Modélisation de la probabilité de croissance de C. sporogenes et C. botulinum groupe I en fonction du pH et de la concentration en NaCl après un traitement thermique de faible intensité

Emmanuelle Boix

▶ **To cite this version:**

Emmanuelle Boix. Modélisation de la probabilité de croissance de C. sporogenes et C. botulinum groupe I en fonction du pH et de la concentration en NaCl après un traitement thermique de faible intensité. Microbiologie et Parasitologie. Université de Bretagne occidentale - Brest, 2022. Français. NNT : 2022BRES0004 . tel-03890503

HAL Id: tel-03890503
https://theses.hal.science/tel-03890503

Submitted on 8 Dec 2022

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.

DOCTORAT ECOLOGIE BRETAGNE GEOSCIENCES LOIRE AGRONOMIE ALIMENTATION

Université de Bretagne Occidentale

THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE
DE BRETAGNE OCCIDENTALE

ECOLE DOCTORALE N° 600
Ecole doctorale Ecologie, Géosciences, Agronomie et Alimentation
Spécialité : Microbiologie, virologie et parasitologie

Par

Emmanuelle BOIX

Modélisation de la probabilité de croissance de *C. sporogenes* et *C. botulinum* groupe I en fonction du pH et de la concentration en NaCl après un traitement thermique de faible intensité

Thèse présentée et soutenue à Quimper, le 20 Janvier 2022
Unité de recherche : Laboratoire de Biodiversité de d'Ecologie Microbienne
Centre Technique pour la Conservation des Produits Agricoles

Rapporteurs avant soutenance :

Véronique BROUSSOLLE	Directrice de Recherche, INRAE, Avignon
Christina NIELSEN-LEROUX	Directrice de Recherche, INRAE, Jouy-en-Josas

Composition du Jury :

Présidente :	Véronique BROUSOLLE	Directrice de Recherche, INRAE, Avignon
Examinatrices :	Jeanne-Marie MEMBRE	Ingénieure de Recherche, INRAE, Nantes
	Christina NIELSEN-LEROUX	Directrice de Recherche, INRAE, Jouy-en-Josas
Dir. de thèse :	Louis COROLLER	Professeur des Universités, UBO
Co-dir. de thèse :	Olivier COUVERT	Maître de Conférences, UBO
	Stéphane ANDRE	Chef de projets, CTCPA, Avignon

Invités :

	Nathalie PANIEL	Cheffe de projets, CTCPA, Avignon
	Daniel HUSSON	Responsable du pôle Process & Olives de table, France Olive
	Anne LAURENT	Directrice Générale, Société Coopérative Agricole du Nyonsais

A mon papi Emmanuel Lagrée,

Son regard bleu et profond, accompagné de son petit sourire de tendresse

suffisait sans dire un mot, à apaiser tous les maux.

Remerciements

Mon aventure m'a amenée au gré des vents de la Bretagne jusqu'au chant des cigales du Sud à la rencontre de nombreuses personnes qui se retrouvent ainsi de manière fortuite ou non, pour le pire ou le meilleur dans mon histoire. Ce sont ces personnes que j'aimerais mettre en avant dans ces remerciements.

Mes premiers remerciements vont à M. Vincent Thibault du Centre Technique pour la Conservation des Produits Agricoles (CTCPA) d'Avignon et Pr. Emmanuel Coton du Laboratoire de Biodiversité et d'Ecologie Microbienne (LUBEM) de Quimper pour m'avoir accueillie au sein de leurs laboratoires et centres techniques et pour m'avoir donné l'opportunité de travailler sur ce projet durant ces trois années et quelques mois.

Je remercie également les membres du jury de ma thèse : Dr. Véronique Broussolle, Dr. Christine Nielsen-Leroux, Dr. Jeanne-Marie Membré et Dr. Nathalie Paniel qui ont évalué ce travail.

Je tiens tout particulièrement à remercier mes directeurs de thèse qui ont été à mes côtés durant ce projet, le Pr. Louis Coroller, le Dr. Olivier Couvert et le Dr. Stéphane André.

Merci Louis pour m'avoir aidée jusqu'à la dernière minute, m'avoir guidée avec tes questions (pourquoi ?) tout au long de ces trois ans. Je te remercie du temps que tu as pris pour ce projet et tout cela avec ta bonne humeur et ton sens de l'humour (les petites blagues dans les commentaires). J'en profite également pour remercie ta belle-maman pour éliminer les derniers petits problèmes orthographiques.

Merci Olivier pour m'avoir encadrée durant ce projet. Je te remercie sincèrement pour ton aide avec Matlab qui a su nous donner pas mal de fils à retordre. Merci d'avoir eu un regard critique sur mes travaux. Je te remercie également pour ta bienveillance et ta patience.

Merci Stéphane pour m'avoir écoutée et d'avoir pris le temps pour m'apprendre la thermorésistance des spores. Je te remercie aussi pour ton expertise dans le monde la conserve et avoir su me pousser lorsqu'il était nécessaire. Merci pour m'avoir donnée l'opportunité de présenter mes travaux aux industriels.

Je tiens à remercier les membres de mon comité de suivi individuel de thèse qui ont su examiner mon travail et qui ont su m'aiguiller dans mes recherches. Merci à Pr. Jean-Christophe Augustin, Dr. Frédéric Carlin, Ph.D. Michael W. Peck et M. Daniel Husson.

Mes remerciements vont aussi à l'Unité Toxines Bactériennes de l'Institut Pasteur pour l'accueil chaleureux et leur implication dans ce projet. Je remercie notamment, Dr. Emmanuel Lemichez et Dr. Christine Rasetti-Escargueil qui ont su me former et me guider pour travailler avec *Clostridium botulinum.*

En Bretagne, il fait beau plusieurs fois par jours (entre deux averses) mais c'est surtout l'équipe de Quimper qui a été mon rayon de soleil.

Je tiens à remercier plus que tout Loona, qui même si je ne suis pas son amie, a été mon pilier durant mon passage au LUBEM. Merci pour ton aide au laboratoire et tes conseils. Je te remercie d'avoir partagée des secrets de coutures devant un repas chinois. Je te remercie aussi d'avoir toujours une petite place chez Clément et toi pour m'accueillir. J'en profite aussi pour remercier Clément et son bon coup de pagaie sans qui, nous aurions certainement mis une éternité pour descendre l'Odet en canoë. Junior, un grand merci pour ta bonne humeur et surtout tes jeux de mots (que j'utilise au quotidien). Merci pour tes talents culinaires et surtout pour ta brioche à la frangipane. Et Félicitation Docteur ! Je remercie aussi ma grande sœur de cœur Leila joon, une petite étoile dans l'univers. Merci pour ton soutien sans faille durant ce projet. Merci pour ton rire si communicateur. Merci pour m'avoir accompagnée lors de nos pauses pipi. Merci Clément pour m'avoir accompagnée lors de mon premier colloque où l'accent du Sud a pris le dessus face au stress de la présentation. Merci Clément pour m'avoir donné l'opportunité d'encadrer des stagiaires, ce fut une belle expérience. Je remercie également Roua pour ta gentillesse même lorsqu'on est ton démon ; Héléna pour l'escape game juste incroyable et le surf ; Marion et Manon pour votre dynamisme dans le bureau. Merci pour à vous tous pour les soirées jeux de société et les soirées crêpes à volonté. Je remercie toute l'équipe Noémie, Ivan, Pierre, Hélène, Loïc, Sophie, Anne-Gabrielle, Nicolas pour leur soutien et leur aide durant mon passage en Bretagne.

Sous le soleil d'Avignon, je tiens à remercier Stella qui a été mon premier mentor durant mon master 1 et qui a été un soutien à bien des moments durant toutes ces années. Merci pour ta générosité et ta disponibilité pour m'écouter. Je te remercie également Nathalie pour ton attention et ta bienveillance. Merci d'avoir toujours gardé un œil sur moi et d'avoir été présente lorsque que j'en avais besoin.

Je remercie tout particulièrement Lwidgi que j'ai pu rencontrer à Quimper et qui a suivi sur Avignon (car oui, il ne le dira jamais mais c'est grâce à moi qu'il a eu son poste). Merci pour m'avoir offert des pâtisseries lorsque je t'accompagnais à la boulangerie. Merci de m'avoir ramenée chez moi lorsque mon vélo était à plat. Merci Guillaume, mon acolyte de bureau, pour ton soutien, pour m'avoir épaulée dans les pires et les meilleurs moments. Merci d'avoir pris le temps de m'écouter même si ce n'était pas très intéressant. Je remercie également Jérémie pour son aide en informatique et les pauses

déjeuners dans le patio. Merci pour les sorties au restaurant et les discussions lorsque j'en avais besoin. Ma petite Marie, comment te remercier pour ton aide pendant ces derniers mois, pour nos appels téléphoniques où tu me racontes ta folle vie, nos Tea time, nos échanges scientifiques parce qu'il y en a eu quand même. Merci pour être toujours là. Je tiens chaleureusement à remercier toute l'équipe Micro d'Avignon : Florent, Flora, Sandra, Benoît que de souvenirs emprisonnés littéralement derrière la station anaérobie. Merci à tous les collaborateurs du CTCPA, Sarah, Carine, Virginie, François, Jessica, Coline, Maxime, Benoît … pour leur aide et bienveillance.

Je tiens également à remercier les stagiaires que j'ai encadrés pendant la thèse : Dhouha, Lisa et Noëmie. Merci pour votre contribution à ce travail. Je pense aussi à tous les stagiaires que j'ai croisés durant cette thèse, Vincent et Martin. Merci pour votre aide lorsque j'étais sous la station anaérobie.

Au terme de ce parcours, je remercie enfin celles et ceux qui me sont chers et que j'ai quelque peu délaissés ces derniers mois pour achever cette thèse. Leur attention et encouragement m'ont accompagné tout au long de ces années. A mes amies et amis, Cassou, Manon, Dodo, Clara, Pauline Apha, Pauline Beta, Eline, Marine, Kévin, Quentin, Nicolas, Paul qui ont toujours répondu présents. Je remercie aussi mes petites boules de poils, Lilly (mon petit chat) pour ses réveils à 6h du matin même le week-end pour manger et Joly (mon petit chien) pour ces balades dans la forêt entre deux pages de rédaction.

Finalement, c'est avec beaucoup d'émotion que je consacre ces dernières lignes pour ma famille. A Maman dont tes petits plats m'ont rendu le sourire, dont tes câlins m'ont apporté le réconfort, dont tes paroles m'ont permis d'avancer dans cette aventure, dont la sagesse et le courage sont une leçon de vie pour moi. A mon papa, qui m'a aidée lors de mes déménagements, qui m'a rendu visite plusieurs fois en Bretagne, qui a su toujours me guider même lorsqu'il a fallu changer la batterie de la C3. A mon beau-père, qui était présent et m'a soutenue en prenant toujours mon parti même quand j'avais tort, qui a su me remonter le moral lors de nos balades en vélo. Si j'en suis arrivée là, c'est grâce à vous alors MERCI !

Enfin, j'ai une pensée toute particulière à mon grand-père, Emmanuel Lagrée, dont les moments partagés entre les glaces pistache chocolat et la pèche au bord de la rivière m'ont ouvert les yeux sur un monde rempli de possibilité.

Mes remerciements ne vont pas à la Covid19 et à Mark Zuckerberg, qui m'ont fait perdre beaucoup de temps et d'énergie.

Préambule

Le projet de thèse qui a été mené par le Centre Technique de la Conservation des Produits Agricoles (CTCPA) et ses partenaires, portait sur trois volets :

- Modélisation de la probabilité de croissance de *Clostridium sporogenes* PA 3679 (souche 1) en fonction du pH et de la concentration en chlorure de sodium après un traitement thermique.
- Études physiologique et génétique de *Clostridium sporogenes* et *Clostridium botulinum* et prise en compte de la variabilité biologique dans le modèle.
- Caractérisation des paramètres physicochimiques des produits à base d'olives traités thermiquement

Les travaux de thèse sont menés au sein (i) de l'UMT Qualiveg 2 (Qualité Nutritionnelle des produits végétaux) associant l'INRAE Domaine St Paul à Avignon et le Centre Technique de la Conservation des Produits Agricoles (CTCPA) d'Avignon, (ii) du Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Ecologie Microbienne (LUBEM) de Quimper, (iii) de l'Association Française Interprofessionnelle de l'Olive (France Olive) et (iv) l'Institut Pasteur de Paris.

Le présent travail a été réalisé dans le cadre du projet Safood financé par l'Association Nationale de Recherche et Technologie (ANRT) (CIFRE No. 2017/1608), le Centre Technique de la Conservation des Produits Agricoles (CTCPA) et l'Association Interprofessionnelle de l'Olive (France Olive).

Je remercie tous les partenaires pour leurs contributions et leurs coopérations : François Ingremeau (UBO) (francois.ingremeau@univ-brest.fr) pour ses précieux conseils lors de la mise au point de l'automatisation du système de dépôt par l'interface Jupyter (Focus) ; Emmanuel Lemichez (Institut Pasteur) (emmanuel.lemichez@pastreur.fr) et Christine Rasetti-Escargueil (Institut Pasteur) (christine.rasetti-escargueil@pasteur.fr) pour m'avoir ouvert les portes de leurs Laboratoires et m'avoir formée à travailler avec *Clostridium botulinum* (Chapitre 3) ; Stella Planchon (CTCPA) (splanchon@ctcpa.org), Michael W. Peck (Quadram Institute) (mike.peck@quadram.ac.uk), Arnoud H. M. van Vliet (University of Surrey) (a.vanvliet@surrey.ac.uk), Jason Brunt (University of Cambridge) (jasonwbrunt@gmail.com) pour leurs aides m'a permis d'appréhender la phylogénie complexe des espèces de *C. sporogenes* et *C. botulinum* groupe I (Chapitre 3) ; Daniel Husson (France Olive) (d.husson@ctolivier.org), Sarah Gervais (CTCPA) (sgervais@ctcp.org) et Lisa Guigard (stagiaire DUT) pour leurs implications dans la caractérisation physico-chimique des produits à base d'olives (Chapitre 4).

Table des matières

CHAPTIRE 1 : INTRODUCTION GENERALE 25

1. Les produits à base d'olives 26

1.1 L'olive, le fruit 26

1.2 Procédés de fabrication des olives de table 32

2. Le botulisme d'origine alimentaire 38

2.1 Aspect clinique du botulisme 38

2.2 Neurotoxines botuliques 39

2.3 Epidémiologie 43

2.4 Le botulisme dans les produits à base d'olives traités thermiquement 47

3. Biologie et génétique de *Clostridium botulinum* et *Clostridium sporogenes* 49

3.1 Taxonomie 49

3.2 Caractéristiques physiologiques 53

3.3 Endospore 56

4. Maîtrise du micro-organisme *Clostridium botulinum* 67

4.1 Traitement de destruction 67

4.2 Formulation de l'aliment 69

4.3 Effets synergiques des facteurs environnementaux 71

5. Objectifs de la thèse 72

6. Références 74

CHAPITRE 2 : MODELISATION DE LA PROBABILITE DE CROISSANCE DE *C. SPOROGENES* EN FONCTION DU PH ET DE LA CONCENTRATION EN CHLORURE DE SODIUM APRES UN TRAITEMENT THERMIQUE 89

1. Highlights 92

2. Abstract 92

3. Introduction 92

4. Materials and methods 94

4.1 Bacterial strains 94

4.2 Sporulation 95
4.3 Heat treatment of spore suspensions 95
4.4 Experimental design 96
4.5 Data processing 97
4.6 Modeling 97
4.7 Model fitting and statistical analysis 99
5. Results & Discussion 100
5.1 Effect of pH and sodium chloride concentration on growth limit of *C. sporogenes* 100
5.2 Assessment of the probability of recovery of *C. sporogenes* 104
6. Conclusion 110
7. Acknowledgements 111
8. References 112
FOCUS : DEVELOPPEMENT D'UNE TECHNIQUE DE MICROFLUIDIQUE POUR EVALUER LA PROBABILITE DE GERMINATION ET DE CROISSANCE DES SPORES BACTERIENNES 117
1. Introduction 118
2. Matériel & Méthodes 120
2.1 Dispositif de dépôt des micro-gouttes 120
2.2 Souche bactérienne 122
2.3 Désinfection du système et dépôt des micro-gouttes 124
2.4 Détermination de la concentration bactérienne par les méthodes de micro-gouttes, de microplaques et de boîte de Pétri 124
2.5 Détermination de la concentration de *C. sporogenes* PA 3679 en micro-gouttes et en boîte de Pétri. 125
3. Résultats & Discussion 126
3.1 Mise au point de la technique de dépôt des micro-gouttes avec de l'eau stérile 126
3.2 Mise en place d'une procédure de désinfection du système de dépôt des micro-gouttes 127
3.3 Croissance de *B. cereus* n°86 en micro-gouttes, en microplaques et en milieu gélosé .. 127
3.4 Croissance de *C. sporogenes* PA 3679 en micro-gouttes 129

4. Conclusion & Perspective 130

5. Références 132

CHAPITRE 3 : ETUDES PHYSIOLOGIQUE ET GENETIQUE DE *C. SPOROGENES* ET *C. BOTULINUM* GROUPE I POUR SELECTIONNER PLUSIEURS SOUCHES AFIN DE VALIDER LE MODELE DEVELOPPE 135

1. Highlights 138

2. Abstract 138

3. Introduction 139

4. Materials and methods 141

4.1 Bacterial strains 141

4.2 Spore suspension 145

4.3 Measurement of the spore heat resistance 145

4.4 Study of the physiological diversity of *C. sporogenes* and Group I *C. botulinum* strains 146

4.5 Diversity and phylogeny of *C. sporogenes* and Group I *C. botulinum* strains and neurotoxin production capacity 148

4.6 Synergistic effect of pH sodium chloride concentration and heat treatment on growth limits of *C. sporogenes* and Group I *C. botulinum* 149

5. Results & Discussion 153

5.1 Study of physiological diversity of *C. sporogenes* and Group I *C. botulinum* strains 153

5.2 Genetic diversity a of *C. sporogenes* and Group I *C. botulinum* strains and their neurotoxin production ability 160

5.3 Synergistic effect of pH, sodium chloride concentration and heat treatment on growth limits of *C. sporogenes* and Group I *C. botulinum* strains 163

6. Conclusion 171

7. Acknowledgements 172

8. References 173

CHAPITRE 4 : CARACTERISATION DES PARAMETRES PHYSICO-CHIMIQUES DES PRODUITS A BASE D'OLIVES TRAITES THERMIQUEMENT 179

1. Introduction 181

2. Matériel et Méthodes 182

2.1 Catégories de produits à base d'olives traités thermiquement 182
2.2 Paramètres physico-chimiques mesurés 182
2.3 Analyse statistique 185
3. Résultats 186
3.1 Mesure de pH 186
3.2 Mesure de l'activité de l'eau 188
3.3 Mesure de la concentration en chlorure de sodium 190
3.4 Mesure des polyphénols 195
3.5 Mesure des acides gras 197
4. Discussion et Conclusion 198
5. Références 201
CHAPITRE 5 : SYNTHESE DES RESULTATS ET PERSPECTIVES 205
1. Diversité physiologique et génétique de *C. sporogenes* et *C. botulinum* groupe I 206
2. Impact des effets barrières sur les interfaces de croissance/non-croissance 208
3. Application des interfaces de croissance / non-croissance sur les effetsbarrière des produits à base d'olives 211
4. Perspectives 216
5. Références 219
CHAPITRE 6 : VALORISATION 225
1. Publications 226
2. Communications orales 226
3. Communications affichées (poster) 226
4. Activité d'encadrement 227

Liste des figures

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION GENERALE

Figure 1 : Morphologie de l'olive..... 28

Figure 2 : Élaboration des principales préparations commerciales..... 32

Figure 3 : Mécanismes d'action des toxines botulique au sens des jonctions neuromusculaires..... 42

Figure 4 : Dendrogramme du genre *Clostridium* basé sur l'analyse des séquences des gènes d'ARNr 16S..... 51

Figure 5 : Formation de l'endospore de *Clostridium botulinum*..... 56

Figure 6 : Représentation schématique de l'initiation de la sporulation des Clostridies par *quorum sensing*..... 57

Figure 7 : Représentation schématique de la structure d'une spore..... 61

Figure 8 : Processus de germination des spores..... 66

CHAPITRE 2 : MODELISATION DE LA PROBABILITE DE CROISSANCE DE *C. SPOROGENES* EN FONCTION DU PH ET DE LA CONCENTRATION EN CHLORURE DE SODIUM APRES UN TRAITEMENT THERMIQUE

Figure 9: Response surface (3D graph plot) of the probabilities of germination and growth of *C. sporogenes* PA 3679 vegetative cells (a) and spores heat-treated at 80 °C for 10 min and (b) incubated at different combined pH and sodium chloride concentration levels. These probabilities are represented by their log-transformed n..... 106

Figure 10: Comparison between observed (nobs) and predicted (npred) decimal reduction numbers of *C. sporogenes* PA 3679..... 108

Figure 11: Contour plots (see solid lines) of the growth or recovery (germination and growth) probabilities for *C. sporogenes* PA 3679 vegetative cells (a), spores heat-treated at 80 °C for 10 min (b) and spores heat-treated at 100 °C for 1.5 min (c) or spores heat-treated at 100 °C for 5.2 min (d) incubated at different combined pH and water activity levels. These probabilities are represented by their log-transformed n..... 110

FOCUS : DEVELOPPEMENT D'UNE TECHNIQUE DE MICROFLUIDIQUE POUR EVALUER LA PROBABILITE DE GERMINATION ET DE CROISSANCE DES SPORES BACTERIENNES

Figure 12 : Encapsulation unicellulaire d'algue dans des micro-gouttes observée par microscopie optique..... 118

Figure 13 : Système de dépôt des micro-gouttes avec une imprimante 3D et un pousse-seringue commandé par ordinateur..... 121

Figure 14 : Emplacement de la boîte de Pétri sur le plateau de l'imprimante 3D (a) et schéma du dépôt des micro-gouttes dans la boîte de Pétri (b)..... 122

Figure 16 : Croissance des cellules végétatives de *B. cereus* n°86 en micro-gouttes immergées dans l'huile minérale..... 129

CHAPITRE 3 : ETUDES PHYSIOLOGIQUE ET GENETIQUE DE *C. SPOROGENES* ET *C. BOTULINUM* GROUPE I POUR SELECTIONNER PLUSIEURS SOUCHES AFIN DE VALIDER LE MODELE DEVELOPPE

Figure 17: Boxplots of (a) observed growth limit pH, (b) observed growth limit sodium chloride concentration and (c) *D*-value calculated at 121 °C of 42 strains..... 157

Figure 18: (a) Principal component analysis (PCA) correlation circle for growth limit as a function of pH and sodium chloride concentration (NaCl) and heat resistance (TT) of spores of 42 *C. sporogenes* and Group I *C. botulinum* isolates (at 121.1 °C). (b) PCA map for *C. sporogenes* isolates and Group I *C. botulinum* strains. Each number corresponds to the strain number. Each shape corresponds to the source of isolation of each strain (see legend)..... 159

Figure 19: Phylogeny of genomes of Group I *C. botulinum* and *C. sporogenes* based on the phylogeny tree of Brunt (Brunt et al., 2020)..... 161

Figure 20: Effect of physiological state on (a) observed pH and (b) water activity a_w, controlled by NaCl for growth limit of *C. sporogenes* isolates 1, 14 and 17, and Group I *C. botulinum* isolates 34 and 41..... 165

Figure 21: Comparison between observed (n_{obs}) and predicted (n_{pred}) decimal reduction numbers of *C. sporogenes* (isolates 1, 14 and 17) and non-toxigenic Group I *C. botulinum* (strain 34) and Group I *C. botulinum* (strain 41)..... 167

Figure 22: Contour plots (solid lines) showing the growth or recovery (including germination and outgrowth) probabilities of Group I *C. botulinum* strain 34 (a) vegetative cells, (b) spores, (c) heat-treated spores..... 170

CHAPITRE 4 : CARACTERISATION DES PARAMETRES PHYSICO-CHIMIQUES DES PRODUITS A BASE D'OLIVES TRAITES THERMIQUEMENT

Figure 23 : Variabilité du pH des produits à base d'olives traités thermiquement..... 186

Figure 24 : Variabilité du pH des saumures des olives noires et vertes..... 187

Figure 25 : Variabilité de l'activité de l'eau (*aw*) dans les produits à base d'olives traités thermiquement..... 189

Figure 26 : Variabilité de la teneur en chlorure de sodium dans les produits à base d'olives traités thermiquement (produit)..... 191

Figure 27 : Variabilité de la teneur en chlorure de sodium dans les produits à base d'olives traités thermiquement (saumure)..... 193

Figure 28 : Variabilité de la teneur en chlorure de sodium des produits à base d'olives traités thermiquement (fraction dégraissées)..... 194

Figure 29 : Variabilité de la teneur en polyphénols dans les produits à base d'olives traités thermiquement..... 196

Figure 30 : Variabilité de la teneur en acide gras dans les produits à base d'olives traités thermiquement..... 197

CHAPITRE 5 : SYNTHESE DES RESULTATS ET PERSPECTIVES

Figure 31 : Interface de probabilité de croissance ou de recouvrement (germination/croissance) des cellules végétatives et des spores de *C. sporogenes* et *C. botulinum* en fonction des paramètres physico-chimiques (pH et NaCl) des produits à base d'olives traités thermiquement..... 215

Figure 32 : Cytogramme de l'évolution de la germination et de la croissance des spores de *C. sporogenes* PA 3679 (souche 1) après un traitement thermique (80°C – 10 min) en condition optimale de croissance par cytométrie en flux..... 218

Liste des tableaux

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION GENERALE

Tableau 1 : Principales variétés d'olives en France..... 27

Tableau 2 : Caractéristiques chimiques d'une olive..... 29

Tableau 3 : Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) des composés phénoliques des olives de table sur les micro-organismes..... 30

Tableau 4 : Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) des acides gras des olives de table sur les micro-organismes..... 31

Tableau 5 : Composition de la tapenade noire, de la tapenade verte, de l'olivade et de la pâte d'olives vertes ou noires..... 35

Tableau 6 : Présence et influence des micro-organismes sur la physico-chimie des produits au cours de la fermentation..... 36

Tableau 7 : Caractéristiques physico-chimiques de la saumure ou du jus après atteinte de l'équilibre osmotique et application du traitement thermique..... 37

Tableau 8 : Sérotypes et sous-types de toxines botuliques (BoNTs) produites par *Clostridium botulinum*..... 40

Tableau 9 : Tendances épidémiologiques du botulisme alimentaire dans le monde..... 44

Tableau 10 : Nombre de cas de botulisme d'origine alimentaire en Europe entre 2013 et 2020. 46

Tableau 11 : Aliments impliqués dans le botulisme d'origine alimentaire en France entre 2010 et 2020..... 47

Tableau 12 : Principaux foyers de botulisme d'origine alimentaire associés à la consommation d'olives dans le monde entre 2004 et 2021..... 49

Tableau 13 : Principales caractéristiques de *C. botulinum* (pathogène), *C. perfringens* (pathogène), *C. difficile* (pathogène), *C. tetani* (pathogène), *C. butyricum* (altération et/ou pathogène) et *C. beijerinckii* (altération)..... 50

Tableau 14 : Caractéristiques de quatre groupes de *Clostridium botulinum*..... 55

Tableau 15 : Mécanisme de résistance des spores face aux traitements chimiques et physiques..... 63

Tableau 16 : Germinant et co-germinant de *C. botulinum* groupe I à IV et *C. sporogenes*..... 65

Tableau 17 : Relation entre le micro-organisme visé par le traitement thermique et la limite létale admissible..... 69

Tableau 18 : Catégorisation des produits alimentaires selon leurs pH..... 69

CHAPITRE 2 : MODELISATION DE LA PROBABILITE DE CROISSANCE DE *C. SPOROGENES* EN FONCTION DU PH ET DE LA CONCENTRATION EN CHLORURE DE SODIUM APRES UN TRAITEMENT THERMIQUE

Table 1: Observed growth (+) or no-growth (-) for vegetative cells and heat-treated spores incubated at different pH levels and sodium chloride concentrations (% NaCl) in PYGm at 30 °C for 7.42 log CFU ± 0.6 per well..... 101

Table 2: Estimation of the parameters of the probability model (Equation 3) for *C. sporogenes* PA 3679..... 107

CHAPITRE 3 : ETUDES PHYSIOLOGIQUE ET GENETIQUE DE *C. SPOROGENES* ET *C. BOTULINUM* GROUPE I POUR SELECTIONNER PLUSIEURS SOUCHES AFIN DE VALIDER LE MODELE DEVELOPPE.

Table 3: List of *C. sporogenes* isolates and Group I *C. botulinum* strains used in this study..... 143

Table 4: Growth limits as a function of pH and sodium chloride concentration and *D-value* at 121.1 °C of 42 strains of *C. sporogenes* and Group I *C. botulinum.*..... 155

Table 5: Estimation of the parameters of the probability model (Equation 12) for *C. sporogenes* (Isolates 1, 14 and 17) and Group I *C. botulinum* (Isolates 34 and 41)..... 169

CHAPITRE 4 : CARACTERISATION DES PARAMETRES PHYSICO-CHIMIQUES DES PRODUITS A BASE D'OLIVES TRAITES THERMIQUEMENT

Tableau 19 : Nombre d'échantillons par catégorie de produits à base d'olives..... 182

Tableau 20 : Description de la distribution des valeurs de pH des produits à base d'olives traités thermiquement..... 187

Tableau 21 : Description de la distribution des valeurs pH des produits à base d'olives traités thermiquement..... 188

Tableau 22 : Description de la distribution des valeurs d'activité de l'eau (*aw*) des produits à base d'olives traités thermiquement..... 190

Tableau 23 : Description de la distribution de la teneur en chlorure de sodium des produits à base d'olives traités thermiquement (produits)..... 192

Tableau 24 : Description de la distribution de la teneur en chlorure de sodium des produits à base d'olives traités thermiquement (saumure)..... 193

Tableau 25 : Description de la distribution de la teneur en chlorure de sodium des produits à base d'olives traités thermiquement (fraction dégraissée)..... 195

Tableau 26 : Analyse statistique de la teneur en polyphénols sur les produits à base d'olives traités thermiquement..... 196

Tableau 27 : Analyse statistique de la teneur en acide gras sur les produits à base d'olives traités thermiquement..... 198

Liste des équations

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION GENERALE

Équation 1 : Inactivation thermique..... 68

Équation 2 : Evolution de la résistance bactérienne en fonction de la température de traitement..... 68

CHAPITRE 2 : MODELISATION DE LA PROBABILITE DE CROISSANCE DE *C. SPOROGENES* EN FONCTION DU PH ET DE LA CONCENTRATION EN CHLORURE DE SODIUM APRES UN TRAITEMENT THERMIQUE

Equation 1: Water activity (Raoult's law)..... 96

Equation 2: Number of decimal reductions observed..... 97

Equation 3: Number of decimal reductions predicted..... 97

Equation 4: Gamma product derived from the Gamma concept..... 98

Equation 5: Gamma product from cardinal values..... 98

Equation 6: Gamma product from interaction..... 99

Equation 7: Interaction model (i)..... 99

Equation 8: Interaction model (ii)..... 99

CHAPITRE 3 : ETUDES PHYSIOLOGIQUE ET GENETIQUE DE *C. SPOROGENES* ET *C. BOTULINUM* GROUPE I POUR SELECTIONNER PLUSIEURS SOUCHES AFIN DE VALIDER LE MODELE DEVELOPPE.

Equation 9: D-value..... 147

Equation 10 : Comparison of D-value of the strains at 121.1°C..... 147

Equation 11: Number of decimal reductions observed..... 150

Equation 12: Number of decimal reductions predicted..... 151

Equation 13: Gamma product derived from the Gamma concept..... 152

Equation 14: Gamma product from cardinal's values..... 152

Equation 15: Gamma product from interaction..... 152

Equation 16: Interaction model (i)..... 153

Equation 17: Interaction model (ii)..... 153

CHAPITRE 4 : CARACTERISATION DES PARAMETRES PHYSICO-CHIMIQUES DES PRODUITS A BASE D'OLIVES TRAITES THERMIQUEMENT

Équation 3 : Teneur en NaCl..... 183

Équation 4 : Teneur en NaCl dans la fraction dégraissée..... 184

Équation 5 : Teneur en polyphénols totaux..... 185

CHAPITRE 1

INTRODUCTION GENERALE

1. Les produits à base d'olives

La production d'olives de table et d'huile d'olive est concentrée au niveau du bassin méditerranéen tels qu'en Égypte (600 000 tonnes entre 2018 et 2019), en Espagne (591 000 tonnes), en Turquie (423 000 tonnes) et en Algérie (299 000 tonnes). Des pays comme le Pérou (124 000 tonnes), l'États-Unis (15 500 tonnes), le Mexique (15 000 tonnes) et le Chili (13 000 tonnes) sont devenus des pays émergents pour la production d'olives de table. La production mondiale d'olives, entre 2018 et 2019, s'élève à 2 750 000 tonnes. Cette production est en corrélation avec la consommation des pays producteurs. Certains pays non producteurs d'olives de table voient leurs consommations augmenter tel que les États-Unis (182 000 tonnes). En France, la production moyenne est de 1 205 tonnes par an, ce qui représente 0,04 % de la production mondiale. La majorité de la production française est répartie entre trois régions : Rhône-Alpes (41 %), Languedoc-Roussillon (32 %) et Provence-Alpes-Côte d'Azur (26 %). Les Français consomment près de 70 000 tonnes par an d'olives sous diverses formes. Par exemple, sous forme de tapenade entre 350 et 400 tonnes (26 % de tapenade verte et 74 % de tapenade noire). Ces produits sont largement consommés à l'apéritif comme en témoigne l'augmentation des ventes en une dizaine d'années avec +12,5 % et +6,2 % de tapenade noire et verte, respectivement en 2009 (AFIDOL, 2012; International Olive Oil Council, 2020a, 2020b, 2020c, 2020d, 2020e, 2020f, 2020g, 2020h).

1.1 L'olive, le fruit

Dans le monde, il existe approximativement 2 000 variétés d'olives (doit 400 en France) pouvant être utilisées pour la production d'huile et/ou d'olives de table (Tableau 1). En France, les principales variétés d'olives de Provence sont l'olive verte l'Aglandau (Verdale de Carpentras ou Béruguette) et l'olive noire la Grossane. Tandis qu'en Languedoc-Roussillon, les variétés les plus représentatives sont la Picholine pour l'olive verte et la Négrette pour l'olive noire. La Tanche est également une variété d'olive noire très présente en Rhône-Alpes (AFIDOL, 2015a).

Tableau 1 : Principales variétés d'olives en France.

Type d'olives	Variétés	Nom commercial	Zone de production	Appellation d'Origne Contrôlé (AOC)
Olives vertes	Lucque	Lucque ou Olive du Languedoc	Hérault - Aude - Pyrénées Orientales	« Lucques du Languedoc » depuis 2017
	Picholine	Picholine ou Olive de Nîmes	Gard – Bouches-du-Rhône - Hérault - Aude	« Olive de Nîmes » depuis 2006 dans le Gard et l'Est de l'Hérault
	Salonenque Aglandau	Olive verte cassée de la Vallée des Baux-de-Provence	Bouches-du-Rhône	« Olive verte cassée de la Vallée des Baux-de-Provence » depuis 1997
	Bouteillan	Bouteillan	Var	ND
	Amellau	Amellau	Hérault - Aude	ND
	Belgentiéroise	Olive de Belgentier	Sud du Var	ND
Olives noires	Tanche	Olive de Nyons	Drôme - Vaucluse	« Olive noire de Nyons » depuis 1994
	Cailletier	Olive de Nice	Alpes-Maritimes - Est du Var	« Olive de Nice » et « Pate d'Olive de Nice » depuis 2001
	Grossanne	Olives noires de la Vallée des Baux-de-Provence	Bouches-du-Rhône	« Olive noire de la Vallée des Baux-de-Provence » depuis 1997

ND : Non déterminé ; (AFIDOL, 2015a).

L'olive de table est composée de 78 % de pulpe (mélange d'huile et d'eau), de 20 % de noyau et les 2 % restant correspondent à l'amande (Figure 1).

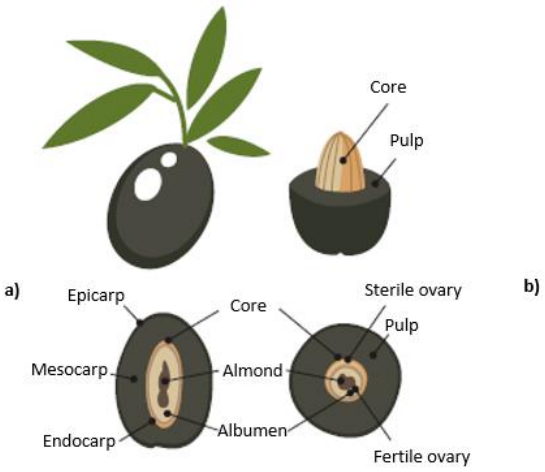


Figure 1 : Morphologie de l'olive.

a) Coupe longitudinale ; b) Coupe transversale (AFIDOL, 2015b)

La composition type de l'olive est décrite dans le Tableau 2, tous les composés sont exprimés en grammes par kilogrammes de pulpe. Plus précisément, le fruit est composé de 65 à 75 % d'humidité, de 12 à 30 % de lipides, de 1 à 1,5% de minéraux, de 2 à 5 % de fibres, de 1 à 2 % de protéines et de 3 à 6% de sucre. Le pourcentage d'huile dans l'olive dépend de la variété des fruits et de leur maturité. L'olive est riche en acide oléique, en acide palmitique, en acide linoléique et en minéraux (Tableau 2) (AFIDOL, 2015a; Noé and López, 2014).

Tableau 2 : Caractéristiques chimiques d'une olive.

Famille	Composition	Quantité (g/kg)
Acide gras	Fibres	43,8
	Protéines	13,9
	Glucides	0,43
	Acide oléique	50 – 190
	Acide palmitique	15 – 60
	Acide linoléique	5 – 39
	Acide élaïdique	0,8 – 4,4
Minéraux	Calcium	8,3
	Potassium	0,5 – 1,2
	Phosphore	0,5 – 1,4
	Magnésium	0,5 - 2
	Cuivre	1,7 – 11
	Zinc	0,001 – 0,003
	Manganèse	0,0002 – 0,001
Vitamines	Vitamine E	0,013 – 0,052
	Vitamine A	0,000001 – 0,000013
Polyphénols	Polyphénols	0,250 – 0,001
	Triterpènes	0,460 – 0,002
Sucres	Fructose	0,5
	Galactose	0,5
	Glucose	0,63
	Lactose	0,5
	Maltose	0,55
	Saccharose	0,63

(ANSES, 2020; Noé and López, 2014).

