inducing their HP-sensitization to nisin. Similar results were found in our previous study, showing that spores of *Bacillus* spp. treated by HP were sensitized to low concentration of nisin while their germination was not detected [309]. In order to identify the mechanisms underlying this phenomenon, study of HP treated spores was conducted by microspectroscopy.

For the first time, the tracking of individual spores by microspectroscopy led to an accurate identification of the impact of HP on their structure. Instead of observing a whole spore population by “classic” FTIR spectroscopy methods, this technic allows the observation of the structural properties of single spores.

After their treatment by HP at 500 MPa; 50 °C or 20 °C, spores were immediately placed on the ZnSe hemisphere and dried for 5 min. The analysis once obtained by microspectroscopy gave a faithful “picture” of the physiological states of individual spores, at a maximum time of 5 min after treatment.

As expected and largely described in the literature, the changes induced by HP at 50 °C were fully linked to the induction of the spore germination [49,308]. Indeed, the PCA analysis did not permit to discriminate the HP₅₀ group from the germinated control group, whether on the amid or lipid domains. The similarities between these two populations were also confirmed by the switch of their α -helix spectral band (1665 cm^{-1}), previously identified as one of the markers of spore germination [322]. Therefore, the HP treatment at 50 °C induced a rapid spore germination with a fast impact on the membrane and proteins structure and characteristics. These results are consistent with other studies showing a rapid induction of spore germination when submitted to pressure treatment at temperature above 40 °C [49,311].

Considering spores treated at 20 °C, heterogeneous spectral characteristics were observed. In a general manner, three spore populations were discriminated named Gr1; Gr2 and Gr3. High similarities were found between Gr1 and dormant spores; and Gr2 and germinated spores. However, analysis on their lipid domain reveals atypical property of the CH₂ groups, resulting in the presence of a positive peak centered around 2852 cm^{-1} . The modification of the spectral features of this specific band was previously linked to changes in the membrane viscosity, known as an important step of spore germination [35,312,323,324]. As this particular peak was not found on the germinated control sample, it could be due to a transitory modification of spore membrane properties, occurring since the very beginning of the germination process. Works concerning the study by FTIR spectroscopy of germinating spores are scarcely reported on the literature. However, Loison (2013) reported that the intensity of the spectral band of CH₂ of a whole spore population increased during the germination process [324].

Focusing on the amid regions of the Gr1 and Gr2, it has been seen that Gr2 spores presented all the spectral characteristics of germinated spores. However, Gr1 was divided into two subgroups: one displaying some spectral signature of germinated spores and a second one composed of dormant spores. First of all, this

fact confirms that spores of Gr2 group are in an advanced phase of germination. Secondly, it is interesting to note that even if Gr1 group has a lipid structure close to dormant spores, some spores have protein structure of germinated spores.

At moderate temperature, high pressure above 500 MPa induces spore germination by triggering dipicolinic acid (DPA) release from the spore core [33]. The DPA release leads to the activation of the cortex lytic enzymes and to a partial hydration of the spore core. This first phase of germination (phase I), is followed by the cortex lysis and the total spore rehydration, named phase II. It has been recently showed that these two phases are concomitant with a rapid establishment of the metabolic activity, as one third of the proteome of the future vegetative cell is synthesized during this time [50,325]. The accurate timescale of these steps is still unknown but it is thought that steps I and II happen within the first 30 min at 37 °C after the induction of germination [50,325]. The kinetic of this process is fully dependent of the temperature, as DPA release is twice as slower at 20 °C than at 50 °C during a HP treatment at 150 MPa [326]. Therefore, we can consider that applying the HP treatment at 20 °C just induced spores in germination. After depressurization, the germination process is slowed to a crawl by the analysis method implying drying on the ZnSe hemisphere. The analysis of the amid and lipid domain of these spores by FTIR spectroscopy thus showed a “picture” of the characteristics of the different populations once obtained. At the end of the treatment, some spores are still dormant while other groups start their germination process (Gr1) or may have already restart their metabolic activity (Gr2). We can also assume that a rapid change of membrane properties is the first step of spore germination, followed by the modification of the protein properties.

It is well known that spores in phase I of germination recover they heat sensitivity [42,49]. However, Modugno *et al.* (under review) recently showed that applying a HP treatment at 500 MPa – 20 °C for 10 min did not led to the thermal sensitization of spores [309]. We can therefore assume that the characteristics of groups 1 and 2 is only due to initial steps of spore germination. Nonetheless, these spores were found to be sensitives to nisin. We can suggest that this simple induction in germination is sufficient to enhance spore sensitivity to these antimicrobial agents. As nisin acts on bacterial spores by targeting their lipid II, it is therefore possible that the first step of spore germination involves this specific molecule [229].

A third group (Gr3) was also observed having similar protein conformational properties as inactivated spores. If the induction of germination brings specific sensitivities to spores, it is possible that the drying step imposed by the analysis process has inactivated some part of the germinating population. However, no publication regarding spore sensitivity to drying was found in the literature to verify this hypothesis.

For the first time, the effect of HP on spores was observed at an individual scale. The microspectroscopy gave here the opportunity to identify accurately spore populations having singular properties. It seems clear that the HP conducted at 50 °C induced a rapid and homogeneous spore germination, as previously described in the literature, as these spores had all the lipid and protein conformational properties of germinated spores. However, spores submitted to HP at 20 °C react more slowly. If their membrane seems quickly impacted by the induction of their germination imposed by HP, the conformational modification of their protein appears in a second time. As these spores are in the early stage of germination, they cannot be detected by the current thermal treatment described in the literature to identify germinated spores [49]. Nonetheless, it is interesting to note that these physiological states may appear before the stage I of germination and are accompanied by the recovery of spore sensitivities to nisin or drying (see **Figure 33**). Further experiment focusing on the identification of the structures involved in this early stage of germination could potentially allow a subtler physiological characterization of these spores.

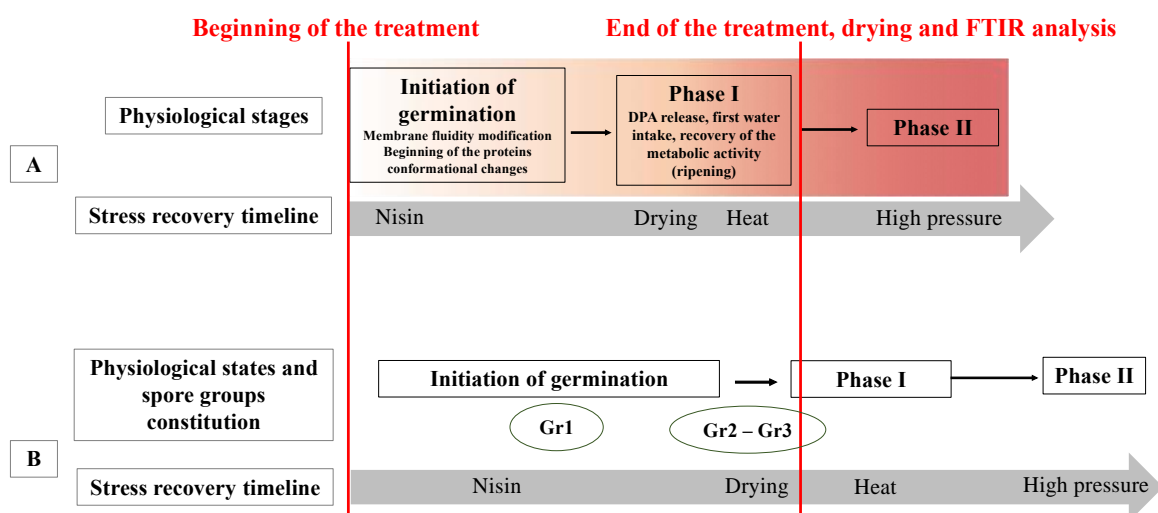


Figure 33: Effect of HP treatment at 500 MPa for 10 min at 50 °C (A) or 20 °C (B) on the spore physiological states and their sensitivity to further stress

3. Conclusion et perspectives

L'usage de la microspectroscopie IR couplée à des analyses chimiométriques a ainsi permis l'étude de l'effet de deux traitements HP sur des spores à l'échelle d'un individu. Certaines populations, qui seraient sans doute passées inaperçues lors d'analyses en spectroscopie « conventionnelle », ont ici été identifiées et caractérisées. Il est ainsi apparu qu'un traitement HP appliqué à 50 °C induisait une germination rapide et homogène des spores. Les caractéristiques biochimiques de ces spores, sont indissociables de celles de spores germées naturellement (nutriments).

A l'inverse, la population de spores traitées à 20 °C est apparue largement divisée en plusieurs groupes, ayant des caractéristiques partagées entre des spores dormantes et germées. Cette hétérogénéité, observable aussi bien lors de l'analyse de leur structures lipidique et protéique, révèle donc que la réponse des spores à un traitement HP à température ambiante n'est pas binaire (spore germée/spore dormante). En effet, si certaines spores semblent avoir largement entamé leur processus de germination, d'autres en sont seulement à la phase d'initiation. Cette phase d'initiation, très peu étudiée et non détectable par les méthodes conventionnelles d'analyse de la germination (traitement thermique, dosage du DPA), apparaît néanmoins être une étape clé dans le rétablissement de la sensibilité au stress des spores (nisine, séchage).

Cette étude, menée sur les spores de *B. subtilis*, serait néanmoins à compléter avec des résultats obtenus avec d'autres souches et notamment des souches pathogènes et d'altération.

Chapitre 4

Effet d'un traitement en hautes pressions sur les capacités antimicrobiennes d'une souche de bactérie lactique de biopréservation

1. Introduction

L'induction de la germination des spores par un traitement HP les rend sensibles à la nisine. Cependant, l'ajout de nisine pure lors de la formulation d'aliments est considéré au même titre que l'ajout d'un additif chimique et doit être signalé par la présence du numéro d'additif E 234 sur l'étiquette de composition, ce qui est souvent mal perçu par le consommateur. De plus, il a déjà été démontré que la complexation de la nisine avec certains groupements chimiques des produits carnés réduisait largement son effet antimicrobien au cours du temps [239,241,242]. Ainsi, l'ajout direct de ferments lactiques produisant de la nisine *in situ* dans les aliments pourrait permettre d'éviter ces deux problèmes.

L'effet des HP sur les bactéries lactiques varie en fonction du genre, de l'espèce mais aussi du milieu de traitement. De manière générale, les espèces du genre *Lactobacillus* résistent mieux aux HP que les lactocoques [327] et la présence de certains solutés dépresseur de l' a_w tels que le saccharose ou le chlorure de sodium induisent une plus forte résistance de ces bactéries aux HP [142]. Par ailleurs, il a été récemment démontré que même si une population de bactéries lactiques n'était plus détectable après un traitement HP, un temps de récupération suffisant leur permettait de reprendre leur croissance après quelques jours de stockage, et ce plus rapidement que d'autres flores endogènes [328].

Si l'impact d'un traitement HP sur la reprise de croissance de bactéries lactiques est bien décrit dans la littérature, l'effet d'un tel traitement sur les capacités antimicrobiennes de ces souches n'a pour le moment jamais été étudié. Il est cependant reconnu que les HP peuvent réprimer ou induire la synthèse de nombreuses protéines [329–332]. Les bactériocines sont des peptides microbiens dont la synthèse est finement régulée par des paramètres environnementaux tels que le pH, la présence de nutriment ou le *quorum sensing* [333–335]. Il est ainsi probable qu'un traitement HP puisse modifier les capacités de cultures de bactéries lactiques à en produire.

Dans cette étude, un traitement HP a été combiné à une souche *Lc. lactis* productrice de nisine. Dans un premier temps, l'effet de ces deux traitements a été évalué sur la reprise de croissance de spores de *B. subtilis* en suspension dans un

milieu nutritif. Dans un second temps, l'impact du traitement HP sur la reprise de croissance et les capacités antimicrobiennes *Lc. lactis* a été évalué.

2. Matériel et méthodes

2.1. Effet d'un traitement HP sur une co-culture *Lc. lactis* – *B. subtilis*

La souche de *Lc. Lactis* BS 30 a été utilisée comme souche de biopréservation productrice de nisine. Cette souche a été fournie gracieusement par la société Chr. Hansen. Des colonies ont été isolées sur du milieu M17 à partir de cryotubes stockés à -80 °C. Une pré-culture a été obtenue en inoculant 3-4 colonies dans 50 mL de MMH (composition Chapitre 2 section 2.2.5), incubé à 30 °C pendant 24 h sous agitation à 200 rpm. Une culture a ensuite été préparée en diluant 1 mL de la pré-culture dans 100 mL de milieu MMH. Après 13 h d'incubation à 30 °C sous agitation à 200 rpm, les cellules ont été prélevées par centrifugation (3600 g – 15 min – 25 °C), lavées dans du PBS (centrifugation 3600 g – 15 min – 25 °C et re-suspension dans PBS) et conservée à 4 °C pendant 30 min maximum.

Des spores de *B. subtilis* PS533 ont été préparées selon le protocole exposé **Chapitre 4, section 2.2.1.**

Une co-culture *B. subtilis* / *Lc. lactis* a été obtenue en inoculant 3,5 log (UFC/mL) de spores de *B. subtilis* et 6,5 log (UFC/mL) de *Lc. lactis* dans 100 mL de milieu MMH tamponné (composition **Chapitre 2, Section 2.2.5**). Ces taux d'inoculation ont été choisis de manière à refléter au mieux les taux d'inoculation et de contamination potentiels des industries alimentaires

Cette co-culture a ensuite été thermoscellée dans des sacs (Sacs PA-PE 1500 x 300 mm, Videmba, France) puis traitées à 500 MPa pendant 5 min à 20 °C (± 5 °C) dans une enceinte pilote Top-industrie (volume max. de traitement : 5 L). La montée en pression s'est faite à raison de 30 bar/s et l'échauffement adiabatique durant la montée en pression n'a pas excédé +5 °C par rapport à la température de consigne.

Une fois traitées, les cellules ont été immédiatement récupérées par centrifugation (3600 g – 15 min – 20 °C), reprises dans 100 mL de MMH non tamponné et mise à incuber à 30 °C sous agitation à 200 rpm. Un milieu non tamponné a été choisi dans cette partie de l'étude car des essais préliminaires ont indiqué que la présence de

tampon MES perturbait fortement la croissance de *Lc. Lactis* (données non présentées).

Toutes les deux heures, 1 mL de la co-culture a été prélevé, dilué dans du PBS et étalé sur des boîtes de milieu M17 (Sigma-Aldrich, France). Pour dénombrer la flore totale, certaines de ces boîtes ont été mises à incuber en aérobie à 30 °C pendant 48 h avant d'être dénombrées, tandis que d'autres ont été mises à incuber dans les mêmes conditions en jarre anaérobie pour ne sélectionner que la population de *Lc. lactis*. La population de *B. subtilis* a ainsi été calculée en soustrayant la population de *Lc. lactis* à la flore totale ($\log(\text{UFC/mL})_{B. subtilis} = \log(\text{UFC/mL})_{\text{Flore totale}} - \log(\text{UFC/mL})_{Lc. lactis}$).

Un suivi identique a été effectué sur des échantillons témoins ne contenant que *Lc. lactis* ou *B. subtilis* seuls ainsi que sur des co-cultures non-traitées en HP.

2.2. Effet d'un traitement HP sur la synthèse de nisine par *Lc. lactis*

Une culture de *Lc. lactis* a été obtenue en inoculant une colonie fraîche dans 50 mL de milieu M17 (Sigma-Aldrich, France). Les colonies fraîches ont été préalablement isolées sur des boîtes de milieu M17 à partir d'un cryotube stocké à -80 °C. Après 24 h d'incubation à 30 °C sous agitation à 200 rpm, 1 mL de la pré-culture a été dilué dans 100 mL de milieu M17. Après 14 h d'incubation à 30 °C, les cellules ont été récupérées par centrifugation (3600 g ; 25 °C ; 10 min) puis lavées deux fois par centrifugation et reprises dans du PBS (Sigma-Aldrich, France). Les cellules obtenues ont ensuite été remises en suspension à 10⁹ UFC/mL dans du MMH tamponné. Des échantillons de 1 mL de cette suspension ont été thermoscellés dans des capillaires en polyéthylène (pipette de transfert, Sigma-Aldrich, France) puis traités par HP à 500 MPa – 20 °C pendant 5 min.

Après traitement, chaque échantillon traité a été remis en culture dans 100 mL de MMH non tamponné et mis à incuber à 30 °C pendant 48 h. Toutes les heures, 3 mL de culture sont prélevés, neutralisés (NaOH 3 M, Sigma-Aldrich, France) et filtrés à 0,2 µm (Minisart, France). L'activité antimicrobienne de la solution obtenue est ensuite déterminée selon le protocole décrit **Section 2.2.1** et inspiré de la méthode développée par Tramer et Flower (1965) [265]. Dans le même

temps, 1 mL de la culture est aussi prélevé pour mesure de la densité optique à 600 nm.

Une population de *Lc. lactis* témoin, non traitée en HP a été analysé dans les mêmes conditions.

2.3. Analyses statistiques

Pour chaque manipulation, trois répétitions indépendantes ont été effectuées. Les barres d'erreurs apparaissant en **Figures 35 et 36** correspondent aux écarts types calculés à partir des trois répétitions indépendantes.

3. Résultats et discussion

L'effet d'un traitement conjoint HP/biopréservation sur la reprise de croissance de spores de *B. subtilis* a été évalué. Les spores dormantes ont ainsi été mises en culture avec la souche de *Lc. lactis* BS30 productrice de nisine dans le milieu MMH mimant les caractéristiques physico-chimiques d'un jambon cuit supérieur [309]. Après un traitement à 500 MPa – 20 °C – 5 min, le suivi de la reprise de croissance à 30 °C de ces deux populations a été effectué. Les résultats obtenus (**Figure 34, B**) ont été comparés à la reprise de croissance d'une co-culture témoin non traitée en HP (**Figure 34, A**). Dans le cas de la culture témoin, *Lc. lactis* domine très nettement la flore totale, induisant une décroissance de la population de *B. subtilis*, passant sous le seuil de détection dès la 6^e heure de culture. Alors qu'en culture simple la population de *B. subtilis* atteint 7 log (UFC/mL) dès 7 h d'incubation, il apparaît donc clairement que *Lc. lactis* inhibe la reprise de croissance des spores de *B. subtilis*. Cet effet inhibiteur n'est pas dû à la différence initiale de population entre les deux souches, puisque des résultats identiques ont été obtenus dans le cas d'une inoculation égale à 6 log (UFC/mL) pour chacune des souches (résultats non présentés).

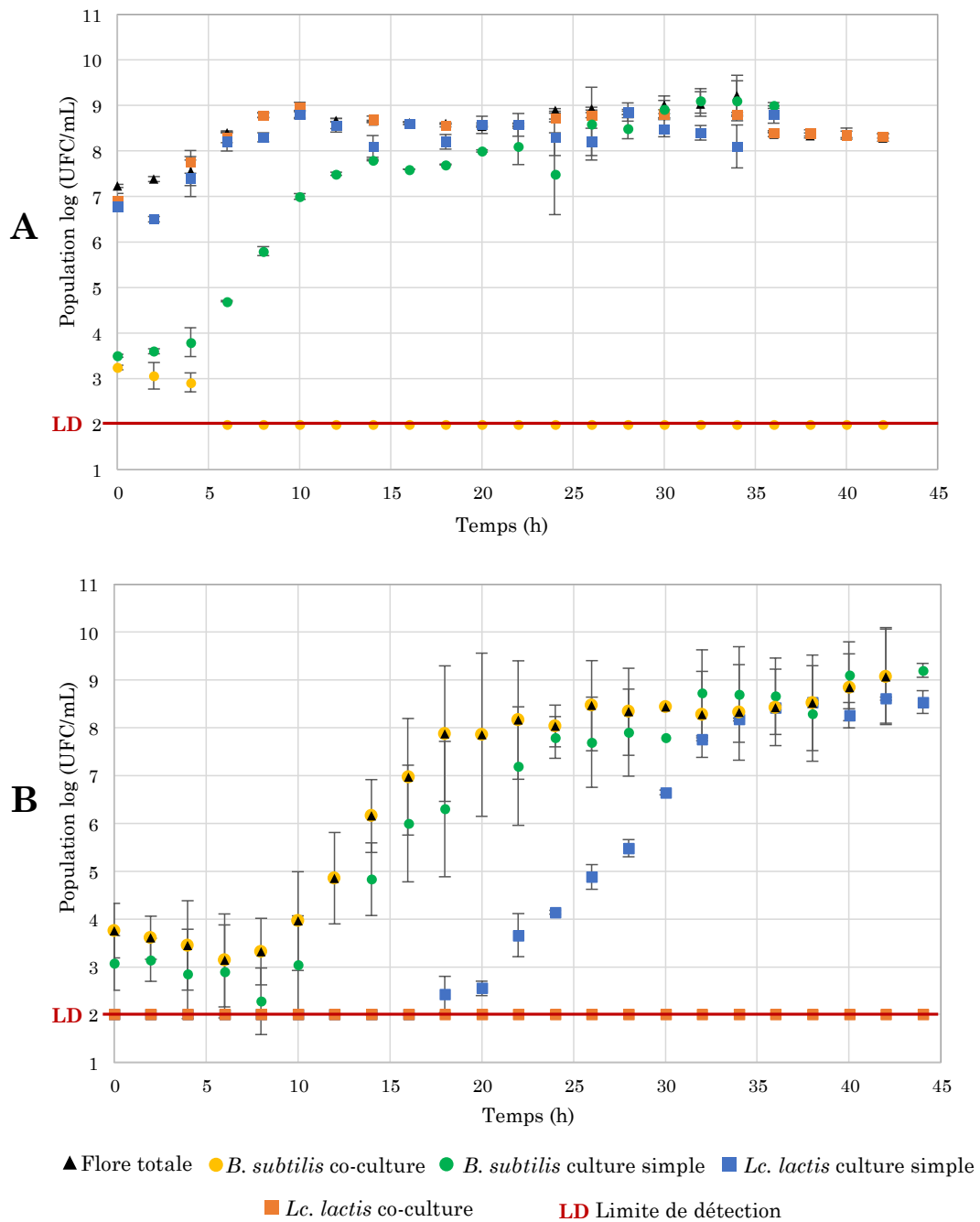


Figure 34: Effet d'un traitement HP sur la reprise de croissance de *Lc. lactis* et des spores de *B. subtilis* en co-culture et en culture simple

A : Co-culture et cultures simples non traitées

B : Co-culture et cultures simples traitées à 500 MPa – 5 min – 20 °C

La production de nisine par la souche de *Lc. lactis* a été suivie pendant sa croissance en milieu MMH. Les résultats obtenus sont présentés **Figure 35 A**. Il apparaît ainsi que la production de nisine a lieu pendant la phase exponentielle de croissance à des niveaux pouvant atteindre plus de 100 UI/mL. La concentration de

nisine dans le milieu repasse ensuite sous le seuil de détection lors de la phase de latence. Ces observations sont cohérentes avec les précédents résultats de De Vuyst *et al.* (1992), montrant une production maximale de nisine en fin de phase exponentielle, suivi d'une diminution de l'activité antimicrobienne selon la source de carbone disponible dans le milieu [336].

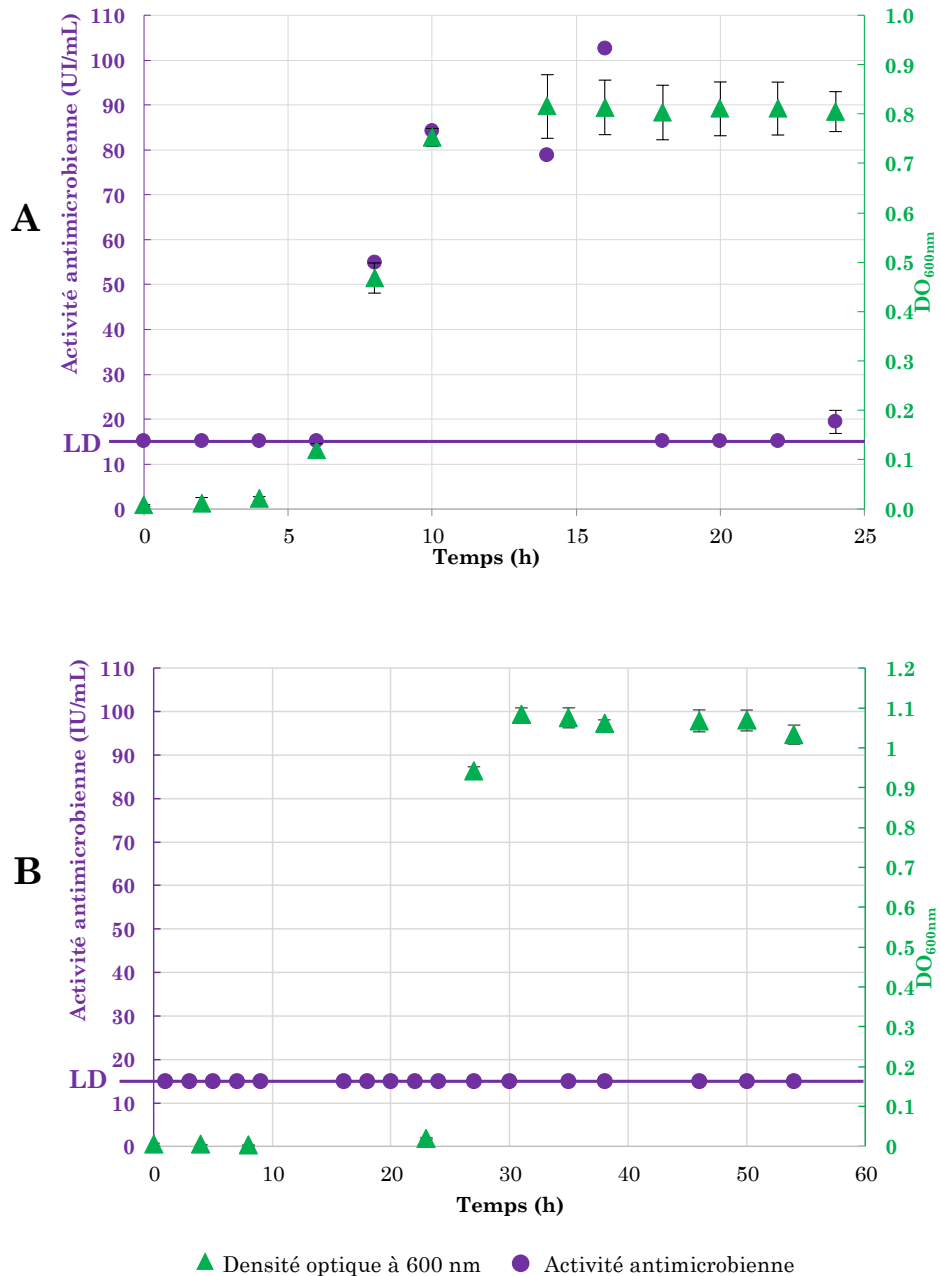


Figure 35: Effet d'un traitement HP sur la reprise de croissance et synthèse de nisine par *Lc. lactis* BS 30

A : Témoin négatif non traité ; B : Culture traitée à 500 MPa – 5 min – 20 °C.

L'inhibition de la croissance de *B. subtilis* dans le milieu MMH serait donc due à la production de nisine par la souche de biopréservation, ces deux événements ayant lieu tous deux à partir de cinq heures de culture. Ces résultats sont cohérents avec de précédentes études montrant l'inhibition totale d'une flore sporulante (*C. beijerinckii*, *C. tyrobutyricum*) par des souches de bactéries lactiques productrices de bactériocines [251,252].

Par ailleurs, il est intéressant de noter que la phase de latence avant la synthèse de bactériocine semble avoir laissé aux spores de *B. subtilis* le temps d'initier leur processus de germination, permettant leur inactivation par la nisine. En effet, cette dernière ne peut avoir qu'une action sporostatique sur des spores non-germées [229].

Le suivi des populations effectué après un traitement HP à 500 MPa – 20 °C pendant 5 min montre cette fois-ci des résultats diamétralement opposés. En effet, comme le montre la **Figure 35 B**, la flore dominant la co-culture est ici *B. subtilis*. La population initialement inoculée (3.5 log(CFU/mL)) n'ayant pas été affectée par le traitement HP, les spores ont germé et se sont multipliées. La courbe de croissance de *B. subtilis* en co-culture est ainsi calquée sur celle observée en culture simple après un traitement HP. A l'inverse, la population de *Lc. lactis* inoculée à 6,5 log(UFC/mL) n'est plus détectable après le traitement HP, que ce soit dans la co-culture ou en culture simple. Fortement impacté, *Lc. lactis* n'est dès lors plus détecté dans la co-culture. Sa population est cependant repassée au-dessus du seuil de détection après 18 h en culture simple. Il apparaît donc clairement que la croissance de *Lc. lactis* semble cette fois-ci inhibée par celle de *B. subtilis*. Cette observation semble s'expliquer par le fait que *B. subtilis* a déjà atteint sa phase stationnaire de croissance au bout de 18 h de culture (**Figure 34, B**), temps pendant lequel *Lc. lactis* est encore en phase de latence.

Cette croissance forte monopolise des ressources nutritionnelles du milieu qui ne seront alors pas disponibles pour *Lc. lactis*. Cette course aux nutriments, dite effet Jameson, s'est ainsi soldée par l'inhibition de la population de *Lc. lactis* [215,217,337]. Par ailleurs, il a aussi été démontré à de nombreuses reprises que l'inhibition d'une souche indésirable par une bactérie protectrice était possible seulement si cette dernière était majoritaire dans le milieu de culture [338–343]. Nilsson *et al.* (2005) ont ainsi démontré que l'inhibition de *L. monocytogenes* par une

souche de *Carnobacterium piscicola* n'était possible que si une différence de 3 log était respectée entre les deux inoculums [342].

Par ailleurs, même si la population de *Lc. lactis* traitée par HP reprend sa croissance après environ 20 h de latence, aucune activité antimicrobienne n'est détectée dans le milieu de culture de *Lc. Lactis*, et ce, peu importe la phase de croissance (**Figure 35, B**). De manière similaire, Rodriguez *et al.* (2005) ont montré que des cultures starter de bactéries lactiques ne synthétisaient plus de bactériocines après un traitement par HP à 500 MPa – 10 °C pendant 10 min [344].

Chez *Lc. lactis* BS30, la nisine est codée par le gène *NisA* présent sur le chromosome. Synthétisée au niveau des ribosomes sous la forme d'un peptide de 57 acides aminés, la pré-nisine est ensuite transloquée au niveau de la membrane cytoplasmique pour subir des étapes de maturation. De nombreuses modifications post-transitionnelles ont alors lieu, notamment une déshydratation des résidus sérines et thréonine conduisant à la synthèse des cinq anneaux lanthionines typiques de la nisine [335]. La synthèse de nisine est ainsi une opération impliquant plusieurs enzymes telles que des kinases ainsi que des transporteurs. Or, l'application d'un traitement HP sur des bactéries lactiques peut induire une répression de l'expression de certains gènes, mais aussi induire un dysfonctionnement de certains transporteurs [345,346]. Drews *et al.* (2002) ont en effet démontré une répression de la synthèse de GMP synthase par *Lb. sanfranciscensis* suite à un traitement HP d'une heure à 200 MPa – 30 °C [329].

Il est donc possible que les nombreux dommages sublétaux induits par l'application du traitement HP sur l'inoculum initial de *Lc. lactis* aient fortement réduit sa capacité de production de nisine. Par ailleurs, en plus de son activité antimicrobienne, la nisine agit aussi comme une phéromone impliquée dans la régulation de sa propre synthèse [333,334]. Ainsi, la production de nisine par quelques cellules d'une population induit l'expression du gène *nisA* chez les autres cellules et une synthèse jusqu'à 1000 fois plus importante de nisine [333,334]. L'inhibition de la production de nisine chez les cellules traitées peut donc induire une réduction durable de la capacité de synthèse de l'ensemble de la population.

4. Conclusion et perspectives

Si les HP peuvent induire une sensibilité accrue des spores de *B. subtilis* à la nisine, la combinaison directe de la souche productrice avec le traitement HP donne des résultats pour le moins contrastés. En effet, la reprise rapide de *B. subtilis* induit une forte compétition nutritive, ne permettant pas à *Lc. lactis* de reprendre sa croissance. Par ailleurs, ses capacités de production de nisine semblent fortement altérées par le traitement, puisqu'aucune activité antimicrobienne n'est détectée dans le milieu de croissance.