Les composés phénoliques représentent entre 1 à 3 % du poids de la pulpe de l'olive de table. Leurs propriétés sont responsables de la couleur, du goût et de la texture de l'olive. La composition et la teneur en polyphénol d'une olive dépendent de plusieurs facteurs comme la maturité de l'olive, la variété et les conditions climatiques auxquelles elle aura été exposée au cours de son développement (Charoenprasert and Mitchell, 2012; Petridis et al., 2012). Les principaux polyphénols retrouvés dans les feuilles d'olivier et les olives sont l'oleuropéine (3 g/kg de poids sec) et l'hydroxytyrosol (0,2 à 71 g/kg de poids sec). Les olives sont aussi composées de différents acides phénoliques : les acides caféiques, et les acides galliques ainsi que des flavonoïdes : la lutéoline-7-glucoside et la cyanidine-3-glucoside (Conte et al., 2020). Les méthodes de préparation, telle que la désamérisation, des olives de table ont une influe sur la concentration finale en polyphénols (description section 1.2.1). De plus, les composés phénoliques ont une importante capacité antioxydante, une activité antimicrobienne et ils

apportent une protection contre les effets des mycotoxines (Malheiro et al., 2011). L'oleuropéine et l'hydroxytyrosol sont actifs contre les bactéries à Gram positifs et négatifs (Tableau 3) (de Carvalho and Caramujo, 2008; Pereira et al., 2006). Mais, l'activité antimicrobienne est plus efficace contre les bactéries à Gram positifs car leurs membranes interagissent avec les composés hydrophiles des polyphénols (de Carvalho and Caramujo, 2008; Liu et al., 2017).

Tableau 3 : Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) des composés phénoliques des olives de table sur les micro-organismes.

Composés phénoliques	Micro-organismes	CMI (mg/mL)
Hydroxytyrosol	*Salmonella* typhi	0,004
	Staphylococcus aureus	0,008
	Haemophilus influenzae	0,001
Oleuropéine	*Listeria monocytogenes*	25
	Salmonella typhi	0,125
	Staphylococcus aureus	0,062
	Haemophilus influenza	0,5
	Bacillus cereus	10 – 25
	Bacillus subtillis	50 – 100
	Pseudomonas aeruginosa	100
	Escherichia coli	75 – 100
	Candida albicans	100

(Charoenprasert and Mitchell, 2012; Conte et al., 2020; de Carvalho and Caramujo, 2008; Liu et al., 2017; Malheiro et al., 2011; Pereira et al., 2006; Petridis et al., 2012).

La présence des acides gras assure aussi une activité antimicrobienne contre *Clostridium sporogenes*, *Clostridium botulinum*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* et *Escherichia coli* (Tableau 4) (Ababouch et al., 1992; Foster and Wynne, 1948; Malheiro et al., 2011; Zheng et al., 2004).

Tableau 4 : Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) des acides gras des olives de table sur les micro-organismes.

Acide gras	Micro-organismes	CMI (mg/mL)
Acide oléique	*Clostridium botulinum*	0,15
	Staphylococcus aureus	0,113
	Escherichia coli	> 0,028
	Pseudomonas aeruginosa	> 0,028
Acide palmitique	*Clostridium botulinum*	> 0,15
	Clostridium sporogenes	> 0,15
	Staphylococcus aureus	> 0,025
	Escherichia coli	> 0,025
	Pseudomonas aeruginosa	> 0,025
Acide linoléique	*Clostridium botulinum*	0,03 – 0,1
	Clostridium sporogenes	0,03 – 0,1
	Bacillus cereus	0,03 – 0,1
	Staphylococcus aureus	0,112
	Escherichia coli	> 0,028
	Pseudomonas aeruginosa	> 0,028

(Ababouch et al., 1992; Foster and Wynne, 1948; Zheng et al., 2004).

1.2 Procédés de fabrication des olives de table

1.2.1 Préparations industrielles des olives de table

L'élaboration de l'olive de table commence à la fin du mois d'août pour les olives vertes et en février pour les olives noires. L'élaboration des principales préparations commerciales sont présentées en Figure 2.

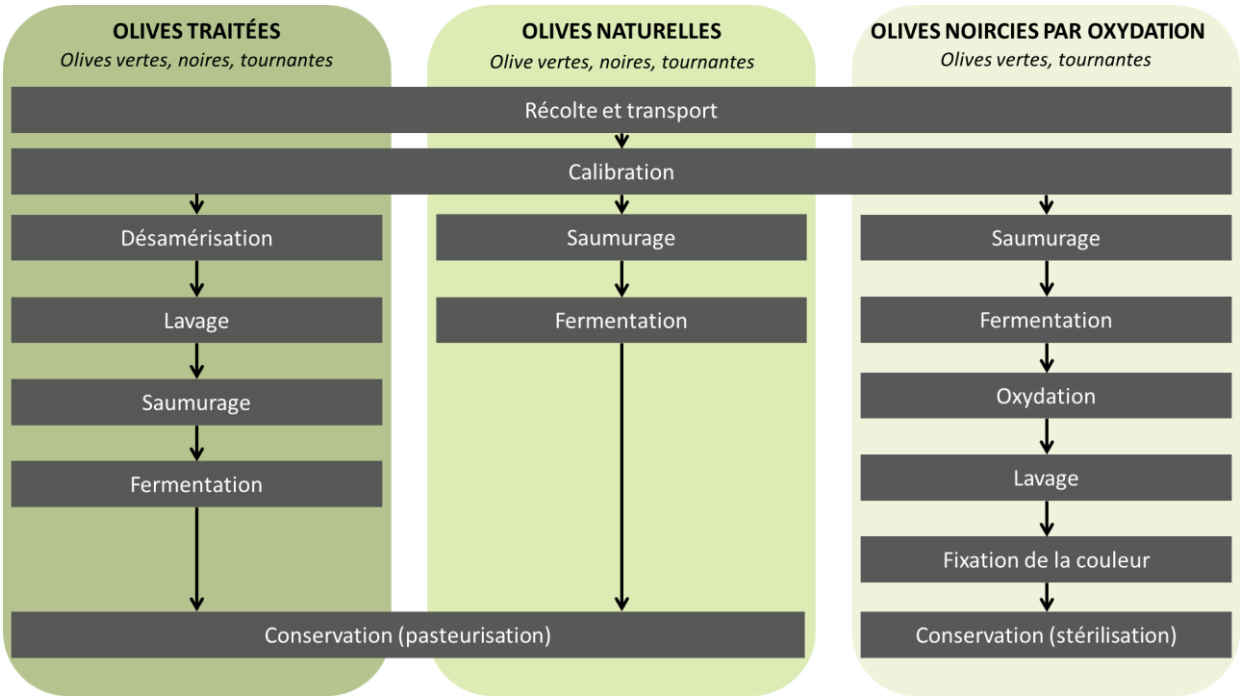


Figure 2 : Élaboration des principales préparations commerciales.

Lors de la récolte, les fruits sont cueillis à la main pour éviter le développement de tâches de couleur brune sur les zones endommagées de l'olive ou par vibration du tronc. Puis, les olives sont transportées pour être calibrées. Afin de rassembler les olives d'une même taille dans le but d'assurer une meilleure homogénéisation de la désamérisation.

Les **olives traitées** correspondent aux olives vertes, noires et tournantes (avant complète maturation). Les olives sont désamérisées par un traitement alcalin (2 à 5 % v/v de NaOH) permettant l'hydrolyse de l'oleuropéine responsable de l'amertume de l'olive. Lorsque la pulpe de l'olive est brune sur les 2/3 de l'épaisseur, les olives sont retirées du traitement. Puis, les olives sont lavées avec de l'eau potable entre 1 à 6 fois selon la variété. Cependant, plus le nombre de lavage est important, moins il y a

d'éléments fermentescibles disponibles pour la fermentation. Les olives sont mises en saumurage (mélange d'eau et de chlorure de sodium). La teneur en chlorure de sodium (NaCl) de la saumure est d'environ 10 %. Ensuite, la fermentation d'une durée de 30 à 60 jours démarre généralement spontanément du fait de la présence naturelle ou artificielle de bactéries lactiques (*Lactobacillus*) et de levures (*Saccharomyces*) à la surface des fruits. Cette présence artificielle de bactéries lactiques et de levures est due à l'ajout de cultures microbiennes appelées ferments composés des genres et espèces suivantes : *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus paracasei Pediococcus pentosaceus*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Debaromyces hansenii*, et *Weissella anomalus*. Cette inoculation volontaire des olives avec un ferment constitué d'un mélange de micro-organismes d'origine et de concentration connue et maîtrisée permet de mieux contrôler le démarrage et le déroulement de la fermentation (Perpetuini et al., 2020; Zago et al., 2013). Enfin, les olives ayant un niveau modéré de NaCl (5 à 6 %) et un pH bas (< 4,5) sont pasteurisées pour permettre leur conservation.

Les **olives dites « naturelles »** (olives vertes, noires et tournantes) sont directement mises en saumurage après le calibrage. La concentration en chlorure de sodium (NaCl) de la saumure est comprise entre 8 et 10 %. L'absence de l'étape de désamérisation (solubilisation de l'oleuropéine) et l'activité antimicrobienne des polyphénols entraînent une augmentation de la durée de la fermentation de 8 à 12 mois. La présence de bactéries lactiques et de levures permet la fermentation spontanée des olives. Les olives ayant une concentration en NaCl comprise entre 8 à 10 % et un pH compris entre 4,3 et 4,5 sont pasteurisées puis conservées à température ambiante.

Les **olives noires** sont obtenues par oxydation à partir d'olives vertes et tournantes. Les olives sont directement mises en saumurage après le calibrage. La concentration en chlorure de sodium (NaCl) de la saumure est comprise entre 8 et 9 %. Tout comme la préparation des olives naturelles, l'absence de désamérisation au préalable et l'activité antimicrobienne des polyphénols conduisent à une augmentation de la durée de la fermentation jusqu'à 180 jours. Puis, l'exposition à l'air et un traitement avec 1 à 2 % de NaOH favorisent le noircissement des olives vertes et tournantes. L'ajout de cation de manganèse, de gluconate de manganèse ou de lactate de manganèse favorise l'oxydation des molécules d'orthodiphénols, d'hydroxytyrosol et de l'acide caféique responsables du noircissement des olives. Ensuite, plusieurs lavages sont effectués pour retirer au maximum le NaOH des olives (rinçage successif jusqu'à ce l'eau reste claire au moins durant 4 heures). Par la suite, l'ajout de gluconate ferreux ou de lactate ferreux prévient le brunissement des olives noircies et favorise la fixation de la couleur. Enfin, les olives noircies par oxydation ont un pH proche de 7 et une teneur en

chlorure de sodium de 2 à 4 % ce qui permet de les stabiliser avec un traitement thermique de stérilisation pour une conservation à température ambiante (Husson, 2000; Sánchez Gómez et al., 2006).

1.2.2 Les produits à base d'olives traités thermiquement

Plusieurs déclinaisons de produits traités thermiquement à base d'olives de table entières ou farcies ainsi qu'à bases d'olives finement hachées (tapenades, pâtes d'olives ou olivades) existent sur le marché. La composition de ces différentes préparations est décrite dans le Tableau 5 (AFIDOL, 2009).

La tapenade est une préparation composée d'olives vertes ou noires (olives traitées ou naturelles) finement broyées, à laquelle sont ajoutés des câpres, des anchois, de l'huile d'olive et des aromates. L'olivade quant à elle, est composée à part égale d'olives vertes et d'olives noires quelles soient traitées ou naturelles. Enfin, la pâte d'olives est fabriquée avec de la chair d'olives vertes ou noires et finement broyée seule sans ajout d'ingrédient.

Tableau 5 : Composition de la tapenade noire, de la tapenade verte, de l'olivade et de la pâte d'olives vertes ou noires.

	Tapenades noires	Tapenades vertes	Olivades	Pâtes d'olives noires	Pâtes d'olives vertes
Ingrédients requis					
Olives noires[1]	70 % min.	Non	50 % min.	100 %	Non
Olives vertes[2]	Non	70 % min.	50 % min.	Non	100 %
Câpre	3 % min.	3 % min.	Oui	Non	Non
Anchois[3]	0,5 % min.	0,5 % min.			
Huile d'olive	26,5 % max	26,5 max			
Aromates	5 % max.	5 % max.			
Ingrédients optionnels (5 % max.)					
Cognac/eau-de-vie	Oui	Oui	Oui	Non	Non
Câpre	Non	Non			
Anchois	Non	Non			
Aromates	Non	Non			
Jus de citron	Oui	Oui			
Vinaigre	Oui	Oui			
Tomates séchées	Oui	Oui			
Autre	Non	Oui			
Ingrédients admis					
Émulsifiant, exhausteur de goût, épaississant, colorant, arôme.	Non	Non	Oui	Non	Non

% min. ou % max. : pourcentage minimum ou maximum d'ingrédient pour la fabrication du produit. [1] Olives noires à la grecque sans saumure, olives noires au naturel conservées en saumure ou sans saumure ; [2] olives vertes confites ou au naturel ; [3] les produits issus de l'Agriculture Biologique ne peuvent pas contenir d'anchois (AFIDOL, 2009).

1.2.3 Physico-chimie et microbiologie des produits à base d'olives traités thermiquement

L'étape clef du processus de fabrication des olives de table qui permettra leur conservation et les rendra propre à la consommation est la fermentation qui se découpe en trois phases successives. Cette étape commence spontanément grâce à la présence des micro-organismes à la surface des olives. Durant la fermentation, plusieurs groupes de micro-organismes interviennent (Entérobactéries ; Bactéries lactiques et Levures) (Bleve et al., 2014).

La première phase de la fermentation se caractérise par une concentration en chlorure de sodium élevée (~10 %) et un pH compris entre pH 8 et 9 (désamérisation - traitement alcalin). Ces conditions favorisent le développement des micro-organismes sporulés appartenant aux genres *Bacillus* et *Clostridium* et de bacilles non sporulés à Gram négatif appartenant à la famille des Entérobactéries. La diminution du pH qui passe de 8 - 9 à 6 par l'action des entérobactéries favorise le développement des bactéries lactiques appartenant aux genres *Pediococcus* et *Leuconostoc*. Quant à la concentration en chlorure de sodium, celle-ci s'équilibre à 5 % caractérisant la deuxième phase de la fermentation. Lors de la troisième phase de la fermentation, le développement des espèces appartenant au genre *Lactobacillus* (*L. pentosus* et *L. plantarum*) entraîne la production d'acide lactique à partir de la dégradation du glucose favorisant la diminution du pH à 4 (Tableau 6 et Tableau 7). Cette diminution du pH confère aux produits une acidité telle que la croissance des bactéries pathogènes ou d'altération est inhibée (Anagnostopoulos et al., 2020; Botta and Cocolin, 2012; Heperkan, 2013; Hurtado et al., 2012; Perpetuini et al., 2020).

Tableau 6 : Présence et influence des micro-organismes sur la physico-chimie des produits au cours de la fermentation.

Micro-organismes	Phases de la fermentation			pH	Concentration en chlorure de sodium (% NaCl)
	Phase 1	Phase 2	Phase 3		
Entérobactéries	■			8 – 9	10
Bacillus	■			8 – 9	10
Clostridium	■			8 – 9	10
Leuconostoc		■		6	5
Pediococcus		■		6	5
Lactobacillus plantarum	■	■	■	4	5
Lactobacillus paracollinoides		■	■	4	5
Lactobacillus pentosus			■	4	5
Candida	■	■	■	4	5
Pichia	■	■	■	4	5
Rhodotorula	■	■	■	4	5
Saccharomyces	■	■	■	4	5

(Anagnostopoulos et al., 2020; Botta and Cocolin, 2012; Heperkan, 2013; Hurtado et al., 2012; Perpetuini et al., 2020).

Tableau 7 : Caractéristiques physico-chimiques de la saumure ou du jus après atteinte de l'équilibre osmotique et application du traitement thermique.

Préparations	Concentration en chlorure de sodium (% NaCl)	pH
Olive traitée	4	4,3
Olive naturelle	6	4,3
Olive noircie par oxydation	BPF	BPF

BPF : Bonnes Pratiques de Fabrication (International Olive Oil Council, 2004).

Au cours des trois phases de la fermentation, un développement de levures appartenant aux genres *Candida*, *Pichia*, *Rhodotorula* et *Saccharomyces*) a été mis en évidence par différent auteurs. Leur développement contribue à l'amélioration des propriétés organoleptiques et favorise la croissance des bactéries lactiques *via* la diminution du pH (Heperkan, 2013; Perpetuini et al., 2020; Romeo, 2012). De plus, l'efficacité de la fermentation dépend de nombreux paramètres tels que les conditions climatiques, la taille des jarres (relation olive/saumure et conditions aérobies/anaérobies), les variétés d'olives, la maturité des olives et les procédés d'élaboration (olives traitées, olives au naturel et olives noircies par oxydation). En effet, la présence ou l'absence de résidus de soude après un traitement de désamérisation influence le développement des micro-organismes lors de la fermentation (Emmanouilidou et al., 2020).

La fermentation des olives est un processus spontané, sous l'influence de facteurs biotiques et abiotiques (augmentation de la température), pouvant rapidement entraîner le développement de micro-organismes non-désirés responsables d'altérations ou de risques sanitaires. Les principales altérations observées sur des olives de table sont : la formation de fissures par l'accumulation de gaz produits par le développement de bactéries à Gram négatif et de certaines levures ; la production de gaz ainsi que de mauvaises odeurs dus à une fermentation putride et butyrique par le développement de *Clostridium* spp. et de *Propionibacterium* spp. ; la formation d'un voile en surface des jarres dus à certaines levures et moisissures qui ont la capacité de consommer l'acide lactique et de se développer en présence d'oxygène ; la formation de points blancs sur la surface des olives de table par le développement d'*Oenococcus kitaharae* et de *Lactobacillus parafarraginis* ; l'alcalisation due à la dégradation des acides organiques tels que l'acide lactique en acide acétique par *Lactobacillus buchneri* en absence d'oxygène ; ou bien par la présence de levures oxydatives capables de consommer les acides lactiques et acétiques en présence d'oxygène engendre l'augmentation du pH et donc le

développement des micro-organismes pathogènes ou responsables d'altération (Lanza et al., 2013; Medina et al., 2016).

Les risques sanitaires liés à la consommation de produits à base d'olives sont principalement dus au développement de micro-organismes pathogènes (Caggia et al., 2004; Heperkan, 2013; Medina-Pradas and Arroyo-López, 2015; Panagou et al., 2008; Romeo, 2012) :

- Certaines espèces d'*Aspergillus* et de *Penicillium* (mycotoxines)
- Listeria monocytogenes
- Staphylococcus aureus (hémolysine)
- Escherichia coli
- *Bacillus cereus* (toxine émétique)
- Clostridium botulinum (toxine botulique)

Pour améliorer le contrôle de la fermentation et éviter le développement des micro-organismes non désirés, il est possible de faire appel à des ferments. Ces ferments sont composés d'une ou plusieurs souche(s) bactérienne(s) appartenant au genre *Lactobacillus*. La diminution rapide du pH par la croissance des *Lactobacillus* diminue le temps de fermentation et inhibe la croissance des micro-organismes responsables d'altérations et des micro-organismes pathogènes (Heperkan, 2013; Zago et al., 2013).

2. Le botulisme d'origine alimentaire

2.1 Aspect clinique du botulisme

Le botulisme est connu depuis plus de 1 000 ans et a été décrit pour la première fois par Müller et Justinius Kerner après avoir retrouvé la toxine botulique dans de la saucisse. Le botulisme a été associé à une maladie caractérisée par la paralysie musculaire et la suffocation (Frank, 2007). C'est en 1895 que le microbiologiste d'origine belge, Emile Pierre van Ermengem, a isolé un bacille anaérobie dénommé *Bacillus botulinus*. Par la suite, l'antitoxine produite par Van Ermengen à l'encontre de *Bacillus botulinus* n'a pas neutralisé les toxines de différentes souches de *C. botulinum*, révélant ainsi que différents types de toxines pouvaient être produits (Frank, 2007; van Ermengem, 1979).

Il existe trois grands types de botulisme humain : le botulisme d'origine alimentaire ; le botulisme infantile et la présence de la toxine botulique dans les plaies par le développement de *C. botulinum* (le botulisme par blessure).

Le **botulisme d'origine alimentaire** est une intoxination causée par l'ingestion de toxine botulique préformée dans un aliment. Cette intoxination est souvent associée à la consommation de conserves artisanales en raison d'un traitement thermique ne permettant pas la destruction de la bactérie. **Le botulisme infantile** est quant à lui, une infection liée à la production de toxines dans l'intestin du jeune enfant (0 - 12 mois) après l'ingestion de la bactérie et sa multiplication. Cette infection est possible en raison de la flore intestinale réduite qui n'empêche pas la multiplication bactérienne. Cette ingestion de *C. botulinum* est souvent associée à la consommation de miel. Enfin, **le botulisme par blessure** est associé à la multiplication et à la formation de toxines dans une plaie souvent liée à la toxicomanie (infection par piqûres avec du matériel contaminé). Cette infection a été décrite pour la première fois en 1943 dans le cas pour des traumatismes majeurs tel que l'écrasement des extrémités (Sofos and Juneja, 2010).

Le botulisme d'origine alimentaire a généralement une période d'incubation de 12 à 36 heures après la consommation d'un aliment contaminé par la neurotoxique botulique. Le délais d'apparition des symptômes varie selon le type de botulisme, le sérotype de la toxine et la quantité de neurotoxine (Frank, 2007). Les patients présentent initialement des symptômes gastro-intestinaux comme des nausées, des vomissements, des crampes abdominales et des diarrhées. Ces signes généralement associés aux toxi-infections alimentaires ne sont pas forcément synonymes de botulisme. Effectivement, les premiers signes du botulisme montrent une faiblesse musculaire caractérisée par des troubles de la fonction oculaire (vision floue) ainsi que des difficultés à avaler et à parler. Au fur et à mesure, la paralysie flasque descend affectant les muscles de la respiration nécessitant une mise sous ventilation mécanique pour éviter la mort par suffocation. Le botulisme est mortel dans 5 à 10 % des cas et si les cas graves ne sont pas mortels, la guérison complète dure entre un mois et plusieurs années (Frank, 2007 ; Sofos & Juneja, 2010).

2.2 Neurotoxines botuliques

La toxine produite par *Clostridium botulinum* est ainsi à l'origine du botulisme. Cette toxine est la plus puissante des toxines connues, nommée neurotoxine botulique (BoNT). La dose létale administrée par injection à un homme de 70 kg est estimée à 70 ng. Il existe différents types de neurotoxines (A, B, C, D, E, F, G, HA et X) et plus de 30 sous-types de neurotoxines différentes citées dans le Tableau 8 (Frank, 2007). En 2013, un nouveau type de neurotoxine a été découvert, l'isolat de type H de la souche IBCA10-7060 de *C. botulinum* dans un cas de botulisme infantile. Cette souche peut produire la toxine

de type B et la nouvelle toxine identifiée de type H, donnant la nouvelle désignation de type Bh (Barash and Arnon, 2014; Fan et al., 2016). Cependant, cette nouvelle toxine de type H est controversée, Maslanka S. E. (2015) et Kalb S. R. (2016) ont signalé que la neurotoxine botulique de type H (BoNT/H) a une structure hybride. L'analyse génétique suggère que le type H contient des régions similaires à celles des toxines A1 et F5 et que les effets toxiques ont été éliminés par les antitoxines du sérotype A (Kalb et al., 2015; Maslanka et al., 2016). *C. botulinum* produit plusieurs types de toxines mais les symptômes sont les mêmes. Les toxines botuliques sont sensibles à la chaleur et rapidement inactivées à 80°C.

Tableau 8 : Sérotypes et sous-types de toxines botuliques (BoNTs) produites par *Clostridium botulinum*.

	Groupe I Protéolytique	**Groupe II Non-protéolytique**	**Groupe III**	**Groupe IV**
Type	A, B, F	B, E, F	C, D	G
Sous-type	A1 ; A2 ; A3 ; A4 ; A5 ; A6 ; A7 ; A8 ; A9 ; A10 B1 ; B2 ; B3 ; B5 (Ba) ; B6 ; B7 A(B) ; Ab ; Af ; Af84 ; Bf F1 ; F2 ; F3 ; F4 ; F5 H/A ; F/H	B4 E1 ; E2 ; E3 ; E6 ; E7 ; E8 ; E9 ; E10 ; E11 F6	C D CD ; DC	

(Rossetto et al., 2014).

La neurotoxine botulique agit sur le système nerveux en bloquant la communication entre le nerf et le muscle. La neurotoxine forme des complexes protéiques accessoires (hémagglutinine (HA) et non-toxique-hémagglutinine (NTNH) de taille variée allant de 300 à 900 kDa. Ces protéines accessoires protègent la neurotoxine et facilitent son absorption dans le corps (Carter and Peck, 2015). Les protéines de la toxine botulique sont synthétisées sous forme de chaînes polypeptidiques de 150 kDa, qui sont composées d'une chaîne lourde (100 kDa) et d'une chaîne légère (50 kDa) reliées par un pont disulfure (Frank, 2007). Le domaine C-terminal de la chaîne lourde est impliqué dans la connexion entre la neurotoxine et la cellule nerveuse. Le domaine N-terminal est quant à lui impliqué dans le mouvement de la chaîne légère dans le cytosol de la cellule nerveuse. La connexion entre le domaine C-terminal de la chaîne lourde (chaîne H) et les deux protéines membranaires (récepteur du polysialoganglioside (PSG) et le récepteur de la synaptotagmine (Syt) ou SV2) permet l'endocytose de

la toxine botulique à l'intérieur des vésicules synaptiques. La vésicule synaptique acidifiée va protoner la toxine botulique et assurer ainsi le déplacement de la chaîne légère (chaîne L) de la membrane de la vésicule vers le cytosol. Ensuite, les métalloprotéases de la chaîne légère (chaîne L) clivent VAMP, SNAP25 et syntaxine, ce qui entraîne l'inhibition de la libération du neurotransmetteur (acétylcholine) et provoque une neuroparalysie (Figure 3) (Peck, 2009; Rossetto et al., 2014).

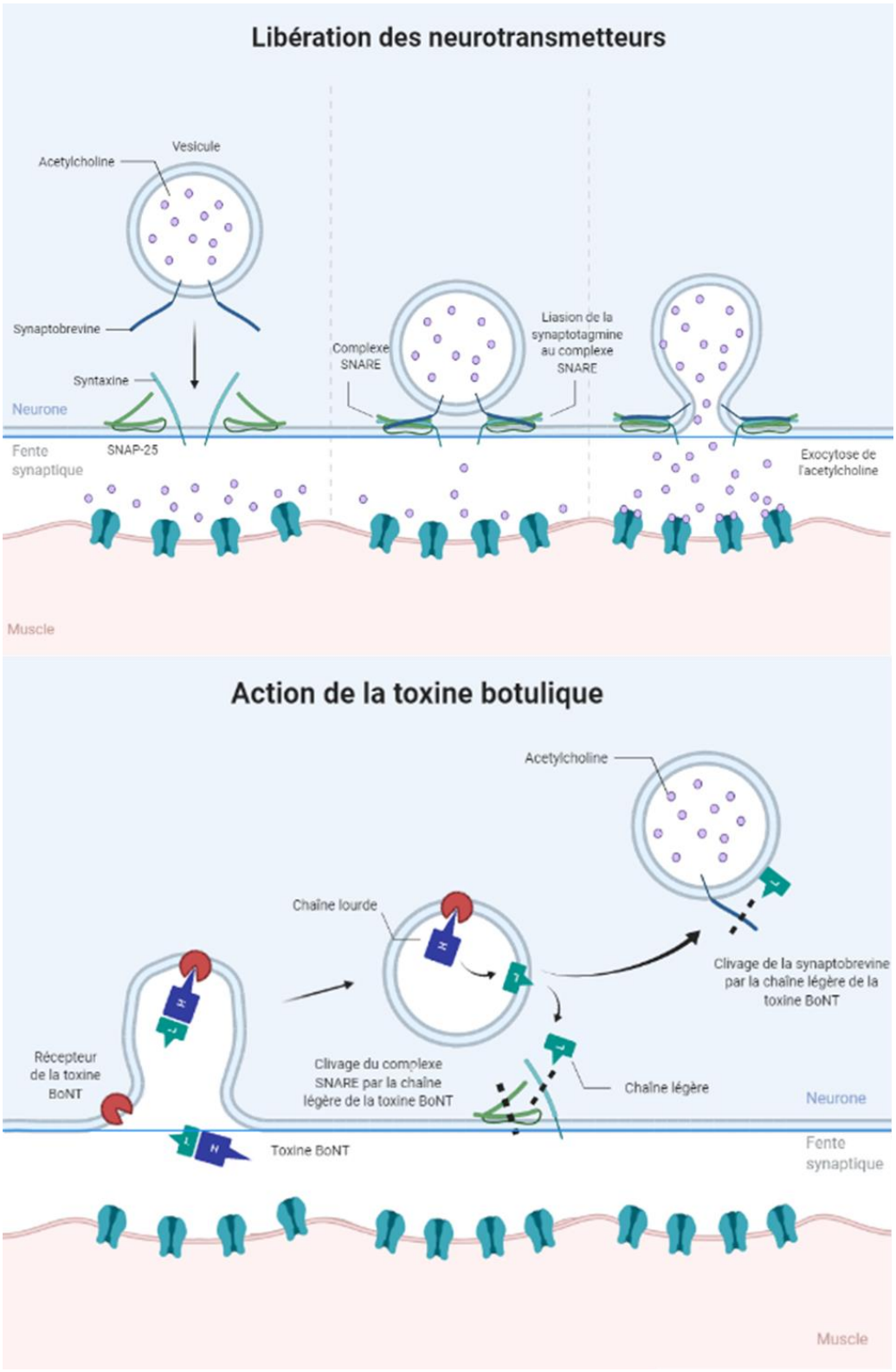


Figure 3 : Mécanismes d'action des toxines botulique au sens des jonctions neuromusculaires.

(Création avec BioRender.com d'après Rowland, 2002)

2.3 Epidémiologie

C. botulinum protéolytique de type A (groupe I) a été isolé du sol de diverses régions géographiques, tels que les États-Unis, la Chine, le Brésil et l'Argentine. *C. botulinum* protéolytique de type B (groupe I) a été isolé en Europe. *C. botulinum* non-protéolytique de type E (groupe II) est associé aux sédiments d'eau douce et marins en Scandinavie, au Canada, en Alaska et au Japon (Tableau 9). Ainsi, *C. botulinum* de type A (34 % des cas), de type B (52 % des cas) et de type E (12 % des cas) sont principalement responsables du botulisme d'origine alimentaire (Lindstrom and Korkeala, 2006).

Plusieurs études menées par Dodds (1993) ont permis de conclure à une faible présence de spores de *C. botulinum* dans l'environnement. Sur 57 études réalisées en Europe et en Amérique du Nord, 39 montrent une contamination des sédiments/sols < 100 spores/kg contre 14 montrant une contamination des sédiments/sols comprises entre 100 et 1000 spores/kg et 4 ont montré une contamination supérieure à 1000 spores/kg (Dodds, 1993). La présence de *C. botulinum* dans les sédiments et les sols augmente les risques de contamination des produits de la mer (*C. botulinum* Groupe II type E, plus de 100 spores/kg dans les poissons) et des légumes (*C. botulinum* Groupe I type A/B, environ 410 spores/kg dans les légumes) ainsi que des plats préparés contenant de la viande (7 spores/kg) par la contamination croisée *via* les légumes, les épices et les aromates (Dodds, 1993; Hauschild, 1993). Ces études ont permis de définir un taux d'incidence en *C. botulinum* de l'ordre de 0,36 %. A partir d'une étude de 316 échantillons de légumes crus (carottes et haricots verts) prélevés dans les boîtes de légumes de conserves françaises, seulement deux échantillons ont révélé la présence de spores de *C. botulinum*. Ainsi, une incidence de 0,8 % pour les carottes et 0,5 % pour les haricots verts a été calculée (Hauschild, 1993; Miliotis and Bier, 2003; Sevenier et al., 2012). Cette occurrence de *C. botulinum* principalement dans les produits végétaux, le développement de nouveaux produits alimentaires, les contaminations liées aux matériels et les défauts de traitement thermique montrent la nécessité de contrôler *C. botulinum* dans les aliments et notamment dans les boîtes de conserve. En effet, la thermorésistance des spores par *C. botulinum* représente un risque pour la santé publique.

Tableau 9 : Tendances épidémiologiques du botulisme alimentaire dans le monde.

Pays	Type de neurotoxine	Aliments contaminés prédominants
Etats-Unis		
Canada, Alaska	E	Produits de la mer
Amérique du Nord	A/B	Fruits et légumes
Amérique du Sud	A	Fruits et légumes
Europe		
Scandinavie	E	Produits de la mer
Europe centrale	A/B	Viandes
Europe de l'ouest	A/B	Viandes
Pologne	B	Fruits et légumes
Italie	B	Fruits et légumes
Espagne	B	Fruits et légumes
France	B	Viandes
Asie		
Chine	A	Haricots de soja fermentés
Japon	E	Poissons fermentés

(Drasar, 2010; Frank, 2007; Rasetti-Escargueil et al., 2020a).

De plus, les conditions de transformation et l'hygiène des usines ont également une incidence sur la contamination des aliments par *C. botulinum*. La mise en place de nouveaux procédés de transformation doit faire l'objet d'une évaluation afin de s'assurer que ce dernier n'augmentera pas le risque de croissance de *C. botulinum* dans les aliments. La formulation des aliments, en tenant compte des facteurs intrinsèques (pH, concentration en NaCl) et extrinsèques (traitements thermique), est essentielle pour contrôler la production de la neurotoxine botulique (BoNT).

En Europe depuis 5 ans, le nombre de cas de botulisme d'origine alimentaire était plus élevé principalement en Italie. En 2016, les foyers de botulisme d'origine alimentaire placent la France au deuxième rang en nombre de cas en Europe. En 2020, le cas botulisme alimentaire concernait le fenouil et les amandes au pesto produits en Italie (Tableau 10) (European Center for Disease Prevention and Control, 2021). En France, les aliments les plus impliqués dans le botulisme alimentaire étaient les viandes (jambon, pâté), les légumes (aubergines en conserve, asperges) et d'autres aliments (pâtes fraîches) comme l'illustre le Tableau 11. Depuis 2017, les statistiques sont constantes en France avec une moyenne de 17,4 cas de botulisme alimentaire par an, au minimum 9 cas et maximum 49 cas au cours des 7 dernières années (Rasetti-Escargueil et al., 2020a). La persistance du botulisme alimentaire repose principalement sur des défauts de traitement thermique au niveau des conserves de fabrication artisanale et familiale. Toutefois, l'incidence des cas de botulisme alimentaire causée par les conserves

industrielles est de l'ordre de 0,2 à 0,5 pour 1 million de personnes (Sevenier et al., 2012). De plus, la demande croissance des consommateurs pour avoir accès à des produits dont la qualités organoleptique et nutritionnelles sont préservés oriente les procédés de fabrication vers de nouvelles techniques moins impactantes. Ces dernières doivent cependant être suffisantes pour éliminer le risque de botulisme. Par exemple, le développement des aliments transformés réfrigérés à durée de vie prolongée (en anglais *Refrigerated Processed Foods of Extended Durability*) ouvre de nouvelle porte pour le développement de *C. botulinum*. En France, suite à la mise sur le marché de ces produits réfrigérés, le nombre de cas de botulisme alimentaire a augmenté de plus de 7 % (Carlin et al., 2004).

Tableau 10 : Nombre de cas de botulisme d'origine alimentaire en Europe entre 2013 et 2020.

	2013	**2014**	**2015**	**2016**	**2017**	**2018**	**2019**	**2020**
Cas total	112	97	99	127	85	93	81	82
1er pays	Italie (40)[1]	Roumanie (31)	Italie (20)	Italie (37)	Italie (21)	Italie (26)	Roumanie (23)	Italie (46)
2ème pays	Roumanie (25)	Pologne (17)	Pologne (18)	France (18) Pologne (18)	Pologne (14)	Roumanie (15)	Italie (13)	France (11)
3ème pays	France (15)	Hongrie (12) Italie (12)	France (15) Angleterre (15)	Roumanie (15)	Roumanie (13)	Pologne (14)	France (10)	Pologne (6) Romanie (6)

[1]Le nombre entre parenthèses correspond au nombre de cas dans chaque pays. (European Center for Disease Prevention and Control, 2021).

Tableau 11 : Aliments impliqués dans le botulisme d'origine alimentaire en France entre 2010 et 2020.

Années	Aliments	Produits	Nombre de cas	Total
2010	Jambon	Fait maison	17	23
	Asperges	Conserves artisanales	1	
	Haricots verts	Conserves artisanales	5	
2011	Tapenades d'olives vertes avec amandes	Producteur artisanal et familial	9	14
	Tomates séchées	ND	3	
	Epinards	Conserves artisanales	1	
	Pâtes fraîches	ND	1	
2012	Pâté	Importation	1	7
	Jambon	Fait maison	3	
	Aubergines	Conserves artisanales	3	
2013	Jambon	ND	5	7
	Chorizo	Importation	2	
2014	Jambon	ND	4	4
2015	Terrine de porc	ND	1	11
	Hamburger	ND	3	
	Jambon	ND	3	
	Pâté de faisan	ND	3	
	Chorizo	Importation	1	
2016	Jambon	ND	12	13
	Charcuterie	Importation	1	
2017	Boulettes de soja sous vide	Plat industriel	3	5
	Terrine de lièvre	Fait maison	2	
2018	ND	ND	ND	7
2019	ND	ND	ND	10
2020	ND	ND	ND	11

ND : Non Déterminé ; (Carlier et al., 2007; European Commission, 2018; Mazuet et al., 2017).

2.4 Le botulisme dans les produits à base d'olives traités thermiquement

L'espèce *Clostridium botulinum* peut être retrouvée à la surface des olives et des feuilles par contact avec le sol ou un environnement contaminé. Cette contamination des produits à base d'olives est essentiellement due à la récolte directe au niveau du sol, à une mauvaise hygiène de la part du personnel ou du matériel et à l'absence de lavage des olives avant le saumurage (Panagou et al., 2013). Cependant, la fermentation est une excellente technique de conservation. Durant la fermentation, le développement des bactéries lactiques entraîne la diminution du pH (pH < 4,5) inhibant la croissance des pathogènes. Pour cette raison, les produits à base d'olives sont généralement considérés comme

moins susceptibles de provoquer des intoxications d'origine alimentaire, bien que plusieurs cas de botulisme alimentaire aient été signalés (Tableau 12). Les intoxications d'origine alimentaire suite à la consommation de produits à base d'olives se situent principalement dans les pays européens en relation avec le régime alimentaire et l'origine méditerranéenne de l'olivier. La présence de *Clostridium botulinum* et/ou de la toxine botulique peut être expliquée par une contamination post-traitement thermique (défaut d'emballage) ou un défaut de traitement thermique (pas de destruction bactérienne suffisante ou pas de destruction de la toxine) ou de formulation (produit faiblement acide permettant le développement bactérien). Par ailleurs, la contamination des produits à base d'olives peut provenir des ingrédients ajoutés à la préparation (tapenades, pâtes d'olives, huiles d'olives) telles que les tomates séchées, les amandes, les herbes aromatiques. La présence en acide gras dans les olives impacte fortement sur la disponibilité de l'eau. Cette diminue de l'activité de l'eau entraîne une inhibition de la croissance bactérienne. Cependant, l'utilisation d'ingrédients aqueux peut créer des microenvironnements dont l'augmentation de l'activité de l'eau est favorables à la croissance de *C. botulinum* au sein des produits tels que les tapenades ou les infusions de plantes dans l'huile d'olive (Heperkan, 2013; Medina-Pradas and Arroyo-López, 2015; Panagou et al., 2013, 2008).

Tableau 12 : Principaux foyers de botulisme d'origine alimentaire associés à la consommation d'olives dans le monde entre 2004 et 2021.