Bien que cette étude n'ait pas permis de démontrer que la combinaison HP-*Lc. lactis* était efficace pour inactiver les spores de *B. subtilis*, elle rapporte cependant pour la première fois l'inhibition des capacités antimicrobiennes d'une souche de biopréservation par les HP. Des manipulations complémentaires seraient cependant indispensables afin de déterminer précisément quels mécanismes sont mis en jeu et si l'inhibition de la production de nisine est aussi observée dans d'autres milieux ainsi qu'à d'autres températures. Par ailleurs, la recherche d'autres souches de biopréservation ayant des capacités de résistance plus importantes aux HP est aussi nécessaire afin d'évaluer le potentiel de la combinaison de ces deux procédés sur l'inactivation de spores bactériennes.

Conclusion générale

Synthèse des résultats et perspectives

La reprise de croissance de spores dans les aliments peut être à l'origine de graves toxi-infections alimentaires. Afin de réduire ce risque, notamment dans les produits réfrigérés, l'usage de conservateurs est largement employé par les industriels du secteur de l'agroalimentaire. Le projet ANR BlacHP, dans le cadre duquel s'inscrit cette thèse, avait pour objectif de relever un défi ambitieux : trouver un moyen de préserver des produits carnés réfrigérés en combinant des traitements par HP et biopréservation. Le point de départ du projet repose sur de nombreuses études antérieures montrant une synergie potentielle entre HP et nisine pour l'inactivation d'endospores bactériennes.

L'objectif premier de cette thèse a donc été d'étudier précisément cette synergie afin de mieux appréhender les mécanismes sous-jacents. Ceci est en effet indispensable au développement de procédés transférables industriellement pour une application sur des produits carnés réfrigérés.

La biopréservation, au sens large du terme, est l'utilisation des capacités antimicrobiennes de flores protectrices dans le but d'augmenter la durée de vie d'un produit alimentaire. L'usage de la nisine, seule bactériocine autorisée comme additif alimentaire, est ainsi largement employée pour la conservation des aliments d'origine animale. Dans le cadre du projet BlacHP, le screening de 63 souches de bactéries de biopréservation a montré que les bactéries exerçant un effet antagoniste contre plusieurs espèces sporulantes caractéristique des produits carnés produisent des bactériocines, la plus efficace étant la nisine [347]. De ce fait, la première partie de cette thèse a permis d'évaluer et de comprendre l'effet des HP sur la structure et l'activité de cette bactériocine. Il a ainsi été démontré que les effets d'un traitement HP sur la structure et l'activité de la nisine n'étaient pas anodins. Le dépliement des structures β induit par les HP est exacerbé à pH neutre, provoquant une diminution de l'activité antimicrobienne pouvant aller jusqu'à 50%. Ce phénomène peut donc expliquer la grande variabilité des résultats obtenus par différents auteurs ayant étudié l'inactivation par la nisine d'une même souche cible dans des milieux de traitement variés. Cette étude doit cependant être étoffée par d'autres essais dans des milieux à pH différents et pour d'autres barèmes de traitement HP. Les résultats obtenus pourraient ainsi permettre de prédire l'activité antimicrobienne persistant dans des aliments après un traitement hyperbare. Cette prédiction est en effet

essentielle afin de s'assurer que l'activité antimicrobienne résiduelle puisse limiter la croissance des flores pathogènes et d'altération ayant résisté au traitement HP.

Ces résultats sont d'autant plus importants, que la seconde partie de cette thèse a permis de montrer que la présence de nisine dans le milieu de recouvrement de spores traitées en pression permettait d'inhiber durablement leur reprise de croissance. Il a en effet été démontré que l'application d'un traitement HP pouvait sensibiliser des spores de *B. sporothermodurans* et *B. weihenstephanensis* à une faible concentration de nisine. Cette sensibilisation, durable après un traitement à 50 °C et réversible après un traitement à 20 °C, est apparue comme n'étant pas uniquement liée à l'initiation de la germination des spores. En effet, plus particulièrement après un traitement à 20 °C, une grande partie des spores inhibées par la nisine n'avaient pas été induites en germination par le traitement HP. Or, il a de nouveau été démontré récemment que l'action de la nisine était ciblée sur la membrane interne des spores et n'était possible qu'une fois le processus de germination entamé [348]. Ouardien *et al.* (2018) expliquent ainsi que, 30 min après l'initiation de la germination, la nisine interagit avec la membrane interne des spores et en perturbe l'intégrité [348].

Cependant, si le terme « germination » a été maintes fois défini dans la littérature, les mécanismes précis désignés par ce terme restent finalement sources de controverses. En effet, la plupart des auteurs s'accordent à dire qu'une spore est germée à partir du moment où elle entre en phase I de germination, stade correspondant entre autres, à un retour de la sensibilité thermique [33,349]. Cependant, qu'en est-il des phases d'initiation ? Ces étapes préliminaires, encore peu connues et difficilement détectables, semblent pourtant être à l'origine de changements physiologiques majeurs. De nombreuses études évoquent ainsi une phase dite d'« activation », pendant laquelle des spores non germées deviennent plus sensibles à certains facteurs environnementaux tels que la présence de nutriments [163]. Cette activation, largement amplifiée par un traitement thermique modéré (30 min – 70 °C pour *B. subtilis*), serait le résultat d'une modification réversible de la configuration des GRs [163]. Par conséquent, une population de spores considérées comme dormantes par les techniques d'analyses « courantes » [350], peuvent cependant présenter des caractéristiques physiologiques particulières, leur conférant une sensibilité accrue à certains facteurs environnementaux. Le fait qu'un

traitement hyperbare puisse sensibiliser les spores à la nisine via ce mécanisme d'activation a ainsi été l'hypothèse mise en avant dans le second chapitre de cette thèse.

La recherche et la caractérisation de cet état bien particulier a été l'objet de la troisième partie de cette étude. Mené en partenariat avec l'équipe de la ligne SMIS du Synchrotron Soleil, elle a ainsi permis de mettre en évidence l'impact d'un traitement HP sur la physiologie de spores de *B. subtilis* à l'échelle de l'individu. L'analyse des spectres infra-rouges de spores traitées par HP a ainsi permis de mettre en évidence que l'état d'« activation » obtenu suite à un traitement mené à 20 °C était en fait lié à un état précoce de la germination. Cette population de spores activées, bien qu'ayant conservé des caractéristiques lipidiques proches des spores dormantes, ont une configuration protéique semblable à celles de spores germées. Ces modifications, aussi mineures puissent-elles paraître, semblent néanmoins responsables du retour de la sensibilité des spores à la nisine. S'il est maintenant clair que l'activation des spores est partie prenante des stades précoces de la germination, il reste dorénavant à déterminer quelles sont les structures impliquées (GRs ; membrane interne).

Un traitement hyperbare peut ainsi sensibiliser des spores du genre *Bacillus* à une application sublétale de nisine. Néanmoins, l'application directe de nisine dans les aliments doit être signalée sur l'emballage, au même titre que les additifs de synthèse. De plus, la première partie de cette thèse a démontré que l'action antimicrobienne de la nisine peut aussi être impactée par un traitement HP.

Une solution alternative, consistant en l'application directe d'une culture productrice de nisine a été testée dans la dernière partie de ce travail. Une souche de *Lc. lactis* a été préalablement sélectionnée par l'ensemble des partenaires du projet BlacHP selon des critères bien définis (absence d'antibiorésistance et de production d'amines biogènes, production de nisine suffisante et résistance à la pression). La souche de *Lc. lactis* ainsi choisie été ajoutée dans le milieu de traitement de spores de *B. subtilis* et la reprise de croissance des deux souches a ensuite été analysée. Après un traitement HP à 20 °C pendant 5 min à 500 MPa suivi de 40 h de culture à 30 °C, les résultats ont démontré une dominance nette de la population de *B. subtilis*, alors même que *Lc. lactis* n'était plus détectée dans le milieu. Alors que, dans le cas d'une co-culture non traitée en pression, *Lc. lactis* était la flore

dominante, l'obtention d'un résultat diamétralement opposé s'explique de deux manières. Premièrement, les spores de *B. subtilis* reprennent leur croissance bien plus vite que la population *Lc. lactis* après HP et imposent ainsi une compétition nutritionnelle drastique à cette dernière. Deuxièmement, aucune activité antimicrobienne n'a été détectée dans une culture de *Lc. lactis* traitée en pression, indiquant que le traitement hyperbare a inhibé durablement la synthèse de nisine par cette souche. Cette dernière observation nécessite d'être approfondie par des méthodes de biologie moléculaire afin d'identifier les mécanismes mis en jeu. Par ailleurs, avant de conclure définitivement que la combinaison d'un traitement HP avec une souche de biopréservation ne permet pas d'inactiver des spores, la sélection d'une autre souche de biopréservation serait souhaitable. De même, l'étude de la reprise de croissance de la co-culture à des températures réfrigérées permettrait d'avoir un meilleur aperçu du réel potentiel de cette méthode de conservation.

L'application d'un traitement hyperbare permet donc de sensibiliser des spores du genre *Bacillus* à la présence d'une bactériocine telle que la nisine. Pour la première fois, cette étude a permis de démontrer que cette sensibilisation avait lieu dans les toutes premières phases de la germination des spores. Ces phases, rassemblées sous le terme d'« activation » ou « initiation de la germination » par certains auteurs, désigne alors l'ensemble des modifications physiologiques ou biochimiques ayant lieu avant la phase I de germination. Afin d'éviter la reprise de croissance de spores dans des aliments, il serait donc possible de combiner nisine et HP, à condition que la quantité de nisine initiale soit suffisamment importante pour qu'une activité antimicrobienne résiduelle soit présente dans le produit. Enfin, les résultats de cette étude ont montré que la combinaison directe d'une souche de bactérie lactique protectrice avec un traitement HP n'avait pas encore un avenir tout tracé en industrie agroalimentaire... Bien que cette dernière partie ait été une étude préliminaire, de nombreux essais restent à faire avant de conclure quant au potentiel de cette méthode. Il serait en effet intéressant de mettre au point des moyens de protection des bactéries lactiques vis-à-vis des traitements HP, tels que l'encapsulation par exemple.

Finalement, la solution ne serait-elle pas de combiner la résistance des spores aux propriétés antimicrobiennes des bactéries lactiques ? De nombreuses espèces

sporulantes telles que *B. amyloliquefaciens*, *Enterococcus faecium*, ou *Sporolactobacillus* spp. produisent en effet des bactériocines [351–353].

Références bibliographiques

1. Abramov O, Mojzsis SJ. Microbial habitability of the Hadean Earth during the late heavy bombardment. *Nature*. Nature Publishing Group; 2009;459: 419–422. doi:10.1038/nature08015
2. Glansdorff N, Xu Y, Labedan B. The Last Universal Common Ancestor : emergence, constitution and genetic legacy of an elusive forerunner. *Biol Direct*. 2008;29: 29–64. doi:10.1186/1745-6150-3-29
3. Tocheva EI, Ortega DR, Jensen GJ. Sporulation, bacterial cell envelopes and the origin of life. *Nat Rev Microbiol*. 2017;14: 535–542. doi:10.1038/nrmicro.2016.85.Sporulation
4. Kirk MD, Pires SM, Black RE, Caipo M, Crump JA. World Health Organization Estimates of the Global and Regional Disease Burden of 22 Foodborne Bacterial , Protozoal , and Viral Diseases , 2010 : A Data Synthesis. 2015; 1–21.
5. Nicholson WL, Schuerger AC, Setlow P. The solar UV environment and bacterial spore UV resistance : considerations for Earth-to-Mars transport by natural processes and human spaceflight. 2005;571: 249–264. doi:10.1016/j.mrfmmm.2004.10.012
6. Nicholson WL, Munakata N, Horneck G, Melosh HJ, Setlow P. Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2000;64: 548–72.
7. Setlow P. Spores of *Bacillus subtilis*: their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals. *J Appl Microbiol*. 2006;101: 514–525.
8. Scheldeman P, Herman L, Foster S, Heyndrickx M. *Bacillus sporothermodurans* and other highly heat-resistant spore formers in milk. *J Appl Microbiol*. 2006;1: 542–555. doi:10.1111/j.1365-2672.2006.02964.x
9. Huemer IA, Klijn N, Vogelsang HWJ, Langeveld LPM. Thermal death kinetics of spores of *Bacillus sporothermodurans* isolated from UHT milk. *Int Dairy J*. 1998;8: 851–855.
10. Hartman PE. Review : Putative Mutagens and Carcinogens in Foods 1 . Nitrate / Nitrite Ingestion and Gastric Cancer Mortality. *Environ Mutagen*. 1983;5: 111–121.

11. Gould GW. History of science – spores Lewis B Perry Memorial Lecture 2005. 2006;101: 507–513. doi:10.1111/j.1365-2672.2006.02888.x
12. Gauvry E, Mathot A-G, Leguérinel I, Couvert O, Postollec F, Broussolle V, et al. Knowledge of the physiology of spore-forming bacteria can explain the origin of spores in the food environment. *Res Microbiol.* 2017;168: 369–378. doi:10.1016/j.resmic.2016.10.006
13. Errington J. Regulation of endospore formation in *Bacillus subtilis*. 2003;1. doi:10.1038/nrmicro750
14. Higgins D, Dworkin J. Recent progress in *Bacillus subtilis* sporulation. 2013;36: 131–148. doi:10.1111/j.1574-6976.2011.00310.x.Recent
15. González-Pastor JE, Hobbs EC, Losick R. Cannibalism by Sporulating Bacteria. *Science (80-)*. 2007;510: 510–513. doi:10.1126/science.1086462
16. Setlow P, Johnson EA. Spores and Their Significance. In: Doyle MP, Buchanan R, editors. *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*. ASM press. Washington; 2013. pp. 45–79.
17. McKenney PT, Driks A, Eichenberger P. The *Bacillus subtilis* endospore: assembly and functions of the multilayered coat. *Nat Rev Microbiol.* Nature Publishing Group; 2012;11: 33–44. doi:10.1038/nrmicro2921
18. Henriques AO, Moran Jr CP. Structure, assembly, and function of the spore surface layers. *Annu Rev Microbiol.* 2007;61: 555–588. doi:10.1146/annurev.micro.61.080706.093224
19. Harry KH, Zhou R, Kroos L, Melville SB. Sporulation and Enterotoxin (CPE) Synthesis Are Controlled by the Sporulation-Specific Sigma Factors SigE and SigK in. 2009;191: 2728–2742. doi:10.1128/JB.01839-08
20. Perchat S, Dubois T, Zouhir S, Gominet M, Poncet S, Lemy C, et al. A cell – cell communication system regulates protease production during sporulation in bacteria of the *Bacillus cereus* group. *Mol Microbiol.* 2011;82: 619–633. doi:10.1111/j.1365-2958.2011.07839.x
21. Vreeland HR, Rosenzweig WD, Powers DW. Isolation of a 250 million-year-old halotolerant bacterium from a primary salt crystal. *Nature.* 2000;407: 897–900.

22. Bozue JA, Welkos S, Cote CK. The Bacillus anthracis Exosporium: What's the Big "Hairy" Deal? In: Driks A, Eichenberger P, editors. The bacterial spore: from molecules to system. ASM press. Washington; 2016. pp. 253–268.
23. Charlton S, Moir AJG, Baillie L, Moir A. Characterization of the exosporium of Bacillus cereus. 1999; 241–245.
24. Leggett M, McDonnell G, Denyer SP, Setlow P, Maillard J-Y. Bacterial spore structures and their protective role in biocide resistance. J Appl Microbiol. 2012;113: 485–498.
25. Setlow P. Spore Resistance Properties. Microbiol Spectr. 2014;
26. Driks A, Eichenberger P. The spore coat. In: Driks A, Eichenberger P, editors. The bacterial spore: from molecules to system. ASM press. Washington; 2016. pp. 179–200.
27. Labbé RG, Reich RR, Duncan CL. Alteration in ultrastructure and germination of Clostridium perfringens type A spores following extraction of spore coats. 1978;77: 1526–1536.
28. Crafts-Lighty A, Ellar DJ. The Structure and Function of the Spore Outer Membrane in Dormant and Germinating Spores of Bacillus megaterium. J Appl Bacteriol. 1980;48: 135–145.
29. Popham DL, Bernhards CB. Spore peptidoglycans. In: Driks A, Eichenberger P, editors. The bacterial spore: from molecules to system. ASM press. Washington; 2016. pp. 157–177.
30. Lewis C., Snell N. S., Burr H. K. Water Permeability of Bacterial Spores and the Concept of a Contractile Cortex Author. Science (80-). 1960;132: 544–545.
31. Popham DL. Cellular and Molecular Life Sciences Specialized peptidoglycan of the bacterial endospore : the inner wall of the lockbox. Cell Moléculaire Life Sci. 2002;59: 426–433.
32. Cowan AE, Olivastro EM, Koppel DE, Loshon CA, Setlow B, Setlow P. Lipids in the inner membrane of dormant spores of Bacillus species are largely immobile. 2004;101: 7733–7738.

33. Setlow P. Germination of spores of *Bacillus* species: what we know and do not know. *J Bacteriol.* 2014;196: 1297–1305.
34. Sunde EP, Setlow P, Hederstedt L, Halle B. The physical state of water in bacterial spores. 2009;
35. Loison P, Hosny NA, Gervais P, Champion D, Kuimova MK, Perrier-Cornet J-M. Direct investigation of viscosity of an atypical inner membrane of *Bacillus* spores: a molecular rotor/FLIM study. *Biochim Biophys Acta (BBA)-Biomembranes.* 2013;1828: 2436–2443.
36. Hofstetter S, Denter C, Winter R, McMullen LM, Gänzle MG. Use of the fluorescent probe LAURDAN to label and measure inner membrane fluidity of endospores of *Clostridium* spp. *J Microbiol Methods.* 2012;91: 93–100.
37. Setlow B, Setlow P. Small, acid-soluble proteins bound to DNA protect *Bacillus subtilis* spores from killing by dry heat. *Appl Environ Microbiol.* 1995;61: 2787–2790.
38. Sinai L, Rosenberg A, Smith Y, Segev E, Ben-Yehuda S. The Molecular Timeline of a Reviving Bacterial Spore. *Mol Cell.* 2015;57: 695–707.
39. Paredes-sabja D, Setlow P, Sarker MR. Germination of spores of Bacillales and Clostridiales species: mechanisms and proteins involved. *Trends Microbiol.* Elsevier Ltd; 2011;19: 85–94. doi:10.1016/j.tim.2010.10.004
40. Ramirez-Peralta A, Gupta S, Butzin XY, Setlow B, Korza G, Leyva-Vazquez M-A, et al. Identification of new proteins that modulate the germination of spores of *Bacillus* species. *J Bacteriol.* 2013;195: 3009–3021.
41. O'Connor RJ, Halvorson HO. L-Alanine dehydrogenase: a mechanism controlling the specificity of amino acid-induced germination of *Bacillus cereus* spores. *J Bacteriol.* 1961;82: 706–713.
42. Setlow P. Spore germination. *Curr Opin Microbiol.* 2003;6: 550–556.
43. Stewart GS, Johnstone K, Hagelberg E, Ellar DJ. Commitment of bacterial spores to germinate. A measure of the trigger reaction. *Biochem J.* 1981;198: 101–106.
44. Thackray PD, Behravan J, Southworth TW, Moir A. GerN, an antiporter homologue important in germination of *Bacillus cereus* endospores. *J*

- Bacteriol. 2001;183: 476–482.
45. Yi X, Setlow P. Studies of the Commitment Step in the Germination of Spores of *Bacillus* Species. *J Bacteriol.* 2010;192: 3424–3433. doi:10.1128/JB.00326-10
 46. Lee WH, Ordal JH. Reversible activation for germination and subsequent changes in bacterial spores. *J Bacteriol.* 1962;85: 207–217.
 47. Trovar-Rojo F, Chander M, Setlow B, Setlow P. The products of the spoVA operon are involved in dipicolinic acid uptake into developing spores of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol.* 2002;184: 584–587.
 48. Velásquez J, Schuurman-wolters G, Birkner JP, Abee T, Poolman B. *Bacillus subtilis* spore protein SpoVAC functions as a mechanosensitive channel. 2014;92: 813–823.
 49. Nguyen Thi Minh H, Dantigny P, Perrier-Cornet J, Gervais P. Germination and inactivation of *Bacillus subtilis* spores induced by moderate hydrostatic pressure. *Biotechnol Bioeng.* 2010;107: 876–883.
 50. Segev E, Rosenberg A, Mamou G, Sinai L, Ben-yehuda S. Molecular Kinetics of Reviving Bacterial Spores. 2013;195: 1875–1882. doi:10.1128/JB.00093-13
 51. Brunt J, van Vliet AHM, van den Bos F, Carter AT, Peck MW. Diversity of the Germination Apparatus in *Clostridium botulinum* Groups I, II, III, and IV. *Front Microbiol.* 2016;7: 1–13. Available: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2016.01702/full>
 52. Doona CJ, Feeherry FE, Setlow B, Wang S, Li W, Nichols FC, et al. Effects of High-Pressure Treatment on Spores of *Clostridium* Species. *Appl Environ Microbiol. American Society for Microbiology;* 2016;82: 5287–97.
 53. Olgu V, Banawas S, Sarker MR, Paredes-sabja D. Recent advances in germination of *Clostridium* spores. *Res Microbiol.* 2015;166: 236–243. doi:10.1016/j.resmic.2014.07.017
 54. ANSES. *Clostridium neurotoxinogènes Caractéristiques et sources.* 2016.
 55. Gunders D. *Wasted: How America Is Losing Up to 40 Percent of Its Food from Farm to Fork to Landfill* Author. New York; 2012.

56. European Parliament. Parliament calls for urgent measures to halve food wastage in the EU [Internet]. 2012. Available: <http://www.europarl.europa.eu/news/en/press-room/20120118IPR35648/parliament-calls-for-urgent-measures-to-halve-food-wastage-in-the-eu>
57. Prescott JF, MacInnes JI, Wu AK. Taxonomic Relationships among the Clostridia. In: Uzal FA, Francis PJ, Songer JG, Popoff MR, editors. Clostridial Diseases of Animals. Wiley Blac. Oxford: John Wiley & Sons, Inc; 2016. pp. 3–5.
58. Uzal FA, Francis PJ, Songer JG, Popoff MR, editors. General Physiological and Virulence Properties of the Pathogenic Clostridia. Clostridial Diseases of Animals. John Wiley. Oxford; 2016. pp. 7–11.
59. Chen J, Ma M, Uzal FA, McClane BA, Chen J, Ma M, et al. Host cell-induced signaling causes Clostridium perfringens to upregulate production of toxins important for intestinal infections. Gut microbiota. 2014;5: 37–41. doi:10.4161/gmic.26419
60. Lindström M, Heikinheimo A, Lahti P, Korkeala H. Novel insights into the epidemiology of Clostridium perfringens type A food poisoning. Food Microbiol. 2011;28: 192–198. doi:10.1016/j.fm.2010.03.020
61. ANSES. Clostridium perfringens. 2010.
62. Freedman JC, Shrestha A, McClane BA. Clostridium perfringens Enterotoxin: Action, Genetics, and Translational Applications. Toxins (Basel). 2016;8: 73. doi:10.3390/toxins8030073
63. de la Cochetière MD, Piloquet H, Des Robert C, Darmaun D, Galmiche J, Rozé J. Early Intestinal Bacterial Colonization and Necrotizing Enterocolitis in Premature Infants: The Putative Role of Clostridium. 2004;56: 366–370. doi:10.1203/01.PDR.0000134251.45878.D5
64. Sarker MR, Carman RJ, Bruce A. Inactivation of the gene (cpe) encoding Clostridium perfringens enterotoxin eliminates the ability of two cpe - positive C . perfringens type A human gastrointestinal disease isolates to affect rabbit ileal loops. 1999;33: 946–958.

65. InVS. Surveillance des toxi-infections alimentaires collectives. 2015.
66. Hoffmann S, Batz MB, Morris JG. Annual Cost of Illness and Quality-Adjusted Life Year Losses in the United States Due to 14 Foodborne Pathogens. 2012;75: 1292–1302. doi:10.4315/0362-028X.
67. Scallan E, Hoekstra RM, Angulo FJ, Tauxe R V, Widdowson M, Roy SL, et al. Foodborne Illness Acquired in the United States — Major Pathogens. 2011;17: 7–15. doi:10.3201/eid1701.P11101
68. Hill KK, Smith TJ. Genetic Diversity Within *Clostridium botulinum* Serotypes, Botulinum Neurotoxin Gene Clusters and Toxin Subtypes. In: Rummel A, Binz T, editors. Botulinum Neurotoxins. Springer-V. Berlin; 2013. pp. 1–20.
69. Popof MR. *Clostridium botulinum* and *clostridium tetani* Neurotoxins. In: Uzal FA, Francis PJ, Songer JG, Popoff MR, editors. Clostridial Diseases of Animals. John Wiley. Oxford; 2016. pp. 71–106.
70. Lynt RK, Solomon HM, Lilly T, Kautter DA. Thermal death time of *Clostridium botulinum* type E in meat of the blue crab. 1977;42: 1022–1025.
71. Juneja VK, Eblen BS, Marmer BS, Williams AC, Palumbo SA, Miller AJ. Thermal resistance of nonproteolytic type B and E *Clostridium botulinum* spores in phosphate buffer and turkey slurry. J Food Prot. 1994; 722–823.
72. Collins MD, East AK. Phylogeny and taxonomy of the food-borne pathogen *Clostridium botulinum* and its neurotoxins. 1998; 5–17.
73. Gill DM. Bacterial Toxins : a Table of Lethal Amounts. 1982;46: 86–94.
74. Arnon SS, Schechter R, Inglesby T V, Ascher MS. Botulinum Toxin as a Biological Weapon. 2008; doi:10.1001/jama.285.8.1059
75. Lam K, Yao G, Jin R. Diverse binding modes, same goal: the receptor recognition mechanism of botulinum neurotoxin. HHS Public Access. 2016;117: 225–231. doi:10.1016/j.pbiomolbio.2015.02.004.Diverse
76. Mazuet C, King LA, Bouvet P, Legeay C, Sautereau J, Popoff MR. Le botulisme humain en France, 2010-2012. Bull épidémiologique Hebd. 2014;6: 106–114.

77. Rossetto O, Pirazzini M, Montecucco C. Botulinum neurotoxins: genetic, structural and mechanistic insights. *Nat Publ Gr. Nature Publishing Group*; 2014;12: 535–549. doi:10.1038/nrmicro3295
78. Scharff RL. Economic Burden from Health Losses Due to Foodborne Illness in the United States. *J Food Prot.* 2012;75: 123–131. doi:10.4315/0362-028X.JFP-11-058
79. Mazuet C, Sautereau J, Legeay C, Bouchier C, Bouvet P, Popoff MR. An atypical outbreak of food-borne botulism due to clostridium botulinum types B and e from ham. *J Clin Microbiol.* 2015;53: 722–726. doi:10.1128/JCM.02942-14
80. Institut de veille sanitaire. Caractéristiques épidémiologiques du botulisme humain en 2013 [Internet]. 2017 [cited 3 Nov 2017]. Available: <http://invs.santepubliquefrance.fr/Dossiers-thematiques/Maladies-infectieuses/Risques-infectieux-d-origine-alimentaire/Botulisme/Donnees-epidemiologiques/Caracteristiques-epidemiologiques-du-botulisme-humain-en-2013>
81. Institut de veille sanitaire. Caractéristiques épidémiologiques du botulisme humain en 2014 [Internet]. 2017 [cited 3 Nov 2017]. Available: <http://invs.santepubliquefrance.fr/fr../layout/set/print/Dossiers-thematiques/Maladies-infectieuses/Risques-infectieux-d-origine-alimentaire/Botulisme/Donnees-epidemiologiques/Caracteristiques-epidemiologiques-du-botulisme-humain-en-2014>
82. Institut de veille sanitaire. Caractéristiques épidémiologiques du botulisme humain en 2015 [Internet]. 2017 [cited 3 Nov 2017]. Available: <http://invs.santepubliquefrance.fr/Dossiers-thematiques/Maladies-infectieuses/Risques-infectieux-d-origine-alimentaire/Botulisme/Donnees-epidemiologiques/Caracteristiques-epidemiologiques-du-botulisme-humain-en-2015>
83. Myllykoski J, Nevas M, Lindström M, Korkeala H. The detection and prevalence of *Clostridium botulinum* in pig intestinal samples. 2006;110: 172–177. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2006.04.017

84. Rosetti F, Castelli E, Labbe J, Funes R. Outbreak of Type E Botulism Associated with Home-cured Ham Consumption. 1999;5: 171–172.
85. Koepke R, Sobel J, Arnon SS. Global Occurrence of Infant Botulism, 1976–2006. *Am Acad Pediatr*. 2014;122: 73–82. doi:10.1542/peds.2007-1827
86. Rosow LK, Strober JB. Pediatric Neurology Infant Botulism : Review and Clinical Update. *Pediatr Neurol*. Elsevier Inc; 2015;52: 487–492. doi:10.1016/j.pediatrneurol.2015.01.006
87. Bohnel H, Behrens S, Loch P, Lube K, Gessler F. Is there a link between infant botulism and sudden infant death ? Bacteriological results obtained in Central Germany. 2001;160: 623–628. doi:10.1007/s004310100807
88. Brett MM, Mclauchlin J, Harris A, Brien SO, Black N, Forsyth RJ, et al. A case of infant botulism with a possible link to infant formula milk powder : evidence for the presence of more than one strain of *Clostridium botulinum* in clinical specimens and food Clinical presentation. 2008; 769–776. doi:10.1099/jmm.0.46000-0
89. Bianco MI, Lúquez C, Jong LIT De, Fernández RA. Presence of *Clostridium botulinum* spores in *Matricaria chamomilla* (chamomile) and its relationship with infant botulism. 2008;121: 357–360. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2007.11.008
90. Fernandez R, Satorres SE, Alcara LE, Centorbi ONP De. Isolation of *Clostridium botulinum* in Medicinal Plants. 1999; 173–175.
91. Coban A, Matur Z, Hanagasi PHA, Parman Y. Iatrogenic Botulism After Botulinum Toxin Type A Injections. 2010;33: 158–160. doi:10.1097/WNF.0b013e3181d479e0
92. Schechter R, Inglesby T V, Henderson DA, Bartlett JG, Ascher MS, Eitzen E, et al. Botulinum Toxin as a Biological Weapon Medical and Public Health Management. 2012;285.
93. Katona P. Anaerobe Botulinum toxin: Therapeutic agent to cosmetic enhancement to lethal biothreat. *Anaerobe*. Elsevier Ltd; 2012;18: 240–243. doi:10.1016/j.anaerobe.2011.12.001
94. Zhang J, Sun LI, Nie Q. Botulism, where are we now? 2010; 867–879.