Années	Aliments	Pays	Références
2004	Olives vertes en saumure	Italie	Cawthorne et al., 2005
2006	Olives (fabriquées en Italie)	Canada	https://www.promedmail.org/
2007	Olive (fabriquées en Italie)[1]	USA	
2008	Huiles d'olives infusées[1]	UK	
2008	Sauces à l'huile d'olive[1]	USA	
2010	Olives farcies aux amandes (fabrication artisanale)	Espagne	WHO and FAO, 2013
2011	Olives, Soupes aux haricots, Tortillas aux haricots[1]	USA	https://www.promedmail.org/
2011	Olives farcies aux amandes (fabriquées en Italie)	Finlande	WHO and FAO, 2013
2011	Tapenades d'olives vertes avec amandes	France	
2012	Olives vertes (fabriquées en Italie)	UK	
2013	Olives[1]	USA	https://www.promedmail.org/
2021	Olives[1]	Canada	https://www.promedmail.org/

[1] : indique le rappel après un risque potentiel pour la sécurité alimentaire. USA : Les Etats-Unis, UK : Le Royaume-Uni.

3. Biologie et génétique de *Clostridium botulinum* et *Clostridium sporogenes*

3.1 Taxonomie

Le genre *Clostridium* est généralement défini par des bactéries anaérobies ou aérotolérantes à Gram-positif sous forme de bâtonnets et formant des endospores (spores déformantes). Ce genre comprend plus de 100 espèces. Les principales espèces pathogènes et d'altération sont *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium difficile, Clostridium tetani, Clostridium butyricum* et *Clostridium beijerinckii* (Tableau 13).

Tableau 13 : Principales caractéristiques de *C. botulinum* (pathogène), *C. perfringens* (pathogène), *C. difficile* (pathogène), *C. tetani* (pathogène), *C. butyricum* (altération et/ou pathogène) et *C. beijerinckii* (altération).

Espèce	*C. botulinum*	*C. perfringens*	*C. difficile*	*C. tetani*	*C. butyricum*	*C. beijerinckii*
Taille (µm)	0,6-1,4 x 3,0-20,2	0,6-2,4 x 1,3-19	0,5-1,9 x 3,0-16,9	0,5-1,7 x 2,1-18,1	0,5-1,7 x 2,4-7,6	0,5-1,7 x 1,7-8,0
Mobilité	Oui Flagelles péritriches	Non	Oui Flagelles péritriches	Oui Flagelles péritriches	Oui Flagelles péritriches	Oui Flagelles péritriches
Respiration	Anaérobie	Anaérobie - Aérotolérante	Anaérobie	Anaérobie	Anaérobie	Anaérobie
Température (°C)	2,5 – 45	20 – 50	25 – 45	25 – 45	30 – 37	30 – 37
pH minimum	4,6 – 5,1	5,5	5,0	6,1	4,6	4,6
% NaCl maximum	5 – 10	6,5	ND	6,5	6,5	6,5
Toxine	Oui (A, B, C, D, E, F, G et H)	Oui (α, β, Entérotoxine)	Oui (A et B)	Oui (Toxine tétanique, TeNT)	Non *	Non
Spore	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui
Pathologie	Botulisme (Paralysie musculaire)	Toxi-infection alimentaire (Entérite nécrosante)	Diarrhée nosocomiale Colite pseudo-membraneuse	Tétanos (Paralysie musculaire)	Non*	Non (Bactérie d'altération)
Transmission	Aliments/Animaux	Aliments	Selles de personnes infectées	Blessure (sol/selles)	Sol Aliments	Sol

*Rare cas de production de toxine botulique de type E provoquant des entérocolites nécrosantes et paralysie des muscles (Anniballi et al., 2002; Frank, 2007; Hatheway, 1990; Vos et al., 2009).

C. botulinum est une espèce très hétérogène qui se divise en quatre groupe différents (Figure 4).

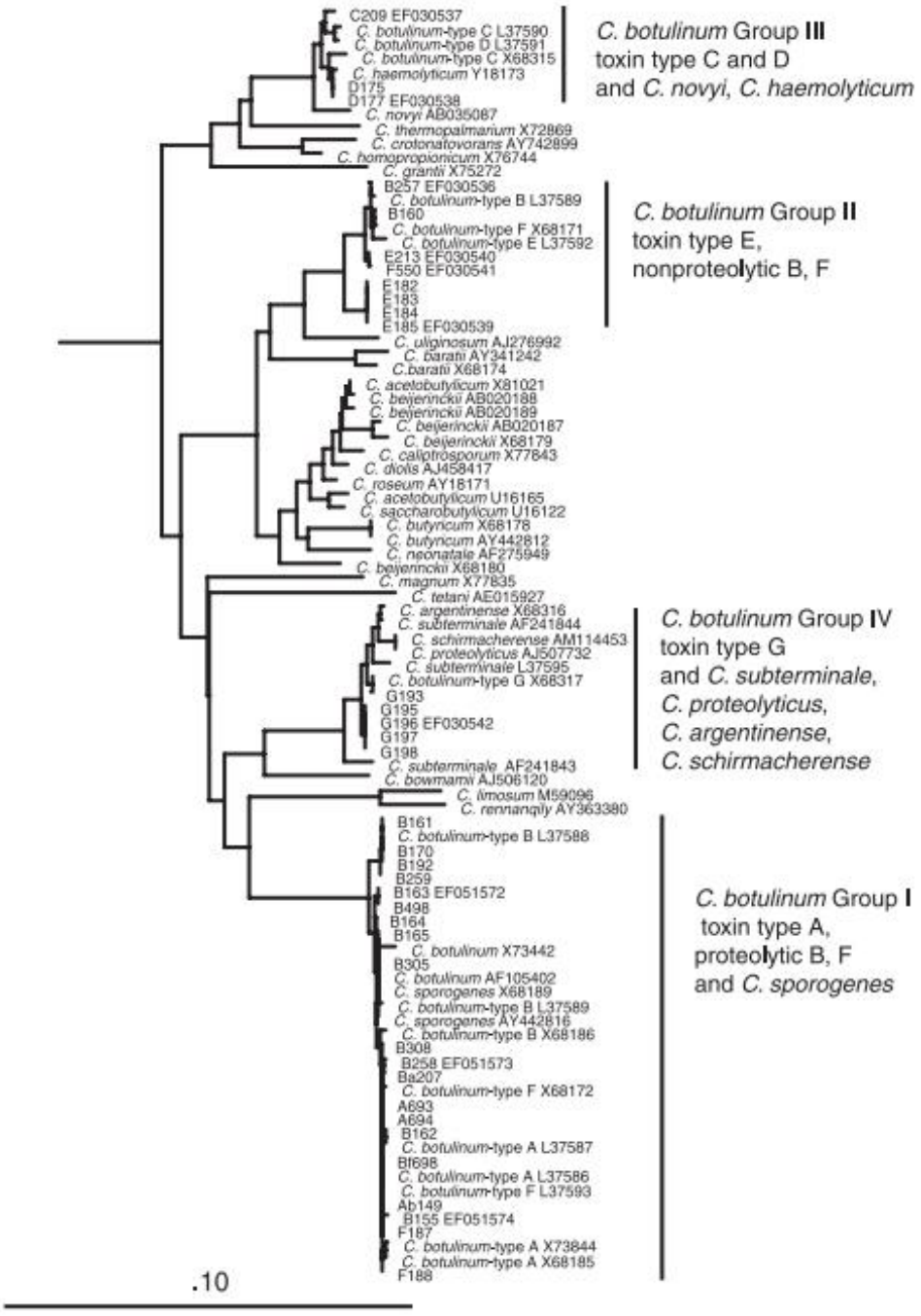


Figure 4 : Dendrogramme du genre *Clostridium* basé sur l'analyse des séquences des gènes d'ARNr 16S.

Dendrogramme phylogénique illustrant la diversité génétique des clostridies. L'arbre a été construit à partir d'un alignement de 1 329 bases des séquences des gènes d'ARNr 16S après suppression des colonnes contenant plus de 80 % de caractères manquants (Hill et al., 2007).

***C. botulinum* groupe I** rassemble des souches produisant les toxines de types A, B et F. L'espèce *C. botulinum* groupe I est étroitement liée avec l'espèce *Clostridium sporogenes*. En effet, cette espèce présente des similarités phylogénétiques avec *C. botulinum* groupe I mais ne possède pas et/ou ne produit pas la toxine botulique. Ainsi, à l'origine l'appellation *C. botulinum* groupe I a été longtemps réservée aux souches toxinogènes et l'appellation *C. sporogenes* aux souches non toxinogènes. Le séquençage du génome entier (Whole Genome Sequencing, WGS) a été utilisé pour recueillir plus d'informations sur la relation existante entre *C. sporogenes* et *C. botulinum* groupe I. Cette technique a montré que le pangénome de ces souches était composé de 16 229 gènes avec 143 signatures spécifiques pour *C. sporogenes*. L'espèce *C. sporogenes* forme son propre « clade » avec une identité nucléotidique moyenne (ANI) de 93,4 % (inférieure au seuil ANI de 95 % fréquemment utilisé pour la séparation entre les espèces) ce qui suggère que *C. sporogenes* est une espèce bactérienne distincte. Cependant, certaines souches de *C. sporogenes* sont trouvées dans le clade *C. botulinum* groupe I. Certaines souches de *C. botulinum* groupe I ont perdu leurs capacités à produire la toxine, tout comme certaines souches de *C. sporogenes* auraient la capacité de produire la toxine (Weigand et al., 2015). En effet, les gènes responsables de la production de toxine (*bont*) sont flanqués de séquences d'insertion (IS) qui favorisent le transfert génétique (Poulain and Popoff, 2019; Smith et al., 2015). Ainsi, certaines souches identifiées comme *C. sporogenes* en raison de leurs absences de gènes de toxines, seraient des souches de *C. botulinum* groupe I ayant perdu leurs gènes produisant les toxines. La présence ou l'absence de gène produisant les toxines botuliques ne serait pas un critère fiable pour distinguer les souches de *C. sporogenes* et de *C. botulinum* groupe I. Une étude récente utilisant l'analyse du polymorphisme mononucléotidique (Single Nucleotide Polymorphism, SNP) du core génome (ensemble des gènes présents dans l'ensemble des souches analysées) sur 556 souches de *C. botulinum* groupe I et *C. sporogenes* a montré deux clades distincts. Le premier clade comprend les souches de *C. botulinum* groupe I dont la plupart possèdent un ou plusieurs gènes de la toxine botulique de type A, B et/ou F. Cependant, certaines souches de *C. botulinum* groupe I ne possèdent pas de gène de la toxine botulique et sont présents dans le premier clade. Les souches de *C. sporogenes* composent le deuxième clade dont certaines d'entre elles possèdent un gène de la toxine botulique de type B (Brunt et al., 2020; Poulain and Popoff, 2019; Schill et al., 2016; Weigand et al., 2015; Williamson et al., 2016).

***C. botulinum* groupe II** regroupe les souches productrices des toxines de types B, E et F et est plus étroitement lié avec *C. beijerinckii*. Des relations étroites ont également été observées pour les souches

de ***C. botulinum* groupe III** avec *C. novyi* et *C. subterminale* pour ***C. botulinum* groupe IV** (Carter et al., 2009; Hill et al., 2007; Mazuet et al., 2016; Skarin and Segerman, 2011; Williamson et al., 2016).

3.2 Caractéristiques physiologiques

Les quatre groupes de *Clostridium botulinum* sont différents sur le plan phylogénique et physiologique. Ces caractéristiques sont présentées dans le Tableau 14.

C. botulinum* groupe I** est associé au botulisme d'origine alimentaire, botulisme par blessure et botulisme infantile. Le groupe I rassemble des souches protéolytiques produisant les toxines de type A, B, ou F localisées sur les plasmides et/ou les chromosomes. *C. botulinum* groupe I dégrade différentes sources de carbone telles que le glucose, le fructose et le maltose. La température optimale de croissance est de 37 °C. Les températures minimales de croissance et de production de la toxine ont été observées entre 10 °C et 12 °C. *C. botulinum* groupe I est incapable de se développer ou de former la toxine botulique en dessous d'un pH 4,6, ou à une concentration en chlorure de sodium (NaCl) supérieure à 10 % soit une activité de l'eau (a_w) de 0,94 (a_w : 0,93 pour le glycérol). *C. botulinum* groupe I est potentiellement capable de se développer dans des milieux de culture contenant des protéines précipitées à pH 4,30 après 6 semaines à 30 °C (Lund et al., 1987). Elle est le micro-organisme pathogène produisant les spores les plus thermorésistantes ($D_{121,1\,°C}$ = 0,21 min). Elle est la principale préoccupation pour la sécurité alimentaire des conserves faiblement acide (voir section 4.2.1). ***C. sporogenes est une espèce qui partage des similitudes morphologiques, physiologiques et génétiques avec *C. botulinum* groupe I mais non-toxinogène, ce qui facilite son étude et son utilisation (Bradbury et al., 2012; Brown et al., 2012). L'espèce *C. sporogenes* a été isolée à l'origine à partir de conserves de maïs avariées en 1927 (travaux de E. J. Cameron), et désignée « Putrefactive Anaerobe » (PA) 3679 (ATCC 7955, NCTC 8594). La souche PA 3679 de *C. sporogenes* est étroitement liée à *C. botulinum* groupe I, mais ces deux espèces diffèrent par certaines propriétés comme l'expression des protéines solubles et la thermorésistance des spores (Bradshaw et al., 2010; Weigand et al., 2015). En effet, les valeurs $D_{121,1\,°C}$ pour PA 3679 dans le tampon phosphate sont comprises entre 0,189 et 3,5 min (moyenne 1,51 ± 0,81 min), avec des valeurs z comprises entre 9,11 °C et 15,1 °C (11,34 ± 1,64 °C). Contrairement à *C. botulinum* groupe I dont les valeurs D et les valeurs z sont respectivement comprises entre 0,055 et 1,43 min (moyenne de 0,21 +/- 0,27 min)et 8,1 °C et 14,06 °C (moyenne de 9,89 +/- 1,30 °C) (Brown et al., 2012). L'étude de Butler *et al.*, (2017) a permis d'identifier les gènes associés à cette thermorésistance. Les données ont montré l'acquisition d'un second opéron spoVA,

responsable du transport de l'acide dipicolinique (DPA) dans le noyau de la spore pendant la sporulation. Les multiples opérons spoVA se retrouvent chez d'autres bactéries formant des endospores comme *Geobacillus* et *Bacillus cereus* (Butler et al., 2017).

***C. botulinum* groupe II non-protéolytique** est associé au botulisme d'origine alimentaire. Toutes les souches produisent les toxines de type B, E, ou F et les gènes de toxines sont localisés sur le plasmide ou le chromosome. Les souches du groupe II utilisent plusieurs sources de carbone telles que le glucose, le fructose, le maltose et le sucrose. *C. botulinum* groupe II est psychrophile, avec une température optimale de croissance à 25 °C. La croissance et la formation de toxine ont été observées jusqu'à des températures comprises entre 2,5 °C et 3,0 °C. Aucune croissance n'a été observée en dessous d'un pH 5,0 ou à une concentration en NaCl supérieure à 5 % (a_w : 0,97 ; a_w : 0,94 pour le glycérol). Les spores formées par *C. botulinum* groupe II sont faiblement thermorésistantes ($D_{82,2\,°C}$ = 2,4 min) (Hauschild, 1993; Peck, 2009). Actuellement, il n'y a pas de souche non-toxinogène de *C. botulinum* groupe II. Cependant, une étude menée par Clauwers *et al.,* (2016) a permis d'obtenir des substituts de *C. botulinum* groupe II non-toxinogènes (Clauwers et al., 2016).

C. botulinum* groupe III** produit les toxines de type C ou D par l'intermédiaire d'un bactériophage. *C. botulinum* groupe III fermente le glucose, le fructose et le maltose. Les souches du groupe III ont une température de croissance optimale de 40 °C et une température de croissance minimale de 15 °C. En dessous d'un pH 5,1, aucune croissance n'a pas été observée. La thermorésistance de ces spores est intermédiaire ($D_{104\,°C}$ = 0,9 min). *C. botulinum* groupe III est étroitement liée à *C. novyi* (Hauschild, 1993; Peck, 2009). ***C. novyi partage des similarités physiologique et phylogénétique avec *C. botulinum* groupe III type C (99 % de similarité par analyse ADNr 16S), mais non-toxinogène. *C. novyi* (ancien nom *Bacillus oedematis maligni* no. 2) a été isolée en 1984 sur des cochons d'Inde par le Dr. Frederick Novy. (Jeong et al., 2020).

Le groupe IV est très différent des autres groupes puisqu'il produit la toxine de type G localisée sur le plasmide. ***C. botulinum* groupe IV** est aussi connue sous le nom de *C. argentinense* (isolée dans du sol en Argentine). *C. botulinum* groupe IV ne fermente aucune de ces sources de carbone (glucose, fructose, maltose et sucrose). La thermorésistance de ses spores est intermédiaire ($D_{104\,°C}$ = 1,1 min). *C. botulinum* groupe IV est étroitement liée à *C. subterminale* (Hauschild, 1993; Peck, 2009). *C. subterminale* est considéré comme le substitut non-toxinogène de *C. botulinum* groupe IV. *C. subterminale* se développe entre 25 °C et 45 °C. La croissance est inhibée lorsque le pH est inférieur à 6 et la concentration en NaCl supérieure à 6,5 % (Peck, 2009; Vos et al., 2009).

Tableau 14 : Caractéristiques de quatre groupes de *Clostridium botulinum.*

	Groupe I Protéolytique	**Groupe II Non-protéolytique**	**Groupe III**	**Groupe IV**
Botulisme	Alimentaire Blessure Infantile	Alimentaire	Chez les animaux	Chez les animaux
Toxine	A, B, F, H	B, E, F	C, D	G
Localisation des gènes de la BoNT	Plasmide et/ou chromosome	Plasmide ou chromosome	Bactériophage	Plasmide
Glucose	+	+	+	-
Fructose	+/-	+	+/-	-
Maltose	+/-	+	+/-	-
Sucrose	-	+	-	-
Température de croissance (minimum/optimum/maximum)	10-12 °C/37 °C/45 °C	2.5-3 °C/25 °C/ND	15 °C/40 °C/ND	12 °C/37 °C/45 °C
pH minimum de croissance	4.6	5.0	5.1	ND
Concentration en NaCl maximum de croissance	10 %	5 %	3 %	6,5 %
Activité de l'eau minimum de croissance (NaCl/glycérol)	0,94/0,93	0,97/0,94	0,981/ND	0,96/ND
Thermorésistance des spores	$D_{121,1\,°C}$ = 0,21 minutes	$D_{82,2\,°C}$ = 2,4 minutes	$D_{104\,°C}$ = 0,9 minutes	$D_{104\,°C}$ = 1,1 minutes
Substitut non-toxinogène	*C. sporogenes*	ND	*C. novyi*	*C. subterminale*

ND : Non Déterminé, (Derman, 2015; Peck, 2009; Vos et al., 2009)

3.3 Endospore

3.3.1 Les mécanismes de sporulation

Parmi les espèces bactériennes certaines ont la particularité de former une structure spéciale en dormance, appelée endospore. Les bactéries entament un mécanisme de sporulation lorsqu'elles atteignent la en phase stationnaire. Le mécanisme de sporulation de *Clostridium* diffère du cycle de sporulation de *Bacillus* par un « clostridial stage ». Le stade « clostridien » correspond à une accumulation de vésicules appelées granuloses à l'intérieur du cytosol pendant la première étape de la sporulation. La sporulation peut être décomposée en sept étapes morphologiquement différentes et illustrées dans la Figure 5 (Al-Hinai et al., 2015; Talukdar et al., 2015).

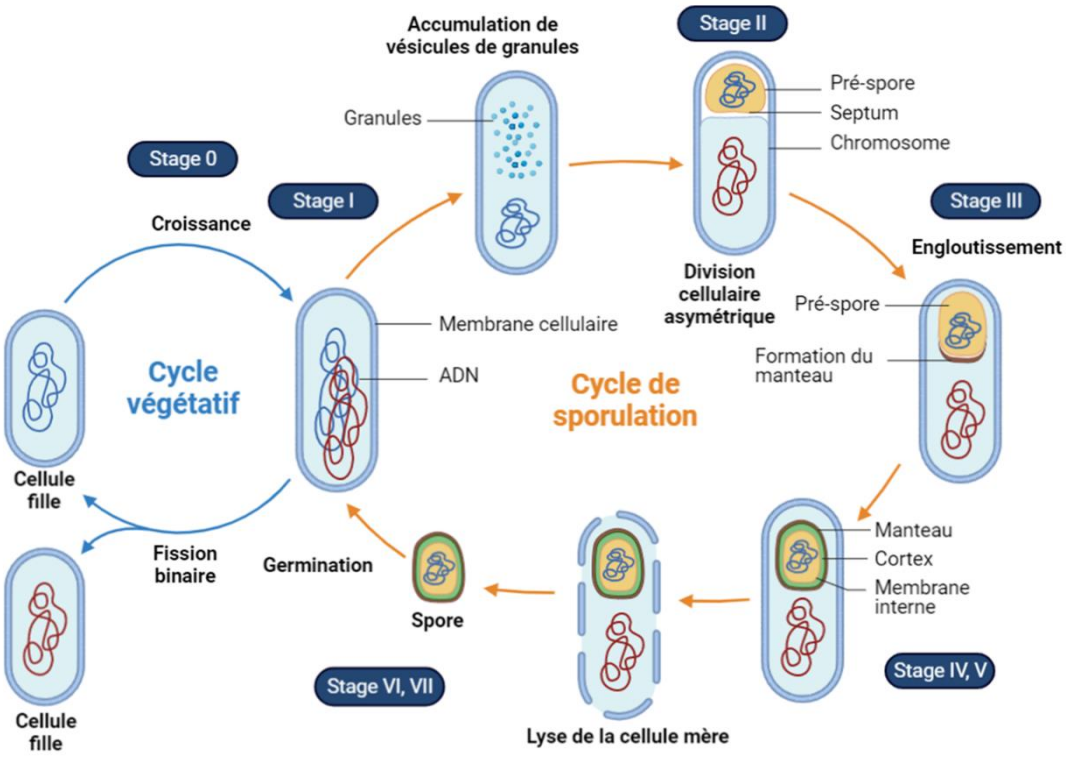


Figure 5 : Formation de l'endospore de *Clostridium botulinum*.

Stade 0 : cycle végétatif de *C. botulinum* (division cellulaire) ; Stade I : duplication de l'ADN et accumulation de vésicules de granules ; Stade II : division cellulaire asymétrique ; Stade III : formation de la spore par engloutissement ; Stade IV et V : développement de la pré-spore ; Stade VI : maturation de la spore par l'acquisition des résistances ; Stade VII : libération de la spore et lyse de la cellule mère (d'après Al-Hinai et al., 2015; Dürre, 2014).

Au **stade 0**, la bactérie dans sa forme végétative est métaboliquement active. A ce stade, les cellules végétatives peuvent croître par fission binaire, produire la toxine botulique ou bien initier la sporulation.

Chez les Clostridies, l'initiation de la sporulation (**Stade I**) est possible lors de la perception de la densité cellulaire par un mécanisme de *quorum sensing* (communication entre cellules végétatives). Ce mécanisme est régulé par l'opéron agrBDCA (Figure 6). La protéine AgrB associée à la membrane traite et exporte un peptide auto-inducteur (AIP), qui est codé par AgrD. L'AIP est ensuite perçu par un système à deux composants AgrC et AgrA. Le capteur de l'AIP, AgrC est une protéine membranaire composée de récepteurs histidine kinase (HPKs). La phosphorylation (P*) des histidines kinases active le régulateur AgrA agit, comme un facteur de transcription et permet la transcription de RNAIII. La molécule d'ARN (RNAIII) contrôle la formation des toxines et la sporulation, notamment la formation des vésicules de granules (Dürre, 2014; Gray et al., 2013; Steiner et al., 2012).

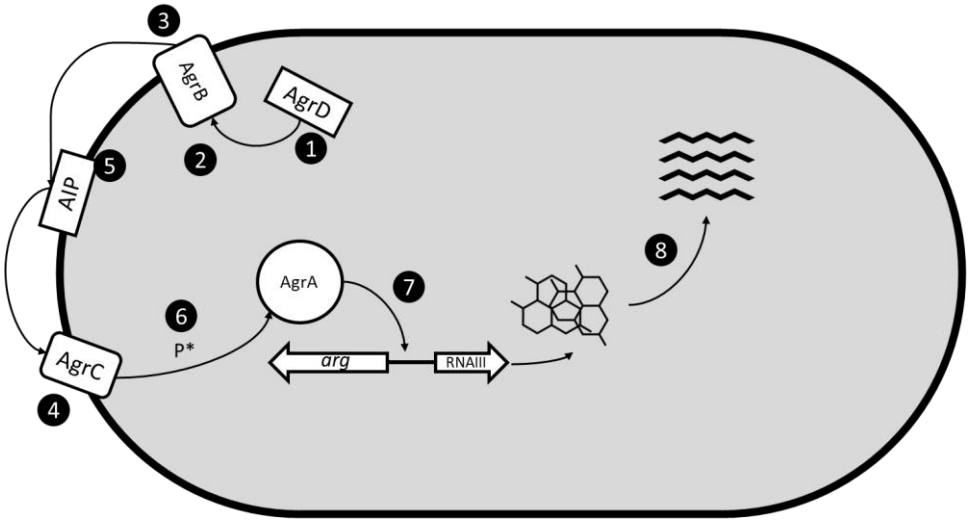


Figure 6 : Représentation schématique de l'initiation de la sporulation des Clostridies par *quorum sensing.*

1 : Liaison et clivage de l'extrémité C' du peptide AgrD par l'endopeptidase l'AgrB ; 2 : Cyclisation du propeptide ; 3 : Exportation de l'AIP ; 4 : Liaison de l'AIP avec le récepteur AgrC ; 5 : Dimérisation, activation du récepteur AgrC ; 6 : Phosphorylation et activation du régulateur AgrA ; 7 : Liaison du régulateur AgrA avec les séquences cibles ; 8 : régulation post-transcriptionnelle de l'expression des gènes de la sporulation. Figure adaptée de Gray, 2013 et Paredes-Sabja, 2014) (Gray et al., 2013; Paredes-Sabja et al., 2014).

La spécificité des Clostridies vis-à-vis des bacilles, réside dans une étape de différenciation juste avant l'entrée en sporulation et en fin de croissance exponentielle. Cette étape appelée « clostridial stage » correspond à un gonflement des cellules par l'accumulation de granules d'amylopectine au sein de leur cytoplasme. Le polysaccharide composé de α (1→4)-polyglucane de poids moléculaire élevé a été désigné de « granulat » chez *C. saccharobutylicum*. Chez *C. botulinum*, *C. butyricum* et *C. pasteurianum*, des granulats similaires ont été mis en évidence et correspondent à de l'amylopectine ou à du glycogène. Cette accumulation de granulose est généralement dégradée pendant la formation des spores apportant une source d'énergie (Al-Hinai et al., 2015; Dürre, 2014; Reysenbach et al., 1986). L'entrée en sporulation est marquée par la duplication de l'ADN bactérien qui se condense en un filament axial longitudinal du fait de la présence de la protéine RacA attachant le chromosome au pôle cellulaire (Higgins and Dworkin, 2013).

Le **stade II** est caractérisé par la division asymétrique de la cellule végétative en deux compartiments séparés par un septum. Il est formé par invagination de la membrane plasmidique de la cellule mère. Les deux compartiments possèdent une copie du génome. Le plus grand compartiment correspond à la cellule mère et le plus petit à la future spore ou pré-spore. Le génome n'est pas réparti de façon équitable entre les deux compartiments, seul 1/3 de l'ADN de la future spore est initialement présent dans celle-ci et les 2/3 restant sont dans la cellule mère. Les derniers tiers y seront déplacés par la suite grâce à l'action de la translocase, SpoIIIE. SpoIIE est une protéine membranaire polytopique qui joue aussi un rôle lors de l'engloutissement de la pré-spore (Higgins and Dworkin, 2013; Talukdar et al., 2015; Tan and Ramamurthi, 2014).

Au **stade III**, la cellule-mère engloutit la pré-spore. Le septum formé lors de la division asymétrique entoure la future spore, on parle d'enkystement. L'endospore possède alors une membrane interne et externe permettant la libération de la spore dans le cytosol de la cellule mère. A la fin du stade III, la sporulation est irréversible (Al-Hinai et al., 2015).

La mise en place des différentes couches de la spore à savoir le cortex entre les membranes internes et externes de la spore est réalisée lors du **stade IV** (Al-Hinai et al., 2015).

Ensuite, la synthèse des tuniques sporales autour de l'endospore dans le cytosol de la cellule mère correspond au **stade V** (Al-Hinai et al., 2015).

Lors du **stade VI**, la maturation de la spore est effectuée par l'acquisition des propriétés de résistance vis-à-vis des stress environnementaux grâce à l'accumulation de l'acide dipicolinique (DPA). L'acide dipicolinique est largement synthétisé lors des stades IV et V. Cette molécule est produite dans la

cellule mère et s'accumule sous forme chélatée avec des cations bivalents de calcium (Ca^{2+}) au niveau du cœur de l'endospore. Cette accumulation de d'acide dipicolinique associée aux cation bivalents de calcium (Ca^{2+}-DPA) entraîne la déshydratation du cœur et s'illustre par le passage à l'état de réfringence de la spore en microscopie à contraste de phase (Al-Hinai et al., 2015).

Enfin, au **stade VII**, la lyse de la cellule mère permet la libération de la spore dans l'environnement. Les propriétés des membranes de la spore, lui permettent de rester dans un état de dormance jusqu'à ce que les conditions environnementales redeviennent favorables. La réactivation de la spore entraîne sa germination pour aboutir à la formation d'une cellule végétative métaboliquement active et capable de croître (Al-Hinai et al., 2015; Dürre, 2014).

A partir du **stade IV**, la formation de la structure de la spore permet de gagner en résistance contre les stress environnementaux. La structure de la spore est complexe et conservée entre les différentes espèces à l'exception de la structure de l'exosporium. La spore est composée d'un exosporium, d'un manteau, d'une membrane externe et interne, d'un cortex, d'une paroi cellulaire germinale et d'un cœur pour *Clostridium botulinum*, comme le montre la Figure 7.

L'exosporium est la couche la plus externe de la spore. Cette structure particulière n'est pas présente chez toutes les espèces bactériennes et varie en taille chez les bactéries sporulées. L'exosporium est une structure lâche. Une étude par microscopie électronique (ME) révèle que la surface de l'exosporium est composée de fibrilles intermédiaires et de fibrilles ressemblant à des « cheveux » (Janganan et al., 2016). L'exosporium est composé de glucides et de protéines. Ces protéines, nommées CsxA, CsxB, CsxC et BclA, sont riches en cystéine et ont un domaine collagène similaire à la composition de la protéine BclB trouvée chez *Bacillus anthracis* (Black et al., 2007; Janganan et al., 2020, 2016).

Sous l'exosporium, **le manteau** (ou tuniques) est composé de différentes couches rassemblant plus de 30 protéines différentes produites exclusivement dans la cellule mère (Black et al., 2007; Tan and Ramamurthi, 2014). La fraction protéique du manteau représente 50 à 80 % des protéines totales de la spore, cette composition est différente entre les espèces et au sein des espèces. En effet, seulement 20 protéines du manteau des spores de *B. subtilis* ont des orthologues avec les protéines du manteau des spores du genre *Clostridium* (Al-Hinai et al., 2015; Leggett et al., 2012).

Sous le manteau de la spore, **la membrane externe** ne révèle pas de fonction précise. Cette partie de la structure de la spore n'a pas un grand effet sur la résistance aux radiations, à la chaleur ou aux produits chimiques (Leggett et al., 2012).

Entre les membranes internes et externes, il y a le **cortex**. Le cortex est composé d'un peptidoglycane (PG) spécial qui contient de l'acide diaminopimélique et de l'acide muramique sous forme d'acide muramique-δ-lactame (MAL). Le cortex est important pour établir et maintenir une faible teneur en eau dans le noyau et ainsi assurer la résistance des spores. Pendant la germination, le PG du cortex est dégradé, cette étape est essentielle pour la germination et la reprise de croissance des spores (Black et al., 2007; Higgins and Dworkin, 2013).

Près du cortex, **la paroi de la cellule germinale** a une structure similaire à la paroi de la cellule végétative (Tan and Ramamurthi, 2014). Cette structure n'est pas dégradée pendant la germination des spores et devient la paroi cellulaire de la cellule végétative après l'excroissance de la spore (Black et al., 2007).

La membrane interne est la dernière structure avant le noyau de la spore. Cette structure est composée de lipides similaires à ceux de la membrane plasmique des cellules végétatives. Mais, les principales différences entre ces deux structures sont la présence de récepteurs germinatifs et la protéine SpoVA dans la membrane interne de la spore. Les lipides composant la membrane interne sont faiblement mobiles. La faible mobilité des lipides et la viscosité de la membrane interne permettent uniquement le passage des petites molécules telles que la méthylamine et l'eau (Black et al., 2007; Leggett et al., 2012; Setlow, 2014).

Au centre de la spore se trouve **le noyau**, contenant l'ADN, l'ARN, les ribosomes et les enzymes des spores. La déshydratation du noyau est favorisée par l'accumulation de l'acide dipicolinique (Ca^{2+}-DPA), de cations bivalents de calcium et de protéines Small Acid Soluble Proteins (SASP) qui sont de petites molécules qui protègent l'ADN de la dégradation et des rayonnements UV. Cette déshydratation favorise la résistance à la chaleur et la dormance de la spore (Black et al., 2007; Leggett et al., 2012). De plus, la propriété biochimique du noyau avec un pH plus faible (1,0 à 1,5 unités pH) module l'activité enzymatique pendant la sporulation et la germination (Black et al., 2007).

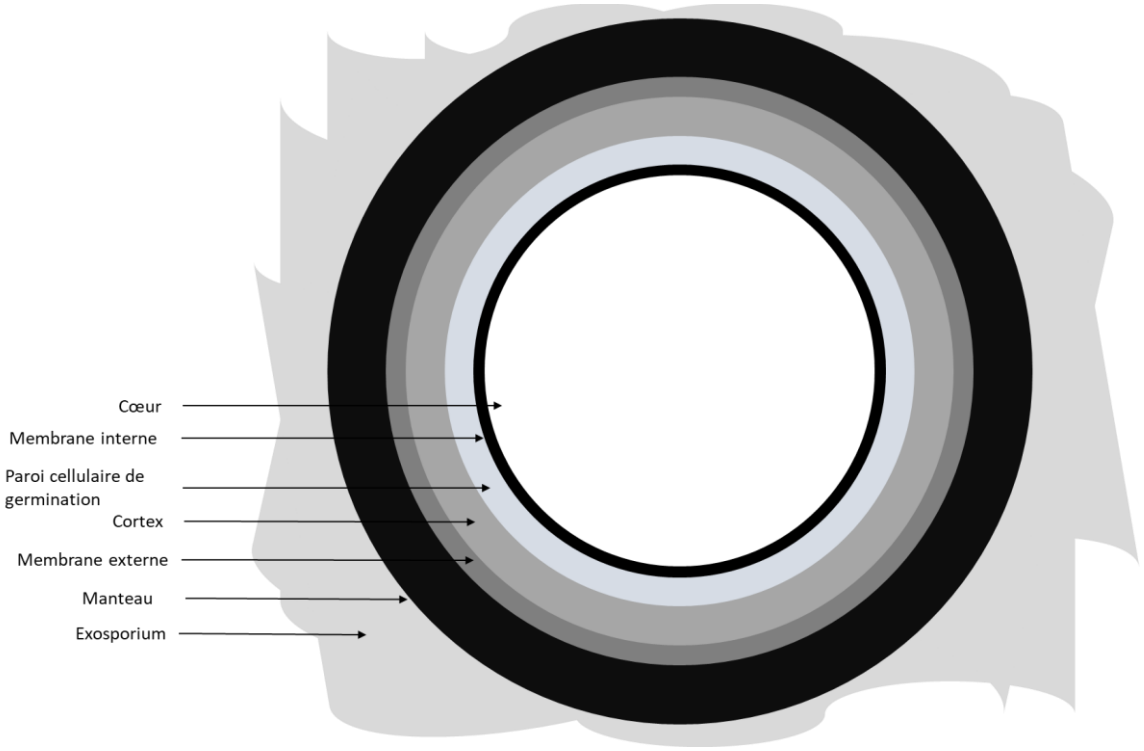


Figure 7 : Représentation schématique de la structure d'une spore.
(d'après Setlow, 2003).

3.3.2 La résistance des spores

La structure de la spore lui permet de résister à différents stress environnementaux, comme les composés chimiques, les radiations UV, les traitements thermiques (Tableau 15).

La composition en protéines riches en cystéine de **l'exosporium** des spores favorise la mise en place de ponts disulfures. La présence de ces ponts augmente la résistance des spores contre le lysozyme et le peroxyde d'hydrogène (Janganan et al., 2020). Chez *B. anthracis*, l'exosporium joue le rôle de barrière imperméable contre les anticorps (Moeller et al., 2008; Setlow, 2014).

La composition particulière du peptidoglycane et la quantité importante en protéines du **manteau** de la spore permettent également de créer une barrière imperméable aux grosses molécules, comme les lysozymes, les agents oxydants, les aldéhydes, les désinfectants, le plasma (gaz comprimé et source électrique) et à la prédation par les bactérivores (protozoaire) (Setlow, 2014). Le manteau contient aussi des enzymes capables de détoxifier les agents chimiques tels que le peroxyde et les agents alkylants de faible poids moléculaire (Black et al., 2007; Henriques and Moran, Jr., 2007; Leggett et al., 2012; Setlow, 2014; Tan and Ramamurthi, 2014). Les spores de *B. subtillis* ont **un manteau** pouvant

accumuler un pigment brun foncé semblable à la mélanine qui absorbe les rayons UV assurant ainsi la résistance des spores.

L'immobilité des lipides et la faible perméabilité peuvent être dues à la compression des **membranes externe et interne** par le cortex permettant d'augmenter la résistance de la spore (Black et al., 2007; Leggett et al., 2012; Setlow, 2006). Dans **le cœur de la spore**, le changement de conformation de la protéine SASP de type α/β après liaison avec l'ADN permet de protéger l'ADN des produits chimiques et les facteurs physiques tels que les UV, les radiations gamma et les traitements thermiques (Leggett et al., 2012). Les radiations UV ciblent principalement l'ADN. Ainsi, la présence de protéines SASPs de type α/β permet un changement de configuration de l'ADN et bloque sa dépurination assurant une meilleure résistance aux UV, aux radiations γ, à la dessication et aux traitements thermiques par la chaleur humide (Henriques and Moran, Jr., 2007; Moeller et al., 2008; Reineke et al., 2013; Riesenman and Nicholson, 2000; Setlow, 2014, 2006).

De plus, l'augmentation de la concentration en ions bivalents tels que Mn^{2+} et la déshydration du cœur de la spore par l'accumulation de l'acide dipicolinique (Ca^{2+}-DPA) favorisent la résistance des spores face aux stress environnementaux (Moeller et al., 2008; Setlow, 2014). En effet, la déshydratation du cœur rend les protéines immobiles et augmente la dormance des spores (Leggett et al., 2012; Moeller et al., 2008; Reineke et al., 2013; Riesenman and Nicholson, 2000; Setlow, 2014, 2006).

Cependant, toutes les structures n'ont pas de rôle dans la résistance des spores tels que **le cortex** et **la paroi cellulaire de germination**.