- doi:10.3109/15563650.2010.535003
95. Qureshi IA, Qureshi MA, Kassar MRA, Maud A, Rodriguez GJ, Cruz-Flores S, et al. Black Tar Heroin Skin Popping as a Cause of Wound Botulism. *Neurocrit Care*. Springer US; 2017; doi:10.1007/s12028-017-0415-6
 96. Bazinet AL. Pan-genome and phylogeny of *Bacillus cereus* sensu lato. 2017; 1–27.
 97. Miller RA, Beno SM, Kent DJ, Carroll LM, Martin NH, Boor KJ, et al. *Bacillus wiedmannii* sp . nov ., a psychrotolerant and cytotoxic *Bacillus cereus* group species isolated from dairy foods and dairy environments. 2016; 4744–4753. doi:10.1099/ijsem.0.001421
 98. EFSA. Opinion of the Scientific Panel on Biological Hazards on *Bacillus cereus* and other *Bacillus* spp in foodstuffs. 2005;1: 1–48.
 99. Granum E. *Bacillus cereus* Food poisoning. In: Tham W, Danielsson-Tham M-L, editors. Food associated pathogens. CRC Press. New York: Science publishers; 2014. pp. 20–32.
 100. Guinebretière M-H, Auger S, Galleron N, Contzen M, De Sarrau B, De Buyser M-L, et al. *Bacillus cytotoxicus* sp . nov . is a novel thermotolerant species of the *Bacillus cereus* Group occasionally associated with food poisoning. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2013; 31–40. doi:10.1099/ijs.0.030627-0
 101. Ankolekar C, Rahmati T, Labbé RG. International Journal of Food Microbiology Detection of toxigenic *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* spores in U . S . rice. *Int J Food Microbiol*. Elsevier B.V.; 2009;128: 460–466. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2008.10.006
 102. Jackson SG, Goodbrand RB, Ahmedl R, Kasatlya S. *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* isolated in a gastroenteritis outbreak investigation. 1995; 103–105.
 103. Lechner S, Mayr IR, Francis KP, Pruo BM, Kaplan T, Wieoner-gunkel E, et al. *Bacillus weihenstephanensis* sp . nov . is a new psychrotolerant species of the *Bacillus cereus* group. 1998;48: 1373–1382.
 104. Jiménez G, Blanch AR, Tamames J, Rosselló-mora R. Complete Genome

- Sequence of *Bacillus toyonensis* BCT-7112 T , the Active Ingredient of the Feed Additive Preparation Toyocerin. 2013;1: 1–2. doi:10.1128/genomeA.01080-13.Copyright
105. ANSES. *Bacillus cereus* [Internet]. 2011. Available: <https://www.anses.fr/fr/system/files/MIC2011sa0116Fi.pdf>
106. Griffiths MW, Schraft H. *Bacillus cereus* Food Poisoning. Foodborne Diseases. Third Edit. Elsevier Inc.; 2017. pp. 395–405. doi:10.1016/B978-0-12-385007-2.00020-6
107. Hu D, Nakane A. Mechanisms of staphylococcal enterotoxin-induced emesis. *Eur J Pharmacol.* Elsevier; 2013;722: 95–107. doi:10.1016/j.ejphar.2013.08.050
108. Arnesen LPS, Fagerlund A, Granum PE. From soil to gut : *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. 2008;32: 579–606. doi:10.1111/j.1574-6976.2008.00112.x
109. André S. Caractérisation et écologie microbienne de lignes de production de conserves. 2015.
110. André S, Vallaëys T, Planchon S. Spore-forming bacteria responsible for food spoilage. *Res Microbiol.* 2017;168: 379–387. doi:10.1016/j.resmic.2016.10.003
111. Diaoa MM, André S, Membré J-M. Meta-analysis of D-values of proteolytic *Clostridium botulinum* and its surrogate strain *Clostridium sporogenes* PA 3679. *Int J Food Microbiol.* 2014;174: 23–30.
112. Rigaux C, André S, Albert I, Carlin F. Quantitative assessment of the risk of microbial spoilage in foods . Prediction of non-stability at 55 ° C caused by *Geobacillus stearothermophilus* in canned green beans. *Int J Food Microbiol.* Elsevier B.V.; 2014;171: 119–128. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2013.11.014
113. McClure P. Spore-forming bacteria. In: de W. Blackburn C, editor. Food spoilage microorganisms. CRC. Cambridge; 2006. pp. 579–623.
114. Húngaro HM, Caturla MYR, Furtado MM, Ana ASS. Blown pack spoilage in vacuum-packaged meat : A review on clostridia as causative agents ,

- sources , detection methods , contributing factors and mitigation strategies. Trends Food Sci Technol. 2016;52: 123–138. doi:10.1016/j.tifs.2016.04.010
115. Rosenkvist H, Hansen A. Contamination profiles and characterisation of *Bacillus* species in wheat bread and raw materials for bread production. Int J Food Microbiol. 1995;26: 353–363.
116. Kmiha S, Aouadhi C, Klibi A, Jouini A, Béjaoui A, Mejri S, et al. Factors influencing the quality of UHT milk; Seasonal and regional occurrence of heat resistant spore-forming bacteria in the course of UHT milk production in Tunisia. J Dairy Sci. 2016;In press.
117. Aouadhi C, Maaroufi A, Mejri S. Incidence and characterisation of aerobic spore-forming bacteria originating from dairy milk in Tunisia. Int J Dairy Technol. 2014;67: 95–102. doi:10.1111/1471-0307.12088
118. Jonghe V De, Coorevits A, Block J De, Coillie E Van, Grijspeerdt K, Herman L, et al. Toxinogenic and spoilage potential of aerobic spore-formers isolated from raw milk. Int J Food Microbiol. Elsevier B.V.; 2010;136: 318–325. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2009.11.007
119. Kalogridou-vassiliadou D. Biochemical activities of bacillus species isolated from flat sour evaporated milk. J Dairy Sci. Elsevier; 1992;75: 2681–2686. doi:10.3168/jds.S0022-0302(92)78030-8
120. Crielly EM, Logan NA, Anderton A. Studies on the *Bacillus* flora of milk and milk products. 1994; 256–263.
121. Scheldeman P, Herman L, Foster S, Heyndrickx M. *Bacillus sporothermodurans* and other highly heat-resistant spore formers in milk. J Appl Microbiol. 2006;101: 542–555.
122. Klijn N, Herman L, Langeveld L, Vaerewijck M, Wagendorp AA, Huemer I, et al. Genotypical and phenotypical characterization of *Bacillus sporothermodurans* strains, surviving UHT sterilisation. Int Dairy J. Elsevier; 1997;7: 421–428.
123. Yamazaki K, Teduka H, Shinano H. Isolation and identification of *Alicyclobacillus acidoterrestris* from acidic beverages. Biosci Biotechnol Biochem. 1996;60: 543–545.

124. Martinez-Monteagudo SI, Balasubramaniam VM. Fundamentals and Applications of High-Pressure Processing Technology. In: Balasubramaniam VM, Barbosa-Cánovas G V, Lelieveld HLM, editors. High Pressure Processing of Food. Springer. New York; 2016. pp. 3–17.
125. Perrier-cornet J, Moussa M, Gervais P. Applications des hautes pressions hydrostatiques en agroalimentaire. Tech l'ingénieur. 2009;
126. Martinez-Monteagudo SI, Saldan MDA. Chemical Reactions in Food Systems at High Hydrostatic Pressure. Food Eng Rev. 2014;6: 105–127. doi:10.1007/s12393-014-9087-6
127. Yamamoto K, Buckow R. Pressure Gelatinization of Starch. In: Balasubramaniam VM, Barbosa-Cánovas G V., Lelieveld HLM, editors. High Pressure Processing of Foods. Springer. New York: Food Engineering Series; 2016. pp. 433–459.
128. Yang J, Powers JR. Effects of High Pressure on Food Proteins. In: Balasubramaniam VM, Barbosa-Cánovas G V., Lelieveld HLM, editors. High Pressure Processing of Foods. Springer. New York: Food Engineering Series; 2016. pp. 353–389. doi:10.1007/978-1-4939-3233-7
129. Oey I. Effects of High Pressure on Enzymes. In: Balasubramaniam VM, Barbosa-Cánovas G V., Lelieveld H, editors. High Pressure Processing of Foodscsessing of Foods. Springer. New York: Food Engineering Series; 2016. pp. 391–431.
130. Heremans K, Smeller L. Protein structure and dynamics at high pressure. Biochim Biophys Acta. 1998;1386.
131. Laszlo Smeller. Pressure-temperature phase diagrams of biomolecules. Biochim Biophys Acta. 2002;1595: 11–29.
132. Medina-Meza IG, Barnaba C, Barbosa-Cánovas G V. Effects of high pressure processing on lipid oxidation : A review. Innov Food Sci Emerg Technol. Elsevier Ltd; 2014;22: 1–10. doi:10.1016/j.ifset.2013.10.012
133. Zulkurnain M, Maleky F, Balasubramaniam VM. High Pressure Processing Effects on Lipids Thermophysical Properties and Crystallization Kinetics. Food Eng Rev. Springer US; 2016;8: 393–413. doi:10.1007/s12393-016-9144-

134. Kato M, Hayashi R. Effects of high pressure on lipids and biomembranes for understanding high-pressure-induced biological phenomena. *Biosci Biotechnol Biochem.* 1999;63: 1321–1328.
135. Daryaei H, Yousef AE, Balasubramaniam VM. *Microbiological Aspects of High-Pressure Processing of Food: Inactivation of Microbial Vegetative Cells and Spores.* Springer New York; 2016. pp. 271–294.
136. Smelt JP, Hellemons JC, Patterson M. Effects of High Pressure on Vegetative Microorganisms. In: Hendrickx MEG, Knorr D, Ludikhuyze L, Van Loey A, Heinz V, editors. *Ultra high pressure treatments of Foods.* Food Engin. Boston: Springer; 2001. pp. 55–76.
137. Shigehisa T, Ohmori T, Taji S, Hayashi R. Effects of high hydrostatic pressure on characteristics of pork slurries and inactivation of microorganisms associated with meat and meat products. *Int J Food Microbiol.* 1991;12: 207–215.
138. Parish ME. High pressure inactivation of *saccharomyces cerevisiae*, endogenous microflora and pectinmethylesterase in orange juice. *J Food Saf.* 1998;18: 57–65.
139. Raso J, Calderón ML, Góngora M, Barbosa-cánovas G V, Swanson BG. Inactivation of *Zygosaccharomyces Bailii* in Fruit Juices by Heat , High Hydrostatic Pressure and Pulsed Electric Fields. *J Food Sci.* 1998;63: 1042–1044.
140. Patterson MF, Quinn M, Simpson R, Gilmour A. Sensitivity of Vegetative Pathogens to High Hydrostatic Pressure Treatment in Phosphate-Buffered Saline and Foods. *J Food Prot.* 1995;58: 524–529.
141. Metrick C, Hoover G, Farkas DF. Effects of High Hydrostatic Pressure on Heat-Resistant Heat-Sensitive Strains of *Salmonella*. *J Food Sci.* 1989;54: 1547–1550.
142. Molina-Hoppner A, Doster W, Vogel RF, Ganzle MG. Protective Effect of Sucrose and Sodium Chloride for *Lactococcus lactis* during Sublethal and Lethal High-Pressure Treatments. *Appl Environ Microbiol.* 2003;70: 2013–

2020. doi:10.1128/AEM.70.4.2013
143. Paredes-Sabja D, Gonzalez M, Sarker MR, Torres JA. Combined Effects of Hydrostatic Pressure , Temperature, and pH on the Inactivation of Spores of *Clostridium perfringens* Type A and *Clostridium sporogenes* in Buffer Solutions. *Food Microbiol Saf.* 2007;72: 202–206. doi:10.1111/j.1750-3841.2007.00423.x
144. Van Opstal I, Bagamboula CF, Vanmuysen SCM, Opstal I Van, Wuytack EY, Michiels CW. Inactivation of *Bacillus cereus* spores in milk by mild pressure and heat treatments. *Int J Food Microbiol.* 2004;92: 227–234. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2003.09.011
145. Koseki S, Yamamoto K. pH and solute concentration of suspension media affect the outcome of high hydrostatic pressure treatment of *Listeria monocytogenes*. *Int J Food Microbiol.* 2006;111: 175–179. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2006.05.008
146. Mackey BM, Forestière K, Isaacs N. Factors affecting the resistance of *Listeria monocytogenes* to high hydrostatic pressure. *Food Biotechnol.* 1995;9: 1–11. doi:10.1080/08905439509549881
147. Black EP, Koziol-Dube K, Guan D, Wei J, Setlow B, Cortezzo DE, et al. Factors influencing germination of *Bacillus subtilis* spores via activation of nutrient receptors by high pressure. *Appl Environ Microbiol. American Society for Microbiology;* 2005;71: 5879–87.
148. Wuytack EY, Boven S, Michiels CW. Comparative study of pressure-induced germination of *Bacillus subtilis* spores at low and high pressure. *Appl Environ Microbiol.* 1998;64: 3220–3224.
149. Reineke K, Mathys A, Heinz V, Knorr D. Mechanisms of endospore inactivation under high pressure. *Trends Microbiol.* 2013;21: 296–304.
150. Reineke K, Ellinger N, Berger D, Baier D, Mathys A, Setlow P, et al. Structural analysis of high pressure treated *Bacillus subtilis* spores. *Innov Food Sci Emerg Technol.* 2013;17: 43–53.
151. Sale AJH, Gould GW, Hamilton WA. Inactivation of bacterial spores by hydrostatic pressure. *J Gen Microbiol.* 1970;60: 323–334.

152. Reineke K, Doehner I, Schlumbach K, Baier D, Mathys A, Knorr D. The different pathways of spore germination and inactivation in dependence of pressure and temperature. *Innov Food Sci Emerg Technol*. Elsevier Ltd; 2012;13: 31–41. doi:10.1016/j.ifset.2011.09.006
153. Black EP, Koziol-dube K, Guan D, Wei J, Setlow B, Cortezzo DE, et al. Factors Influencing Germination of *Bacillus subtilis* Spores via Activation of Nutrient Receptors by High Pressure. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2005;71: 5879–5887.
154. Nguyen Thi Minh H, Durand A, Loison P, Perrier-Cornet J-M, Gervais P. Effect of sporulation conditions on the resistance of *Bacillus subtilis* spores to heat and high pressure. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2011;90: 1409–1417.
155. Braganza LF, Worcester DL. Structural changes in lipid bilayers and biological membranes caused by hydrostatic pressure. *Biochemistry*. 1986;25: 7484–7488.
156. Cabrera-Martinez R-M, Tovar-Rojo F, Vepachedu VR, Setlow P. Effects of Overexpression of Nutrient Receptors on Germination of Spores of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol*. 2003;185: 2457–2464. doi:10.1128/JB.185.8.2457
157. Casadei MA, Manas P, Niven G, Needs E, Mackey BM. Role of Membrane Fluidity in Pressure Resistance of *Escherichia coli* NCTC 8164. *Appl Environ Microbiol*. 2002;68: 5965–5972. doi:10.1128/AEM.68.12.5965
158. Raso J, Palop A, Pagan R, Condon S. Inactivation of *Bacillus subtilis* spores by combining ultrasonic waves under pressure and mild heat treatment. *J Appl Microbiol*. 1998;85: 849–854. doi:DOI 10.1046/j.1365-2672.1998.00593.x
159. Garcia D, der Voort M van, Abee T. Comparative analysis of *Bacillus weihenstephanensis* KBAB4 spores obtained at different temperatures. *Int J Food Microbiol*. 2010;140: 146–153.
160. Lenz CA, Vogel RF. Differential effects of sporulation temperature on the high pressure resistance of *Clostridium botulinum* type E spores and the interconnection with sporulation medium cation contents. *Food Microbiol*. 2015;46: 434–442.

161. Doona CJ, Ghosh S, Feeherry FF, Huang Y, Chen H, Setlow P. High pressure germination of *Bacillus subtilis* spores with alterations in levels and types of germination proteins. 2014;
162. Black EP, Setlow P, Hocking AD, Stewart CM, Kelly AL, Hoover DG. Response of spores to high-pressure processing. *Compr Rev Food Sci Food Saf.* 2007;6: 103–119.
163. Luu S, Cruz-Mora J, Setlow B, Feeherry FE, Doona CJ, Setlow P. The Effects of Heat Activation on Nutrient and High-Pressure Germination of Spores of *Bacillus* Species With and Without Various Germination Proteins. *Appl Environ Microbiol.* 2015;81: 2927–2938.
164. Daryei H, Yousef AE, Balasubramaniam VM. Microbiological Aspect of High-Pressure Processing of Food: Inactivation of Microbial Vegetative Cells and Spores. In: Balasubramaniam VM, Barbosa-Cánovas G V., Lelieveld HLM, editors. *High Pressure Processing of Food.* Food Engin. New York: Springer; 2016. pp. 271–294.
165. Ahn J, Balasubramaniam VM, Yousef AE. Inactivation kinetics of selected aerobic and anaerobic bacterial spores by pressure-assisted thermal processing. *Int J Food Microbiol.* 2015;113: 321–329. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2006.08.012
166. Hayakawa I, Kanno T, Yoshiyama K. Oscillatory Compared with Continuous High Pressure Sterilization on *Bacillus stearothermophilus* Spores. *J Food Sci.* 1994;59.
167. Ananta E, Heinz V, Schluter O. Kinetic studies on high-pressure inactivation of *Bacillus stearothermophilus* spores suspended in food matrices. *Innov Food Sci Emerg Technol.* 2001;2: 261–272.
168. Reineke K, Mathys A, Knorr D. The Impact of High Pressure and Temperature on Bacterial Spores: Inactivation Mechanisms of *Bacillus subtilis* above 500 MPa. *J Food Sc.* 2011;76: 189–197. doi:10.1111/j.1750-3841.2011.02066.x
169. Munakata N. Ultraviolet Sensitivity of *Bacillus subtilis* Spores upon Germination and Outgrowth. *J Bacteriol.* 1974;120: 59–65.

170. Nerandzic MM, Donskey CJ. Triggering Germination Represents a Novel Strategy to Enhance Killing of *Clostridium difficile* Spores. *PLoS One*. 2010;5: 2–9. doi:10.1371/journal.pone.0012285
171. Durban E, Goodnow R, Grecz N. Changes in Resistance to Radiation and Heat During Sporulation and Germination of *Clostridium botulinum* 33A. *J Bacteriol*. 1970;102: 590–592.
172. Raso J, Gongora-Nieto MM, Barbosa-Canovas G V, Swanson BG. Influence of several environmental factors on the initiation of germination and inactivation of *Bacillus cereus* by high hydrostatic pressure. *Int J Food Microbiol*. 1998;44: 125–132.
173. Akhtar S, Paredes-Sabja D, Torres JA, Sarker MR. Strategy to inactivate *Clostridium perfringens* spores in meat products. *Food Microbiol*. 2009;26: 272–277.
174. Ishimori T, Takahashi K, Goto M, Nakagawa S, Kasai Y, Konagaya Y, et al. Synergistic effects of high hydrostatic pressure, mild heating, and amino acids on germination and inactivation of *Clostridium sporogenes* spores. *Appl Environ Microbiol*. 2012;78: 8202–8207.
175. Stewart CM, Dunne CP, Sikes A, Hoover DG. Sensitivity of spores of *Bacillus subtilis* and *Clostridium sporogenes* PA 3679 to combinations of high hydrostatic pressure and other processing parameters. *Innov Food Sci Emerg Technol*. 2000;1: 49–56.
176. Shearer AEH, Dunne CP, Sikes A, Hoover DG. Bacterial spore inhibition and inactivation in foods by pressure, chemical preservatives, and mild heat. *J Food Prot*. 2000;63: 1503–1510.
177. López-Pedemonte TJ, Roig-Sagués AX, Trujillo AJ, Capellas M, Guamis B. Inactivation of Spores of *Bacillus cereus* in Cheese by High Hydrostatic Pressure with the Addition of Nisin or Lysozyme. *J Dairy Sci*. 2003;86: 3075–3081.
178. Sokołowska B, Skapska S, Fonberg-Broczek M, Niezgoda J, Chotkiewicz M, Dekowska A, et al. The combined effect of high pressure and nisin or lysozyme on the inactivation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores in

- apple juice. *High Press Res.* 2012;32: 119–127.
179. Gayán E, Torres JA, Paredes-Sabja D. Hurdle approach to increase the microbial inactivation by high pressure processing: Effect of essential oils. *Food Eng Rev.* 2012;4: 141–148.
180. Bermúdez-Aguirre D, Corradini MG, Candoğan K, Barbosa-Cánovas G. High Pressure Processing in Combination with High Temperature and Other Preservation Factors. In: Balasubramaniam VM, Barbosa-Cánovas G V., Lelieveld HLM, editors. *High Pressure Processing of Foods.* Springer. New York; 2016. pp. 193–215.
181. Corthouts J, Michiels CW. Inhibition of nutrient- and high pressure-induced germination of *Bacillus cereus* spores by plant essential oils. *Innov Food Sci Emerg Technol.* Elsevier Ltd; 2016;34: 250–258.
182. Luu-Thi H, Corthouts J, Passaris I, Grauwet T, Aertsen A, Hendrickx M, et al. Carvacrol suppresses high pressure high temperature inactivation of *Bacillus cereus* spores. *Int J Food Microbiol.* 2015;197: 45–52.
183. Modugno C, Simonin H, Pilet M-F, Zagorec M, Perrier-Cornet J-M. La biopréservation : une stratégie d ’ avenir pour la conservation des aliments. *Ind Aliment Agric.* 2015; 6–8.
184. Vermeiren L, Devlieghere F, Debevere J. Evaluation of meat born lactic acid bacteria as protective cultures for the biopreservation of cooked meat products. *Int J Food Microbiol.* 2004;96: 149–164.
185. Stiles ME, Hastings JW. Bacteriocin production by lactic acid bacteria: potential for use in meat preservation. *Trends Food Sci Technol.* 1991;2: 247–251.
186. Yildiz F. Development and manufacture of yogurt and other functional dairy products. CRC Press; 2009.
187. Guinane CM, Cotter PD, Hill C, Ross RP. Microbial solutions to microbial problems; lactococcal bacteriocins for the control of undesirable biota in food. *J Appl Microbiol.* 2005;98: 1316–1325.
188. Leistner L, Gould GW. The hurdle concept. *Hurdle Technologies.* Springer; 2002. pp. 17–28.

189. Matamoros S, Leroi F, Cardinal M, Gigout F, Chadli FK, Cornet J, et al. Psychrotrophic lactic acid bacteria used to improve the safety and quality of vacuum-packaged cooked and peeled tropical shrimp and cold-smoked salmon. *J Food Prot.* 2009;72: 365–374.
190. Thonart P, Dortu C. Les bactériocines des bactéries lactiques: caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires. *Biotechnol Agron Société, Environ.* 2009;13: 143–154.
191. De Vuyst L, Vandamme EJ. Antimicrobial potential of lactic acid bacteria. In: De Vuyst L, Vandamme EJ, editors. *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria.* Springer. Boston: Springer; 1994. pp. 91–142.
192. Alakomi H-L, Skyttä E, Saarela M, Mattila-Sandholm T, Latva-Kala K, Helander IM. Lactic acid permeabilizes gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane. *Appl Environ Microbiol.* 2000;66: 2001–2005.
193. Naim F, Zareifard MR, Zhu S, Huizing RH, Grabowski S, Marcotte M. Combined effects of heat, nisin and acidification on the inactivation of *Clostridium sporogenes* spores in carrot-alginate particles: from kinetics to process validation. *Food Microbiol.* 2008;25: 936–941.
194. Lange M, Champagne CP, Goulet J. Contribution de *Lactococcus lactis* ssp *lactis* biovar *diacetylactis* au brunissement de fromages de types brie et camembert. *Lait.* 1994;74: 187–195.
195. Jay JM, Rivers GM. Antimicrobial activity of some food flavoring compounds. *J Food Saf.* 1984;6: 129–139.
196. Piard JC, Desmazeaud M. Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. 1. Oxygen metabolites and catabolism end-products. *Lait.* 1991;71: 525–541.
197. Whittenbury R. Hydrogen peroxide formation and catalase activity in the lactic acid bacteria. *J Gen Microbiol.* 1964;35: 13–26.
198. Dahiya RS, Speck ML. Hydrogen peroxide formation by lactobacilli and its effect on *Staphylococcus aureus*. *J Dairy Sci.* 1968;51: 1568–1572.
199. Fang FC. Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: concepts and

- controversies. *Nat Rev Microbiol.* 2004;2: 820–832.
200. Gänzle MG. Reutericyclin: biological activity, mode of action, and potential applications. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2004;64: 326–332.
201. Arques JL, Rodriguez E, Nunez M, Medina M. Antimicrobial activity of nisin, reuterin, and the lactoperoxidase system on *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in cuajada, a semisolid dairy product manufactured in Spain. *J Dairy Sci.* 2008;91: 70–75.
202. Klaenhammer TR. Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie.* 1988;70: 337–349.
203. Klaenhammer TR. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Rev.* 1993;12: 39–85.
204. Cotter PD, Hill C, Ross RP. Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nat Rev Microbiol.* 2005;3: 777–788.
205. Heng NCK, Tagg JR. What's in a name? Class distinction for bacteriocins. *Nat Rev Microbiol.* 2006;4.
206. Uteng M, Hauge HH, Markwick PRL, Fimland G, Mantzilas D, Nissen-Meyer J, et al. Three-dimensional structure in lipid micelles of the pediocin-like antimicrobial peptide sakacin P and a sakacin P variant that is structurally stabilized by an inserted C-terminal disulfide bridge. *Biochemistry.* 2003;42: 11417–11426.
207. Breukink E, de Kruijff B. Lipid II as a target for antibiotics. *Nat Rev Drug Discov.* 2006;5: 321–323.
208. Delves-Broughton J, Williams GC, Wilkinson S. The use of the bacteriocin, nisin, as a preservative in pasteurized liquid whole egg. *Lett Appl Microbiol.* 1992;15: 133–136.
209. Delves-Broughton J. Use of Nisaplin® as a preservative in pasteurised liquid egg products. *Int Egg Forum.* 2007;
210. Muriana PM, Kanach L. Use of Nisaplin™ to inhibit spoilage bacteria in buttermilk ranch dressing. *J Food Prot.* 1995;58: 1109–1113.
211. Plockova M, Stepanek M, Demnerova K, Curda L, Svirakova E. Effect of nisin for improvement in shelf-life and quality of processed cheese. *Adv food*

- Sci. 1996;18: 78–83.
212. Vedamuthu ER. Culturing milk based medium with *Pediococcus acidilactici*; heat inactivation; adding yogurt culture. US 5445835 A. USA: Google Patents; 1995.
213. Richard C, Brillet A, Pilet MF, Prévost H, Drider D. Evidence on inhibition of *Listeria monocytogenes* by divercin V41 action. *Lett Appl Microbiol.* 2003;36: 288–292.
214. Jameson JE. A discussion of the dynamics of *Salmonella* enrichment. *J Hyg (Lond).* 1962;60: 193–207.
215. Mellefont LA, McMeekin TA, Ross T. Effect of relative inoculum concentration on *Listeria monocytogenes* growth in co-culture. *Int J Food Microbiol.* 2008;121: 157–168.
216. Le Marc Y, Valík L, Medvedová A. Modelling the effect of the starter culture on the growth of *Staphylococcus aureus* in milk. *Int J Food Microbiol.* 2009;129: 306–311.
217. Cornu M, Billoir E, Bergis H, Beaufort A, Zuliani V. Modeling microbial competition in food: Application to the behavior of *Listeria monocytogenes* and lactic acid flora in pork meat products. *Food Microbiol.* 2011;28: 639–647.
218. Mejlholm O, Dalgaard P. Modeling and predicting the growth of lactic acid bacteria in lightly preserved seafood and their inhibiting effect on *Listeria monocytogenes*. *J Food Prot.* 2007;70: 2485–2497.
219. Yamazaki K, Murakami M, Kawai Y, Inoue N, Matsuda T. Use of nisin for inhibition of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in acidic drinks. *Food Microbiol.* 2000;17: 315–320. doi:10.1006/fmic.1999.0309
220. Komitopoulou E, Boziaris IS, Davies EA, Delves-broughton J, Adams MR. *Alicyclobacillus acidoterrestris* in fruit juices and its control by nisin. *Int J Food Sci Technol.* 1999;34: 81–85.
221. Mansour M, Amri D, Bouttefroy A, Linder M, Milliere JB. Inhibition of *Bacillus licheniformis* spore growth in milk by nisin , monolaurin , and pH combinations. *J Appl Microbiol.* 1999;86: 311–324.

222. Aouadhi C, Mejri S, Maaroufi A. Inhibitory effects of nisin and potassium sorbate alone or in combination on vegetative cells growth and spore germination of *Bacillus sporothermodurans* in milk. *Food Microbiol.* 2015;46: 40–45.
223. Mazzotta AS, Crandall AD, Montville TJ. Nisin Resistance in *Clostridium botulinum* Spores and Vegetative Cells. *Appl Environ Microbiol.* 1997;63: 2654–2659.
224. Nerandzic MM, Donskey CJ. Activate to Eradicate: Inhibition of *Clostridium difficile* Spore Outgrowth by the Synergistic Effects of Osmotic Activation and Nisin. *PLoS One.* 2013;8. doi:10.1371/journal.pone.0054740
225. Jaquette CB, Beuchat LR. Combined Effects of pH , Nisin , and Temperature on Growth and Survival of Psychrotrophic *Bacillus cereus*. *J Food Prot.* 1998;61: 563–570.
226. Morris SL, Hansen JN. Inhibition of *Bacillus cereus* spore outgrowth by covalent modification of a sulfhydryl group by nitrosothiol and iodoacetate. *J Bacteriol.* 1981;148: 465–471.
227. Morris SL, Walsh RC, Hansen JN. Identification and characterization of some bacterial membrane sulfhydryl groups which are targets of bacteriostatic and antibiotic action. *J Biol Chem.* 1984;259: 13590–13594.
228. Gut IM, Prouty AM, Ballard JD, van der Donk WA, Blanke SR. Inhibition of *Bacillus anthracis* spore outgrowth by nisin. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52: 4281–4288.
229. Gut IM, Blanke SR, Van Der Donk WA. Mechanism of Inhibition of *Bacillus anthracis* Spore Outgrowth by the Lantibiotic Nisin. *ACS Chem Biol.* 2011;6: 744–752.
230. Grande MJ, Lucas R, Abriouel H, Omar N Ben, Maqueda M, Martí M. Control of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in fruit juices by enterocin AS-48. *Int J Food Microbiol.* 2005;104: 289–297. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2005.03.010
231. Grande MJ, Lucas R, Abriouel H, Valdivia E, Omar N Ben, Maqueda M. Inhibition of *Bacillus licheniformis* LMG 19409 from ropy cider by

- enterocin AS-48. *J Appl Microbiol.* 2006;101: 422–428. doi:10.1111/j.1365-2672.2006.02942.x
232. Abriouel H, Maqueda M, Gálvez A, Martínez-Bueno M, Valdivia E. Inhibition of bacterial growth, enterotoxin production, and spore outgrowth in strains of *Bacillus cereus* by bacteriocin AS-48. *Appl Environ Microbiol.* 2002;68: 1473–1477.
233. Wang G, Manns DC, Guron GK, Churey JJ, Worobo RW. Large-Scale Purification , Characterization , and Spore Outgrowth Inhibitory Effect of Thurincin H , a Bacteriocin Produced by *Bacillus thuringiensis* SF361. *Probiotics Antimicrob Proteins.* 2014; 105–113. doi:10.1007/s12602-014-9159-1
234. Gut IM, Blanke SR, Van Der Donk WA. Mechanism of Inhibition of *Bacillus anthracis* Spore Outgrowth by the Lantibiotic Nisin. *ACS Chem Biol.* 2011;6: 744–752. doi:10.1021/cb1004178
235. Hasper HE, Kramer NE, Smith JL, Hillman JD, Zachariah C, Kuiper OP, et al. An Alternative Bactericidal Mechanism of Action for Lantibiotic Peptides That Target Lipid II. *Science* (80-). 2006;313. doi:10.1126/science.1129818
236. Egan K, Field D, Rea MC, Ross RP, Hill C, Cotter PD. Bacteriocins : Novel Solutions to Age Old Spore-Related Problems? *Front Microbiol.* 2016;7. doi:10.3389/fmicb.2016.00461
237. Chung K-T, Dickson JS, Crouse JD. Effects of nisin on growth of bacteria attached to meat. *Appl Environ Microbiol.* 1989;55: 1329–1333.
238. Rose NL, Sporns P, Stiles ME, McMullen LM. Inactivation of nisin by glutathione in fresh meat. *J Food Sci.* 1999;64: 759–762.
239. Nattress FM, Yost CK, Baker LP. Evaluation of the ability of lysozyme and nisin to control meat spoilage bacteria. *Int J Food Microbiol.* 2001;70: 111–119.
240. Kumar B, Balgir PP, Kaur B. Assessment of stability and biopreservative effect of recombinant pediocin CP2. *Int J Food Ferment Technol.* 2012;2: 149–156.