Par ailleurs, la résistance des spores dépend des espèces bactériennes et de l'environnement de sporulation des spores. En effet, les protéines des spores d'espèces thermophiles sont plus thermostables ce qui augmente leur résistance vis-à-vis d'un traitement thermique. Les conditions de sporulation affectent la thermorésistance des spores : une température de sporulation élevée permet une augmentation de la déshydratations du cœur et donc une augmentation de la thermorésistance (traitement par la chaleur sèche) (Setlow, 2014). Le même phénomène est observé lors de l'ajout d'additifs tels que les acides gras. En effet, la membrane des spores enrichie en lipides diminue la perméabilité et augmente la résistance (Sugiyama, 1951).

Tableau 15 : Mécanisme de résistance des spores face aux traitements chimiques et physiques.

Traitement sporicides	Structures de la spore impliquées dans la résistance	Mécanismes de résistance
Produit chimique	Exosporium	Barrière imperméable
	Manteau	Protéines créant une barrière imperméable et détoxifiante
	Membrane externe et interne	Faible perméabilité et immobilité des lipides
	Cœur de la spore	Protection de l'ADN par la protéine SASP de type α/β
Radiation UV	Manteau	Pigment brun foncé absorbeur de rayon UV
	Cœur de la spore	Protection de l'ADN par la protéine SASP de type α/β
Radiation γ	Cœur de la spore	Protection de l'ADN par la protéine SASP de type α/β Accumulation d'ions bivalents (Mn^{2+})
Dessication	Cœur de la spore	Protection de l'ADN par la protéine SASP de type α/β
Chaleur humide	Cœur de la spore	Protection de l'ADN par la protéine SASP de type α/β
Chaleur sèche	Cœur de la spore	Protection de l'ADN par la protéine SASP de type α/β Accumulation de DPA Accumulation d'ions bivalents Ca^{2+} Espèce thermophile plus résistante (espèce dépendante)

(Black et al., 2007; Henriques and Moran, Jr., 2007; Leggett et al., 2012; Moeller et al., 2008; Reineke et al., 2013; Riesenman and Nicholson, 2000; Setlow, 2014, 2006; Sugiyama, 1951; Tan and Ramamurthi, 2014)

3.3.3 Germination et croissance

La germination des spores permet le passage de l'état de spore à celui de cellule végétative lorsque des conditions environnementales favorables sont rencontrées : présence de nutriments, température favorable à la croissance. En d'autres termes, la germination est définie par le passage du stade de dormance au stade actif. Ce mécanisme divisé en quatre étapes principales est présenté ci-après (Figure 8).

Lors du **stade I**, plusieurs nutriments, stimuli enzymatiques et physiques activent la germination. Parmi les stimuli physiques, le traitement thermique (*B. subtillis* : 30 min à 70 °C ; *C. botulinum* : 10 min à 80 °C) et les hautes pressions (de 100 à 600 megaPascals) activent la germination des spores. L'activation de la germination par un traitement thermique entraîne une modification des protéines de surface activant la perméabilisation du noyau par la libération de l'acide dipicolinique (Ca^{2+}-DPA). Les hautes pressions ne déclenchent pas la germination *via* les récepteurs de nutriments mais semblent directement causer la libération de l'acide dipicolinique (Ca^{2+}-DPA) (Luu et al., 2015; Setlow, 2014; Wells-Bennik et al., 2016). Chez *C. botulinum*, la L-alanine et le co-germinant L-lactate activent aussi la germination (Broussolle et al., 2002). Plusieurs études indiquent que la présence de L-alanine seule est suffisante pour induire la germination (concentration minimale pour initier la germination : 1 mM de L-alanine). Mais en présence des deux germinants L-alanine et L-lactate, la germination est plus rapide et la quantité de spores germées est plus importante. Les différents germinants sont présentés dans le Tableau 16. La L-alanine et le L-lactate sont tous deux des acides aminés hydrophobes composés d'une chaîne latérale courte (Brunt et al., 2014; Peck, 2009). Le traitement thermique (15 min à 70 °C) combiné au germinant L-alanine améliore le taux de germination (Wang et al., 2017). Les germinants sont reconnues par les récepteurs spécifiques de la germination (GR) situés dans la membrane interne de la spore. Ces GR sont codés par deux opérons tricistroniques et un opéron pentacistronique pour *C. botulinum* groupe I (ATCC 3502) et trois opérons tricistroniques et un opéron tétracistronique pour *C. sporogenes* (ATCC 15579) (Brunt et al., 2014; Peck, 2009). Le récepteur germinatif est composé de quatre protéines (GerA, GerB, GerC et GerX) et il peut y avoir six sous-types de protéines GerX (gerX type 1a-f). Toutes les souches du groupe I possèdent les gènes gerX1a et gerX1d. Alors que le gène gerX1c n'est présent que dans le groupe II, les gènes gerX1b et gerX1e sont tous deux présents dans le groupe III de *C. botulinum* et le gène gerX1F dans le groupe IV de *C. botulinum* (Brunt et al., 2016; Shen et al., 2019).

Tableau 16 : Germinant et co-germinant de *C. botulinum* groupe I à IV et *C. sporogenes*.

Espèce	Germinant	Co-germinant
C. botulinum Groupe I	L-alanine, L-cystéine, L-méthionine, L-serine, L-phénylalanine, glycine	L-alanine, L-lactate
C. botulinum Groupe II	L-alanine, L-serine, L-cystéine, L-thréonine, glycine	ND
C. botulinum Groupe III	ND	ND
C. botulinum Groupe IV	L-cystéine, L-alanine	ND
C. sporogenes	L-alanine, L-cystéine, L-méthionine, L-serine, L-phénylalanine	ND

ND : Non déterminé (Brunt et al., 2016).

Les germinants (L-alanine) et le co-germinant (L-alanine/L-lactate) induisent la libération d'un cation monovalent tel que H^+, K^+ et Na^+ caractérisant le **stade II** de la germination. Ensuite, l'acide dipicolinique (Ca^{2+}-DPA) chélaté avec des cations bivalents de calcium, participant à la dormance de la spore, sont également libérés lors de la germination. Cette libération participe à l'hydratation du noyau, régulée par l'opéron spoVA. Au cours du stade II, les spores perdent leurs propriétés de résistance, en particulier, la résistance à la chaleur, car le noyau est progressivement hydraté. Les protéines SASPs de types α/β toujours présentes autour de l'ADN ont un rôle de protection, ainsi les spores sont encore résistantes aux rayons UV (Black et al., 2007; Brunt et al., 2016; Janganan et al., 2016; Shen et al., 2019).

Le **stade III** correspond à la libération de Ca^{2+}-DPA. Cette libération active les enzymes lytiques du cortex de la spore (SCLE). Les enzymes CwlJ et SleB sont localisées respectivement dans le manteau et la membrane interne/externe. Elles sont responsables de l'hydrolyse du peptidoglycane du cortex. L'hydrolyse du cortex permet l'augmentation du volume du noyau par l'accumulation d'eau (en moyenne 80 % du poids humide) (Brunt et al., 2016, 2014; Dürre, 2014; Janganan et al., 2016; Shen et al., 2019).

Enfin, le **stade IV** correspond à la reprise du métabolisme. Chez les espèces du genre *Bacillus*, l'hydrolyse des SASPs par une protéase permet la transcription de l'ADN et fournit une source d'acides aminés pour la biosynthèse *de novo*. La spore devient une cellule végétative métaboliquement active (Janganan et al., 2016; Setlow et al., 2008; Setlow, 2003; Shen et al., 2019).

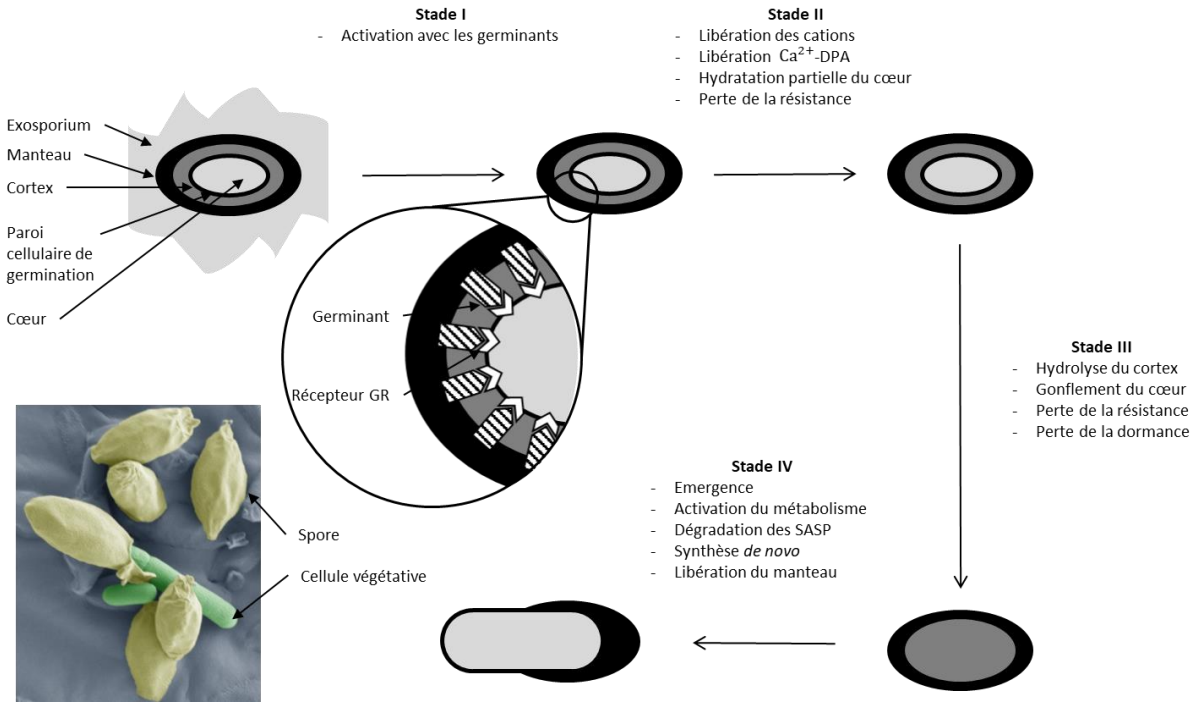


Figure 8 : Processus de germination des spores.

Figure adaptée de Setlow, 2003. Image de microscopie électronique des spores de *Clostridium sporogenes* en cours de germination (recolorées en vert)(Setlow, 2003). Crédit Kathryn Cross, Institute of Food Research. Site Web : **https://www.eurekalert.org/pub_releases/2015-05/nbi-sft051315.php.**

Au sein d'une population de spores, il existe une certaine hétérogénéité entre les individus. Chaque spore a son propre temps de germination et de latence avant de conduire à une première division cellulaire. En condition optimale de croissance et pour des spores non-stressées, l'hétérogénéité des temps de latence est plutôt faible mais lorsque les spores subissent un traitement thermique, le temps nécessaire à la première division cellulaire est très variable et probablement fonction de la capacité de chaque cellule à réparer les dommages avant de germer. Cet effet est d'autant plus marqué que les conditions de croissance sont défavorables et le stress thermique élevé (temps, température). Une partie des spores traitées inoculées dans des conditions défavorables va mourir et l'autre partie va réparer les dommages, voire produire de nouvelles molécules ou structures résistantes. Parmi les spores réparées certaines pourront germer alors que d'autres seront inactives (*i.e.,* une spore incapable de germer) (Peck, 2006; Stringer et al., 2011, 2009). Tous ces facteurs affectent la probabilité de croissance des spores, en particulier lors de la modélisation. Dans les conditions optimales de

croissance, le temps de latence est significativement affecté par la taille de l'inoculum de *C. botulinum* 56A. Quand la taille de l'inoculum augmente de 1 à 100 spores/mL, le temps de latence diminue (Zhao et al., 2000). L'effet de la taille de l'inoculum peut être expliqué par l'hétérogénéité de la population *i.e.,* une plus grande probabilité d'avoir des spores qui germent plus rapidement ou un phénomène de « *quorum sensing* » (communication entre cellules par accumulation de molécules signalétiques) qui se déclenche en présence d'une quantité plus importante de cellules (Webb et al., 2012).

4. Maîtrise du micro-organisme *Clostridium botulinum*

4.1 Traitement de destruction

Le traitement thermique est la méthode la plus utilisée et la plus efficace pour détruire les micro-organismes, inactiver les enzymes et les toxines. Deux types de traitements thermiques à chaleur humide sont utilisés dans l'industrie alimentaire : la pasteurisation et la stérilisation. La pasteurisation est un traitement thermique dont la température est généralement inférieure à 100 °C et qui est susceptible de détruire les cellules végétatives bactériennes, les spores fongiques et la majorité des toxines (Hauschild, 1993). La stérilisation est un traitement thermique à une température supérieure à 100 °C permettant également la destruction des spores bactériennes.

Bigelow (1921) propose de quantifier la résistance des micro-organismes au traitement thermique par deux paramètres : D et z (Bigelow, 1921; Esty and Meyer, 1922; Katzin et al., 1942). La valeur D (durée de réduction décimale) est la durée du traitement thermique capable de réduire la population d'un micro-organisme de 1 log (ou 90 % de la population) à une température spécifique (D_T). La diminution de la résistance (D) en fonction de l'augmentation de la température est exprimée par la valeur z, celle-ci représente l'augmentation de température nécessaire pour réduire le temps de mort thermique D d'un facteur 10.

Selon ces définitions, le modèle cinétique décrivant l'évolution du nombre de survivants (*N*) en fonction du temps de traitement thermique (*t*) est le suivant (Équation 1 ; Équation 2) :

$$LogN = LogN_0 - \frac{t}{D}$$

Équation 1 : Inactivation thermique.

Où *N* représente le nombre de cellules survivantes après le temps de traitement thermique *t*, N_0 est la population initiale, *t* le temps de traitement thermique et *D* le temps de réduction décimale (Katzin et al., 1942).

$$D_T = D_{T_{ref}} \times 10^{\left(\frac{T_{ref} - T}{z}\right)}$$

Équation 2 : Evolution de la résistance bactérienne en fonction de la température de traitement.

Où D_{Tref} est le temps de réduction décimale à une température de référence (T_{ref}) et *z* est le nombre de degrés Celsius nécessaires pour réduire D d'un facteur 10 (Bigelow, 1921).

Ces valeurs permettent de calculer le temps équivalent F0 (valeur stérilisatrice ou pasteurisatrice) nécessaire pour détruire un nombre précis de cellules viables à une température donnée, ou encore avec des traitements complexes lorsque la température n'est pas constante.

Les spores de *C. botulinum* groupe I sont hautement thermorésistantes ($D_{121,1\,°C}$ = 0,21 minutes) et sont la principale préoccupation pour la production sûre d'aliments en conserve faiblement acide. *C. botulinum* groupe I est pris comme micro-organisme de référence pour les traitements de stérilisation. Les industries alimentaires doivent appliquer un traitement thermique entraînant une destruction de 12 réductions décimales pour les produits en conserve faiblement acides. Cette règle correspond au traitement thermique minimal qui est capable de détruire 10^{12} log de spores de *C. botulinum* groupe I (Tableau 17), soit un traitement thermique de $F_{121,1\,°C}$ = 3 minutes (calculé à partir de $D_{121,1\,°C}$ = 0,21 minutes, 12 x 0,21 = 2,52 arrondis à 3 min), appelé « Botulinum cook » (CTCPA and DGAL/SDSSA, 2015; FDA and GMA, 2010; Peck, 2009; Sperber et al., 2009; Stumbo et al., 1975).

Tableau 17 : Relation entre le micro-organisme visé par le traitement thermique et la limite létale admissible.

Cible bactérienne	*C. botulinum* groupe I	*C. sporogenes*
Danger	Botulisme alimentaire	Altération (formation de gaz)
Risque	Santé publique (pathogène)	Commercial
$D_{121.1\,°C}$ (min)	0,21	1,5
Nombre de réduction décimale minimale	10^{-12}	10^{-6}
Traitement thermique minimal	12D	6D

(Piar and Lanoisellé, 2000).

4.2 Formulation de l'aliment

4.2.1 Acidification

L'acidification des produits alimentaires est utilisée pour contrôler la germination et la croissance de *C. botulinum*. L'ajout d'acide dans le produit permet de diminuer le pH et d'inhiber la croissance bactérienne. En effet, un pH bas contribue à la dénaturation des protéines de surface en favorisant la perméabilité cellulaire et en inhibant l'activité enzymatique (Dahlsten et al., 2015).

Les produits faiblement acides (pH > 4,5) sont plus sujets au développement de micro-organismes dont *C. botulinum* groupe I, la stérilisation est nécessaire dans ce cas. A l'inverse, les produits alimentaires naturellement acides ou acidifiés (pH ≤ 4,5 pour la réglementation européenne ou pH ≤ 4,6 pour les USA, réglementation appliquée par la FDA) ont une probabilité de croissance plus faible du fait de leur acidité, une pasteurisation suffisante permet de lutter contre le développement des cellules végétatives (CTCPA and DGAL/SDSSA, 2015; Diao et al., 2014)(Tableau 18).

Tableau 18 : Catégorisation des produits alimentaires selon leurs pH.

Aliments	pH	Exemples
Faiblement acide	pH ≥ 4,5	Viande, poisson, la plupart des légumes, les plats préparés, les produits laitiers
Modérément acide	4,2 ≤ pH ≤ 4,5	Tomates, fruits (pommes, fraises, etc.), produits volontairement acidifiés
Acide	3,8 ≤ pH < 4,2	La plupart des fruits, spécialités volontairement acidifiées
Hautement acide	pH < 3,8	Agrumes, baies, choucroute, jus de fruits

(CTCPA and DGAL/SDSSA, 2015).

De plus, le type d'acidifiant joue un rôle dans l'inhibition de la croissance de *C. botulinum*. Les acides organiques à chaîne courte tels que l'acide lactique, l'acétate ou l'acide malique ont un pKa compris entre 3 et 5 et sont généralement utilisés comme acidifiants. Leur pouvoir inhibiteur est plus important que les acides minéraux à des valeurs de pH équivalentes (McClure et al., 1994). Dans certaines conditions, la pénétration de l'acide dans la matrice alimentaire n'est pas complète créant ainsi des microenvironnements avec un pH supérieur à 4,6 favorable à la croissance bactérienne et donc, potentiellement, à la formation de la toxine botulique (Frank, 2007). Le type d'acidifiant joue aussi un rôle dans la thermorésistance des spores. Chez *B. cereus*, la sensibilité au pH augmente lorsque la valeur du pKa augmente. Cette relation a révélé que les formes dissociées des acides modifient la résistance à la chaleur des spores par l'accumulation de protons. A pH 7,0 et avec une molarité de 0,01 M d'acide acétique, la valeur de D est de 3,4 min. Lorsque la molarité d'acide acétique augmente jusqu'à 1 M, la valeur de D est de 6,0 min (Leguerinel and Mafart, 2001). Un second facteur important est la flore endogène, le développement des levures, des moisissures et des bactéries permet de métaboliser les acides et les protéines entrainant l'augmentation du pH et par conséquent, le développement de *C. botulinum*. Le troisième facteur pouvant jouer sur la croissance de *C. botulinum* est la présence en forte concentration de protéines notamment dans les viandes et les plats préparés. En effet, *C. botulinum* groupe I est potentiellement capable de se développer dans des milieux de culture contenant des protéines précipitées à pH 4,30 après 6 semaines à 30 °C même si la limite de croissance est de pH 4,60 (Lund et al., 1987).

4.2.2 Activité de l'eau

L'activité de l'eau (a_w) du produit est un autre paramètre permettant le contrôle de *C. botulinum*. Un faible niveau d'activité de l'eau est critique pour le micro-organisme car les enzymes sont immobiles et ne peuvent pas activer le métabolisme. Lorsque l'activité de l'eau extérieure est inférieure à celle de la cellule, il se produit une plasmolyse (sortie de l'eau). Elle entraîne l'accumulation de cations de potassium qui réduisent les aminates céto-glutamate en glutamate par l'action de la glutamate déshydrogénase. L'accumulation de glutamate permet l'entrée d'eau dans la cellule. Le glutamate peut être transformé en acide γ-aminobutyrique (GABA) ou en proline lorsque l'activité de l'eau est inférieure à 0,95 comme en présence de glycérol (Sperber, 1983).

La modulation de l'activité de l'eau est basée sur l'ajout de plusieurs solutés comme le NaCl, le glucose, le saccharose ou le glycérol. Pour *C. botulinum* groupe I, les limites de croissance sont de 10 % de NaCl

(Peck, 2009). Pour *C. sporogenes*, les mêmes valeurs d'a_w ont été retrouvées (a_w = 0,94 avec du NaCl et a_w = 0,93 pour le glycérol). Cependant, l'utilisation de NaCl comme dépresseur de l'a_w entraîne un effet cytotoxique pour la cellule. La baisse de l'a_w favorise l'accumulation de glutamate, étant chargé négativement vis-à-vis du pH de la cellule, cela nécessite la présence d'un cation compensateur tel que l'ion potassium. L'augmentation de la concentration en glutamate entraîne l'augmentation d'ions potassium toxique pour les fonctions cellulaires ce qui entraîne l'inhibition de la croissance. A l'inverse, le glycérol est considéré comme un « soluté compatible » car il réduit l'a_w intracellulaire sans effet toxique sur la structure et sur la fonction cellulaire (Sperber, 1983). La présence du NaCl a également un impact sur la résistance thermique des spores. En effet, la thermorésistance des spores est plus élevée à de faibles valeurs d'a_w. La thermorésistance des spores de *C. botulinum* groupe I (type B) et *C. sporogenes* augmente de 20 à 30 % lorsque 2 % de NaCl sont ajoutés au milieu (Hutton et al., 1991).

4.3 Effets synergiques des facteurs environnementaux

L'inactivation des spores de *C. botulinum* pour prévenir le botulisme est complexe. L'intensité élevée des traitements thermiques appliqués pour assurer la sécurité alimentaire cause des dommages importants au niveau de la qualité nutritionnelle et sensorielle des aliments. Par conséquent, *C. botulinum* est parfois contrôlé par inhibition plutôt que par la destruction dans les aliments. L'inhibition de la germination, de la croissance et de la production de toxines sont un moyen de limiter l'émergence des risques liés à la présence de *C. botulinum*. Elles sont généralement maitrîsées en contrôlant plus d'un facteur environnemental qu'il s'agisse des facteurs intrinsèques (pH, concentration en chlorure de sodium, additifs, polyphénols…) ou extrinsèques (température de stockage, traitement thermique, atmosphère modifiée…). Ainsi, une multitude de facteurs s'accumulent pour inhiber la croissance bactérienne, on parle d'effet barrière ou « *hurdle technology* » en anglais. C'est en 1978 que Leistner a défini la « *hurdle technology* ». Il associe un effet barrière à la combinaison de plusieurs facteurs limitant la prolifération bactérienne ou sa prévalence tels que le pH, l'a_w, la température de réfrigération et le traitement thermique (Jalali et al., 2016; Leistner and Gould, 2002). Par exemple, l'association de chlorure de sodium, d'acide sorbique et de sel de phosphate avec la pasteurisation permet l'inhibition de *C. botulinum* dans le fromage (Glass et al., 2017). La combinaison d'un traitement thermique minimal avec à l'ajout de nitrite de sodium sur de la viande salée faiblement acide permet également d'inhiber *C. botulinum* (Frank, 2007; Hauschild, 1993).

5. Objectifs de la thèse

Les micro-organismes sporulés pathogènes conduisent chaque année à des toxi-infections alimentaires (24 % des TIAC en 2019 en France) (Fourner et al., 2021). L'espèce bactérienne *Clostridium botulinum* a été identifiée comme l'espèce pathogène la plus thermorésistante et l'une des plus dangereuses, ce qui en fait une référence dans l'établissement des barèmes de stérilisation. Usuellement, la sécurité alimentaire est atteinte vis-à-vis de *C. botulinum* groupe I lorsque la destruction atteint 12 réductions décimales. Cette destruction est obtenue par un traitement thermique équivalent à 3 min à 121,1 °C correspondant à ce qu'on appelle le « botulinum cook » : valeur stérilisatrice (VS) ≥ 3 min. Ainsi, les aliments permettant le développement de *C. botulinum* groupe I (pH > 4,5), doivent subir un traitement thermique de stérilisation au moins égal à cette cible. La germination des spores survivantes au traitement thermique et la croissance de *C. botulinum* groupe I peuvent également être affectées par la formulation d'un produit alimentaire (sel, pH, a_w, sucres, additifs, conservateurs chimiques…). Ces facteurs utilisés indépendamment et à forte intensité sont suffisants pour inhiber totalement la croissance de *C. botulinum* groupe I mais les qualités organoleptiques et nutritionnelles du produit sont fortement impactées.

Toutefois, la synergie de plusieurs facteurs en lien avec la formulation du produit, associée à un traitement thermique même réduit, semble permettre la maîtrise des risques alliés à la présence de *C. botulinum* groupe I. De nombreux cas existent où des produits, tels que le foie gras et les produits à base d'olives (tapenades, olivades, pâtes d'olives) sont constatés microbiologiquement stables bien qu'aucun des facteurs (caractéristiques physico-chimiques, traitement thermique) ne puisse l'expliquer à lui seul. Ces effets synergiques n'ont jamais été réellement étudiés pour ces produits ayant reçu un faible traitement thermique. Les industriels et artisans, qui souhaitent fabriquer des produits appertisés doivent, en fonction des caractéristiques physicochimiques de leurs produits, se conférer aux dispositions réglementaires des Instructions Techniques de la Direction générale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes (DGCCRF) (par exemple : « un produit de pH > 4,5 doit être stérilisé avec VS = 3 minutes minimum ») pour établir le barème de traitement thermique. Aujourd'hui, il existe une forte demande des industriels pour pouvoir valider des traitements thermiques de plus faible intensité (pasteurisation) combinés avec les autres facteurs d'inhibition microbienne liés à la formulation du produit. La mise en évidence de ce type d'interactions synergiques agissant comme des « barrières » (« *hurdles technologies* ») serait donc théoriquement possible pour des produits stables à température ambiante bien que faiblement traités thermiquement. La combinaison avec la température, le pH et l'a_w a été largement documentée pour

la croissance microbienne. L'exemple le plus connu est *Listeria monocytogenes* qui, comme l'indique le Règlement U.E. 2073-2006, est maîtrisée lorsque l'a_w est inférieure à 0,94 en association avec un pH inférieur à 5,0 (alors qu'une $a_w \leq 0,92$ constitue sa limite de croissance comme unique facteur de maîtrise) ("Règlement (CE) N°2073/2005 de la Commission," 2005). L'existence de nombreux modèles disponibles permet de décrire certaines de ces interactions. Toutefois, ces modèles ne prennent pas en compte les interactions entre le traitement thermique partiellement destructif, le pH et l'a_w pour la stabilité du produit.

L'objectif principal de la thèse était de comprendre et de quantifier les interactions entre le traitement thermique et les caractéristiques physico-chimiques du milieu de recouvrement (pH, a_w) pour expliquer l'inhibition de la germination et/ou de la croissance des espèces de *C. botulinum* groupe I et de *C. sporogenes* dans les produits à base d'olives traités thermiquement.

Pour cela trois objectifs ont été identifiés et sont traités sous forme de trois chapitres :

Le premier objectif (Chapitre 2) était de développer un modèle décrivant la probabilité de germination/croissance de la souche de *C. sporogenes* PA 3679 en tenant compte de l'interaction entre le pH et la concentration en chlorure de sodium après un traitement thermique.

Le deuxième objectif (Chapitre 3) était dédié aux études physiologiques et génétiques de *C. sporogenes* et *C. botulinum* groupe I pour évaluer la variabilité biologique de ces espèces et l'impact de cette variabilité sur la probabilité de germination/croissance en fonction du pH, de la concentration en chlorure de sodium et du traitement thermique.

Le troisième objectif (Chapitre 4) était consacré à la caractérisation des paramètres physico-chimiques de produits à base d'olives traités thermiquement. Cette caractérisation vise à mieux identifier la variabilité des facteurs pouvant contribuer à l'inhibition de croissance de *C. botulinum* groupe I et *C. sporogenes* et de pouvoir qualifier la variabilité de chaque classe de produits à base d'olives traités thermiquement (olives entières, tapenades, olivades, pâtes d'olives et pâtes d'olives de Nice).

6. Références

Ababouch, L., Chaibi, A., Busta, F.F., 1992. Inhibition of bacterial spore growth by fatty acids and their sodium salts. J. Food Prot. 55, 980–984. https://doi.org/10.4315/0362-028X-55.12.980

AFIDOL, 2015a. Carnets de route - A la découverte des nos terroirs.

AFIDOL, 2015b. Carnet de Route - A la découverte de l'olivier.

AFIDOL, 2012. Le marché de l'huile d'olive : situation & perspectives 1–75.

Al-Hinai, M.A., Jones, S.W., Papoutsakis, E.T., 2015. The Clostridium Sporulation Programs: Diversity and Preservation of Endospore Differentiation. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 79, 19–37. https://doi.org/10.1128/MMBR.00025-14

Anagnostopoulos, D.A., Kamilari, E., Tsaltas, D., 2020. Evolution of Bacterial Communities, Physicochemical Changes and Sensorial Attributes of Natural Whole and Cracked Picual Table Olives During Spontaneous and Inoculated Fermentation. Front. Microbiol. 11. https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01128

Anniballi, F., Fenicia, L., Franciosa, G., Aureli, P., 2002. Influence of pH and Temperature on the Growth of and Toxin Production by Neurotoxigenic Strains of Clostridium butyricum Type E. J. Food Prot. 65, 1267–1270. https://doi.org/10.4315/0362-028X-65.8.1267

ANSES, 2020. Table de composition nutritionnelle des aliments Ciqual 2020.

Barash, J.R., Arnon, S.S., 2014. A Novel Strain of Clostridium botulinum That Produces Type B and Type H Botulinum Toxins. J. Infect. Dis. 209, 183–191. https://doi.org/10.1093/infdis/jit449

Bigelow, W.. D.., 1921. The Logarithmic Nature of Thermal Death Time Curves. Oxford Univ. Press 29, 528–536.

Black, E.P., Setlow, P., Hocking, A.D., Stewart, C.M., Kelly, A.L., Hoover, D.G., 2007. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety Response of Spores to Processing. Compr. Rev. Food Sci. Food Saf. 6, 103–119.

Bleve, G., Tufariello, M., Durante, M., Perbellini, E., Ramires, F.A., Grieco, F., Cappello, M.S., de Domenico, S., Mita, G., Tasioula-Margari, M., Logrieco, A.F., 2014. Physico-chemical and microbiological characterization of spontaneous fermentation of Cellina di Nardò and Leccino table olives. Front. Microbiol. 5, 1–18. https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00570

Botta, C., Cocolin, L., 2012. Microbial dynamics and biodiversity in table olive fermentation: Culture-

dependent and -independent approaches. Front. Microbiol. 3. https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00245

Bradbury, M., Greenfield, P., Midgley, D., Li, D., Tran-Dinh, N., Vriesekoop, F., Brown, J.L., 2012. Draft genome sequence of Clostridium sporogenes PA 3679, the common nontoxigenic surrogate for proteolytic Clostridium botulinum. J. Bacteriol. 194, 1631–2. https://doi.org/10.1128/JB.06765-11

Bradshaw, M., Marshall, K.M., Heap, J.T., Tepp, W.H., Minton, N.P., Johnson, E.A., 2010. Construction of a Nontoxigenic Clostridium botulinum Strain for Food Challenge Studies. Appl. Environ. Microbiol. 76, 387–393. https://doi.org/10.1128/AEM.02005-09

Broussolle, V., Alberto, F., Shearman, C.A., Mason, D.R., Botella, L., Nguyen, C., Peck, M.W., Carlin, F., 2002. Molecular and physiological characterisation of spore germination in Clostridium botulinum and C. sporogenes. Anaerobe 8, 89–100. https://doi.org/10.1006/anae.2002.0424

Brown, J.L., Tran-Dinh, N., Chapman, B., 2012. Clostridium sporogenes PA 3679 and Its Uses in the Derivation of Thermal Processing Schedules for Low-Acid Shelf-Stable Foods and as a Research Model for Proteolytic Clostridium botulinum. J. Food Prot. 75, 779–792. https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-11-391

Brunt, J., Plowman, J., Gaskin, D.J.H., Itchner, M., Carter, A.T., Peck, M.W., 2014. Functional Characterisation of Germinant Receptors in Clostridium botulinum and Clostridium sporogenes Presents Novel Insights into Spore Germination Systems. PLoS Pathog. 10, 21–23. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004382

Brunt, J., van Vliet, A.H.M., Carter, A.T., Stringer, S.C., Amar, C., Grant, K.A., Godbole, G., Peck, M.W., 2020. Diversity of the Genomes and Neurotoxins of Strains of Clostridium botulinum Group I and Clostridium sporogenes Associated with Foodborne, Infant and Wound Botulism. Toxins (Basel). 12, 586. https://doi.org/10.3390/toxins12090586

Brunt, J., van Vliet, A.H.M., van den Bos, F., Carter, A.T., Peck, M.W., 2016. Diversity of the germination apparatus in clostridium botulinum groups I, II, III, and IV. Front. Microbiol. 7, 1–13. https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01702

Butler, R.R., Schill, K.M., Wang, Y., Pombert, J.F., 2017. Genetic characterization of the exceptionally high heat resistance of the non-toxic surrogate Clostridium sporogenes PA 3679. Front. Microbiol. 8, 1–11. https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00545

Caggia, C., Randazzo, C.L., Salvo, M.D.I., Romeo, F., Giudici, P., 2004. Occurrence of Listeria monocytogenes in green table olives. J. Food Prot. 67, 2189–2194. https://doi.org/10.4315/0362-028X-67.10.2189

Carlier, J.-C., Espié, E., Popoff, M.R., 2007. Le botulisme humain en France, 2003-2006, Bulletin Epidemiologique Hebdomadaire.

Carlin, F., Broussolle, V., Perelle, S., Litman, S., Fach, P., 2004. Prevalence of Clostridium botulinum in food raw materials used in REPFEDs manufactured in France. Int. J. Food Microbiol. 91, 141–145. https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00371-4

Carter, A.T., Paul, C.J., Mason, D.R., Twine, S.M., Alston, M.J., Logan, S.M., Austin, J.W., Peck, M.W., 2009. Independent evolution of neurotoxin and flagellar genetic loci in proteolytic Clostridium botulinum. BMC Genomics 10, 1–18. https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-115

Carter, A.T., Peck, M.W., 2015. Genomes, neurotoxins and biology of Clostridium botulinum Group I and Group II. Res. Microbiol. 166, 303–317. https://doi.org/10.1016/j.resmic.2014.10.010

Cawthorne, A., Celentano, L.P., D'Ancona, F., Bella, A., Massari, M., Anniballi, F., Fenicia, L., Aureli, P., Salmaso, S., 2005. Botulism and preserved green olives. Emerg. Infect. Dis. 11, 781–2. https://doi.org/10.3201/eid1105.041088

Charoenprasert, S., Mitchell, A., 2012. Factors influencing phenolic compounds in table olives (Olea europaea). J Agric Food Chem 60, 7081–7095. https://doi.org/10.1021/jf3017699

Clauwers, C., Vanoirbeek, K., Delbrassinne, L., Michiels, C.W., 2016. Construction of Nontoxigenic Mutants of Nonproteolytic Clostridium botulinum NCTC 11219 by Insertional Mutagenesis and Gene Replacement. Appl. Environ. Microbiol. 82, 3100–3108. https://doi.org/10.1128/AEM.03703-15

Conte, P., Fadda, C., Del Caro, A., Urgeghe, P.P., Piga, A., 2020. Table olives: An overview on effects of processing on nutritional and sensory quality. Foods 9. https://doi.org/10.3390/foods9040514

CTCPA, DGAL/SDSSA, 2015. Note conjointe de la DGCCRF et de la DGAL relative aux conditions hygiéniques et sanitaires de production et de mise sur le marché de produits végétaux ou animaux appertisés (produits à base de viande et produits de la pêche) et aux modalités de contrôle.

Dahlsten, E., Lindström, M., Korkeala, H., 2015. Mechanisms of food processing and storage-related stress tolerance in Clostridium botulinum. Res. Microbiol. 166, 344–352.

https://doi.org/10.1016/j.resmic.2014.09.011

de Carvalho, C.C.C.R., Caramujo, M.J., 2008. Ancient Procedures for the High-Tech World: Health Benefits and Antimicrobial Compounds from the Mediterranean Empires. Open Biotechnol. J. 2, 235–246. https://doi.org/10.2174/1874070700802010235

Derman, Y., 2015. STRESS RESPONSE OF GROUP I AND II CLOSTRIDIUM BOTULINUM.

Diao, M.M., André, S., Membré, J.M., 2014. Meta-analysis of D-values of proteolytic clostridium botulinum and its surrogate strain Clostridium sporogenes PA 3679. Int. J. Food Microbiol. 174, 23–30. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.12.029

Dodds, K.L., 1993. An introduction to predictive microbiology and the development and use of probability models with Clostridium botulinum. J. Ind. Microbiol. 12, 139–143. https://doi.org/10.1007/BF01584182

Drasar, B.S., 2010. The Bacteria: Historical Introduction, in: Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK. https://doi.org/10.1002/9780470688618.taw0001

Dürre, P., 2014. Physiology and Sporulation in Clostridium. Microbiol. Spectr. 2, TBS-0010-2012. https://doi.org/10.1128/microbiolspec.TBS-0010-2012

Emmanouilidou, M.G., Koukourikou-Petridou, M., Gerasopoulos, D., Kyriacou, M.C., 2020. Evolution of physicochemical constitution and cultivar-differential maturity configuration in olive (Olea europaea L.) fruit. Sci. Hortic. (Amsterdam). 272, 109516. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2020.109516

Esty, J.R., Meyer, K.F., 1922. The heat resistance of the spores of B. botulinus and allied anaerobes. XI. J. Infect. Dis. 31, 650–663. https://doi.org/10.1093/infdis/31.6.650

European Center for Disease Prevention and Control, 2021. Surveillance and disease data [WWW Document]. URL https://ecdc.europa.eu/en/surveillance-and-disease-data

European Commission, 2018. RASFF Portal [WWW Document]. URL https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/portal/?event=SearchForm&cleanSearch=1

Fan, Y., Barash, J.R., Lou, J., Conrad, F., Marks, J.D., Arnon, S.S., 2016. Immunological Characterization and Neutralizing Ability of Monoclonal Antibodies Directed Against Botulinum Neurotoxin Type H. J. Infect. Dis. 213, 1606–1614. https://doi.org/10.1093/infdis/jiv770

FDA, GMA, 2010. Draft Guidance for Industry: Acidified Foods.

Foster, J.W., Wynne, E.S., 1948. Physiological studies on spore germination, with special reference to Clostridium botulinum : IV. Inhibition of germination by unsaturated C(18) fatty acids. J. Bacteriol. 55, 495–501. https://doi.org/10.1201/9781003075356-5

Fourner, N., Laurent, L., Jone, G., Tourdjman, M., Chereau, F., Nisavanh, A., Jourdan Da Silva, N., de Valk, H., 2021. Surveillance des toxi-infections alimentaires collectives Données de la déclaration obligatoire, 2019, Santé publique France.

Frank, J.F., 2007. Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers, Third Edition, Food microbiology: Fundamentals and Frontiers. American Society of Microbiology. https://doi.org/10.1128/9781555815912

Glass, K.A., Mu, M., LeVine, B., Rossi, F., 2017. Inhibition of Clostridium botulinum in Model Reduced-Sodium Pasteurized Prepared Cheese Products. J. Food Prot. 80, 1478–1488. https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-17-027

Gray, B., Hall, P., Gresham, H., 2013. Targeting agr- and agr-like quorum sensing systems for development of common therapeutics to treat multiple gram-positive bacterial infections. Sensors (Switzerland) 13, 5130–5166. https://doi.org/10.3390/s130405130

Hatheway, C.L., 1990. Toxigenic clostridia. Clin. Microbiol. Rev. 3, 66–98. https://doi.org/10.1128/cmr.3.1.66-98.1990

Hauschild, A.H.W., 1993. Clostridium Botulinum : Ecology and Control in Foods Food Science and Technology (Marcel Dekker, Inc.) ; 54. CRC Press.

Henriques, A.O., Moran, Jr., C.P., 2007. Structure, Assembly, and Function of the Spore Surface Layers. Annu. Rev. Microbiol. 61, 555–588. https://doi.org/10.1146/annurev.micro.61.080706.093224

Heperkan, D., 2013. Microbiota of table olive fermentations and criteria of selection for their use as starters. Front. Microbiol. 4, 1–11. https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00143

Higgins, D., Dworkin, J., 2013. Recent progress in Bacillus subtilus sporulation. FEMS Microb. Rev. 36, 131–148. https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00310.x.Recent

Hill, K.K., Smith, T.J., Helma, C.H., Ticknor, L.O., Foley, B.T., Svensson, R.T., Brown, J.L., Johnson, E.A., Smith, L.A., Okinaka, R.T., Jackson, P.J., Marks, J.D., 2007. Genetic diversity among botulinum neurotoxin-producing clostridial strains. J. Bacteriol. 189, 818–832.

https://doi.org/10.1128/JB.01180-06

Hurtado, A., Reguant, C., Bordons, A., Rozès, N., 2012. Lactic acid bacteria from fermented table olives. Food Microbiol. 31, 1–8. https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.01.006

Husson, D., 2000. L'olive de table. Le Nouv. Oliv. 97, 10–21.

Hutton, M.T., Koskinen, M.A., Hanlin, J.H., 1991. Interacting Effects of pH and NaCl on Heat Resistance Bacterial Spores of. J. Food Sci. 56, 821–822.

International Olive Oil Council, 2020a. Table Olives Consumption.

International Olive Oil Council, 2020b. Table Olives Consumption in EU.

International Olive Oil Council, 2020c. Table Olives Exportation in EU.

International Olive Oil Council, 2020d. Table Olives Exportation.

International Olive Oil Council, 2020e. Table Olives Importation in EU.

International Olive Oil Council, 2020f. Table Olives Importation.

International Olive Oil Council, 2020g. Table Olives Production in EU.

International Olive Oil Council, 2020h. Table Olives Production.

International Olive Oil Council, 2004. Norme commerciale applicable aux olives de table (FR).

Jalali, M., Warriner, K., Esfandiari, Z., 2016. Risk assessment of the growth of *Clostridium botulinum* and spores germination induced by high hydrostatic pressure in seafood. Int. J. Environ. Health Eng. 5, 20. https://doi.org/10.4103/2277-9183.196663

Janganan, T.K., Mullin, N., Dafis-sagarmendi, A., Brunt, J., Tzokov, S.B., Stringer, S., 2020. Architecture and Self-Assembly of Clostridium sporogenes and Clostridium botulinum Spore Surfaces Illustrate a General Protective Strategy across Spore Formers.

Janganan, T.K., Mullin, N., Tzokov, S.B., Stringer, S., Fagan, R.P., Hobbs, J.K., Moir, A., Bullough, P.A., 2016. Characterization of the spore surface and exosporium proteins of Clostridium sporogenes; implications for Clostridium botulinum group I strains. Food Microbiol. 59, 205–212. https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.06.003

Jeong, C.-G., Seo, B.-J., Nazki, S., Jung, B.K., Khatun, A., Yang, M.-S., Kim, S.-C., Noh, S.-H., Shin, J.-H., Kim, B., Kim, W.-I., 2020. Characterization of Clostridium novyi isolated from a sow in a sudden death case in Korea. BMC Vet. Res. 16, 127. https://doi.org/10.1186/s12917-020-02349-9

Kalb, S.R., Baudys, J., Raphael, B.H., Dykes, J.K., Lúquez, C., Maslanka, S.E., Barr, J.R., 2015. Functional Characterization of Botulinum Neurotoxin Serotype H as a Hybrid of Known Serotypes F and A (BoNT F/A). Anal. Chem. 87, 3911–3917. https://doi.org/10.1021/ac504716v

Katzin, L.I., Sandholzer, L.A., Strong, M.E., 1942. Application of the decimal reduction time principle to a study of the resistance of coliform bacteria to paseurization. J. Bacteriol. 45, 265–272.

Lanza, B., Di Serio, M.G., Giansante, L., Di Loreto, G., Russi, F., Di Giacinto, L., 2013. Effects of pasteurisation and storage on quality characteristics of table olives preserved in olive oil. Int. J. Food Sci. Technol. 48, 2630–2637. https://doi.org/10.1111/ijfs.12259

Leggett, M.J., Mcdonnell, G., Denyer, S.P., Setlow, P., Maillard, J.Y., 2012. Bacterial spore structures and their protective role in biocide resistance. J. Appl. Microbiol. 113, 485–498. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05336.x

Leguerinel, I., Mafart, P., 2001. Modelling the influence of pH and organic acid types on thermal inactivation of Bacillus cereus spores. Int. J. Food Microbiol. 63, 29–34. https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00394-9

Leistner, L., Gould, G.W., 2002. Hurdle Technologies. Combination Treatments for Food Stability, Safety and Quality. Food Engineering Series. Int. J. Food Microbiol. 91, 224. https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00370-2

Lindstrom, M., Korkeala, H., 2006. Laboratory Diagnostics of Botulism. Clin. Microbiol. Rev. 19, 298–314. https://doi.org/10.1128/CMR.19.2.298-314.2006

Liu, Y., McKeever, L.C., Malik, N.S.A., 2017. Assessment of the antimicrobial activity of olive leaf extract against foodborne bacterial pathogens. Front. Microbiol. 8. https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00113

Lund, B.M., Graham, A.F., Franklin, J.G., 1987. The effect of acid pH on the probability of growth of proteolytic strains of Clostridium botulinum. Int. J. Food Microbiol. 4, 215–226. https://doi.org/10.1016/0168-1605(87)90039-0

Luu, S., Cruz-Mora, J., Setlow, B., Feeherry, F.E., Doona, C.J., Setlow, P., 2015. The Effects of Heat Activation on Bacillus Spore Germination, with Nutrients or under High Pressure, with or without Various Germination Proteins. Appl. Environ. Microbiol. 81, 2927–2938. https://doi.org/10.1128/AEM.00193-15

Malheiro, R., Sousa, A., Casal, S., Bento, A., Pereira, J.A., 2011. Cultivar effect on the phenolic

composition and antioxidant potential of stoned table olives. Food Chem. Toxicol. 49, 450–457. https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.11.023

Maslanka, S.E., Lúquez, C., Dykes, J.K., Tepp, W.H., Pier, C.L., Pellett, S., Raphael, B.H., Kalb, S.R., Barr, J.R., Rao, A., Johnson, E.A., 2016. A novel botulinum neurotoxin, previously reported as Serotype H, has a hybrid-like structure with regions of similarity to the structures of serotypes A and F and is neutralized with Serotype A antitoxin. J. Infect. Dis. 213, 379–385. https://doi.org/10.1093/infdis/jiv327

Mazuet, C., Legeay, C., Sautereau, J., Ma, L., Bouchier, C., Bouvet, P., Popoff, M.R., 2016. Diversity of group i and II clostridium botulinum strains from France including recently identified subtypes. Genome Biol. Evol. 8, 1643–1660. https://doi.org/10.1093/gbe/evw101

Mazuet, C., Silva, Jourdan-Da, N., Legeay, C., Sautereau, J., Popoff, M.R., 2017. Le Botulisme Humain en France, 2013-2016, Bulletin Epidemiologique Hebdomadaire.

McClure, P.J., Cole, M.B., Smelt, J.P.P.M., 1994. Effects of water activity and pH on growth of Clostridium botulinum. J. Appl. Bacteriol. 76, 105S-114S. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1994.tb04362.x

Medina-Pradas, E., Arroyo-López, F.N., 2015. Presence of toxic microbial metabolites in table olives. Front. Microbiol. 6, 1–6. https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00873

Medina, E., Romero-Gil, V., Garrido-Fernández, A., Arroyo-López, F.N., 2016. Survival of foodborne pathogens in natural cracked olive brines. Food Microbiol. 59, 104–111. https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.05.017

Miliotis, M.D., Bier, J.W., 2003. International Handbook of Foodborne Pathogens, World Wide Web Internet And Web Information Systems.

Moeller, R., Setlow, P., Horneck, G., Berger, T., Reitz, G., Rettberg, P., Doherty, A.J., Okayasu, R., Nicholson, W.L., 2008. Roles of the Major, Small, Acid-Soluble Spore Proteins and Spore-Specific and Universal DNA Repair Mechanisms in Resistance of Bacillus subtilis Spores to Ionizing Radiation from X Rays and High-Energy Charged-Particle Bombardment. J. Bacteriol. 190, 1134–1140. https://doi.org/10.1128/JB.01644-07

Noé, F., López, A., 2014. L'Olive de Table, un aliment synbiotique.

Panagou, E.Z., Nychas, G.J.E., Sofos, J.N., 2013. Types of traditional Greek foods and their safety. Food Control 29, 32–41. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.05.050

Panagou, E.Z., Tassou, C.C., Vamvakoula, P., Saravanos, E.K.A., Nychas, G.J.E., 2008. Survival of Bacillus cereus vegetative cells during Spanish-style fermentation of conservolea green olives. J. Food Prot. 71, 1393–1400. https://doi.org/10.4315/0362-028X-71.7.1393

Paredes-Sabja, D., Shen, A., Sorg, J.A., 2014. Clostridium difficile spore biology: Sporulation, germination, and spore structural proteins. Trends Microbiol. 22, 406–416. https://doi.org/10.1016/j.tim.2014.04.003

Peck, M.W., 2009. Biology and Genomic Analysis of Clostridium botulinum, Advances in Microbial Physiology. Elsevier. https://doi.org/10.1016/S0065-2911(09)05503-9

Peck, M.W., 2006. Clostridium botulinum and the safety of minimally heated, chilled foods: An emerging issue? J. Appl. Microbiol. 101, 556–570. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.02987.x

Pereira, J.A., Pereira, A.P.G., Ferreira, I.C.F.R., Valentão, P., Andrade, P.B., Seabra, R., Estevinho, L., Bento, A., 2006. Table olives from Portugal: Phenolic compounds, antioxidant potential, and antimicrobial activity. J. Agric. Food Chem. 54, 8425–8431. https://doi.org/10.1021/jf061769j

Perpetuini, G., Prete, R., Garcia-Gonzalez, N., Khairul Alam, M., Corsetti, A., 2020. Table Olives More than a Fermented Food. Foods 9, 178. https://doi.org/10.3390/foods9020178

Petridis, A., Therios, I., Samouris, G., 2012. Genotypic variation of total phenol and Oleuropein concentration and antioxidant activity of 11 Greek olive cultivars (Olea Europaea L.). HortScience 47, 339–342. https://doi.org/10.21273/hortsci.47.3.339

Piar, G., Lanoisellé, J., 2000. Appertisation des denrées alimentaires, in: Congrès Français de Thermique. Lyon, pp. 1–32.

Poulain, B., Popoff, M., 2019. Why Are Botulinum Neurotoxin-Producing Bacteria So Diverse and Botulinum Neurotoxins So Toxic? Toxins (Basel). 11, 34. https://doi.org/10.3390/toxins11010034

Rasetti-Escargueil, C., Lemichez, E., Popoff, M.R., 2020. Human Botulism in France, 1875–2016. Toxins (Basel). 12, 338. https://doi.org/10.3390/toxins12050338

Règlement (CE) N°2073/2005 de la Commission [WWW Document], 2005. . J. Off. l'Union Eur. URL http://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/PDF/?uri=CELEX:32005R2073&from=FR

Reineke, K., Mathys, A., Heinz, V., Knorr, D., 2013. Mechanisms of endospore inactivation under high pressure. Trends Microbiol. 21, 296–304. https://doi.org/10.1016/j.tim.2013.03.001

Reysenbach, A.L., Ravenscroft, N., Long, S., Jones, D.T., Woods, D.R., 1986. Characterization, Biosynthesis, and Regulation of Granulose in Clostridium acetobutylicum. Appl. Environ. Microbiol. 52, 185–190. https://doi.org/10.1128/aem.52.1.185-190.1986

Riesenman, P.J., Nicholson, W.L., 2000. Role of the Spore Coat Layers in Bacillus subtilis Spore Resistance to Hydrogen Peroxide, Artificial UV-C, UV-B, and Solar UV Radiation. Appl. Environ. Microbiol. 66, 620–626. https://doi.org/10.1128/AEM.66.2.620-626.2000

Romeo, F.V., 2012. Microbiological aspects of table olives. Olive Germplasm - Olive Cultiv. Table Olive Olive Oil Ind. Italy 321–342.

Rossetto, O., Pirazzini, M., Montecucco, C., 2014. Botulinum neurotoxins: Genetic, structural and mechanistic insights. Nat. Rev. Microbiol. 12, 535–549. https://doi.org/10.1038/nrmicro3295

Rowland, L.P., 2002. Stroke, Spasticity and Botulinum toxin. N. Engl. J. Med. 347, 381–384. https://doi.org/10.1056/NEJMx090025

Sánchez Gómez, A.H., García García, P., Rejano Navarro, L., 2006. Elaboration of table olives. Grasas y Aceites 57, 86–94. https://doi.org/10.3989/gya.2006.v57.i1.24

Schill, K.M., Wang, Y., Butler, R.R., Pombert, J.-F., Reddy, N.R., Skinner, G.E., Larkin, J.W., 2016. Genetic diversity of Clostridium sporogenes PA 3679 isolates obtained from different sources as resolved by pulsed-field gel electrophoresis and high-throughput sequencing. Appl. Environ. Microbiol. 82, 384–393. https://doi.org/10.1128/AEM.02616-15

Setlow, B., Wahome, P.G., Setlow, P., 2008. Release of small molecules during germination of spores of Bacillus species. J. Bacteriol. 190, 4759–4763. https://doi.org/10.1128/JB.00399-08

Setlow, P., 2014. Spore Resistance Properties. Microbiol. Spectr. 2, 25–32. https://doi.org/10.1128/microbiolspec.TBS-0003-2012

Setlow, P., 2006. Spores of Bacillus subtilis: their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals. J. Appl. Microbiol. 101, 514–525. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02736.x

Setlow, P., 2003. Spore germination. Curr. Opin. Microbiol. 6, 550–556. https://doi.org/10.1016/j.mib.2003.10.001

Sevenier, V., Delannoy, S., André, S., Fach, P., Remize, F., 2012. Prevalence of Clostridium botulinum and thermophilic heat-resistant spores in raw carrots and green beans used in French canning industry. Int. J. Food Microbiol. 155, 263–268. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.02.009

Shen, A., Edwards, A.N., Sarker, M.R., Paredes-Sabja, D., 2019. Sporulation and Germination in Clostridial Pathogens, in: Gram-Positive Pathogens. ASM Press, Washington, DC, USA, pp. 903–926. https://doi.org/10.1128/9781683670131.ch56

Skarin, H., Segerman, B., 2011. Horizontal gene transfer of toxin genes in Clostridium botulinum: Involvement of mobile elements and plasmids. Mob Genet Elem. 1, 213–215. https://doi.org/10.4161/mge.1.3.17617\r2159-2543-1-3- [pii]

Smith, T.J., Hill, K.K., Xie, G., Foley, B.T., Williamson, C.H.D., Foster, J.T., Johnson, S.L., Chertkov, O., Teshima, H., Gibbons, H.S., Johnsky, L.A., Karavis, M.A., Smith, L.A., 2015. Genomic sequences of six botulinum neurotoxin-producing strains representing three clostridial species illustrate the mobility and diversity of botulinum neurotoxin genes. Infect. Genet. Evol. 30, 102–113. https://doi.org/10.1016/j.meegid.2014.12.002

Sofos, J.N., Juneja, V.K. (Eds.), 2010. Pathogens and Toxins in Foods. American Society of Microbiology. https://doi.org/10.1128/9781555815936

Sperber, W., Friendly, T., Llc, M., Sperber, W., 2009. Compendium of the Microbiological Spoilage of Foods and Beverages. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-0826-1

Sperber, W.H., 1983. Influence of Water Activity on Foodborne Bacteria. J. Food Prot. 46, 142–150. https://doi.org/10.4315/0362-028X-46.2.142

Steiner, E., Scott, J., Minton, N.P., Winzer, K., 2012. An agr quorum sensing system that regulates granulose formation and sporulation in Clostridium acetobutylicum. Appl. Environ. Microbiol. 78, 1113–1122. https://doi.org/10.1128/AEM.06376-11

Stringer, S.C., Webb, M.D., Peck, M.W., 2011. Lag time variability in individual spores of Clostridium botulinum. Food Microbiol. 28, 228–235. https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.03.003

Stringer, S.C., Webb, M.D., Peck, M.W., 2009. Contrasting Effects of Heat Treatment and Incubation Temperature on Germination and Outgrowth of Individual Spores of Nonproteolytic Clostridium botulinum Bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 75, 2712–2719. https://doi.org/10.1128/AEM.02572-08

Stumbo, C.R., Purohit, K.S., Ramakrishnan, T. V., 1975. Thermal Process Lethality Guide For Low-Acid Foods in Metal Containers. J. Food Sci. 40, 1316–1323. https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1975.tb01080.x

Sugiyama, H., 1951. STUDIES ON FACTORS AFFECTING THE HEAT RESISTANCE OF SPORES OF

CLOSTRIDIUM BOTULINUM. J. Bacteriol. 62, 81–96. https://doi.org/10.1128/jb.62.1.81-96.1951

Talukdar, P.K., Olguín-Araneda, V., Alnoman, M., Paredes-Sabja, D., Sarker, M.R., 2015. Updates on the sporulation process in Clostridium species. Res. Microbiol. 166, 225–235. https://doi.org/10.1016/j.resmic.2014.12.001

Tan, I.S., Ramamurthi, K.S., 2014. Spore formation in Bacillus subtilis. Environ. Microbiol. Rep. 6, 212–225. https://doi.org/10.1111/1758-2229.12130

van Ermengem, E., 1979. A New Anaerobic Bacillus and Its Relation to Botulism. Clin. Infect. Dis. 1, 701–719. https://doi.org/10.1093/clinids/1.4.701

Vos, P. De, Garrity, G.M., Jones, D., Krieg, N.R., Ludwig, W., Rainey, F.A., Schleifer, K.-H., Whitman, W.B., 2009. BERGEY'S Manual of Systematic Bacteriology, Springer. ed. Athens, GA 30602-2605. https://doi.org/10.1007/b92997

Wang, S., Brunt, J., Peck, M.W., Setlow, P., Li, Y.Q., 2017. Analysis of the germination of individual Clostridium sporogenes spores with and without germinant receptors and cortex-lytic enzymes. Front. Microbiol. 8, 1–13. https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02047

Webb, M.D., Stringer, S.C., Le Marc, Y., Baranyi, J., Peck, M.W., 2012. Does proximity to neighbours affect germination of spores of non-proteolytic Clostridium botulinum? Food Microbiol. 32, 104–109. https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.04.015

Weigand, M.R., Pena-Gonzalez, A., Shirey, T.B., Broeker, R.G., Ishaq, M.K., Konstantinidis, K.T., Raphael, B.H., 2015. Implications of genome-based discrimination between Clostridium botulinum group I and Clostridium sporogenes strains for bacterial taxonomy. Appl. Environ. Microbiol. 81, 5420–5429. https://doi.org/10.1128/AEM.01159-15

Wells-Bennik, M.H.J., Eijlander, R.T., den Besten, H.M.W., Berendsen, E.M., Warda, A.K., Krawczyk, A.O., Nierop Groot, M.N., Xiao, Y., Zwietering, M.H., Kuipers, O.P., Abee, T., 2016. Bacterial Spores in Food: Survival, Emergence, and Outgrowth. Annu. Rev. Food Sci. Technol. 7, 457–482. https://doi.org/10.1146/annurev-food-041715-033144

WHO and FAO, 2013. INFOSAN Activity Report 2011-2012.

Williamson, C.H.D., Sahl, J.W., Smith, T.J., Xie, G., Foley, B.T., Smith, L.A., Fernández, R.A., Lindström, M., Korkeala, H., Keim, P., Foster, J., Hill, K., 2016. Comparative genomic analyses reveal broad diversity in botulinum-toxinproducing Clostridia. BMC Genomics 17. https://doi.org/10.1186/s12864-016-2502-z

Zago, M., Lanza, B., Rossetti, L., Muzzalupo, I., Carminati, D., Giraffa, G., 2013. Selection of Lactobacillus plantarum strains to use as starters in fermented table olives: Oleuropeinase activity and phage sensitivity. Food Microbiol. 34, 81–87. https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.11.005

Zhao, L., Montville, T.J., Schaffner, D.W., 2000. Inoculum Size of Clostridium botulinum 56A Spores Influences Time-to-Detection and Percent Growth-Positive Samples. J. Food Sci. 65, 1369–1375. https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2000.tb10614.x

Zheng, B., Tice, J.D., Ismagilov, R.F., 2004. Formation of Droplets of Alternating Composition in Microfluidic Channels and Applications to Indexing of Concentrations in Droplet-Based Assays. Anal. Chem. 76, 4977–4982. https://doi.org/10.1021/ac0495743

CHAPITRE 2

MODELISATION DE LA PROBABILITE DE CROISSANCE DE *C. SPOROGENES* EN FONCTION DU PH ET DE LA CONCENTRATION EN CHLORURE DE SODIUM APRES UN TRAITEMENT THERMIQUE

Dans le chapitre précédent (Chapitre 1), le risque botulique a été décrit depuis ses origines jusqu'aux différents moyens de maîtrise actuellement utilisés pour assurer la sécurité alimentaire. Toutefois, l'intensité élevée des traitements thermiques appliqués pour assurer la sécurité alimentaire impacte fortement les qualités nutritionnelles et sensorielles des aliments. Par conséquent, *C. botulinum* groupe I et *C. sporogenes* sont parfois contrôlés par des facteurs liés à la formulation du produit alimentaire (concentration élevée en NaCl, présence de polyphénols et d'acide gras…) comme le montre les produits à base d'olives traités thermiquement. La synergie de la formulation du produit associée à un traitement thermique de faible intensité, semble permettre la maîtrise du risque botulique. Bien que ces effets barrières (*hurlde technology* en anglais) aient déjà été observés et modélisés (*Listeria monocytogenes* "Règlement (CE) N°2073/2005 de la Commission," 2005), le sujet est peu documenté lorsqu'il s'agit de l'association du pH, de la concentration en NaCl et du traitement thermique sur *C. botulinum* groupe I et *C. sporogenes*.

L'objectif de ces travaux était de quantifier l'impact des facteurs environnementaux (pH et concentration en chlorure de sodium) et d'un traitement thermique de faible intensité sur les capacités de germination/croissance des spores de *C. botulinum* groupe I et *C. sporogenes*. Ainsi, un modèle de probabilité de croissance a été développé pour *C. sporogenes* PA 3679 en fonction du pH et de la concentration en chlorure de sodium après un traitement thermique.

Dans ce chapitre, le modèle de probabilité de croissance développé est présenté sous forme d'un article publié dans le journal *Food Microbiology* en 2021.

Les travaux de modélisation nécessitent souvent l'acquisition d'un grand nombre de données expérimentales. Pour simplifier et automatiser ces acquisitions, nous avons entrepris des développements méthodologiques en microfluidiques présentés dans une partie « Focus ». Cette approche a été développée en utilisant une imprimante 3D couplée à un pousse-seringue pilotés par un ordinateur. La formation de micro-gouttes aqueuses dans une phase hydrophobe permet d'individualiser des microenvironnements, ce qui présente l'avantage d'acquérir une grande quantité de données dans ces espaces réduits (environ 110 micro-gouttes par boîte de Pétri) et de façon automatisée.

Article 1: The synergic interaction between environmental factors (pH and NaCl) and the physiological state (vegetative cells and spores) provides new possibilities for optimizing processes to manage risk of *C. sporogenes* spoilage

Article publié dans *Food Microbiology*, 100 (2021), **https://doi.org/10.1016/j.fm.2021.103832**

Emmanuelle Boix[1, 2], Olivier Couvert[2], Stéphane André[1], Louis Coroller[2, *]

[1]Centre Technique pour la Conservation des Produits Agricoles, Unité Expertise dans la Maîtrise du Risque Industriel en Thermorésistants Sporulés (EMaiRITS), UMT Qualiveg 2, 449 avenue Clément-Ader, 84911 Avignon, France ; [2]Université de Brest, Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Ecologie Microbienne, UMT19.03 ALTER'iX, 6 Rue de l'Université, 29000 Quimper, France

*Corresponding author

Mailing Address: Louis Coroller, Université de Brest, Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Ecologie Microbienne, 6 Rue de l'Université, 29000 Quimper.

E-mail: louis.coroller@univ-brest.fr

Keywords

Growth limits, hurdles, modelling, minimal processing, water activity, spore germination

1. Highlights

- Vegetative cells and spores have not the same pH growth limits for the parameters analysed.
- If the intensity of heat treatment increases, the spore growth range is decreases.
- Physiological state impacts the growth limits of *C. sporogenes* PA 3679
- The combination of water activity, pH and heat treatment prevent the spore growth.

2. Abstract

Clostridium sporogenes has been widely used as a surrogate for proteolytic *C. botulinum* for validating thermal processes in low-acid cans. To limit the intensity of heat treatments, industrials must use other ways of control as an association of acidic and saline environment after a low heat treatment. The probability of growth of pH (7-4.4), sodium chloride concentration (0-11%) and heat treatment (80 °C-10 min; 100 °C-1.5 min and 5.2 min) were studied on *C. sporogenes* PA 3679 spores and vegetative cells. Vegetative cells or heat-treated spores were inoculated in PYGm broth at 30 °C for 48 days in anaerobic conditions. Vegetative cells growth (pH 4.6–pH 4.5; 7%–8% NaCl) range is larger than the spore one (pH 5.2–pH 5.0; 6%–7% NaCl). Spores germination and outgrowth rage is decreased if the spores are heat-treated at 100 °C for 1.5 min (pH 5.5-5.3; 4%-5% NaCl) and 5.2 min (pH 5.7-5.3; 4%-5% NaCl). The *C. sporogenes* PA 3679 spores germination and outgrowth is impacted by their physiological state. The synergic interaction between environmental factors (pH and NaCl) and the physiological state (vegetative cells and spores) opening new possibilities for optimizing food formulation processes to manage the risks of *C. sporogenes* spoilage.

3. Introduction

Botulism neurotoxins (BoNTs) are among the most poisonous natural substances known (~1 ng/kg). BoNTs cause the severe neuroparalytic illness known as botulism. Foodborne botulism has mainly been described with proteolytic (Group I) and non-proteolytic (Group II) *Clostridium botulinum* strains that produce toxin types A, B and F (Group I) or B, E and F (Group II). Proteolytic strains of *C. botulinum* are mesophilic and highly resistant and may present a hazard in low-acid canned food. *C. botulinum* is the main hazard targeted for optimized heat-process control, but its inactivation by heat cannot be the only technological hurdle relied upon for safety control. A large number of botulism outbreaks over

the years have prompted extensive research into the control of *C. botulinum* growth. The canning industry uses heat treatment to help control spore germination and growth. In low-acid canned foods (pH>4.6), the target organism is *C. botulinum* (usual growth limit is pH 4.5). The proteolytic strains of *C. botulinum* are the most heat-resistant pathogens on record. The decimal reduction time (D-value) at 121 °C, reported by Esty & Meyer in 1922 as the highest heat resistance recorded, was 0.21 min, *i.e*., a sterilization value of 3 min (F0 = 3 min) corresponding to a 12D spore destruction process or "botulinum cook" (Esty and Meyer, 1922). Given the extreme biohazard risk presented by *C. botulinum*, *Clostridium sporogenes* PA 3679 is a widely used surrogate to validate thermal processes for low-acid canned foods, to validate high-pressure processing, or to evaluate the potential of four electro-activated solutions (Busta et al., 2003; Hu and Gurtler, 2017). This strain of *C. sporogenes* is recognized as a suitable surrogate for group I (proteolytic) *C. botulinum* and designated Putrefactive Anaerobe (PA) 3679 (ATCC 7955, NCTC 8594), it was originally isolated from spoiled canned corn in 1927 (see E.J. Cameron).

Food preservation has to be effective and efficient to ensure food is safe from growth of proteolytic *C. botulinum*. Growth of this pathogenic microorganism can be managed by pH or by adjusting water activity (a_w) and adding preservatives. Some studies have established that *C. botulinum* spores cannot germinate, grow and produce toxin when the pH of the medium is less than pH 4.6. It has been reported, in one extreme case, that Group I *C. botulinum* is potentially able to grow in culture media containing precipitated protein at pH 4.30 after 6 weeks at 30 °C, even if the growth limit was 4.60 (Lund et al., 1987). Adding sodium chloride is another common way employed to control the development of *C. botulinum*, but growth is inhibited at high concentrations of sodium chloride (>10%, *i.e.,* a_w = 0.935). This method is not desirable in most foods, especially in a context where nutritional guidelines recommended reducing dietary sodium chloride intakes (World Health Organization, 2019). The minimum a_w for *C. sporogenes* growth is 0.94 with NaCl, which corresponds to 10% of NaCl or 0.93 in the presence of glycerol. Germination of *C. sporogenes* is inhibited by a a_w of 0.93 with NaCl and 0.89 with glycerol (Sperber, 1983).Limits placed on the use of food preservatives and mounting consumer demand for less processed and more nutritionally-valuable food have prompted the food industry to deliver cleaner, safer food by using mild hurdle technologies in combination (Leistner and Gould, 2002). *C. botulinum* is able to grow at pH 7.0 and a_w = 0.960 or pH 5.0 and a_w = 0.997, but does not grow at pH 5.8 and a_w = 0.95 (Sperber, 1983). The European regulation states that growth of *Listeria monocytogenes* could be prevented by pH ≤ 4.4 or $a_w \leq 0.92$ or by factor combinations such as pH ≤ 5.0 and $a_w \leq 0.94$ (Commission regulation (EC) No. 2073/2005, 2005). Studies of the effect of pH and

NaCl on the growth of *Bacillus cereus* by Raevuori et al. in 1975 showed another example of hurdle technology, as the combination of pH 5.5 with 2% NaCl resulted in a 3.88 log reduction after 10 days at 30 °C. However, the effects of pH and NaCl on growth of *B. cereus* are dependent on target strain and medium used (Raevuori and Genigeorgis, 1975).

Here we investigated the combined effects of pH and sodium chloride concentration and their interactions with heat treatment on the probabilities of germination and growth of *C. sporogenes* PA 3679 spores and vegetative cells in broth. Growth of *C. sporogenes* PA 3679 in PYGm broth at suboptimal temperature (30 °C) was determined using the most probable number (MPN) technique. The results were then used to develop an original growth probability model.

4. Materials and methods

4.1 Bacterial strains

This study used *Clostridium sporogenes* strain PA 3679 obtained from the Campden collection and stored at -80 °C in solution with beads (Biomérieux, AES Chemunex, Bruz, France). Three beads were dropped into 10 mL of modified Peptone-Yeast-Glucose broth (PYGm). The culture was incubated at 30 °C for 72 hours. Then two successive pre-cultures of 100 µL of culture inoculate in 10-mL tubes of PYGm broth were incubated at 30 °C for 16 hours. Anaerobiosis was maintained by pouring paraffin into the tubes after inoculation. The modified PYGm broth composition was: yeast extract (10 g/L), beef extract (5 g/L), dextrose (5 g/L), peptone (5 g/L), tryptone (5 g/L) (Biokar Diagnostics, Allonne, France), K_2HPO_4 (2 g/L), resazurin (1 mg/L), Tween® 80 (1 mL/L), and 40 mL/L of salt solution ($NaHCO_3$, 10 g/L; NaCl, 2 g/L; K_2HPO_4, 1 g/L; KH_2PO_4, 1 g/L; $MgSO_4$ $7H_2O$, 0.5 g/L; CaCl $2H_2O$, 0.25 g/L) (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France). The PYGm broth ingredients were placed together in a final solution volume of 1 L and mixed thoroughly, boiled for 5 min, and cooled at room temperature. Then, L-cysteine-HCl (0.5 g/L), vitamin K1 solution and hemin solution (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France) were added to the PYGm broth. The vitamin K1 solution was composed of 0.1 g of vitamin K1 in 20.0 mL of 95% ethanol, then mixed thoroughly, sterilized by filtration, and stored at -18 °C in a brown glass bottle. The hemin solution was composed of 50.0 mg of hemin in 1.0 mL of NaOH 1N to a final volume of 100.0 mL, and stored at 4 °C. Finally, the PYGm broth was distributed into 10 mL tubes and autoclaved for 15 min at 121 °C. The oxygen was removed of PYGm broth after heating in a water bath (JULABO GmbH, Seelbach, Germany) at 95 °C for 20 min or under an anaerobic

chamber (90% N_2, 5% H_2, 5% CO_2, Whitley A35 Workstation, Don Whitley Scientific, United Kingdom). Resazurin (1 mg/L) (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France) added to the PYGm medium is a highly sensitive colour indicator. This indicator is pink in the presence of oxygen and transparent in the absence of oxygen.

4.2 Sporulation

Spores were produced in modified Meat Liver modified agar medium (VFSRm) supplemented with 2 g/L of yeast extract (Biokar Diagnostics, Allonne, France). 1 mL of the pre-culture (previously described) was inoculated on VFSRm agar plates. The plates were incubated under anaerobiosis in jars (Oxoïd™ AnaeroGen™, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France) at 30 °C for 10 days. Sporulation was stopped when free spores represented more than 95% of cells counted by phase-contrast microscopy at a magnification of 1,000 (Olympus BX50; Olympus Optical Co., Ltd., Hamburg, Germany). Spores were harvested by pouring distilled sterile water into the plates and scraping their surface. Spore suspensions were centrifuged at 6,000 g for 10 min at 4 °C, and the spores were resuspended in 5 mL of sterile distilled water. Spores batches were divided into 1 mL aliquots and stored at 4 °C until use. Final concentration of the stock suspensions was approximately 10^9 spores/mL.

4.3 Heat treatment of spore suspensions

To estimate the initial (t0) spore concentration, the spore suspensions were heat-treated in a water bath at 80 °C for 10 min. The spores were also heat-treated for 1.5 min and 5.2 min at 100 °C to achieve 1 ± 0.33 log and 2 ± 0.38 log destruction of the spore suspension. The spore suspensions (10^9 spores/mL) were diluted 1:10 (v/v) in phosphate buffer pH 7.0 (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France) before the treatment. Then, 200 µL capillary tubes (Hirschmann Laborgeräte, Ringcaps®, Germany) were filled with 100 µL of spore suspension and heat-treated in a thermostatic water–glycerol bath (JULABO GmbH, Seelbach, Germany). The capillary tubes were removed from the bath after the predetermined time and cooled in water/ice bath. After a cleaning/disinfection step with ethanol, the tubes were broken at both ends and their contents poured into a tube containing 4 mL of tryptone salt broth (Biokar Diagnostics, Beauvais, France), and the capillary tube was rinsed with 900 µL of tryptone–salt broth.

4.4 Experimental design

Suspensions of cells (vegetative cells or spores) at different physiological states were used at a concentration of 2.10^7 CFU/200 µL. The experiment used vegetative cells, spores heat-treated at 80 °C for 10 min, and spores heat-treated at 100 °C for 1.5 min or 5.2 min. Counts of viable cells were done using the most probable number (MPN) method in PYGm broth in 96-well microplates (Nest, Wuxi, China). MPN estimation was performed by 6 successive 1:10 dilutions in a 96-well microplate. For each dilution, 8 wells were replicated. The cell suspensions (20 µL) were pipetted into each of the first 8 wells (180 µL of PYGm broth). A full factorial design, including 132 combinations of 11 pH levels and 12 sodium chloride concentrations, was performed. The PYGm broth pH levels used were 7.0, 6.0, 5.8, 5.6, 5.4, 5.2, 5.0, 4.8, 4.6, 4.5, and 4.4. pH of broth was adjusted with HCl 1N before autoclaving at 121 °C for 15 min. The pH meter (Meterlab, Villeurbanne, France) and a Tuff-Tip™ electrode (Fisher Bioblock Scientific, Illkirch-Graffenstaden, France) were calibrated using standard buffer solutions (Merck, Darmstadt, Germany) at pH 4.0 and 7.0. The sodium chloride concentrations tested were 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 and 11% (% wt/vol) of NaCl added in PYGm broth before autoclaving at 121 °C for 15 min. The corresponding water activities (a_w) were calculated by Raoult's laws, which state that a_w corresponds to molar faction of water:

$$a_w = \left(\frac{\left(\frac{100 - \%\ sodium\ chloride}{M_{water}}\right)}{\frac{100 - \%\ sodium\ chloride}{M_{water}} + \frac{\%\ sodium\ chloride}{M_{sodium\ chloride}}} \right)^2$$

Equation 1: Water activity (Raoult's law).

where M_{water} is molar mass of water (18 g/mol) and M_{salt} is molar mass of sodium chloride (58.44 g/mol). The calculated a_w were 0.997, 0.994, 0.988, 0.981, 0.975, 0.968, 0.962, 0.955, 0.949, 0.942, 0.935 and 0.928, for each sodium chloride concentration from 0 to 11% (w/w) respectively. The microplates were incubated in an anaerobic chamber (90% N_2, 5% H_2, 5% CO_2, Whitley A35 Workstation, Don Whitley Scientific, United Kingdom) at 30 °C for 48 days. Growth of vegetative cells or germination and outgrowth of spores were determined based on visible broth turbidity in the wells. Observations were done each week. pH and sodium chloride concentrations were tested independently or in association and replicated four times.

4.5 Data processing

For each combination of pH and sodium chloride concentration, we read the number of positive wells in a set of serial dilutions to calculate the MPN and estimate the population size. Population size was given using the MPN function available in the MATLAB Central File Exchange (Statistical Toolbox, MATLAB R2013b, MathWorks, Natick, MA) (Fridman, 2020). Four experimental replicates were used to calculate the mean of the observed number of decimal reductions (nobs). In cases where one of the experimental replicates was bounded by a censored value, the mean is given using the fitdistrplus function available in the R package (https://cran.r-project.org/) (Pouillot and Delignette-Muller, 2010). Based on MPN results, the number of decimal reductions observed (n_{obs}) was defined by Equation 2:

$$n_{obs} = \log(N_0) - \log\left(N_{obs}\right)$$

Equation 2: Number of decimal reductions observed.

where N0 is concentration of cells when the pH is equal to 7 and sodium chloride concentration is 0% (a_w = 0.997), and Nobs is the concentration of vegetative cells or spores at the given condition. The limit of quantification is reached when only one well is positive. Beyond this limit of detection, the result is considered as censored data.