241. Taylor SL, Somers EB, Krueger LA. Antibotulinal effectiveness of nisin-nitrite combinations in culture medium and chicken frankfurter emulsions. *J Food Prot.* 1985;48: 234–239.
242. Nattress FM, Baker LP. Effects of treatment with lysozyme and nisin on the microflora and sensory properties of commercial pork. *Int J Food Microbiol.* 2003;85: 259–267.
243. Zagorec M, Chaillou S, Champomier-Verges MC, CRUTZ-LE COQ A-M. Une bactérie adaptée à la viande: Du génome de *Lactobacillus sakei* à la bio-conservation des produits carnés. *Viandes Prod carnés.* 2006;25: 91–94.
244. Chaillou S, Christieans S, Rivollier M, Lucquin I, Champomier-Verges M-C, Zagorec M. Quantification and efficiency of *Lactobacillus sakei* strain mixtures used as protective cultures in ground beef. *Meat Sci.* 2014;97: 332–338.
245. Comi G, Tirloni E, Andyanto D, Manzano M, Iacumin L. Use of bio-protective cultures to improve the shelf-life and the sensorial characteristics of commercial hamburgers. *LWT-Food Sci Technol.* 2015;62: 1198–1202.
246. Gao Y, Li D, Liu X. Effects of *Lactobacillus sakei* C2 and sakacin C2 individually or in combination on the growth of *Listeria monocytogenes*, chemical and odor changes of vacuum-packed sliced cooked ham. *Food Control.* 2015;47: 27–31.
247. Mey E De, Klerck K De, Maere H De, Dewulf L, Derdelinckx G. The occurrence of N-nitrosamines, residual nitrite and biogenic amines in commercial dry fermented sausages and evaluation of their occasional relation. *Meat Sci.* Elsevier Ltd; 2014;96: 821–828. doi:10.1016/j.meatsci.2013.09.010
248. Jones RJ, Hussein HM, Zagorec M, Brightwell G, Tagg JR. Isolation of lactic acid bacteria with inhibitory activity against pathogens and spoilage organisms associated with fresh meat. 2008;25: 228–234. doi:10.1016/j.fm.2007.11.001
249. Nieto-Lozano JC, Reguera-Useros JI, Peláez-Martínez M del C, Hardisson

- de la Torre A. Effect of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici* against *Listeria monocytogenes* and *Clostridium perfringens* on Spanish raw meat. *Meat Sci.* 2006;72: 57–61. doi:10.1016/j.meatsci.2005.06.004
250. Gioia D Di, Mazzola G, Nikodinoska I, Aloisio I, Langerholc T, Rossi M, et al. Lactic acid bacteria as protective cultures in fermented pork meat to prevent *Clostridium* spp. growth. *Int J Food Microbiol.* Elsevier B.V.; 2016;234: 53–59. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2016.06.019
251. Garde S, Ávila M, Arias R, Gaya P, Nuñez M. Outgrowth inhibition of *Clostridium beijerinckii* spores by a bacteriocin-producing lactic culture in ovine milk cheese. *Int J Food Microbiol.* Elsevier B.V.; 2011;150: 59–65. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2011.07.018
252. Anastasiou R, Aktypis A, Georgalaki M, Papadelli M, Vuyst L De, Tsakalidou E. Inhibition of *Clostridium tyrobutyricum* by *Streptococcus macedonicus* ACA-DC 198 under conditions mimicking Kasserli cheese production and ripening. *Int Dairy J.* Elsevier Ltd; 2009;19: 330–335. doi:10.1016/j.idairyj.2008.12.001
253. Kalchayanand N, Dunne CP, Sikes A, Ray B. Inactivation of bacterial spores by combined action of hydrostatic pressure and bacteriocins in roast beef. *J Food Saf.* 2003;23: 219–231.
254. Black EP, Linton M, McCall RD, Curran W, Fitzgerald GF, Kelly AL, et al. The combined effects of high pressure and nisin on germination and inactivation of *Bacillus* spores in milk. *J Appl Microbiol.* Blackwell Publishing Ltd; 2008;105: 78–87.
255. Aouadhi C, Simonin H, Mejri S, Maaroufi A. The combined effect of nisin, moderate heating and high hydrostatic pressure on the inactivation of *Bacillus sporothermodurans* spores. *J Appl Microbiol.* 2013;115: 147–155.
256. Delves-Broughton J, Blackburn P, Evans RJ, Hugenholtz J. Applications of the bacteriocin, nisin. *Antonie van Leeuwenhoek, Int J Gen Mol Microbiol.* 1996;69: 193–202.
257. Hasper HE, Kruijff B De, Breukink E. Assembly and Stability of Nisin - Lipid II Pores. *Biochemistry.* 2004;43: 11567–11575. doi:10.1021/bi049476b

258. Kupke T, Gotz F. Post-translational modifications of lanfibiotics. *Antonie van Leeuwenhoek, J Microbiol.* 1996;69: 139–150.
259. Black EP, Kelly AL, Fitzgerald GF. The combined effect of high pressure and nisin on inactivation of microorganisms in milk. *Innov Food Sci Emerg Technol.* 2005;6: 286–292.
260. Lee DU, Heinz V, Knorr D. Effects of combination treatments of nisin and high-intensity ultrasound with high pressure on the microbial inactivation in liquid whole egg. *Innov Food Sci Emerg Technol.* 2003;4: 387–393. doi:10.1016/S1466-8564
261. Black EP, Linton M, McCall RD, Curran W, Fitzgerald GF, Kelly AL, et al. The combined effects of high pressure and nisin on germination and inactivation of *Bacillus* spores in milk. *J Appl Microbiol.* 2008;105: 78–87. doi:10.1111/j.1365-2672.2007.03722.x
262. Roberts CM, Hoover DG. Sensitivity of *Bacillus coagulans* spores to combinations of high hydrostatic pressure, heat, acidity and nisin. *J Appl Bacteriol.* 1996;81: 363–368.
263. Davies EA, Bevis HE, Potter R, Harris J, Williams GC, Delves-Broughton J. Research note: the effect of pH on the stability of nisin solution during autoclaving. *Lett Appl Microbiol.* 1998;27: 186–187.
264. Hsu SD, Breukink E, Tischenko E, Lutters MAG, Kruijff B De, Kaptein R, et al. The nisin – lipid II complex reveals a pyrophosphate cage that provides a blueprint for novel antibiotics. *Nat Struct Mol Biol.* 2004;11: 963–967. doi:10.1038/nsmb830
265. Tramer J, Fowler GG. Estimation of nisin in foods. *J Sci Food Agric.* 1964;15: 522–528.
266. Glasoe PK, Long FA. Use of glass electrodes to measure acidities in deuterium oxide. *J Phys Chem.* 1960;64: 188–190. doi:10.1021/j100830a521
267. Khan A, Dang K, Riedl B, Lacroix M. Optimization of the antimicrobial activity of nisin , Na-EDTA and pH against gram-negative and gram-positive bacteria. *LWT - Food Sci Technol. Elsevier Ltd;* 2015;61: 124–129. doi:10.1016/j.lwt.2014.11.035

268. Thomas L V., Wimpenny JW. T. Investigation of the Effect of Combined Variations in Temperature , pH , and NaCl Concentration on Nisin Inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*. *Appl Environ Microbiol.* 1996;62: 2006–2012.
269. Ramseier HR. The mode of action of nisin on *Clostridium butyricum*. *Arch Mikrobiol.* 1960;37.
270. Wei L, Hansen JN. Some Chemical and Physical Properties of Nisin. *Appl Environ Microbiol.* 1990;56: 2551–2558.
271. Dykes GA, Hancock REW, Hasting JW. Structural Variations in Nisin Associated with Different Membrane Mimicking and pH Environments. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998;727: 723–727.
272. Hooven HW Van Den, Fogolarp F, Rollernab HS, Koningsa RNH, Hilbers CW, Vena FJM Van De. NMR and circular dichroism studies of the lantibiotic nisin in environments. *FEBS Lett.* 1993;319: 189–194.
273. Johnson WC. Protein Secondary Structure and Circular Dichroism: A Practical Guide. *Proteins Struct Funct Genet.* 1990;7: 205–214.
274. Rieppo L, Saarakkala S, Närhi T, Helminen HJ, Jurvelin JS, Rieppo J. Application of second derivative spectroscopy for increasing molecular specificity of fourier transform infrared spectroscopic imaging of articular cartilage. *Osteoarthr Cartil.* Elsevier Ltd; 2012;20: 451–459. doi:10.1016/j.joca.2012.01.010
275. El-jastimi R, Lafleur M. Structural characterization of free and membrane-bound nisin by infrared spectroscopy. *Biochim Biophys Acta - Biomembr.* 1997;1324: 151–158.
276. Barth A. Infrared spectroscopy of proteins. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg.* 2007;1767: 1073–1101. doi:10.1016/j.bbabi.2007.06.004
277. Oberg KA, Ruyschaert J, Goormaghtigh E. The optimization of protein secondary structure determination with infrared and circular dichroism spectra. *FEBS J.* 2015;271: 2937–2948. doi:10.1111/j.1432-1033.2004.04220.x
278. Wells-Bennik MHJ, Eijlander RT, Besten HMW Den, Berendsen EM,

- Warda AK, Krawczyk AO, et al. Bacterial Spores in Food: Survival, Emergence, and Outgrowth. *Annu Rev Food Sci Technol.* 2016;7: 457–482. doi:10.1146/annurev-food-041715-033144
279. André S, Zuber F, Remize F. Thermophilic spore-forming bacteria isolated from spoiled canned food and their heat resistance. Results of a French ten-year survey. *Int J Food Microbiol.* 2013;165: 134–143.
280. Mills J, Donnison A, Brightwell G. Factors affecting microbial spoilage and shelf-life of chilled vacuum-packed lamb transported to distant markets: A review. *MESC. Elsevier Ltd;* 2014;98: 71–80. doi:10.1016/j.meatsci.2014.05.002
281. Doona C., Feeherry FE, Setlow B, Wang S, Li W, Nichols FC, et al. Effects of High-Pressure Treatment on Spores of Clostridium Species. *Appl Environ Microbiol. American Society for Microbiology;* 2016;82: 5287–97.
282. Stiles ME. Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 1996;70: 331–345.
283. Gao Y, Qiu W, Wu D, Fu Q. Assessment of Clostridium perfringens Spore Response to High Hydrostatic Pressure and Heat with Nisin. *Appl Biochem Biotechnol. Humana Press Inc;* 2011;164: 1083–1095. doi:10.1007/s12010-011-9196-0
284. Lopez-Pedemonte T, Roig-Sague AX, Trujillo AJ, Capellas M, Guamis B. Inactivation of Spores of Bacillus cereus in Cheese by High Hydrostatic Pressure with the Addition of Nisin or Lysozyme. 2003; 3075–3081.
285. Thorsen L, Hansen BM, Nielsen KF, Hendriksen NB, Phipps RK, Budde BB. Characterization of emetic Bacillus weihenstephanensis, a new cereulide-producing bacterium. *Appl Environ Microbiol. American Society for Microbiology;* 2006;72: 5118–21. doi:10.1128/AEM.00170-06
286. Curators of the DSMZ. DSM 1985. In: Cultures Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell [Internet]. Available: <https://www.dsmz.de/catalogues/details/culture/DSM-1985.html>
287. Koransky JR, Allen SD, Dowell VR. Use of ethanol for selective isolation of sporeforming microorganisms. *Appl Environ Microbiol.* 1978;35: 762–765.

288. Bruins ME, Matser AM, Janssen AEM, Boom RM. Buffer selection for HP treatment of biomaterials and its consequences for enzyme inactivation studies. *High Press Res.* 2007;27: 101–107.
289. R development core team. *A Language and Environment for Statistical Computing*. In: Vienna, Austria. ISBN: 3-900051-07-0. Vienna, Austria; 2008.
290. Margosch D, Ehrmann MA, Gänzle MG, Vogel RF. Comparison of pressure and heat resistance of *Clostridium botulinum* and other endospores in mashed carrots. *J Food Prot.* 2004;67: 2530–2537.
291. Nakayama A, Yano Y, Kobayashi S, Ishikawa M, Sakai K. Comparison of pressure resistances of spores of six *Bacillus* strains with their heat resistances. *Appl Environ Microbiol.* 1996;62: 3897–3900.
292. Reddy NR, Solomon HM, Fingerhut GA, Rhodehamel EJ, Balasubramaniam VM, Palaniappan S. Inactivation of *Clostridium botulinum* type E spores by high pressure processing. *J Food Saf.* 1999;19: 277–288.
293. Black EP, Huppertz T, Fitzgerald GF, Kelly AL. Baroprotection of vegetative bacteria by milk constituents: A study of *Listeria innocua*. *Int Dairy J.* 2007;17: 104–110. doi:10.1016/j.idairyj.2006.01.009
294. Hauben KJ, Bernaerts K, Michiels CW. Protective effect of calcium on inactivation of *Escherichia coli* by high hydrostatic pressure. *J Appl Microbiol.* 1998;85: 678–684.
295. Lakamraju M, McGuire J, Daeschel M. Nisin adsorption and exchange with selected milk proteins at silanized silica surfaces. *J Colloid Interface Sci.* 1996;178: 495–504.
296. Hofstetter S, Gebhardt D, Ho L, Gänzle M, McMullen LM. Effects of nisin and reutericyclin on resistance of endospores of *Clostridium* spp. to heat and high pressure. *Food Microbiol.* 2013;34: 46–51.
297. Rao L, Wang Y, Chen F, Liao X. The Synergistic Effect of High Pressure CO₂ and Nisin on Inactivation of *Bacillus subtilis* Spores in Aqueous Solutions. *Front Microbiol.* 2016;7.

298. Funtenberger S, Dumay E, Cheftel JC. High Pressure Promotes - Lactoglobulin Aggregation through SH/S-S Interchange Reactions. *J Agric Food Chem.* 1997;45: 912–921. Available: <http://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/jf960383d>
299. Zhang Z, Yang Y, Tang X, Chen Y, You Y. Chemical forces and water holding capacity study of heat-induced myofibrillar protein gel as affected by high pressure. *FOOD Chem.* 2015;188: 111–118. doi:10.1016/j.foodchem.2015.04.129
300. Fimland G, Dalhus B, Johnsen L, Nissen-meyer J. Pediocin-like antimicrobial peptides (class IIa bacteriocins) and their immunity proteins : biosynthesis, structure, and mode of action. *J Pept Sci.* 2005;696: 688–696. doi:10.1002/psc.699
301. Mattila K, Saris P, Tyopponen S. Survival of *Listeria monocytogenes* on sliced cooked sausage after treatment with pediocin AcH. *Int J Food Microbiol.* 2003;89: 281–286. doi:10.1016/S0168-1605(03)00299-X
302. 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; 1–14. doi:10.1371/journal.pone.0148418
303. Meghrous J, Lacroix C, Simard RE. The effects on vegetative cells and spores of three bacteriocins from lactic acid bacteria. *Food Mic.* 1999;16: 105–114.
304. Sarker MR, Akhtar S, Torres JA, Paredes-sabja D. High hydrostatic pressure-induced inactivation of bacterial spores. *Crit Rev Microbiology.* 2013;7828: 1–9. doi:10.3109/1040841X.2013.788475
305. Butz P, Funtenberger S, Haberditzl T, Tauscher B. High Pressure Inactivation of *Byssoschlamys nivea* Ascospores and Other Heat Resistant Moulds. *LWT - Food Sci Technol.* 1995;410: 404–410.
306. Setlow P. Spore Resistance Properties. *Microbiol Spectr.* 2014; 1–14. doi:10.1128/microbiolspec
307. Paidhungat M, Setlow B, Daniels WB, Hoover D, Papafragkou E, Setlow P.