4.6 Modeling

The model proposed here to describe the number of decimal reductions (n_{pred}) according to the environmental conditions is given by Equation 3:

$$n_{pred} = \begin{cases} 0 & ,if\ \Pi\ \geq\ \Pi_0 \\ -a \times (\log(\Pi_0) - \log(\Pi)), if\ \Pi\ <\ \Pi_0 \end{cases}$$

Equation 3: Number of decimal reductions predicted.

where n_{pred} is predicted decimal reduction number of vegetative cells or heat-treated spores at different combined pH values and sodium chloride concentrations, a is a shape parameter, π is the

gamma product derived from the Gamma concept (Equation 4, (Zwietering et al., 1992)) in the conditions under study, and π_0 is the π value above which n_{pred} is not affected by pH and sodium chloride concentration. At the optimal condition, π = 1 and n_{pred} = 0. When the conditions become adverse, π = 0 and n_{pred} tends towards infinity when pH, sodium chloride concentration and their interaction approach the limit of growth and germination and outgrowth.

$$\pi = \gamma_{CM_{pH}} \times \gamma_{CM_{a_w}} \times \gamma_{\xi}$$

Equation 4: Gamma product derived from the Gamma concept.

The equations (4) for γ_{CM_x} are:

$$\gamma_{CM_x} = \frac{(X - X_{max}) \times (X - X_{min})^n}{(X_{opt} - X_{min})^{n-1}\left[(X_{opt} - X_{min})(X - X_{opt}) - (X_{opt} - X_{max})((n-1) \times X_{opt} + X_{min} - nX)\right]}$$

Equation 5: Gamma product from cardinal values.

where *X* is the factor studied (a_w or pH), $a_{w_{min}}$, $a_{w_{opt}}$, $a_{w_{max}}$, pH_{min}, pH_{opt} and pH_{max} are minimum, optimum and maximum growth and germination and outgrowth values for the factors studied (a_w and pH), and *n* is a shape parameter which is 1 for a_w and pH (Rosso et al., 1995, 1993). The function describing the interaction between the studied factors was given by Le Marc *et al*. (2001) and later modified by Augustin *et al.* (2005) (Augustin et al., 2005; Le Marc, 2001).

$$\gamma_{\xi} = \begin{cases} 1, \ \psi \leq 0{,}5 \\ 0, \ \psi \geq 1 \\ 2(1-\psi), \ 0{,}5 < \ \psi < 1 \end{cases}$$

Equation 6: Gamma product from interaction.

$$\psi = \sum_{i} \frac{\varphi(X_i)}{2 \ \prod_{j \neq i} [1 - \varphi(X_j)]}$$

Equation 7: Interaction model (i).

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

Equation 8: Interaction model (ii).

where X_{min} and X_{opt} are minimum and optimum growth and germination and outgrowth values for the studied factors.

4.7 Model fitting and statistical analysis

The parameters were estimated by minimizing the sum of squared root error using a non-linear fitting function (*lsqcurvefit* function, Optimization Toolbox, MATLAB R2020a, MathWorks, Natick, MA). The 95% confidence intervals of the estimated parameters were computed using the Jacobian matrix and the Matlab Statistics Toolbox function *nlparci* (Statistical Toolbox, MATLAB R2013b, MathWorks, Natick, MA). Goodness-of-fit was evaluated by the coefficient of determination (R^2) and the root mean squared error (RMSE). A value close to one indicates a best fit for R^2. The smaller the RMSE, the better the model was fitted on the data.

5. Results & Discussion

5.1 Effect of pH and sodium chloride concentration on growth limit of *C. sporogenes*

5.1.1 Growth limits of vegetative cells

First, this study allowed to determine the vegetative cell growth limits of the *C. sporogenes* PA 3679 strain for 7.92 CFU ± 0.5 per well. Several pH and sodium chloride concentration values ranging from 7.0 to 4.4 and from 0% to 11% were tested (Table 1). The growth/no-growth responses were recorded based on visible turbidity of the broth in microplate wells.

The vegetative cells were able to grow between pH 6.7 and pH 4.6, and no growth was observed below pH 4.5 after 48 days of incubation at 30 °C (Table 1). These pH growth limits are close to the recognized growth limits for group I *C. botulinum* and its surrogate *C. sporogenes* (pH ≤ 4.6) (Peck, 2009). The sodium chloride concentration growth limit of vegetative *C. sporogenes* PA 3679 cells were between 7% (a_w = 0.955) and 8% (a_w = 0.949). These vegetative cells growth limit is lower than the recognized growth limit for group I *C. botulinum* species, which is 10% (a_w = 0.935) (ANSES, 2019; Peck, 2009).

Table 1: Observed growth (+) or no-growth (-) for vegetative cells and heat-treated spores incubated at different pH levels and sodium chloride concentrations (% NaCl) in PYGm at 30 °C for 7.42 log CFU ± 0.6 per well.

	pH of the PYGm											% NaCl (a_w) of the PYGm											
	6.6	5.7	5.5	5.3	5.2	5.0	4.9	4.7	4.6	4.5	4.4	0% (0.997)	1% (0.994)	2% (0.988)	3% (0.981)	4% (0.975)	5% (0.968)	6% (0.962)	7% (0.955)	8% (0.949)	9% (0.942)	10% (0.935)	11% (0.928)
Vegetative cells	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
Spores heat-treated at 80 °C for 10 min	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Spores heat-treated at 100 °C for 1.5 min	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Spores heat-treated at 100 °C for 5.2 min	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-

5.1.2 Germination and outgrowth limit of spores

The spores of *C. sporogenes* PA 3679 were heat-treated at 80 °C for 10 min, and 7.42 log CFU ± 0.6 were inoculated per well to determine the germination and outgrowth limit of surviving spores as a function of pH and sodium chloride concentration. Surviving spore germination and outgrowth was observed between pH 6.7 and pH 5.2, whereas no spore growth was observed below pH 5.0 after 48 days incubation at 30 °C (Table 1). These spore germination and outgrowth limits have already been observed for *C. sporogenes* PA 3679 and *C. botulinum*. For Fujioka & Frank in 1966, *C. sporogenes* PA 3679 spores were completely inhibited at pH 4.8 (Fujioka and Frank, 1966). Chyr et al. (1977) also showed that *C. sporogenes* PA 3679 (ATCC 7955) strain showed the least germination at pH 5.5 (Chyr et al., 1977). Spores of *C. sporogenes* strain CGMCC 1.2157 were unable to grow at pH 5.2 (Dong et al., 2007). For group I *C. botulinum*, reported growth limits range between pH 5.4 and 4.8 (Ito et al., 1976; Roberts et al., 1966; Tsang et al., 1985; Valero et al., 2020). These results show a difference between growth limits of vegetative cells and germination and outgrowth limits of spores (80 °C – 10 min), as the pH germination and outgrowth limit of the spores is 0.5 pH units higher than the pH of the vegetative cells (pH 4.6–4.5) (Table 1). Baird-Parker *et al.,* (1967) observed the same difference in growth limits between spores and vegetative cells on several strains of group I *C. botulinum*. These limits are fairly different for two physiological states. To observe (and record) growth of vegetative cells, at least one cell in the vegetative cell population has to multiply at a limit at which growth is detectable, whereas for germination and outgrowth of spores, at least one spore has to germinate, outgrow and give one cell able to multiply (Baird-Parker and Freame, 1967). Baird-Parker & Freame (1967) They studied the growth limits of vegetative cells and spores in nutrient broth for 21 days at 30 °C. Spores of group I *C. botulinum* strains ZK3 (*C. botulinum* type A) and ATCC 438 (*C. botulinum* type B) were unable to grow at pH 5.0 to pH 4.8 whereas vegetative cells were able to grow under these conditions (Baird-Parker and Freame, 1967).

For spores heated at 80 °C for 10 min, spore germination and outgrowth was observed at between 6% (a_w = 0.962) and 7% (a_w = 0.955) sodium chloride concentration but not above 8% (a_w = 0.949) sodium chloride concentration after 48 days of incubation at 30 °C (Table 1). Duncan *et al.,* (1968) studied the spore germination and outgrowth limits of *C. sporogenes* PA 3679 and observed spore germination and outgrowth at 6% (a_w = 0.962) sodium chloride concentration. *C. sporogenes* PA 3679 germinated between 3% (a_w = 0.981) and 6% (a_w = 0.962) sodium chloride concentration but no vegetative cell division was observed (Duncan & Foster, 1968). A study on spore germination and outgrowth limits of

several strains of group I *C. botulinum* as a function of sodium chloride concentration found a sodium chloride germination and outgrowth limit between 7% (a_w = 0.955) and 8% (a_w = 0.949) (Dodds, 1989; Lalitha and Gopakumar, 2007). The germination and outgrowth limits as a function of sodium chloride concentration are therefore slightly lower for spores (6%–7%) than for vegetative cells (7%–8%) of *C. sporogenes* PA 3679. This result is close to the observation of Baird-Parker et al. (1967) for group I *C. botulinum*, where the minimum a_w supporting vegetative cell growth was generally identical of the minimum level for spore germination (Baird-Parker and Freame, 1967).

5.1.3 Germination and outgrowth limit of spores heat-treated at 100 °C

We investigated the germination and outgrowth limits of *C. sporogenes* PA 3679 spores stressed by a heat treatment at 100 °C for 1.5 min or 5.2 min at 6.7 CFU ± 1.6 or 7.15 CFU ± 0.5 per well. The heat-treated spores were then incubated in PYGm broth adjusted to different pH and sodium chloride concentrations for 48 days at 30 °C in anaerobic conditions.

After a heat treatment of 1.5 min at 100 °C, spore germination and outgrowth were observed up to pH 5.5 and 4% sodium chloride concentration (a_w = 0.975). No spore germination and outgrowth were observed below pH 5.3 and 5% sodium chloride concentration (a_w = 0.968). After a heat treatment of 5.2 min at 100 °C, spore germination and outgrowth were observed up to pH 5.7 and 3% sodium chloride concentration (a_w = 0.981). No spore germination and outgrowth were observed below pH 5.3 and 4% sodium chloride concentration (a_w = 0.975).The pH germination and outgrowth limit of spores heat-treated at 100 °C for 1.5 min (pH 5.5–pH 5.3) was 0.4 pH units lower than for spores heat-treated at 100 °C for 5.2 min (pH 5.7–pH 5.5).The sodium chloride concentration germination and outgrowth limit for spores heat-treated at 100 °C for 1.5 min (4%–5%) was 2% higher than for spores heat-treated at 100 °C for 5.2 min (2%–3%).The germination and outgrowth ranges of pH and sodium chloride concentration were different between spores heat-treated at 100 °C (observed germination and outgrowth limit between pH 5.5–pH 5.3 and 4%–5% after 1.5 min or pH 5.7–pH 5.5 and 2%–3% after 5.2 min) and 80 °C (observed germination and outgrowth limit between pH 5.2–pH 5.0 and 6%–7% after 10 min). There was a difference of 0.5 and 0.7 pH units between spores heat-treated at 100 °C for 1.5 min and 5.2 min and spores heat-treated at 80 °C for 10 min. The comparison of germination and outgrowth limits as a function of sodium chloride concentration between spores heat-treated at 100 °C vs. 80 °C showed a difference of 2% after 1.5 min and 4% after 5.2 min. The heat treatment strongly affects germination and growth range of *C. sporogenes* PA 3679 spores as a function of pH

and sodium chloride concentration. These limits become more affected as heat treatment gets more intense. In addition, there are other environmental factors that affect the germination and growth range of spores and vegetative cells, including anaerobic conditions, lag, and inoculum size (Chea et al., 2000; Fujioka and Frank, 1966; Stringer et al., 2005).

5.2 Assessment of the probability of recovery of *C. sporogenes*

5.2.1 Influence of pH and sodium chloride concentration

The growth range of the vegetative cells was extended up to pH 4.6 and 7% sodium chloride, in contrast to spores heat-treated at 80 °C for 10 min whose spore germination and outgrowth range decreased up to pH 5.2 and 6% sodium chloride. This spore germination and outgrowth range decreased even more with increasing intensity of the heat treatment. This suggests that the interactions between pH and sodium chloride concentration, and consequently the probability of growth, are affected by these three physiological states.

The growth range of vegetative cells and germination and outgrowth of spores heat-treated with three levels of intensity (80 °C for 10 min, 100 °C for 1.5 min and 100 °C for 5.2 min) were studied using a factorial design combining different pH values and sodium chloride concentrations. A total of 132 combinations of pH (pH 6.6 to pH 4.4) and sodium chloride concentration (0% to 11% NaCl) were tested. When pH was decreased or sodium chloride concentration was increased, the proportion of *C. sporogenes* PA 3679 vegetative cells and spores able to survive and grow gradually decreases. This means that the growth limit is not the same for all cells in the population, and therefore biological variability within the population. This proportion of cells unable to develop has been expressed as a number of decimal reductions. The number of decimal reductions represents the probability of growth (Equation 2). For example, one decimal reduction corresponds to a 10% probability of growth. The numbers of observed decimal reductions (n_{obs}) of the vegetative cells and spores of *C. sporogenes* PA 3679 as a function of pH and sodium chloride concentration are reported in Table S1 in supplementary data.

The probability of growth in optimal conditions was close to 100%, *i.e.,* $n_{obs} = 0$ (Figure 9). At pH 6.6, the probability of growth was 4.8% ($n_{obs} = 1.32$) when sodium chloride concentration was decreased to 3%. The increase in sodium chloride concentration results in a progressive decrease in the probability of growth of *C. sporogenes* PA 3679 vegetative cells. The vegetative cells growth

progressively decreases with decreasing pH. For example, at pH 5.0, pH 4.9, pH 4.7 and pH 4.5, the probability of growth was 76% (n_{obs} = 0.12), 3.8% (n_{obs} = 1.42), 0.16% (n_{obs} = 3.79) and 0.0044% (n_{obs} = 4.36), respectively (Figure 9a). The probability of germination and outgrowth as a function of pH and sodium chloride concentration also decreased progressively for heat-treated spores (Figure 9b). Spores heat-treated at 80 °C for 10 min had a probability of germination and outgrowth of 3.2% (n_{obs} = 1.50) beginning at 4% sodium chloride and pH 6.6. At 0% sodium chloride, the probability of germination and outgrowth was 3.5% (n_{obs} = 1.46) at pH 5.3, then 0.13% (n_{obs} = 2.87) at pH 5.2 and 0.0055% (n_{obs} = 4.26) at pH 5.0. The probability of germination and outgrowth evolves progressively as a function of pH and sodium chloride concentration, even if the growth range decreases compared to vegetative cells (Figure 9b).

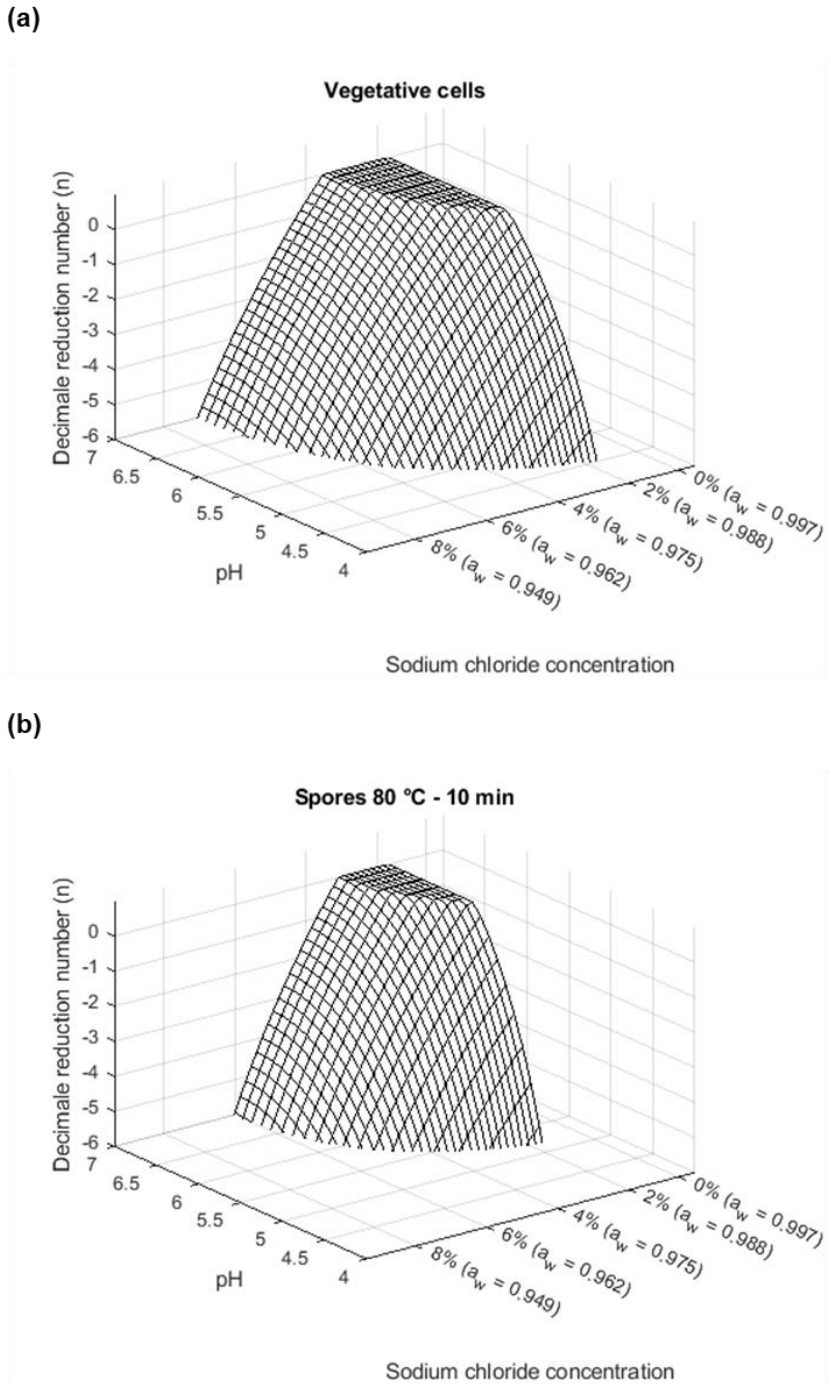


Figure 9: Response surface (3D graph plot) of the probabilities of germination and growth of *C. sporogenes* PA 3679 vegetative cells (a) and spores heat-treated at 80 °C for 10 min and (b) incubated at different combined pH and sodium chloride concentration levels. These probabilities are represented by their log-transformed n.

Decimal reduction number as a function of pH and sodium chloride concentration was modelled following Equation 3. The proposed response surfaces closely follow the growth or germination and outgrowth probabilities proposed by the model. The maximum observed probability of growth or of germination and outgrowth was 6.22 log, which corresponds to the growth or germination and outgrowth of one cell in a million under the given conditions. Estimated coefficients of regression modelled for the probability of growth of vegetative cells and spores of *C. sporogenes* PA 3679 and the outcomes of analysis of variance of the results are shown in Table 2. The developed model possessed good accuracy (see R^2, RMSE), is shown in Figure 10. The parameters of the model are logically distant from the actual limits observed, because pH_{min} and a_{wmin} values would only be determined from an infinite inoculation rate. Consequently, it is not possible to determine the absolute values of pH and sodium chloride concentration experiment-by-experiment.

Table 2: Estimation of the parameters of the probability model (Equation 3) for *C. sporogenes* PA 3679.

	Vegetative cells	**Spores**		
		80 °C - 10 min	**100 °C - 1.5 min**	**100 °C - 5.2 min**
pH_{min}	3.60	4.47	4.84	4.71
a_{wmin}	0.925	0.937	0.954	0.968
a	24.4331			
Π_0	0.7643			
Number of data	50	24	12	8
R^2	0.89	0.87	0.86	0.99
RMSE	0.03	0.10	0.13	0.01

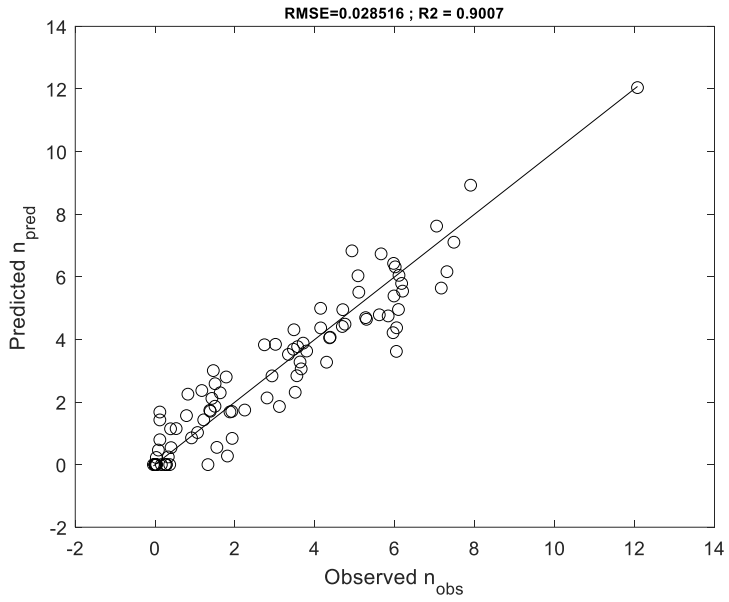


Figure 10: Comparison between observed (n_{obs}) and predicted (n_{pred}) decimal reduction numbers of *C. sporogenes* PA 3679.

5.2.2 Influence of physiological state on probability of germination and outgrowth or growth

Figure 11 presents the plot contour representing the probability of growth or germination and outgrowth (*i.e.,* Equation 3) of vegetative cells and heat-treated spores (80 °C - 10 min; 100 °C - 1.5 min and 100 °C - 5.2 min) of *C. sporogenes* PA 3679 as a function of pH (pH 6.6–pH 4.4) and sodium chloride concentration (0%–11%). The decimal reduction number showed by the contour plot corresponded to the predicted decimal reduction number (n_{pred}) from observed decimal reduction number (n_{obs}).

The probability of growth of vegetative cells decreased rapidly with increasing distance from optimal conditions (Figure 11a). After heat treatment at 80 °C for 10 min or at 100 °C for 1.5 min and 5.2 min, the germination and outgrowth range decreased (Figure 11b to d). At pH 5.5 and 4% NaCl (a_w 0.975), after 48 days, the probability of germination and outgrowth was -6 log for spores stressed by heat treatment at 100 °C for 1.5 min against -4 log at 30 °C when spores were activated at 80 °C for 10 min (Figure 11c). The inhibitory effect of sodium chloride concentration was greater for the most-heat-stressed spores. For example, the probability of germination and outgrowth became -6 log at 4% (a_w:

0.97) sodium chloride concentration, but when the spores were heat-treated at 100 °C for 5.2 min, sodium chloride concentration was 3% (a_w: 0.98) (Figure 11d). Probability of germination and outgrowth is very sensitive to changes in environment. The shape of the isoprobability lines evolves according to physiological states whose germination and outgrowth range is restricted by the increase in intensity of the heat treatment. The synergistic effect of pH and sodium chloride concentration represents one third of the surface area of the probability of growth of vegetative cells (Figure 11a). The spores heat-treated at 80 °C for 10 min and at 100 °C for 1.5 min showed a similar synergistic surface area as a function of pH and sodium chloride concentration (Figure 11b and c). When the heat treatment was more intense (100 °C for 5.2 min), the synergistic surface area between pH and sodium chloride concentration was smaller (Figure 11d). The synergistic effect can be observed in *C. sporogenes* and group I *C. botulinum* species. Studies by Chyr and Baird-Parker confirmed the effect of pH on germination. Chyr et al, (1976) showed that sodium chloride concentration had little additional effect on the inhibition of spore germination in *C. sporogenes* PA 3679 (ATCC 7955) when the pH was equal to or less than 6.0 (Chyr et al., 1977). The same effect was observed for our *C. sporogenes* strain PA 3679. At pH 6.0, the addition of 5%, 3% and 2% sodium chloride to spores heat-treated at 80 °C for 10 min and at 100 °C for 1.5 min and 5.2 min was enough to obtain a probability of germination and outgrowth of 0% (n_{obs}= 6.22 log), whereas for vegetative cells, the sodium chloride concentration had to be increased to 7% to reach zero percent probability of growth. Baird-Parker at al. (1967) showed the same effect for sodium chloride concentration at the optimum pH for growth of group I *C. botulinum*. The sodium chloride concentration has a stronger effect on outgrowth and further development into vegetative cells. In the presence of 8% sodium chloride concentration at a pH down to 5.3, the germinated spores were unable to outgrow under these conditions (Baird-Parker and Freame, 1967). The probability of growth of *C. sporogenes* PA 3679 was 0% (n_{obs} = 6.22 log) under these conditions (pH 5.3 and 8% sodium chloride). The growth range of *C. sporogenes* PA 3679 is affected by environmental factors and becomes even more so after heat treatment.

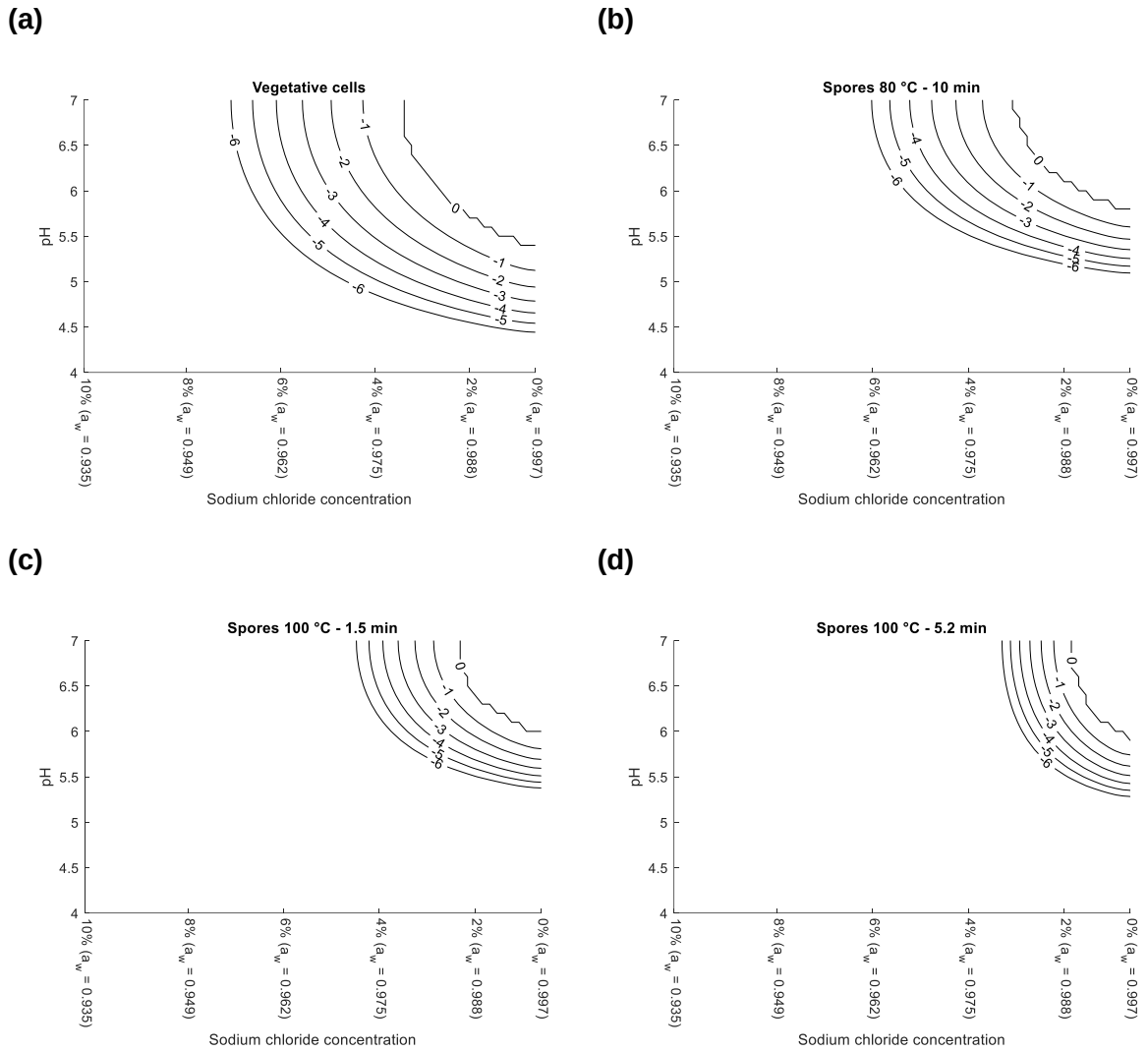


Figure 11: Contour plots (see solid lines) of the growth or recovery (germination and growth) probabilities for *C. sporogenes* PA 3679 vegetative cells (a), spores heat-treated at 80 °C for 10 min (b) and spores heat-treated at 100 °C for 1.5 min (c) or spores heat-treated at 100 °C for 5.2 min (d) incubated at different combined pH and water activity levels. These probabilities are represented by their log-transformed n.

6. Conclusion

The probability of growth of *C. sporogenes* PA 3679 as a function of pH and sodium chloride concentration is impacted by their physiological state. The growth range evolves between vegetative

cells (pH 4.6–pH 4.5 and 7%–8% NaCl) and spores heat-treated at 80 °C for 10 min (pH 5.2–pH 5.0 and 6%–7% NaCl). Indeed, the systems involved in spore germination, outgrowth and cell division into vegetative cells are impacted, thus limiting the process of getting to the growth area commonly used as growth limit for *C. botulinum* (pH<4.5 (European Union regulations) or pH≤4.6 (International regulations) and 10% sodium chloride) (*EU rgeulation (EC) No. 2073/2005*, 2005). The impact of physiological state on growth range is increased if the spores are heat-treated. After heat treatment at 100 °C for 1.5 min, the germination and outgrowth limits are between pH 5.5 and pH 5.3 and 4% and 5% sodium chloride. A more intense heat treatment affects the germination, outgrowth, and cell division process even more. Indeed, the germination and outgrowth range decreased after heat treatment at 100 °C for 5.2 min decreased the germination and outgrowth range to pH 5.7–pH 5.5 and 3%–4% sodium chloride concentration.

In addition to the impact of physiological state on the spore germination and outgrowth abilities, the interaction of environmental factors (pH and sodium chloride) acts synergistically, limiting the probability of spore germination and outgrowth (up to 6.22 log), *i.e.,* the process of germination, outgrowth, and cell division of *C. sporogenes* PA 3679. These findings open new possibilities for optimizing food formulation/manufacturing processes to manage the risks of spoilage related to *C. sporogenes* and possibly also *C. botulinum*. Although supplementary experiments are necessary to investigate the effect environmental factors on the single-cell growth probability of *C. botulinum* and others *C. sporogenes* strains. However, growth of foodborne pathogen *C. botulinum* in foods still presents a severe public health hazard. It is vital for food preservation methods to be stringent enough (probability of one cell out of 10^{12} being able to grow) to guarantee the food safety.

7. Acknowledgements

This work is a part of the Safood project financed by the Association Française Interprofessionnel de l'Olive (France Olive). We thank the partners for their contributions and cooperation, Jean-Christophe Augustin (ENVa/Danone) and Mike Peck (Quantum) for providing useful advice during the PhD committee of E. Boix. E. Boix received PhD funding from the Association Nationale de la Recherche et de la Technologie (ANRT) (CIFRE N°2017/1608).

8. References

ANSES, 2019. Fiche de description de danger biologique transmissible par les aliments/ Clostridium botulinum, Clostridium neurotoxinogènes.

Augustin, J.C., Zuliani, V., Cornu, M., Guillier, L., 2005. Growth rate and growth probability of Listeria monocytogenes in dairy, meat and seafood products in suboptimal conditions. J. Appl. Microbiol. 99, 1019–1042. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02710.x

Baird-Parker, A.C., Freame, B., 1967. Combined Effect of Water Activity, pH and Temperature on the Growth of Clostridium botulinum from Spore and Vegetative Cell Inocula. J. Appl. Bacteriol. 30, 420–429. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1967.tb00320.x

Busta, F.F., Suslow, T.V., Parish, M.E., Beuchat, L.R., Farber, J.N., Garrett, E.H., Harris, L.J., 2003. The Use of Indicators and Surrogate Microorganisms for the Evaluation of Pathogens in Fresh and Fresh-Cut Produce. Compr. Rev. Food Sci. Food Saf. 2, 179–185. https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2003.tb00035.x

Chea, F.P., Chen, Y., Montville, T.J., Schaffner, D.W., 2000. Modeling the germination kinetics of clostridium botulinum 56A spores as affected by temperature, pH, and sodium chloride. J. Food Prot. 63, 1071–9. https://doi.org/10.4315/0362-028X-63.8.1071

Chyr, C., Walker, H.W., Hinz, P., 1977. Influence of pH , Temperature , Curing Agents , and Water Activity on Germination of PA 3679 Spores 1 40, 369–372.

Dodds, K.L., 1989. Combined effect of water activity and pH on inhibition of toxin production by Clostridium botulinum in cooked, vacuum-packed potatoes. Appl. Environ. Microbiol. 55, 656–660.

Dong, Q., Tu, K., Guo, L., Li, H., Zhao, Y., 2007. Response surface model for prediction of growth parameters from spores of Clostridium sporogenes under different experimental conditions. Food Microbiol. 24, 624–632. https://doi.org/10.1016/j.fm.2006.12.003

Duncan, C.L., Foster, E.M., 1968. Effect of sodium nitrite, sodium chloride , and sodium nitrate on germination and outgrowth of anaerobic spores. Appl. Microbiol. 16, 406–411.

Esty, J.R., Meyer, K.F., 1922. The heat resistance of the spores of B. botulinus and allied anaerobes. XI. J. Infect. Dis. 31, 650–663. https://doi.org/10.1093/infdis/31.6.650

Fujioka, R.S., Frank, H.A., 1966. Nutritional Requirements for Germination, Outgrowth, and Vegetative

Growth of Putrefactive Anaerobe 3679 in a Chemically Defined Medium. J. Bacteriol. 92, 1515–1520.

Hu, M., Gurtler, J.B., 2017. Selection of Surrogate Bacteria for Use in Food Safety Challenge Studies: A Review. J. Food Prot. 80, 1506–1536. https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-16-536

Ito, K.A., Chen, J.K., Lerke, P.A., Seeger, M.L., Unverferth, J.A.Y.A., 1976. Effect of Acid and Salt Concentration in Fresh-Pack Pickles on the Growth of Clostridium botulinum Spores 32, 121–124.

Lalitha, K. V., Gopakumar, K., 2007. Combined Effect of Sodium Chloride, pH and Storage Temperature on Growth and Toxin Production by Clostridium botulinum. J. Aquat. Food Prod. Technol. 16, 17–26. https://doi.org/10.1300/J030v16n02_04

Le Marc, Y., 2001. Développement d'un modèle modulaire décrivant l'effet des interaction entre les facteurs environnementaux sur les aptitutdes de croissance de Listeria. Université de Bretagne Occidentale.

Leistner, L., Gould, G.W., 2002. Hurdle Technologies. Combination Treatments for Food Stability, Safety and Quality. Food Engineering Series. Int. J. Food Microbiol. 91, 224. https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00370-2

Lund, B.M., Graham, A.F., Franklin, J.G., 1987. The effect of acid pH on the probability of growth of proteolytic strains of Clostridium botulinum. Int. J. Food Microbiol. 4, 215–226. https://doi.org/10.1016/0168-1605(87)90039-0

Peck, M.W., 2009. Biology and Genomic Analysis of Clostridium botulinum, Advances in Microbial Physiology. Elsevier. https://doi.org/10.1016/S0065-2911(09)05503-9

Raevuori, M., Genigeorgis, C., 1975. Effect of pH and sodium chloride on growth of Bacillus cereus in laboratory media and certain foods. Appl. Microbiol. 29, 68–73.

Règlement (CE) N°2073/2005 de la Commission [WWW Document], 2005. . J. Off. l'Union Eur. URL http://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/PDF/?uri=CELEX:32005R2073&from=FR

Roberts, T.A., Gilbert, R.J., Ingram, M., 1966. The Effect of Sodium Chloride on Heat Resistance and Recovery of Heated Spores of Clostridium sporogenes (PA 3679/S2). J. Appl. Bacteriol. 29, 549–555. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1966.tb03507.x

Rosso, L., Lobry, J.R., Bajard, S., Flandrois, J.P., 1995. Convenient Model To Describe the Combined Effects of Temperature and pH on Microbial Growth. Appl. Environ. Microbiol. 61, 610–616.

https://doi.org/10.1128/AEM.61.2.610-616.1995

Rosso, L., Lobry, J.R., Flandrois, J.P., 1993. An Unexpected Correlation between Cardinal Temperatures of Microbial Growth Highlighted by a New Model. J. Theor. Biol. 162, 447–463. https://doi.org/10.1006/jtbi.1993.1099

Sperber, W.H., 1983. Influence of Water Activity on Foodborne Bacteria. J. Food Prot. 46, 142–150. https://doi.org/10.4315/0362-028X-46.2.142

Stringer, S.C., Webb, M.D., George, S.M., Pin, C., Peck, M.W., 2005. Heterogeneity of times required for germination and outgrowth from single spores of nonproteolytic Clostridium botulinum. Appl. Environ. Microbiol. 71, 4998–5003. https://doi.org/10.1128/AEM.71.9.4998-5003.2005

Tsang, N., Post, L.S., Solberg, M., 1985. Growth and toxin production by Clostridium botulinum in model acidified systems. J. Food Sci. 50, 961–965.

Valero, A., Olague, E., Medina-Pradas, E., Garrido-Fernández, A., Romero-Gil, V., Cantalejo, M.J., García-Gimeno, R.M., Pérez-Rodríguez, F., Posada-Izquierdo, G.D., Arroyo-López, F.N., 2020. Influence of Acid Adaptation on the Probability of Germination of Clostridium sporogenes Spores Against pH, NaCl and Time. Foods 9, 127. https://doi.org/10.3390/foods9020127

World Health Organization, 2019. Meeting of the WHO Action Network on Salt Reduction in the Population in the European Region (ESAN), Meeting Report - Bern, Switzerland.

Zwietering, M.H., Wijtzes, T., De Wit, J.C., Van't Riet, K., 1992. A Decision Support System for Prediction of the Microbial Spoilage in Foods. J. Food Prot. 55, 973–979.

FOCUS

DEVELOPPEMENT D'UNE TECHNIQUE DE MICROFLUIDIQUE POUR EVALUER LA PROBABILITE DE GERMINATION ET DE CROISSANCE DES SPORES BACTERIENNES

1. Introduction

La modélisation est souvent associée à un nombre important d'essais conduit au sein de plans expérimentaux complexes pour collecter les données. Le nombre de réplicas et la répétabilité expérimentale influencent fortement l'incertitude des paramètres estimés (McKellar and Lu, 2005). Le développement de nouvelle technologie comme la microfluidique permettrait de collecter rapidement ces données. En effet, la microfluidique est une discipline basée sur l'écoulement des fluides à petites échelles. La principale utilisation de la microfluidique est la manipulation de micro-gouttes au sein de canaux microfluidiques (Figure 12). Ainsi, chaque micro-goutte peut être utilisée comme un microréacteur séparé à la fois par les parois des canaux et par un fluide porteur non miscible telle qu'une huile minérale.

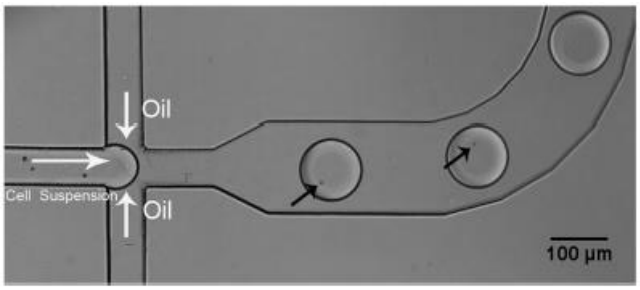


Figure 12 : Encapsulation unicellulaire d'algue dans des micro-gouttes observée par microscopie optique.

La pression de l'huile sur la suspension cellulaire (flèches blanches) produit des gouttelettes dans lesquelles est encapsulée une cellule d'algue (flèches noires). La taille des gouttelettes est de 80 µL (Pan et al., 2011).

Le système microfluidique est capable de compartimenter des molécules (ADN, ARN, protéine, réactifs) ou des cellules (micro-organismes) dans les micro-gouttes, ce qui ouvre le champ d'analyse à l'analyse génétique, à l'amplification de l'ADN, à la chimie clinique, à l'analyse cellulaire, à la protéomique et à la synthèse de petites molécules. La miniaturisation des expériences en utilisant de petits volumes permet donc d'améliorer les performances analytiques, de concentrer les produits de réaction et de réduire leurs consommations, d'uniformiser les conditions de réaction, de réaliser un grand nombre d'expériences, d'automatiser le processus, d'analyser le comportement d'une

population de cellules dans son ensemble ou au niveau cellulaire, voire de réduire le temps d'expérimentation par l'automatisation des étapes analytiques (Chiu et al., 2017; Halldorsson et al., 2015; Labanieh et al., 2015; Panizza et al., 2013).

Ces systèmes de microfluidique peuvent permettre de compartimenter les micro-gouttes dans un fluide porteur non miscible et immobile dans un contenant. En se basant sur cette technologie, nous avons essayé de développer une technique de micro-gouttes pour étudier la germination et la croissance des spores bactériennes (modèle aérobie et anaérobie) en fonction du pH et de la concentration en chlorure de sodium après un traitement thermique de faible intensité. Le système de dépôt de micro-gouttes recherché (i) doit pouvoir être automatisable ; (ii) doit permettre d'obtenir des micro-gouttes de petit volume déposées à une profondeur médiane entre la surface de l'huile minérale et le fond de la boîte Pétri ; (iii) doit pouvoir être décontaminé efficacement de façon automatisée afin d'éviter les contaminations microbiennes ; (iv) doit permettre d'observer la croissance bactérienne par une évolution de la turbidité de la micro-goutte et (v) doit pouvoir être adaptable aux microorganismes aérobies et anaérobies.

Nous avons choisi un système de dépôt avec l'immersion d'un cône de micropipette dans une interface huile minérale immobile contenue dans une boîte de Pétri formant ainsi une micro-goutte. Notre système se compose d'une imprimante 3D dont le système de dépôt a été modifié pour permettre la formation de micro-gouttes dans la boîte de Pétri positionnée à la base de l'imprimante. Ce système de dépôt est relié à un pousse seringue permettant de délivrer la solution et le tout est automatisé et commandé par un ordinateur (interface Jupyter).

Dans ce focus, nous vous présentons les cinq différentes étapes d'optimisation réalisées pour obtenir le système de microfluidique recherché. La première étape a été de permettre la communication entre l'imprimante 3D et le pousse-seringue *via* l'interface Jupyter (langage Python) pour réaliser le dépôt des micro-gouttes dans une interface d'huile. La deuxième étape consiste en une étape d'optimisation des dépôts des micro-gouttes dans une boîte de Pétri (polystyrène ou verre). La troisième étape correspond au développement d'une procédure de décontamination du système de dépôt des micro-gouttes avec la vérification de la stérilité par des méthodes culturales. La quatrième étape a consisté en la validation de la croissance des cellules végétatives en condition aérobie avec la comparaison d'autres méthodes culturales (dénombrement en microplaque et en milieu gélosé), pour cette étape une souche de *Bacillus cereus* a été choisie comme modèle. Enfin, la dernière étape a été l'optimisation

de la croissance des cellules végétatives en condition d'anaérobie avec une souche de *Clostridium sporogenes* comme modèle bactérien.

2. Matériel & Méthodes

2.1 Dispositif de dépôt des micro-gouttes

L'imprimante 3D (MicroDelta Rework, Emotion Tech, France) est composée d'un embout d'origine permettant le dépôt de polymères, celui-ci a été remplacé par un cône (Figure 13a et b). Ce cône en polypropylène utilisé habituellement sur les pipettes automatiques permet de collecter des solutions et de déposer des micro-gouttes (Figure 13c). Le volume des micro-gouttes choisi est de 1 µL permettant d'avoir une espérance de 10 UFC/micro-gouttes à partir d'une concentration d'environ 10^7 UFC/mL selon la loi de Poisson (Poisson, 1837). Le cône est alimenté par un tube en polytétrafluoroéthylène (PTFE communément appelé Teflon ®) de diamètre interne de 1,6 mm relié à un pousse seringue composé d'une seringue de 2 mL (Pump 11 Elite Series Syringe Pump, Harvard Apparatus, États-Unis) (Figure 13d et e). Le mécanisme de l'imprimante est seulement utilisé pour déplacer ce cône dans les trois dimensions de l'espace. L'ensemble est coordonné par un ordinateur. Le programme est réalisé par une interface Jupyter (**https://jupyter.org/**) codée en langage Python (**https://www.python.org/**) (Figure 13f).

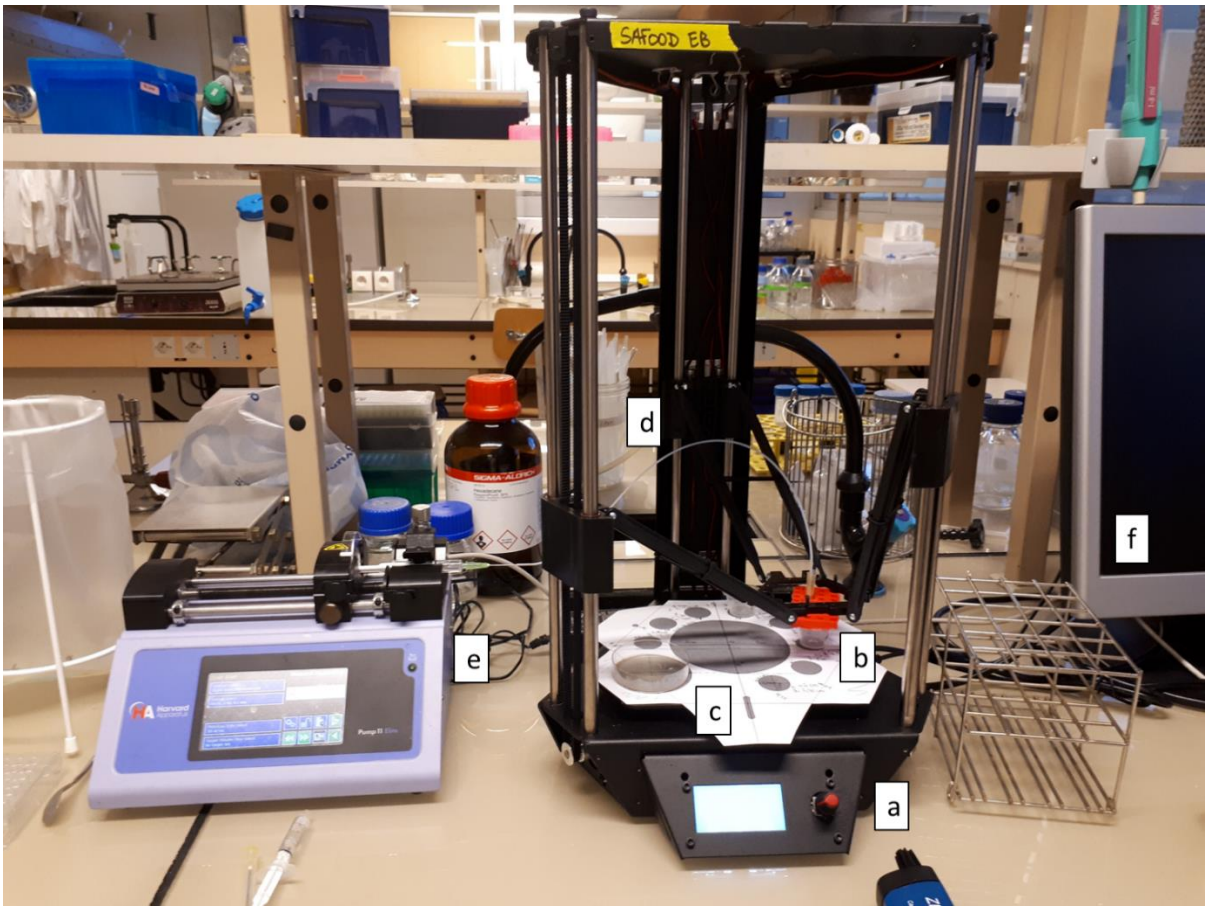


Figure 13 : Système de dépôt des micro-gouttes avec une imprimante 3D et un pousse-seringue commandé par ordinateur.

a. Imprimante 3D ; b. Support de cône ; c. Emplacement pour la boîte de Pétri (Figure 14b) ; d. Tube de PTFE relié à la seringue ; e. Pousse seringue et f. Commande par ordinateur sur l'interface Jupyter avec un langage Python.

Ainsi, la tête de l'imprimante 3D se déplace sur la zone délimitée en blanc sur le plateau. La boîte de Pétri contenant l'huile minérale est positionnée au centre (Figure 14a). Chaque dépôt de micro-gouttes est réalisé par le cône immergé dans l'huile minérale contenue dans la boîte de Pétri (en polystyrène ou en verre). Le système permet de réaliser 112 micro-gouttes de 1 µL dans une boîte de Pétri de 90 mm de diamètre en polystyrène (CORNING Gosselin SAS, Borre, France) ou dans une boîte de Pétri de 80 mm de diamètre en verre (DWK Life Sciences, Wertheim, Allemagne) suivant le schéma de la Figure 14b. Autour de la boîte de Pétri, les différents emplacements correspondent aux gobelets contenant des solutions. Ces solutions permettent de réaliser différents types de dépôt de micro-gouttes (milieu

de culture, eau distillée stérile) ou bien de réaliser la procédure de désinfection du système (acide peracétique à 2,5 %) (Figure 14a).

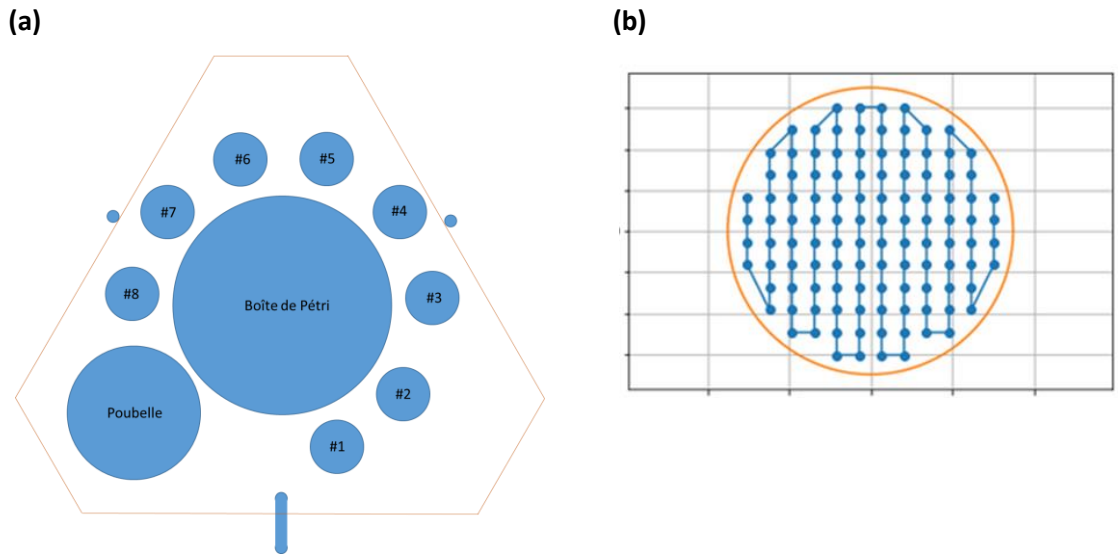


Figure 14 : Emplacement de la boîte de Pétri sur le plateau de l'imprimante 3D (a) et schéma du dépôt des micro-gouttes dans la boîte de Pétri (b).

L'emplacement poubelle correspond à l'emplacement de vidange du contenu de la seringue. Les emplacements 1 à 8 correspondent à des gobelets contenant l'acide peracétique à 2,5 % (v/v), l'eau stérile, le milieu de culture stérile et le milieu de culture inoculé (b).

2.2 Souche bactérienne

Les souches de *Bacillus cereus* n°86 (Collection LUBEM) et *Clostridium sporogenes* PA 3679 (souche 1) (Collection Campden) ont été stockées à -80 °C sur des microbilles (Biomérieux, AES, Chemunex, Bruz, France). La revivification bactérienne a été effectuée avec trois billes déposées dans 10 mL de bouillon Peptone-Yeast-Glucose modifié (PYGm) pour *C. sporogenes* PA 3679 et Brain Heart Infusion (BHI) pour *B. cereus* n°86. Les revivifications (tubes de 10 mL) ont été incubées à 37 °C pendant 72 heures (*C. sporogenes* PA 3679) et à 30 °C pendant 48 heures (*B. cereus* n°86). Ensuite, deux pré-cultures successives inoculées à 1 % ont été réalisées dans des tubes de 10 mL de bouillon PYGm (*C. sporogenes* PA 3679) ou de bouillon BHI (*B. cereus* n°86). Ces tubes ont été incubés à 37 °C pendant 16 heures pour

C. sporogenes PA 3679 et pendant 30 °C pendant 8 heures pour *B. cereus* n°86. L'anaérobiose a été maintenue en versant de la paraffine dans les tubes après l'inoculation pour *C. sporogenes* PA 3679.

La préparation du milieu PYGm a suivi le protocole proposé par la Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (DSMZ, 2020). La composition du bouillon PYGm modifié était la suivante : extrait de levure (10 g/L), extrait de bœuf (5 g/L), dextrose (5 g/L), peptone (5 g/L), tryptone (5 g/L) (Biokar Diagnostics, Allonne, France), K_2HPO_4 (2 g/L), résazurine (1 mg/L), Tween® 80 (1 mL/L), et 40 mL/L de solution saline ($NaHCO_3$, 10 g/L ; NaCl, 2 g/L ; K_2HPO_4, 1 g/L ; KH_2PO_4, 1 g/L ; $MgSO_4$ 7H2O, 0. 5 g/L ; CaCl $2H_2O$, 0,25 g/L) (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France). Les ingrédients du bouillon PYGm ont été placés ensemble dans un volume final de solution de 1 L et mélangés soigneusement, puis portés à ébullition pendant 5 min et refroidis à température ambiante. Ensuite, la L-cystéine-HCl (0,5 g/L), la solution de vitamine K1 et la solution d'hémine (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France) ont été ajoutées au bouillon PYGm. La solution de vitamine K1 était composée de 0,1 g de vitamine K1 dans 20,0 ml d'éthanol à 95 %, puis mélangée, stérilisée par filtration, et conservée à -18 °C dans une bouteille en verre opaque. La solution d'hémine a été composée de 50,0 mg d'hémine dans 1,0 mL de NaOH (1N) jusqu'à un volume final de 100,0 mL, et conservée à 4 °C. La résazurine (1 mg/L) (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France) ajoutée au milieu PYGm est un indicateur coloré très sensible. Cet indicateur est rose en présence d'oxygène et transparent en l'absence d'oxygène.

La préparation du milieu BHI a été réalisée en se conformant aux recommandations du fabricant (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France). La composition du bouillon BHI était la suivante : peptone (10 g/L) ; extrait de cervelle (12,5 g/L) ; extrait de cœur (5 g/L) ; chlorure de sodium (5 g/L) ; hydrogénophosphate disodique anhydre (2,5 g/L) et glucose (2 g/L). La préparation déshydratée a été mélangée dans 1 L d'eau distillée. Le BHI agar a été réalisé comme cité au-dessus auquel a été ajouté de l'agarose (12 g/L) (Biokar Diagnostics, Allonne, France). Le milieu gélosé BHI a été porté à ébullition pendant 5 min à 100 °C. Enfin, le bouillon PYGm et le bouillon BHI ont été répartis dans des tubes de 10 mL et le milieu gélosé BHI agar a été réparti en bouteilles de 200 mL. Tous les milieux ont été autoclavés pendant 15 min à 121 °C.

2.3 Désinfection du système et dépôt des micro-gouttes

Un aliquote de 20 mL d'huile minérale (Hexodécane, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France) a été mis dans des boîtes de Pétri en polystyrène stériles ou en verre préalablement stérilisées (stérilisation à 121 °C pendant 15 min). Afin d'assurer la décontamination de la tubulure de l'imprimante 3D et du cône de polypropylène servant aux dépôts, (i) 1 mL d'acide peracétique à 2,5 % (v/v) (Oxy-Anios 5, Laboratoire Anios, Lezennes, France) est aspiré par le pousse seringue. Puis, (ii) un temps d'incubation de 20 min est appliqué pour détruire les cellules végétatives et les spores (Labomoderne, 2020). Ensuite, (iii) le système est rincé par 300 µL d'eau distillée stérile. Puis, (iv) 300 µL de solution sont prélevées et déposées par le cône de polypropylène immergé dans l'huile minérale. Le dépôt commandé par le bras de l'imprimante 3D et le pousse seringue permet de déposer une micro-goutte de 1 µL de la solution. 112 dépôts sont effectués en série (Figure 14). A la fin d'une série, (v) le contenu restant dans le tube de PTFE est libéré dans un gobelet poubelle et 1 mL d'acide peracétique à 2,5% (v/v) est à nouveau prélevé. Enfin, (vi) le cône est immergé dans un gobelet d'acide peracétique à 2,5% (v/v) jusqu'au prochain dépôt.

Pour déterminer la perte de viabilité après un protocole de désinfection, les étapes (i) à (iii) ont été réalisées. Puis, 300 µL de milieu de culture inoculé avec *B. cereus* n°86 (concentration d'environ 10^8 UFC/mL) sont prélevés. Le cône de polypropylène immergé dans l'huile minérale réalise une série de dépôts (112 micro-gouttes de 1 µL). Après l'étape (v), un nouveau cycle de désinfection est réalisé (étape (i) à (iii)). Puis, pour réaliser une nouvelle série de dépôts dans l'huile minérale, 300 µL de milieu de culture stérile sont aspirés. A la fin de l'étape (vi), les boîtes de Pétri inoculées avec du milieu de culture stérile ou inoculé avec *B. cereus* n°86 ont été incubées à 37 °C pendant 16 heures en conditions d'aérobie et d'anaérobie en station d'anaérobie (90% N_2, 5% H_2, 5% CO_2, Whitley A35 Workstation, Don Whitley Scientific, United Kingdom). La validation du protocole de désinfection a été réalisée en triplicats.

2.4 Détermination de la concentration bactérienne par les méthodes de micro-gouttes, de microplaques et de boîte de Pétri

La validation de la méthode de dénombrement en micro-gouttes a été réalisée après comparaison avec deux autres méthodes de dénombrement (nombre le plus probable en microplaques et milieu gélosé) (AFNOR, 2011a, 2011b). Une culture bactérienne de *B. cereus* n°86 a été réalisée avec 1 mL de

pré-culture dans 10 mL de bouillon BHI incubé à 37 °C pendant 8 heures en condition d'aérobie (concentration initiale : 10^8 UFC/mL). A partir de cette culture bactérienne, trois méthodes de dénombrement ont été réalisée en parallèle. L'estimation du nombre le plus probable en micro-goutte (méthode 1) a été réalisée après des dilutions successives en bouillon BHI de la culture bactérienne. Ces dilutions ont été déposées dans une boîte de Pétri contenant de l'huile minérale avec l'imprimante 3D et le pousse seringue. Chaque dépôt correspond à une micro-goutte inoculée d'environ 1 µL. L'estimation du nombre le plus probable en microplaques (méthode 2) a été réalisée après l'ensemencement de 20 µL de culture bactérienne dans 180 µL de bouillon BHI par puit (Nest, Wuxi, China). L'estimation du nombre le plus probable (NPP) a été réalisée avec 6 dilutions successives au dixième. Une dilution est composée de 8 puits. Le dénombrement selon la méthode référence sur milieu gélosé (méthode 3) a consisté en l'ensemencement en surface d'une gélose BHI d'un millilitre de culture bactérienne. La boîte de Pétri contenant les micro-gouttes, la microplaque inoculée et le dénombrement en milieu gélosé BHI ont été incubés à 37 °C pendant 16 heures. Les méthodes ont été réalisées en triplicats.

2.5 Détermination de la concentration de *C. sporogenes* PA 3679 en micro-gouttes et en boîte de Pétri.

L'estimation du nombre le plus probable en micro-gouttes a été réalisée après des dilutions successives en bouillon PYGm d'une pré-culture de *C. sporogenes* PA 3679 (concentration initiale : 10^8 UFC/mL) (décrit dans la section 2.2). Ces dilutions ont été déposées dans une boîte de Pétri contenant de l'huile minérale préalablement dégazée (dégazage pendant 24 heures) avec l'imprimante 3D et le pousse seringue. Chaque dépôt correspond à une micro-goutte inoculée d'environ 1 µL.

En parallèle, un dénombrement en milieu gélosé Viande Foie Sulfito-réducteur modifié (VFSRm) a été réalisé à partir de la même pré-culture de *C. sporogenes* PA 3679 (concentration initiale : 10^8 UFC/mL). Le milieu gélosé VFSRm a été complété par 2 g/L d'extrait de levure puis porté à ébullition pendant 5 min à 100 °C (Biokar Diagnostics, Allonne, France). Le milieu VFSRm a été réparti en bouteille de 200 mL et autoclavé à 121 °C pendant 15 min.

La boîte de Pétri contenant les micro-gouttes et le dénombrement en milieu gélosé VFSRm ont été incubés à 37 °C pendant 48 heures sous la station anaérobie (0% N_2, 5% H_2, 5% CO_2, Whitley A35

Workstation, Don Whitley Scientific, United Kingdom). Ces deux méthodes ont été réalisées en triplicats.

3. Résultats & Discussion

3.1 Mise au point de la technique de dépôt des micro-gouttes avec de l'eau stérile

Plusieurs mises au point ont été nécessaires (i) pour déterminer la profondeur adéquate dans la formation d'une micro-goutte sans sédimentation de celle-ci au fond de la boîte de Pétri en polystyrène ; (ii) pour déterminer la distance suffisante entre les micro-gouttes afin que celles-ci ne se coalescent pas et (iii) pour déterminer le débit nécessaire dans la formation des micro-gouttes de 1 µL. Les premiers dépôts des micro-gouttes avec de l'eau distillée stérile (milieu modèle) ont été réalisés en surface de l'huile minérale contenue dans la boîte de Pétri en polystyrène. Les micro-gouttes étaient donc en contact direct avec l'air et leurs coalescences étaient problématiques. Par la suite, les micro-gouttes de 1 µL ont été déposées dans un espace médian entre la surface de l'huile minérale et le fond de la boîte de Pétri en polystyrène. Après chaque dépôt des micro-gouttes, leur coalescence au cours du temps a été problématique. Afin de résoudre ce problème, l'espacement entre les micro-gouttes a été agrandi (4,6 mm séparent deux micro-gouttes). Les micro-gouttes formées ne coalescent plus et elles restent en suspension dans l'huile minérale.

A la suite des dépôts des micro-gouttes avec le milieu modèle (l'eau distillée stérile), un dépôt avec du milieu nutritif stérile a été réalisé dans une boîte de Pétri en polystyrène. Les mouvements des micro-gouttes induisant leurs coalescences ont été observés au cours du temps et ce malgré l'augmentation de la distance qui les sépare. Cette mobilité est due à l'électricité statique de la boîte de Pétri en polystyrène qui interagit avec les protéines chargées du milieu nutritif (Gitlin et al., 2006; Strickler et al., 2006). L'utilisation d'un pistolet anti-électricité statique ne parvenait pas à éliminer ce problème. Afin d'éliminer les interactions électrostatiques, une surface neutre devait être utilisée tel que le verre. Nous avons donc utilisé les boîtes de Pétri en verre (80 cm de diamètre). L'utilisation des boîtes de Pétri en verre avec un fond plat permet de faire des micro-gouttes immobiles. Cependant, les micro-gouttes formées ne restent pas en suspension dans l'huile minérale, elles forment un hémisphère sur le fond de la boîte. En effet, la sédimentation des micro-gouttes de milieu nutritif stérile intervient par une différence de densité entre l'huile et le milieu nutritif stérile entrainé par la force de gravité (Langevin et al., 2004).

3.2 Mise en place d'une procédure de désinfection du système de dépôt des micro-gouttes

Une procédure de désinfection du système de dépôt des micro-gouttes a été mise au point pour décontaminer le tube de PTFE et le cône de polypropylène avec l'utilisation de l'acide peracétique. L'acide peracétique est un agent de décontamination utilisé pour les surfaces en industrie agro-alimentaire et en laboratoire. Une solution d'acide peracétique à 2,5% (v/v) avec un temps de contact de 20 minutes est recommandé pour détruire les cellules végétatives et les spores bactériennes (Labomoderne, 2020).

Le protocole de décontamination du système de dépôt utilisé est le suivant : (i) 1 mL d'acide peracétique à 2,5% (v/v) a été aspiré par le pousse seringue pour décontaminer la seringue (2 mL) et le tube de PTFE ; (ii) un temps de contact de 20 min à température ambiante est nécessaire pour éliminer les cellules végétatives et les spores ; (iii) 300 µL d'eau distillée stérile ont été prélevés pour rincer le tube de PTFE ; (iv) puis 300 µL de milieu nutritif stérile ont été prélevés et déposés dans l'huile minérale par l'imprimante 3D et le pousse seringue ; (v) après le dépôt, le contenu du tube de PTFE et de la seringue sont relargués dans une poubelle (emplacement décrit dans la Figure 14a) et (vi) le système de dépôt est maintenu dans un environnement stérile par l'aspiration de 1 mL d'acide peracétique à 2,5 % (v/v) et par l'immersion du cône de dépôt dans un gobelet contenant de l'acide peracétique à 2,5 % (v/v).

Les procédures de vérification de l'asepsie ont consisté à dénombrer les micro-organismes revivifiables au sein du milieu nutritif stérile en micro-gouttes. Les boîtes ont été réalisées en triplicats et incubées en aérobiose et anaérobiose (90 % N_2, 5 % H_2, 5 % CO_2) à 37 °C pendant 16 heures. La croissance de micro-organismes revivifiables n'a pas été observée après la procédure de désinfection.

3.3 Croissance de *B. cereus* n°86 en micro-gouttes, en microplaques et en milieu gélosé

La capacité de croissance de *B. cereus* n°86 observée en micro-gouttes a été comparée avec deux méthodes de référence : la méthode NPP la méthode NPP en microplaques et la méthode en milieu gélosé (AFNOR, 2011a, 2011b).

Ainsi, la croissance de *B. cereus* n°86 a été énumérée par ces trois méthodes en parallèle après une incubation de 16 heures à 37 °C. La méthode NPP en microplaques permet d'observer une concentration de 1,6 x 10^8 UFC/mL avec un intervalle de confiance à 95 % compris entre 9,0 x 10^7 et 2,8 x 10^8 UFC/mL. Le dénombrement sur gélose BHI agar montre une concentration de 1,2 x 10^8

UFC/mL avec un intervalle de confiance à 95 % compris entre 8,9 x 10^7 et 1,6 x 10^8 UFC/mL. Et la méthode NPP en micro-gouttes permet d'observer une concentration de 1,5 x 10^8 UFC/mL avec un intervalle de confiance à 95 % compris entre 1,2 x 10^8 et 1,8 x 10^8 UFC/mL (Figure 15). Les résultats montrent que les trois méthodes de dénombrement obtiennent la même concentration que la suspension initiale avec un écart de confiance plus étroit pour le dénombrement en micro-gouttes.

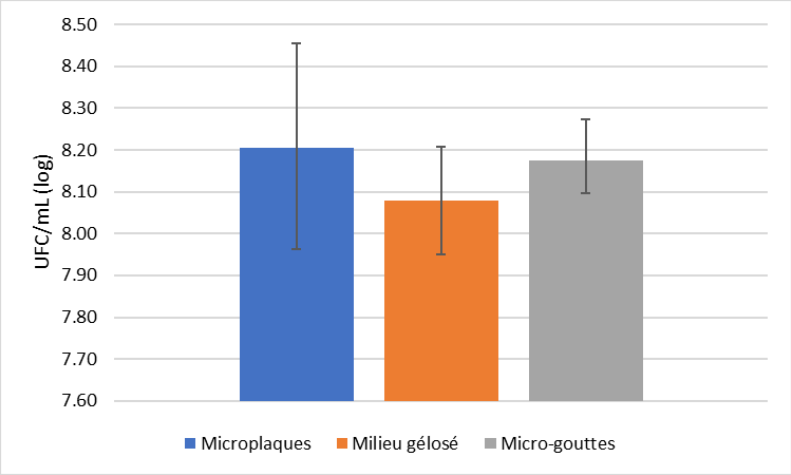


Figure 15 : Histogramme représentant la capacité de croissance de *B. cereus* n°86 en fonction de trois méthodes de dénombrement (NPP en microplaque, Milieu gélosé et NPP en micro-gouttes).

Avec l'utilisation de boîte de Pétri en verre, les micro-gouttes de milieu nutritif inoculées sédimentent au fond de la boîte de Pétri. Ce phénomène de sédimentation pourrait avoir un impact sur la croissance bactérienne. Les résultats de croissance observés par la turbidité des micro-gouttes et leurs dénombrements suggèrent qu'il n'y pas d'impact de la sédimentation des micro-gouttes sur la croissance bactérienne (Figure 16a et b).

(a) **(b)**

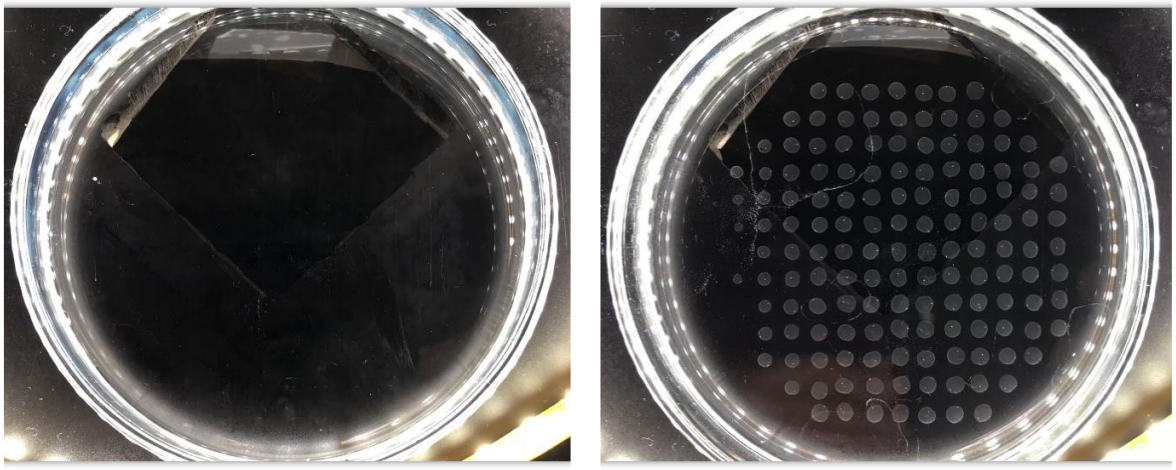


Figure 16 : Croissance des cellules végétatives de *B. cereus* n°86 en micro-gouttes immergées dans l'huile minérale.

Dépôt des micro-gouttes de bouillon BHI inoculé avec *B. cereus* n°86 (a). Croissance de *B. cereus* n°86 observée par le trouble de la micro-goutte après incubation à 37 °C pendant 8 heures (b).

3.4 Croissance de *C. sporogenes* PA 3679 en micro-gouttes

Le système de dépôt a été développé pour des bactéries aérobies mais nous souhaitons reproduire cette technique pour les bactéries anaérobies. Les bactéries anaérobies telles que *C. sporogenes* PA 3679 sont sensibles à l'oxygène présent dans le milieu. L'utilisation d'une interface huile/eau permettrait de limiter la diffusion de l'oxygène dans le milieu et donc de favoriser la croissance des bactéries anaérobies. Plusieurs optimisations ont été mises en place pour éliminer l'oxygène dans le système de dépôt sans impacter la stérilité et favoriser la croissance de *C. sporogenes* PA 3679. Dans un premier temps, le milieu PYGm et l'huile minérale ont été dégazés sous la station anaérobie pendant 24 heures minimum. Dans un deuxième temps, le milieu PYGm a été inoculé avec *C. sporogenes* PA 3679 et les micro-gouttes ont été déposées par l'imprimante 3D. En parallèle, une numération en milieu gélosé VFSRm a été réalisée avec le même inoculum de *C. sporogenes* PA 3679. Enfin, les boîtes de Pétri en verre contenant les micro-gouttes et le dénombrement en milieu gélosé VFSRm ont été incubées à 37°C pendant 48 heures en condition d'anaérobie sous la station anaérobie (90% N_2, 5% H_2, 5% CO_2).

L'absence de croissance de *C. sporogenes* PA 3679 contrairement au milieu gélosé VFSRm (croissance jusqu'à 10^8 UFC/mL) suggèrerait la présence d'oxygène résiduel. En effet, la présence d'oxygène résiduelle dans l'huile minérale pourrait être éliminée par le dégazage sous vide de l'huile minérale. L'huile minérale désoxygénée serait ensuite stockée au sein de la station anaérobie (Englander et al., 1987). Le dépôt de micro-gouttes de PYGm pourrait être utilisé pour quantifier la présence d'oxygène résiduelle. En effet, la résazurine déjà présente dans le bouillon PYGm pour être utilisée comme indicateur d'oxygène. De plus, le dépôt des micro-gouttes par l'imprimante 3D est fait en condition d'aérobiose. La solution serait de mettre tout le système dans une station anaérobie pour limiter au maximum la présence d'oxygène lors du dépôt des micro-gouttes (90% N_2, 5% H_2, 5% CO_2, Whitley A35 Workstation, Don Whitley Scientific, United Kingdom). Toutes ces pistes peuvent être envisagées pour diminuer au maximum la présence d'oxygène dans l'huile et le système de dépôt.

4. Conclusion & Perspective

La technique des micro-gouttes déposées par l'imprimante 3D est une technique innovante permettant d'automatiser les essais et de collecter une grande quantité de données (112 micro-gouttes sur une boîte de Pétri en verre de 80 cm diamètre).

L'automatisation du système de dépôt par l'interface Jupyter (langage Python) permet une grande maniabilité de l'imprimante 3D et du pousse seringue. Cette automatisation a permis d'optimiser les dépôts des micro-gouttes dans l'huile en jouant sur la profondeur de dépôt et la distance inter-micro-goutte. L'automatisation présente aussi l'avantage d'avoir une procédure de désinfection du système rapide et efficace. En effet, le prélèvement et le relargage des différentes solutions d'acide peracétique à 2,5% (v/v), de l'eau stérile et du milieu de nutritif permettent d'assurer la désinfection du système de dépôt sans contamination croisée. Le système de dépôt et la procédure de décontaminations mis au point sont fonctionnels et ont permis d'observer la croissance de *B. cereus* n°86 par la turbidité des micro-gouttes.

Cependant, cette technique nécessite plus d'optimisation vis-à-vis de la croissance des bactéries anaérobies. La présence d'oxygène au niveau du système de dépôt empêche leur croissance. De plus, le plus grand écueil a été la migration des acides gras dans l'huile impactant la croissance bactérienne des micro-gouttes adjacentes. En effet, les caractéristiques physico-chimiques des micro-gouttes (milieu nutritif) ne sont pas stables au cours du temps à cause de la dispersion des molécules au sein

de liquide par simple diffusion ou par dispersion de Taylor. Cette diffusion affecte les paramètres physico-chimiques des micro-gouttes adjacentes et donc la croissance bactérienne à l'intérieur de celle-ci (Squires, 2005). Seule une barrière physique empêche la migration des différents composés entre les micro-gouttes. Ces problématiques associées au temps nécessaire pour les résoudre, nous ont fait prendre la décision d'arrêter le développement de cette technique au profit de l'utilisation des microplaques inoculées et incubées en condition d'anaérobie.

5. Références

AFNOR, 2011a. Microbiologie alimentaire - Matières premières entrant dans la composition des Microbiologie alimentaire - Matières premières entrant dans la composition des conserves - Dénombrement des spores thermorésistantes de Bacillus et Clostridium thermophiles - T.

AFNOR, 2011b. Microbiologie des aliments - Dénombrement des spores dans les produits alimentaires avant traitement d'appertisation par comptage des colonies.

Chiu, D.T., deMello, A.J., Di Carlo, D., Doyle, P.S., Hansen, C., Maceiczyk, R.M., Wootton, R.C.R., 2017. Small but Perfectly Formed? Successes, Challenges, and Opportunities for Microfluidics in the Chemical and Biological Sciences. Chem 2, 201–223. https://doi.org/10.1016/j.chempr.2017.01.009

DSMZ, 2020. DSMZ 104. PYG Medium (modified) [WWW Document]. URL https://www.dsmz.de/microorganisms/medium/pdf/DSMZ_Medium104.pdf

Englander, S.W., Calhoun, D.B., Englander, J.J., 1987. Biochemistry without oxygen. Anal. Biochem. 161, 300–306. https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90454-4

Gitlin, I., Carbeck, J.D., Whitesides, G.M., 2006. Proteins Why Are Proteins Charged ? Networks of Charge – Charge Interactions in Proteins Measured by Charge Ladders and Capillary Electrophoresis Angewandte. Angew. Chemie 43, 3022–3060. https://doi.org/10.1002/anie.200502530

Halldorsson, S., Lucumi, E., Gómez-Sjöberg, R., Fleming, R.M.T., 2015. Advantages and challenges of microfluidic cell culture in polydimethylsiloxane devices. Biosens. Bioelectron. 63, 218–231. https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.07.029

Labanieh, L., Nguyen, T.N., Zhao, W., Kang, D.K., 2015. Floating droplet array: An ultrahigh-throughput device for droplet trapping, real-time analysis and recovery. Micromachines 6, 1469–1482. https://doi.org/10.3390/mi6101431

Labomoderne, 2020. L'expert de la désinfection en Industries agro-alimentaires [WWW Document]. URL https://www.labomoderne.com/catalogues/anios_industrie_alimentaire.pdf

Langevin, D., Poteau, S., Hénaut, I., 2004. Crude Oil Emulsion Properties and their Application to Heavy Oil Transportation. Oil Gas Sci. Technol. - Rev. Energies Nouv. 59, 511–521. https://doi.org/10.2516/ogst:2004036

McKellar, R.C., Lu, X., 2005. MODELING MICROBIAL RESPONSES IN FOOD, CRC series. ed. Taylor & Francis e-Library.

Pan, J., Stephenson, A.L., Kazamia, E., Huck, W.T.S., Dennis, J.S., Smith, A.G., Abell, C., 2011. Quantitative tracking of the growth of individual algal cells in microdroplet compartments. Integr. Biol. 3, 1043–1051. https://doi.org/10.1039/c1ib00033k

Panizza, P., Amon, A., Courbin, L., 2013. Comment circulent des gouttes dans un laboratoire sur puce ? Reflets la Phys. 4–9. https://doi.org/10.1051/refdp/201336004

Poisson, S.D., 1837. Recherches sur la probabilité des jugements en matière criminelle et en matière civile ; précédées des Règles générales du calcul des probabilités.