- Mechanisms of induction of germination of *Bacillus subtilis* spores by high pressure. *Appl Environ Microbiol.* 2002;68: 3172–3175.
308. Doona CJ, Ghosh S, Feeherry FF, Ramirez-Peralta A, Huang Y, Chen H, et al. High pressure germination of *Bacillus subtilis* spores with alterations in levels and types of germination proteins. *J Appl Microbiol.* 2014;117: 711–720.
309. Modugno C, Kmiha S, Aouadhi C, Diosdado Canizares E, Lang E, André S, et al. High pressure sensitization of heat resistant and pathogenic foodborne spores to nisin. *Food Microbiol* [Under Rev. 2018;
310. Valentine NB, Johnson TJ, Su Y, Forrester JB. FTIR Spectroscopy for Bacterial Spore Identification and Classification. *Proc SPIE 6378, Chem Biol Sensors Ind Environ Monit II.* 2006;6378: 1–10. doi:10.1117/12.686232
311. Georget E, Kapoor S, Winter R, Reineke K, Song Y, Callanan M, et al. In situ investigation of *Geobacillus stearothermophilus* spore germination and inactivation mechanisms under moderate high pressure. *Food Microbiol.* Elsevier Ltd; 2014;41: 8–18. doi:10.1016/j.fm.2014.01.007
312. Passot S, Gautier J, Jamme F, Cenard S, Dumas P, Fernanda Fonseca. Understanding the cryotolerance of lactic acid bacteria using combined synchrotron infrared and fluorescence microscopies. *Analyst.* 2015;140: 5920–2928.
313. Beebe KR, Pell RJ, Seasholtz MB. *Chemometrics : A Practical Guide.* Wiley. New York; 1998.
314. Wehrens R. *Chemometrics with R: Multivariate Data Analysis in the Natural Sciences and Life Sciences.* Use R! Gentleman R, Hornik K, Parmigiani G, editors. London: Springer; 2011.
315. Stevens A, Ramirez-Lopez L. Miscellaneous functions for processing and sample selection of vis-NIR diffuse reflectance data. In: *An introduction to the prospectr package. R package Vignette R version 0.1.3* [Internet]. 2013. Available: <https://cran.r-project.org/web/packages/prospectr/index.html>
316. Beleites C, Sergio V. *hyperSpec: a package to handle hyperspectral data sets in R.* In: *R package version 0.99-20171005* [Internet]. 2015. Available:

- <http://hyperspec.r-forge.r-project.org>
317. Cordella CBY. PCA: The Basic Building Block of Chemometrics. In: Krul IS, editor. Analytical Chemistry. InTech. 2012.
318. Movasaghi Z, Rehman S, Rehman I. Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy of Biological Tissues. *Appl Spectrosc Rev.* 2008;4928: 134–179. doi:10.1080/05704920701829043
319. Wolkers WF, Hoekstra FA. Aging of Dry Desiccation-Tolerant Pollen Does Not Affect Protein Secondary Structure '. *Plant Physiol.* 1995;109: 907–915.
320. Céline L, Hélène S, Beney L, Gervais P. Phase transitions as a function of osmotic pressure in *Saccharomyces cerevisiae* whole cells , membrane extracts and phospholipid mixtures. *Biochim Biophys Acta.* 2005;1669: 8–16. doi:10.1016/j.bbamem.2005.01.007
321. Fang J, Lyon DY, Wiesner MR, Alvarez PJJ. Effect of a Fullerene Water Suspension on Bacterial Phospholipids and Membrane Phase Behavior. *Environ Sci Technol.* 2007;41: 2636–2642.
322. Cheung H, Cui J, Sunt S. Real-time monitoring of *Bacillus subtilis* endospore components by attenuated total reflection Fourier-transform infrared spectroscopy during germination. 1999;145: 1043–1048.
323. Alvarez-Ordóñez A, Halisch J, M P. International Journal of Food Microbiology Changes in Fourier transform infrared spectra of *Salmonella enterica* serovars Typhimurium and Enteritidis after adaptation to stressful growth conditions. *Int J Food Microbiol.* Elsevier B.V.; 2010;142: 97–105. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2010.06.008
324. Loison P. Etude de la spore de *Bacillus subtilis*: caractérisation des structures impliquées dans sa résistance. Bourgogne. 2011.
325. Sinai L, Rosenberg A, Smith Y, Segev E, Ben-yehuda S. The Molecular Timeline of a Reviving Bacterial Spore Article The Molecular Timeline of a Reviving Bacterial Spore. *Mol Cell.* The Authors; 2015;57: 695–707. doi:10.1016/j.molcel.2014.12.019
326. Heinz V, Knorr D. High Pressure Food Science, Bioscience and Chemistry. In: Isaacs NS, editor. High Pressure Food Science, Bioscience and

- Chemistry. Woodhead P. Cambridge: The Royal Society of Chemistry; 1998. pp. 435–446.
327. Casal V, Gomez R. Effect of high pressure on the viability and enzymatic activity of mesophilic lactic acid bacteria isolated from caprine cheese. *J Dairy Sci.* 1999;82: 1092–1098.
328. Durantou F, Guillou S, Simonin H, Chéret R, de Lamballerie M. Combined use of high pressure and salt or sodium nitrite to control the growth of endogenous microflora in raw pork meat. *Innov Food Sci Emerg Technol.* 2012;16: 373–380.
329. Drews O, Weiss W, Reil G, Parlar H, Wait R. High pressure effects step-wise altered protein expression in. *Digestion.* 2002; 765–774.
330. Hörmann S, Scheyhing C, Behr J, Pavlovic M, Ehrmann M, Vogel RF. Comparative proteome approach to characterize the high-pressure stress response of *Lactobacillus sanfranciscensis* DSM 20451T. *Proteomics.* 2006;6: 1878–1885. doi:10.1002/pmic.200402086
331. Jofré A, Champomier-Vergès M, Anglade P, Baraige F, Martín B, Garriga M, et al. Protein synthesis in lactic acid and pathogenic bacteria during recovery from a high pressure treatment. *Res Microbiol.* 2007;158: 512–520. doi:10.1016/j.resmic.2007.05.005
332. Gross M, Kosmowsky IJ, Lorenz R, Molitoris HP, Jaenicke R. Response of bacteria and fungi to high-pressure stress as investigated by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Electrophoresis.* 1994;15: 1559–1565. doi:10.1002/elps.11501501224
333. Kleerebezem M, Quadri LE. Peptide pheromone-dependent regulation of antimicrobial peptide production in Gram-positive bacteria: A case of multicellular behavior. *Peptides.* 2001;22: 1579–1596. doi:10.1016/S0196-9781(01)00493-4
334. Kuipers OP, Beerthuyzen MM, De Ruyter PGGA, Luesink EJ, De Vos WM. Autoregulation of nisin biosynthesis in *Lactococcus lactis* by signal transduction. *J Biol Chem.* 1995;270: 27299–27304. doi:10.1074/jbc.270.45.27299

335. Lubelski J, Rink R, Khusainov R, Moll GN, Kuipers OP. Biosynthesis, immunity, regulation, mode of action and engineering of the model lantibiotic nisin. *Cell Mol Life Sci.* 2008;65: 455–476. doi:10.1007/s00018-007-7171-2
336. De Vuyst L, Vandamme EJ. Influence of the carbon source on nisin production in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* batch fermentations. *J Gen Microbiol.* 1992;138: 571–578.
337. Hibbing ME, Fuqua C, Parsek MR, Peterson SB. Bacterial competition: Surviving and thriving in the microbial jungle. *Nat Rev Microbiol.* 2010;8: 15–25. doi:10.1038/nrmicro2259
338. Troller JA, Frazier WC. Repression of *Staphylococcus aureus* by Food Bacteria II. Causes of Inhibition. *Appl Microbiol.* 1962; 163–165.
339. Buchanan RL, Klawitter LA. Characterization of lactic acid bacterium, *Carnobacterium pisciola* LK5 with activity against *Listeria monocytogenes* at refrigeration temperatures. *J Food Saf.* 1992;12: 199–217.
340. Devlieghere F, Geeraerd AH, Versyck KJ, Vandewaetere B, Van Impe J, Debevere J. Growth of *Listeria monocytogenes* in modified atmosphere packed cooked meat products: A predictive model. *Food Microbiol.* 2001;18: 53–66. doi:10.1006/fmic.2000.0378
341. Nilsson L, Ng YY, Christiansen JN, Jørgensen BL, Grótinum D, Gram L. The contribution of bacteriocin to inhibition of *Listeria monocytogenes* by *Carnobacterium piscicola* strains in cold-smoked salmon systems. *J Appl Microbiol.* 2004;96: 133–143. doi:10.1046/j.1365-2672.2003.02129.x
342. Nilsson L, Hansen TB, Garrido P, Buchrieser C, Glaser P, Knöchel S, et al. Growth inhibition of *Listeria monocytogenes* by a nonbacteriocinogenic *Carnobacterium piscicola*. *J Appl Microbiol.* 2005;98: 172–183. doi:10.1111/j.1365-2672.2004.02438.x
343. Vermeiren L, Devlieghere F, Vandekinderen I, Debevere J. The interaction of the non-bacteriocinogenic *Lactobacillus sakei* 10A and lactocin S producing *Lactobacillus sakei* 148 towards *Listeria monocytogenes* on a model cooked ham. *Food Microbiol.* 2006;23: 511–518.

- doi:10.1016/j.fm.2005.10.005
344. Rodriguez E, Arques JL, Nuñez M, Gaya P, Medina M. Combined effect of high-pressure treatments and bacteriocin-producing lactic acid bacteria on inactivation of *Escherichia coli* O157: H7 in raw-milk cheese. *Appl Environ Microbiol.* 2005;71: 3399–3404.
345. Serrazanetti DI, Guerzoni ME, Corsetti A, Vogel R. Metabolic impact and potential exploitation of the stress reactions in lactobacilli. *Food Microbiol. Elsevier Ltd*; 2009;26: 700–711. doi:10.1016/j.fm.2009.07.007
346. Wouters PC, Glaasker E, Smelt JPPM. Effects of High Pressure on Inactivation Kinetics and Events Related to Proton Efflux in *Lactobacillus plantarum* Effects of High Pressure on Inactivation Kinetics and Events Related to Proton Efflux in *Lactobacillus plantarum*. 1998;64: 3–9.
347. Ramaroson M, Guillou S, Rossero A, Rezé S, Anthoine V, Moriceau N, et al. International Journal of Food Microbiology Selection procedure of bioprotective cultures for their combined use with High Pressure Processing to control spore-forming bacteria in cooked ham. *Int J Food Microbiol. Elsevier*; 2018;276: 28–38. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2018.04.010
348. Omardien S, Woulter Drijfhout J, Zaat SAJ, Brul S. Cationic amphipathic antimicrobial peptides perturbs the inner membrane of germinated spores thus inhibiting their outgrowth. *Front Microbiol.* 2018;In press.
349. Zhang P, Setlow P, Li Y. Characterization of single heat-activated *Bacillus* spores using laser tweezers Raman spectroscopy. *Opt Express.* 2009;17: 445–448.
350. Trunet C, Carlin F, Coroller L, Trunet C, Carlin F, Coroller L. Investigating germination and outgrowth of bacterial spores at several scales To cite this version: HAL Id: hal-01551069. *Trends Food Sci Technol.* 2017;64: 60–68. doi:10.1016/j.tifs.2017.03.008
351. Chen YS, Yanagida F, Sriannual S. Characteristics of bacteriocin-like inhibitory substances from dochi-isolated *Enterococcus faecium* D081821. *Lett Appl Microbiol.* 2006;44: 325–338.
352. Scholz R, Vater J, Budiharjo A, Wang Z, He Y, Dietel K, et al.

- Amylocyclicin, a novel bacteriocin produced by *Bacillus amyloliquefaciens*.
J Bacteriol. 2014;36: 125–138. doi:10.1128/JB.01474-14
353. Murinda SE, Roberts RF, Doores S. Evaluation of Lactic Acid-Producing
Bacillus and *Sporolactobacillus* for Antilisterial Activity. *J Food Prot.*
1995;58: 226–238.

Annexes

Valorisation des travaux de thèse

Communications écrites

Articles parus

MODUGNO C., LOUPIAC C., BERNARD A., JOSSIER A., NEIERS F., PERRIER-CORNET J-M., SIMONIN H. Effect of high pressure on the antimicrobial activity and secondary structure of the bacteriocin nisin, 2018. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 2018 ; 47 : 9-15.

MODUGNO C., SIMONIN H., PILET M.F., ZAGOREC M., RAGON M, PERRIER CORNET J-M., 2015. La biopréservation : une stratégie d'avenir pour la conservation des aliments. Revue IAA (Industries Alimentaires et Agricoles) - n°11/12 2015, p18.

Articles soumis ou en préparation

MODUGNO C., KMIHA S., SIMONIN H., AOUADHI C., DIOSDADO CAÑIZARES E., LANG E., ANDRE S. MEJRI S., MAAROUFI A., PERRIER-CORNET J-M. High pressure sensitization of heat-resistant and pathogenic foodborne spores to nisin. Soumis pour publication dans Food Microbiology.

MODUGNO C., PELTIER C., SIMONIN H., DUJOURDY L., CAPITANI F., SANDT C., PERRIER-CORNET, J-M. Understanding the effects of high-pressure at moderate temperature on bacterial spores using synchrotron infrared spectroscopy. En préparation pour publication dans Frontiers in Microbiology.

Communications orales

MODUGNO C., KMIHA S., SIMONIN H., AOUADHI C., PERRIER-CORNET, J-M. A synergistic effect of high pressure and nisin on the inactivation of heat-resistant and pathogenic spores: New insights into the underlying mechanisms. Congrès de la Société Française de Microbiologie, Paris, France, 8-11 octobre 2017.

MODUGNO C., KMIHA S., SIMONIN H., AOUADHI C., ANDRE S., MEJRI S., MAAROUFI A., PERRIER-CORNET, J-M. A synergistic effect of high pressure and nisin on the

inactivation of heat-resistant and pathogenic spores in food matrices. Forum des jeunes chercheurs, Dijon, France, juin 2017.

MODUGNO C., KMIHA S., SIMONIN H., AOUADHI C., PERRIER-CORNET, J-M. A synergistic effect of high pressure and nisin on the inactivation of heat-resistant and pathogenic spores in food matrices. IAFP's European Symposium on Food Safety 2017, Brussels, Belgium, 30-31 mars 2017.

MODUGNO C., SIMONIN H., E. DIOSDADO CAÑIZARES, PERRIER-CORNET J-M. High pressure treatment at mild temperature induces durable sensitization of bacterial spores to antimicrobial agents. 9th International Conference on High Pressure Bioscience and Biotechnology (HPBB2016), Toronto, Canada, 25-29 juillet 2016.

MODUGNO C., DIOSDADO E., SIMONIN H., PERRIER-CORNET J-M. Inactivation des spores bactériennes : comment détruire l'indestructible ? Communication orale grand public, Forum des jeunes chercheurs, Besançon, France, juin 2016.

MODUGNO C., SIMONIN H., PERRIER-CORNET J-M. Bactéries lactiques et Hautes Pressions pour une stabilisation des aliments plus durable. AgroSup Dijon, Workshop interne « Produire, transformer, commercialiser, distribuer, consommer autrement », Dijon, France, 3 juillet 2015.

LOISON P., **MODUGNO C.**, HOSNY N., KUIMOVA M., SIMONIN H., PERRIER-CORNET J-M. Viscosity mapping of the structures of Bacillus subtilis spores by fluorescence lifetime imaging. Colloque BSPIT «Bactéries sporulantes pathogènes ou d'intérêt technologique », Société Française de Microbiologie, Paris, France, 6-7 juillet 2015.

MODUGNO C., SIMONIN H., PERRIER-CORNET J. M. Etude de l'effet d'un procédé alliant biopréservation et hautes pressions sur l'inactivation des spores de Bacillus et Clostridium dans des produits carnés. Forum des jeunes chercheurs, Dijon, France, juin 2015.

Communications affichées

MODUGNO C., SIMONIN H., PELTIER C., DUJOURDY L., PERRIER-CORNET J-M., SIMONIN H. Reversible initiation of spore germination by high-pressure at 20°C. IAFP's European Symposium on Food Safety, Stockholm, Sweden, 25-27 Avril 2018.

PELTIER C., **MODUGNO C.**, JOSSIER A., DUJOURDY L., PERRIER-CORNET J-M, SIMONIN H.. IR-Spectral analysis and chemometrics to study the response of *Bacillus subtilis* spores to high pressures. Congrès Chimioétrie XIX, Paris, France, 30-31 janvier 2018.

MODUGNO C., SABROU P., SIMONIN H., ZULIANI V., WACHE Y., PERRIER-CORNET J-M. Effect of high pressure treatment on the antimicrobial potency of *Lactococcus lactis*. Congrès de la Société Française de Microbiologie, Paris, France, 8-11 octobre 2017.

MODUGNO C., SIMONIN H., E. DIOSDADO CAÑIZARES, PERRIER-CORNET J-M. High pressure treatment at mild temperature induces durable sensitization of bacterial spores to antimicrobial agents. 16ème Congrès de la Société Française de Génie des Procédés, Nancy, France, 11-13 juillet 2017.

MODUGNO C., SIMONIN H., E. DIOSDADO CAÑIZARES, PERRIER-CORNET J-M. High pressure treatment at mild temperature induces durable sensitization of bacterial spores to antimicrobial agents. 10^e Forum de Technologie des Hautes Pressions, La Londe les Maures, France, 10-13 octobre 2016.

JOSSIER A., WINCKLER P., **MODUGNO C.**, SIMONIN H., BECHOUA S., PERRIER-CORNET J-M. High pressure assisted cryopreservation of sperm cells: development and characterization. 9th International Conference on High Pressure Bioscience and Biotechnology (HPBB2016), Toronto, Canada, 25-29 juillet 2016.

Enseignements

132 h de TD et TP de thermodynamique et mécanique des fluides pour les ingénieurs AgroSup 1ère année, Master 1 MATEA (Management Technique et Economique des Agroéquipements) et Licences Pro Traitement des Eaux.