Squires, T.M., 2005. Microfluidics : Fluid physics at the nanoliter scale. Reveiws Mod. Phys. 77, 977–1026. https://doi.org/10.1103/RevModPhys.77.977

Strickler, S.S., Gribenko, Alexey V, Gribenko, Alexander V, Keiffer, T.R., Tomlinson, J., Reihle, T., Loladze, V. V, Makhatadze, G.I., 2006. Protein Stability and Surface Electrostatics : A Charged Relationship. Am. Chem. Soc. 45, 2761–2766. https://doi.org/10.1021/bi0600143

CHAPITRE 3

ETUDES PHYSIOLOGIQUE ET GENETIQUE DE *C. SPOROGENES* ET *C. BOTULINUM* GROUPE I POUR SELECTIONNER PLUSIEURS SOUCHES AFIN DE VALIDER LE MODELE DEVELOPPE.

Dans le chapitre précédent (Chapitre 2), nous avons déterminé l'influence des facteurs environnementaux (pH et concentration en chlorure de sodium) sur la probabilité de germination et de croissance des spores de *C. sporogenes* PA 3679 après un traitement thermique de faible intensité. Les résultats ont montré principalement un effet synergique entre le pH, la concentration en chlorure de sodium et le traitement thermique. Cet effet synergique inhibant la reprise de croissance est observable aussi bien avec des cellules végétatives que des spores, et il est d'autant plus renforcé que le traitement thermique est important. Afin de valider ce phénomène de synergie observé sur la souche de *C. sporogenes* PA 3679, nous avons travaillé avec plusieurs souches de *C. sporogenes* et de *C. botulinum* groupe I isolées de conserves alimentaires altérées ou de références.

L'objectif général de ces travaux était de valider l'effet synergique entre le pH, la concentration en NaCl et le traitement thermique sur la croissance des cellules végétatives et la germination/croissance des spores de *C. sporogenes* et *C. botulinum* groupe I.

La première étape a consisté en la sélection de plusieurs souches de *C. sporogenes* et *C. botulinum* groupe I suivant leurs caractéristiques physiologiques (limite de croissance en fonction du pH et de la concentration en NaCl, thermorésistance de leurs spores). La deuxième étape a consisté en la mise en évidence d'un un lien entre les caractéristiques physiologique des souches sélectionnées et leurs signatures génétiques. Enfin, la probabilité de recouvrement (croissance ou germination/croissance) a été modélisée pour des souches sélectionnées de *C. sporogenes* et *C. botulinum* groupe I en la comparant avec la souche *C. sporogenes* PA 3679. Nos résultats sont présentés ici, sous forme d'une publication soumise dans le journal Food Microbiology en 2021.

Article 2: Synergistic interaction between pH and NaCl in the limits of germination and outgrowth of *Clostridium sporogenes* and Group I *Clostridium botulinum* vegetative cells and spores after heat treatment.

Article publié dans *Food Microbiology,* 106 (2022), **https://doi.org/10.1016/j.fm.2022.104055**

Emmanuelle Boix[1, 2], Louis Coroller[2], Olivier Couvert[2]*, Stella Planchon[1], Arnoud H. M. van Vliet[3], Jason Brunt[4] Michael W. Peck[5], Christine Rasetti-Escargueil[6], Emmanuel Lemichez[6], Michel R. Popoff[6], and Stéphane André[1]

[1]Centre Technique pour la Conservation des Produits Agricoles, Unité Expertise dans la Maîtrise du Risque Industriel en Thermorésistants Sporulés (EMaiRIT'S), UMT Qualiveg 2, 449 avenue Clément-Ader, 84911 Avignon, France; [2]Université de Brest, Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Ecologie Microbienne, UMT19.03 ALTER'iX, 6 Rue de l'Université, 29000 Quimper, France; [3]Department of Pathology and Infectious Diseases, School of Veterinary Medicine, Faculty of Health and Medical Sciences, University of Surrey, Guildford GU2 7AL, UK; [4]Department of Chemical Engineering and Biotechnology, University of Cambridge, Philippa Fawcett Drive, Cambridge CB3 0AS, UK; [5]QIB Extra, Quadram Institute, Norwich Research Park, Norwich NR4 7UQ, UK; [6]Unité des Toxines Bactériennes, UMR CNRS 2001, Institut Pasteur, 75015 Paris, France;

*Corresponding author

Mailing address: Olivier Couvert, Université de Brest, Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Ecologie Microbienne, 6 rue de l'Université, 29000 Quimper.

E-mail: olivier.couvert@univ-brest.fr

Keywords

Growth limits, water activity, heat resistance, diversity, physiology, phylogeny, hurdle technology, spore germination, growth probability.

1. Highlights

- Individual isolates of *C. sporogenes* and C. *botulinum* grew at pH ≥4.5 and NaCl ≤11.5%
- No correlation between physiological and genetic characteristics of 42 isolates
- pH and NaCl growth limits differed between vegetative cells and spores
- Combined low heat treatment, pH 4.9 and NaCl 4% prevented growth

2. Abstract

Group I *C. botulinum* and *C. sporogenes* are physiologically and genetically closely related. Both are widely distributed in the environment and can cause foodborne botulism. In this work, we studied the impact of food formulation (pH, NaCl) on synergy with the use of heat treatment to prevent *C. sporogenes* and Group I *C. botulinum* growth. A physiological study was conducted with 37 isolates from spoiled canned food and five referenced strains of *C. sporogenes* and Group I *C. botulinum*. Growth limits were established as a function of pH and NaCl concentration in PYG modified medium (PYGm) at 30 °C for 48 days. The heat resistance of the spores was studied for 2 min and 10 min at 102 °C and 110 °C, respectively. This physiology study (pH, NaCl growth limits and heat resistance) allowed the selection of 14 isolates of *C. sporogenes* and Group I *C. botulinum* representative of the diversity found. This panel of 14 selected isolates (11 isolates isolated from spoiled canned food and three reference strains), were whole genome sequenced, but no association of physiological and genetic characteristics could be detected. Finally, to quantify the synergistic impact of the environmental factor's pH and NaCl on the growth limits of the vegetative cells, spores and heat-treated spores, five isolates (*C. sporogenes* and Group I *C. botulinum*) were further studied. It was shown that the probabilities of: (i) growth for vegetative cells, (ii) germination and outgrowth for spores and (iii) heat-treated spores were impacted by the environmental factors and the heat treatment. This study provides a better understanding of the behaviour of *C. sporogenes* and Group I *C. botulinum* isolates and shows how synergistic hurdles (combined pH, NaCl and heat treatment) can help prevent or minimise foodborne botulism outbreaks.

3. Introduction

Strains of *Clostridium botulinum* Group I are widespread throughout the environment and can enter the food chain, where they can cause foodborne botulism (due to ingestion of pre-formed botulinum neurotoxin in contaminated food). Strains of Group I *C. botulinum* are able to form strongly heat-resistant spores, which makes Group I *C. botulinum* the most concern pathogen in low-acid canned food. Group I *C. botulinum* and *Clostridium sporogenes* are phylogenetically closely related and share physiological characteristics including the high thermal resistance of their spores and their mesophilic growth.

C. botulinum can produce highly potent neurotoxins (0.1–1 ng/kg for laboratory mice by injection but 100/1000 times less toxic by ingestion) with several different neurotoxin serotypes described (A, B, C, D, E, F, G, HA and X). Foodborne botulism has been mainly described in home-prepared foods but can also affect commercial products, and in the case of Group I *C. botulinum* with strains that produce neurotoxin of serotypes A, B and/or F (Peck, 2009; Rasetti-Escargueil et al., 2020b). For many years, the difference between Group I *C. botulinum* and *C. sporogenes* was considered to be in the production of botulinum toxin and *C. sporogenes* has often been used as a surrogate for Group I *C. botulinum*. It was believed that Group I *C. botulinum* strains could produce botulinum neurotoxins, whereas *C. sporogenes* strains could not. However, recent studies reveal a more complex picture. Various approaches have been used to establish the diversity and the phylogenetic relationship between strains of Group I *C. botulinum* and *C. sporogenes*. Comparisons of core genome single nucleotide polymorphisms (SNP) following whole genome sequencing have shown that Group I *C. botulinum* and *C. sporogenes* are genetically distinct (Peck, 2009; Peck and van Vliet, 2016; Weigand et al., 2015). Brunt et al. (2020) showed the presence of type B neurotoxin genes in some *C. sporogenes* strains, and botulinum neurotoxin genes were absent from some strains of Group I *C. botulinum* (Brunt et al., 2020). The diversity and spread of botulinum neurotoxin genes is associated with horizontal transfer *via* mobile elements, conjugative plasmids and various recombination/insertion events (Nawrocki et al., 2018; Peck and van Vliet, 2016).

Group I *C. botulinum* strains can grow at a pH of 4.6 and above, making this value a reference hazard target for low-acid food (Peck, 2009). Although occasional outbreaks of botulism have been attributed to foods with a pH lower than 4.6, these foods were also contaminated with moulds, whose growth increased the pH of the food, enabling Group I *C. botulinum* to grow and release toxin. Growth of

Group I *C. botulinum* and *C. sporogenes* can be inhibited only at high concentrations of sodium chloride (NaCl ≥ 10%, i.e. aw ≥ 0.94) or glycerol (aw > 0.93) (Peck, 2009).

The decimal reduction value at 121.1 °C ($D_{121.1\,°C}$) of Group I *C. botulinum* spores is commonly taken to be 0.21 min (Esty and Meyer, 1922). This decimal reduction time corresponds to the time required to inactivate 90% of the initial population in bacteria. A recent meta-analysis of 23 scientific papers (394 *D*-values collected) found the mean value of $D_{121.1\,°C}$ to be 0.2 min, with a standard deviation of 0.11 min, and reported values up to 0.48 min at 121.1 °C (Diao et al., 2014). Spores of *C. sporogenes* strains are often reported to be more heat-resistant than those of Group I *C. botulinum* strains, with $D_{121.1\,°C}$ values ranging from 0.2 to 3.5 (Basaran-Akgul, 2013; Brown et al., 2012; Diao et al., 2014). The difference in heat resistance is partially explained by the acquisition of a second *spoVA* operon, which is responsible for the transport of dipicolinic acid into the spore core during the sporulation, increasing the heat resistance of the spores (Brunt et al., 2020; Butler et al., 2017; den Besten et al., 2018).

Previous work indicates a broad diversity in physiological and genetic characteristics within both species. As consumer diet shifts toward the consumption of minimally processed foods, this physiological and genetic diversity needs to be considered to reduce the risks of botulism outbreaks. The purpose of the present study was to seek insights: (i) into the physiological and genetic diversity of isolates of Group I *C. botulinum* and *C. sporogenes* and (ii) into the potential synergistic interaction of food formulation (pH and sodium chloride content) and heat treatment on the probability of spore germination and outgrowth. The growth limits of 37 isolates of *C. sporogenes* and Group I *C. botulinum* isolated from spoiled canned food and five reference strains were assessed in PYGm broth at sub-optimal temperature (30 °C), together with the heat resistance of spores at 102 °C and 110 °C for 2 min and 10 min. Fourteen representative isolates selected according to their physiological characteristics were also sequenced. This genetic study allowed the selection of five diverse isolates (three isolates of *C. sporogenes* or Group I *C. botulinum* and two reference strains) for further study. The ability of these isolates to grow from vegetative cells or from heat-treated spores was assessed according to the pH and NaCl concentration of the growth media.

4. Materials and methods

4.1 Bacterial strains

The isolates of *Clostridium sporogenes* and *Clostridium botulinum* used in this study are listed in Table 3. Isolates 1–40 were food contaminant isolates, isolated from spoiled cans by the Centre Technique pour la Conservation des Produits Agricoles (CTCPA) and identified as *C. sporogenes* with 16S rRNA sequencing, negative *in vivo* test (mice) and absence of toxin genes by PCR. The reference strains of Group I *C. botulinum* were Prevot 910 (isolate 41) and 301-13 (isolate 42) (Mazuet et al., 2016). Each isolate was stored at −80 °C in beads (Biomérieux, AES, Chemunex, Bruz, France). Cell recovery was carried out with three beads dropped into 10 mL of peptone-yeast-glucose modified broth (PYGm). The 10 mL tube was incubated at 37 °C for 72 h. Two successive pre-cultures in 10 mL tubes of PYGm broth inoculated at 1% were then incubated at 30 °C for 16 h and 22 h. Anaerobiosis was maintained by pouring paraffin into the tubes after inoculation. PYGm medium preparation followed DSMZ protocol (DSMZ, 2020). The PYGm modified broth composition was: yeast extract (10 g/L), beef extract (5 g/L), dextrose (5 g/L), peptone (5 g/L), tryptone (5 g/L) (Biokar Diagnostics, Allonne, France), K_2HPO_4 (2 g/L), resazurin (1 mg/L), Tween® 80 (1 mL/L), and 40 mL/L of salt solution ($NaHCO_3$, 10 g/L; NaCl, 2 g/L; K_2HPO_4, 1 g/L; KH_2PO_4, 1 g/L; $MgSO_4$ $7H_2O$, 0.5 g/L; $CaCl_2.2H_2O$, 0.25 g/L) (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France). The PYGm broth ingredients were combined in a final solution volume of 1 L and mixed thoroughly, boiled for 5 min, and cooled to room temperature. L-Cysteine HCl (0.5 g/L), vitamin K1 solution and haemin solution (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France) were then added to the PYGm broth. The vitamin K1 solution was 0.1 g of vitamin K1 in 20.0 mL of 95% ethanol, mixed thoroughly, sterilised by filtration, and stored at −18 °C in a brown glass bottle. The haemin solution was composed of 50.0 mg of haemin in 1.0 mL of 1N NaOH made up to a final volume of 100.0 mL and stored at 4 °C. Resazurin (1 mg/L) (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France) added to the PYGm medium is a highly sensitive colour indicator. It turns pink in the presence of oxygen and is colourless in its absence. Finally, the PYGm broth was distributed in 10 mL tubes and autoclaved for 15 min at 121 °C.

The four reference strains of Group I *C. botulinum* were stored at −80 °C in 1 mL aliquots of trypticase yeast extract glucose (TYG) mixed with 30% glycerol (v/v). A volume of 100 µL of aliquot added to 10 mL of TYG. The culture was incubated at 37 °C for 24 h. A second pre-culture inoculated at 1% in 10 mL tubes of TYG broth was then incubated at 37 °C for 22 h. The TYG broth composition was trypticase (30 g/L) (Biomérieux, AES, Chemunex, Bruz, France), yeast extract (20 g/L) (Becton-

Dickinson, BD Difco, Grenoble, France), glucose (5 g/L) (Biokar Diagnostics, Allonne, France), DL-cysteine (0.5 g/L) (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France). The TYG broth was then distributed in 10 mL tubes and autoclaved for 20 min at 110 °C. The oxygen was removed from the PYGm broth and TYG broth in a water bath (JULABO GmbH, Seelbach, Germany) at 95 °C for 20 min or by storage in an anaerobic chamber before use (90% N_2, 5% H_2, 5% CO_2, Whitley A35 Workstation, Don Whitley Scientific, United Kingdom).

Table 3: List of *C. sporogenes* isolates and Group I *C. botulinum* strains used in this study.

Strain number	Species	Toxin genes (toxin type)	Isolation year	Origin
1	*C. sporogenes*[1]	No	1927	Collection
2	*C. sporogenes*[1]	No	Unknown	Collection
3	*C. sporogenes*	No	2016	Milk-based dessert
4	*C. sporogenes*	No	2010	Meat
5	*C. botulinum*[2]	No	2010	Meat
6	*C. sporogenes*	No	2010	Meat
7	*C. sporogenes*	No	2010	Meat
8	*C. sporogenes*	No	2001	Vegetables
9	*C. sporogenes*	No	2002	Vegetables
10	*C. sporogenes*	No	2005	Vegetables
11	*C. sporogenes*	No	2015	Prepared meat meal
12	*C. sporogenes*	No	2006	Prepared meat meal
13	*C. sporogenes*	No	2007	Fish product
14	*C. sporogenes*	No	2006	Fish product
15	*C. sporogenes*	No	2001	Meat
16	*C. sporogenes*	No	2006	Prepared meat meal
17	*C. sporogenes*	No	2008	Prepared meat meal
18	*C. sporogenes*	No	2009	Prepared meat meal
19	*C. sporogenes*	No	2010	Prepared meat meal
20	*C. sporogenes*	No	2010	Prepared meat meal
21	*C. sporogenes*	No	2011	Prepared meat meal
22	*C. sporogenes*	No	2011	Meat
23	*C. botulinum*[2]	No	2011	Meat
24	*C. sporogenes*	No	2012	Prepared meat meal
25	*C. sporogenes*	No	2012	Meat

26	*C. sporogenes*	No	2013	Prepared meat meal
27	*C. sporogenes*	No	2013	Prepared meat meal
28	*C. sporogenes*	No	2013	Prepared meat meal
29	*C. sporogenes*	No	2013	Prepared meat meal
30	*C. sporogenes*	No	2013	Prepared meat meal
31	*C. sporogenes*	No	2014	Prepared meat meal
32	*C. sporogenes*	No	2014	Meat
33	*C. sporogenes*	No	2015	Prepared meat meal
34	*C. botulinum*[2]	No	2011	Prepared meat meal
35	*C. sporogenes*	No	2006	Prepared meat meal
36	*C. sporogenes*	No	2006	Prepared meat meal
37	*C. sporogenes*	No	2008	Prepared meat meal
38	*C. sporogenes*	No	2006	Meat
39	*C. sporogenes*	No	2005	Prepared meat meal
40	*C. sporogenes*[1]	No	1927	Collection
41	*C. botulinum*[1]	Yes (A1)	1953	Collection
42	*C. botulinum*[1]	Yes (A2)	2013	Collection

[1] Strain 1: PA 3679 Campden collection; strain 2: IFR BL 81/14/1; strain 40: PA 3679 ATCC 7955; strain 41: Prevot 910 Institute Pasteur collection; strain 42: 301-13 Institute Pasteur collection (Mazuet et al., 2016); [2] Renamed non-toxigenic Group I *C. botulinum* instead of *C. sporogenes* after whole genome sequencing analysis (section 5.2).

4.2 Spore suspension

Spores were produced in modified meat liver sulphite reducer agar modified medium (MLSRAm) supplemented with 2 g/L of yeast extract (Biokar Diagnostics, Allonne, France). An aliquot (1 mL) of the pre-culture of vegetative cells (previously described) was inoculated on MLSRAm agar plates. The plates were incubated under anaerobiosis in jars (Oxoïd™ AnaeroGen™, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France) at 30 °C for 10 days. Sporulation was stopped when free spores exceeded 95% of cells counted by phase-contrast microscopy at a magnification of 1,000 (Olympus BX50; Olympus Optical Co., Ltd., Hamburg, Germany). Spores were harvested by pouring distilled sterile water into the plates and scraping them in anaerobiosis conditions. Spore suspensions were centrifuged at 6,000 × *g* for 10 min at 4 °C, and the spores were resuspended in 5 mL of sterile distilled water. Spore batches were divided into 1 mL aliquots and stored at 4 °C until use. Final concentration of the stock suspensions was 10^7–10^9 spores/mL.

4.3 Measurement of the spore heat resistance

To estimate the initial (t_0) spore concentration, the spore suspensions were firstly heated in a water bath at 80 °C for 10 min. For physiology experiments, the spores were heated for 2 min and 10 min at 102 °C and at 110 °C. The spore suspensions (10^7–10^9 spores/mL) were diluted 1:10 (v/v) in phosphate buffer pH 7.0 (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France) before the heat treatment; 50 µL capillary tubes (Hirschmann Laborgeräte, Ringcaps®, Germany) were then filled with 50 µL of spore suspension and heat-treated in a thermostatic oil bath (JULABO GmbH, Seelbach, Germany; LAUDA Therm 180, Roissy-Charles-de-Gaulle, France). The capillary tubes were removed from the bath after the set time and cooled in a water/ice bath. After cleaning/disinfection with ethanol, the tubes were broken at both ends and their contents poured into a tube containing 3 mL of tryptone salt broth (Biokar Diagnostics, Beauvais, France). The capillary tubes were rinsed with 50 µL of tryptone salt broth. Viable cells were counted by plating in MLSRAm. The plates were incubated under anaerobiosis in jars (Oxoïd™ AnaeroGen™, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France) at 30 °C for 48 hours at 30 °C.

4.4 Study of the physiological diversity of *C. sporogenes* and Group I *C. botulinum* strains

4.4.1 Experimental design

The isolates of *C. sporogenes* and Group I *C. botulinum* were incubated in PYGm broth at 37 °C for 72 h in anaerobiosis. Two successive cultures of 100 µL of revived culture inoculated in 10 mL Hungate tubes (Dutscher, Issy-les-Moulineaux, France) tubes of PYGm broth were then incubated at 30 °C for 16 h or 22 h. The vegetative cell suspensions (100 µL) at a concentration of 10^6 CFU/mL were inoculated in 10 mL Hungate tubes of PYGm broth adjusted to different pH values and sodium chloride concentrations. The initial pH values used were 7.0, 5.1, 5.0, 4.9, 4.8, 4.7, 4.6, 4.5, and 4.4. The pH of the broth was adjusted with 1N HCl. The broth was then autoclaved at 121 °C for 15 min. The pH meter (Meterlab, Villeurbanne, France) and a Tuff-Tip™ electrode (Fisher Bioblock Scientific, Illkirch-Graffenstaden, France) were calibrated using standard buffer solutions (Merck, Darmstadt, Germany) at pH 4.0 and 7.0. The sodium chloride concentrations tested were 0, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 and 12% (wt/vol) of NaCl added to the PYGm broth before autoclaving at 121 °C for 15 min. The calculated water activity values were 0.997, 0.994, 0.988, 0.981, 0.975, 0.968, 0.962, 0.955, 0.949, 0.942, 0.935 and 0.928, for each sodium chloride concentration from 0 to 12% (wt/vol) respectively. The oxygen was removed from the PYGm broth in an anaerobic chamber (90% N_2, 5% H_2, 5% CO_2, Whitley A35 Workstation, Don Whitley Scientific, United Kingdom). The Hungate tubes were incubated at 30 °C for 48 days. Growth of vegetative cells was estimated by visible broth turbidity in the Hungate tubes. Visual observations were made weekly. Three biological replicates were acquired for each condition.

4.4.2 Statistical analysis

The turbidity of the tubes was assessed by visual inspection for all pH and sodium chloride concentration values. The observed growth limits of pH and sodium chloride concentration were assessed by a median value calculated between the three replicates values of observed growth or no growth. The heat resistance was quantified by the time needed to inactivate 90% of the cells population, and estimated from the ratio of surviving cells after one of the four led heat treatments. Assuming a log-linear destruction curve, this time corresponds to a decimal reduction time and usually named D-value, was calculated as (Equation 9):

$$D_{\mathrm{T}} = \frac{t_T}{Log_{10}\left(\frac{N_0}{N_t}\right)}$$

Equation 9: D-value.

Where D_T is the decimal reduction time (min) at the heating temperature T (102 or 110°C), t_T is the heating time (2 or 10 min) at the T temperature, N_0 and N_t are the Colony-forming unit (CFU) before and after heat treatment.

In order to compare the heat resistance of the strains, D-values were calculated at the reference temperature (121.1 °C) using the:

$$D_{121.1\,^{\circ}C} = D_T \times 10^{\left(\frac{(T-121.1)}{z}\right)}$$

Equation 10 : Comparison of D-value of the strains at 121.1°C.

Where $D_{121.1\,^{\circ}C}$ is the decimal reduction time at the reference temperature 121.1 °C, D_T is the decimal reduction time at the experimental temperature T (102 °C or 110 °C), and z is the temperature difference required to change the D-value by a factor of 10 (z = 10 °C for Group I *C. botulinum*) (Bigelow, 1921; Diao et al., 2014).

Finally, we performed a principal component analysis (PCA) on the growth limit as a function of pH and sodium chloride concentration; the heat resistance of *C. sporogenes* and Group I *C. botulinum* spores were taken as variables. The strain isolation matrix was used for illustrative qualitative variables. We introduced two illustrative strains, namely Group I *C. botulinum* strain 41 (Prevot 910) and Group I *C. botulinum* strain 42 (301-13). Statistical analysis was performed using the *FactoMineR* package in R software (**https://cran.r-project.org/**) (Lê et al., 2008).

4.5 Diversity and phylogeny of *C. sporogenes* and Group I *C. botulinum* strains and neurotoxin production capacity

4.5.1 Genomic DNA preparation

All genomic DNA preparations and whole-genome sequencing steps were performed by an external partner (Genoscreen, Lille, France). Genomic DNA of *C. sporogenes* was extracted from culture grown in PYGm broth as described previously. DNA extraction was performed by following Gram-positive cell lysis with a Gentra Puregene kit (Qiagen, Valencia, USA). The DNA quality was checked by fluorometric determination with SYBR Green and qualitatively controlled by agarose gel electrophoresis according to the manufacturer's instructions.

4.5.2 Whole-genome sequencing

Whole genome sequence data were generated with the Illumina sequencing technology. Fragment libraries were constructed using a Nextera XT DNA Library Prep kit (Illumina, Cambridge, UK) according to the manufacturer's instructions. Size selection was performed using an agarose gel electrophoresis system (Life Technologies, Grand Island, USA) and quantitatively controlled by fluorometric determination with SYBR Green. The pool of libraries was qualitatively and quantitatively controlled using migration by fluorometric assay and by capillary electrophoresis on an Agilent DNA high sensitivity chip (Agilent, Santa Clara, USA). Sequencing was generated with a 2 × 150 bp read metric on an Illumina HiSeq sequencer.

4.5.3 Genome assembly, phylogeny and bioinformatic analyses

Genome sequences were assembled *de novo* using Shovill version 1.0.9 (**https://github.com/tseemann/shovill**), with default settings for the SPAdes assembler version 3.14.1, a minimum coverage of 5× and a minimum contig size of 200 bp (Bankevich et al., 2012). The assembly metrics were determined using Quast version 4.6.3 (Gurevich et al., 2013). Illumina FASTQ reads. Genome assemblies were uploaded in Genbank in BioProject PRJNA763108 (see Supplementary Data Table S4). Assembly metrics and Genbank/SRA accession numbers of individual samples are given in Supplementary Table S1.

Core genome single nucleotide polymorphisms (SNPs) were identified using ParSNP version 1.2 with PhyPack enabled ("-x" switch). Phylogenetic trees were constructed using the built-in FastTree2 module (Treangen et al., 2014). The Group I *C. botulinum* and *C. sporogenes* genome sequences included for comparison had been previously described (Brunt et al., 2020) (see Supplementary Data Table 4). The genomes were searched for botulinum toxin genes using TBLASTN with the representatives sequences of the A, B, C, D, E, F, G, HA, X and EBoNT/J toxins, with no toxin homologs detected (Peck et al., 2017).

4.6 Synergistic effect of pH sodium chloride concentration and heat treatment on growth limits of *C. sporogenes* and Group I *C. botulinum*

4.6.1 Experimental design

Suspensions of cells (vegetative cells or spores) at different physiological states were used at concentrations of 7.92 ± 0.52 log/mL (*C. sporogenes* isolate 1), 7.54 ± 0.85 log/mL (*C. sporogenes* isolate 14), 7.76 ± 0.36 log/mL (*C. sporogenes* isolate 17), 8.09 ± 1.63 log/mL (*C. sporogenes* isolate 34) and 8.03 ± 0.87 log/mL (Group I *C. botulinum* isolate 41). We used three different cellular physiological states: vegetative cells, spores heated at 80 °C for 10 min (“spores”), and spores heat-treated with sublethal treatment (“heat-treated spores”). The spores were heat-treated to obtain approximately 1 log decimal reduction. The treatments were strain-dependent: (i) strain 1 was heat-treated at 100 °C for 1.5 min, (ii) strain 14 at 100 °C for 1.8 min, (iii) strain 17 at 100 °C for 2.3 min, (iv) strain 34 at 110 °C for 1.7 min and (v) strain 41 at 100 °C for 4 min. These growth limits refer to growth for vegetative cells, and to germination, outgrowth and growth for spores.

Viable cell concentration was assessed using the most probable number (MPN) method in PYGm broth in 96-well microplates (Nest, Wuxi, China). MPN was estimated by six successive 10-fold serial dilutions in a 96-well microplate. For each dilution, eight wells were replicated. A reduced factorial design, including 30 combinations of 11 pH levels and 13 sodium chloride concentrations, was used. The PYGm broth pH values were 7.0, 6.0, 5.8, 5.6, 5.4, 5.2, 5.0, 4.8, 4.6, 4.5, and 4.4. The sodium chloride concentrations tested were 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 and 12% (wt/vol) of NaCl added to PYGm broth before autoclaving at 121 °C for 15 min. The microplates were inoculated an anaerobic chamber (90 % N2, 5 % H2, 5 % CO2, Whitley A35 Workstation, Don Whitley Scientific, United Kingdom). Then, the microplates were incubated in a bag to obtain an anaerobic atmosphere (AnaeroGenTM Thermo

OxoidTM, ThermoFisher Scientifc, Dardilly, France) at 30 °C for 48 days. Growth of vegetative cells or germination and outgrowth of spores were determined based on visible broth turbidity in the wells. The growth was considered as positive when 1 out of 8 wells present growth. Observations were made weekly. The influence of pH and sodium chloride concentrations was studied independently and in combination and replicated four times.

4.6.2 Data processing and modelling

For each combination of pH and sodium chloride concentration, the number of wells where microbial growth was observed was assessed in a set of serial dilutions. This allowed the computation of the of the population density of cells able to grow (MPN function, Statistical Toolbox, MATLAB R2013b, MathWorks, Natick, MA) (Fridman, 2020). Four experimental replicates were used to calculate the mean of the observed number of decimal reductions (n_{obs}). Whenever one of the experimental replicates was bounded by a censored value, the mean was given using the *fitdistrplus* function available in the R package (**https://cran.r-project.org/**) (Pouillot and Delignette-Muller, 2010).

Based on this estimated density of cells able to grow, the number of decimal reductions observed (n_{obs}) was computed with Equation 11, as follows:

$$n_{\mathrm{obs}} = \log(N_0) - \log(N_{\mathrm{obs}})$$

Equation 11: Number of decimal reductions observed.

where N_0 is the concentration of vegetative cells or spores able to grow when the pH is equal to 7 and sodium chloride concentration is 0% (a_w = 0.997), and N_{obs} is the concentration of vegetative cells or spores able to grow at the given condition. The limit of quantification is reached when only one well is positive. Beyond this limit of detection, the result is considered as censored data.

The decimal reduction number according to the environmental conditions was derived from the model of Boix *et al.*, 2021 with Equation 12 (Boix et al., 2021):

$$n_{\text{pred}} = \begin{cases} 0 & , \text{if } \Pi \geq \Pi_0 \\ -10 \times (\log(\Pi_0) - \log(\Pi)), & \text{if } \Pi < \Pi_0 \end{cases}$$

Equation 12: Number of decimal reductions predicted.

Where n_{pred} is the predicted decimal reduction number of vegetative cells or heat-treated spores at different combined pH values and sodium chloride concentrations, Π is the gamma product derived from the Gamma concept (Zwietering et al., 1992), and Π_0 is the Π value above which n_{pred} is not affected by pH and sodium chloride concentration. At the optimal condition, $\Pi = 1$ and $n_{\text{pred}} = 0$. When the conditions become adverse, $\Pi = 0$ and n_{pred} tends towards infinity as pH, sodium chloride concentration and their interaction approach the limit of growth for the vegetative cells and the limit of germination, outgrowth and growth for the spores.

The product *Π* is computed as followed for each condition of recovery:

$$\Pi = \gamma_{\mathrm{CM_{pH}}} \times \gamma_{\mathrm{CM}_{a_w}} \times \gamma_{\xi}$$

Equation 13: Gamma product derived from the Gamma concept.

Where γ_{CM_X} quantifies the impact of each environmental factor (pH, a_w) and γ_{ξ} quantifies their synergistic effect.

γ_{CM_X} is computed as follows:

$$\gamma_{\mathrm{CM}_X} = \frac{(X - X_{\max}) \times (X - X_{\min})^n}{(X_{\mathrm{opt}} - X_{\min})^{n-1}\left[(X_{\mathrm{opt}} - X_{\min})(X - X_{\mathrm{opt}}) - (X_{\mathrm{opt}} - X_{\max})((n-1) \times X_{\mathrm{opt}} + X_{\min} - nX)\right]}$$

Equation 14: Gamma product from cardinal's values.

Where *X* is the variable studied (a_w or pH), $a_{\mathrm{w_{min}}}$, $a_{\mathrm{w_{opt}}}$, $a_{\mathrm{w_{max}}}$, $\mathrm{pH_{min}}$, $\mathrm{pH_{opt}}$ and $\mathrm{pH_{max}}$ are minimum, optimum and maximum growth and germination and outgrowth values for the variables studied (a_w and pH), and *n* is a shape parameter which is 1 for a_w and pH (Rosso et al., 1995, 1993). The function describing the interaction between the studied factors was given by Le Marc *et al*. (2001) and later modified by Augustin *et al.* (2005) (Augustin et al., 2005; Le Marc, 2001). γ_{ξ} is computed as follows:

$$\gamma_{\xi} = \begin{cases} 1, & \psi \leq 0.5 \\ 0, & \psi \geq 1 \\ 2(1-\psi), & 0.5 < \psi < 1 \end{cases}$$

Equation 15: Gamma product from interaction.

Where

$$\psi = \sum_i \frac{\varphi(X_i)}{2\prod_{j\neq i}[1-\varphi(X_j)]}$$

Equation 16: Interaction model (i).

And

$$\varphi(X) = \left(\frac{X_{\text{opt}} - X}{X_{\text{opt}} - X_{\text{min}}}\right)^3$$

Equation 17: Interaction model (ii).

Where X_{min} and X_{opt} are minimum and optimum growth and germination and outgrowth values for the studied variables.

The parameters were estimated by minimizing the sum of square root error using a non-linear fitting function (*lsqcurvefit* function, Optimization Toolbox, MATLAB R2020a, MathWorks, Natick, MA). The 95% confidence intervals of the estimated parameters were computed using the confidence intervals based on bootstrap percentiles (Efron and Tibshirani, 1993). Goodness of fit was evaluated by the coefficient of determination (R^2) and the root-mean-square error (RMSE). A value close to 1 indicates a best fit for R^2. The smaller the RMSE, the closer the model fitted the data.

5. Results & Discussion

5.1 Study of physiological diversity of *C. sporogenes* and Group I *C. botulinum* strains

5.1.1 Minimum growth pH for *C. sporogenes* and Group I *C. botulinum* strains

The lower pH limits for the growth of vegetative cells of the 42 isolates (37 *C. sporogenes*/Group I *C. botulinum* isolates isolated from spoiled canned food, three reference *C. sporogenes* strains and two reference Group I *C. botulinum* strains) are presented in Table 4 and Figure 17a. The growth limits of the 42 studied isolates ranged from pH 4.49 (*C. sporogenes* strain 17) to pH 5.05 (*C. sporogenes* strain 32). Fifty percent of the isolates studied grew at pH 4.6. The median pH limit for growth was pH 4.61. Among these isolates, 18 isolates (43%) grew at a pH below 4.6. A pH of 4.6 Is normally defined as the

minimum pH needed for Group I *C. botulinum* to grow (Peck, 2009). Several studies have shown that the minimum pH for growth of Group I *C. botulinum* is between pH 4.6 and pH 4.8, although for some strains it may far exceed pH 4.9–5.0 (Hauschild, 1993; Odlaug and Pflug, 1978; Townsend et al., 1954). The determination of the minimum pH for growth is dependent on several factors (growth medium, size of the inoculum...), so it is difficult to have the absolute limit of the species but rather a range of growth and no growth. The occurrence of strains of *C. sporogenes* growing at pH 4.5 raises the possibility that certain strains of *C. sporogenes* might form botulinum toxin at this pH. This needs further investigation, given that in canning, the risk presented by Group I *C. botulinum* is currently only considered for products with a pH above 4.6 (CTCPA and DGAL/SDSSA, 2015; FDA and GMA, 2010).

Table 4: Growth limits as a function of pH and sodium chloride concentration and *D*-value at 121.1 °C of 42 strains of *C. sporogenes* and Group I *C. botulinum.*

Strain number	Species	Observed growth limit pH	Observed growth limit sodium chloride concentration (% NaCl)	Calculated *D*-value at 121.1 °C (min)
1	*C. sporogenes*[1,3,4]	4.50	8.5	0.16
2	*C. sporogenes*[1]	4.60	6.5	ND*
3	*C. sporogenes*	4.67	8.5	0.01
4	*C. sporogenes*	4.50	7.5	0.15
5	*C. botulinum*[2,3]	4.70	7.5	0.21
6	*C. sporogenes*	4.76	7.5	0.02
7	*C. sporogenes*[3]	4.89	6.5	0.05
8	*C. sporogenes*[3]	4.83	7.5	0.01
9	*C. sporogenes*	4.60	6.5	0.01
10	*C. sporogenes*	4.50	7.5	0.01
11	*C. sporogenes*	4.55	7.5	0.02
12	*C. sporogenes*[3]	4.69	8.5	0.01
13	*C. sporogenes*	4.73	8.5	0.02
14	*C. sporogenes*[3,4]	4.51	11.5	0.14
15	*C. sporogenes*	4.61	8.5	0.01
16	*C. sporogenes*	4.50	7.5	0.50
17	*C. sporogenes*[3,4]	4.49	9.5	0.02
18	*C. sporogenes*	4.54	7.5	0.07
19	*C. sporogenes*	4.66	6.5	0.26
20	*C. sporogenes*[3]	4.51	7.5	0.02
21	*C. sporogenes*	4.56	7.5	0.04

22	*C. sporogenes*[4]	4.65	5.5	0.01
23	*C. botulinum*[2,3]	4.73	6.5	0.19
24	*C. sporogenes*	4.52	7.5	0.02
25	*C. sporogenes*	4.51	7.5	0.23
26	*C. sporogenes*[3]	4.71	6.5	< 0.01
27	*C. sporogenes*	4.66	8.5	< 0.01
28	*C. sporogenes*[3]	4.51	7.5	0.13
29	*C. sporogenes*	4.73	9.0	0.02
30	*C. sporogenes*	4.85	8.5	0.01
31	*C. sporogenes*	4.50	7.0	0.15
32	*C. sporogenes*	5.05	5.0	ND*
33	*C. sporogenes*	4.66	7.5	0.01
34	*C. botulinum*[2,3,4]	4.50	7.5	0.25
35	*C. sporogenes*	4.50	8.5	0.02
36	*C. sporogenes*	4.71	7.5	0.02
37	*C. sporogenes*	4.57	7.5	0.01
38	*C. sporogenes*	4.70	6.5	0.01
39	*C. sporogenes*	4.60	7.5	0.02
40	*C. sporogenes*[1,3]	4.51	9.5	0.02
41	*C. botulinum*[1,3,4]	4.68	6.75	0.03
42	*C. botulinum*[1]	4.68	6.75	0.07

[1] Strain 1: PA 3679 Campden collection; strain 2: IFR BL 81/14/1; strain 40: PA 3679 ATCC 7955; strain 41: Prevot 910 Institut Pasteur collection; strain 42: 301-13 Institut Pasteur collection; [2]Renamed *C. sporogenes* as non-toxigenic Group I *C. botulinum* after whole genome sequencing analysis (this study, Section 5.2); [3] Isolates selected for the genetic study (results in Section 5.2); [4] Isolates selected to assess their growth potential in conditions combining suboptimal levels of environmental factors (results in Section 5.3); *ND: not determined.

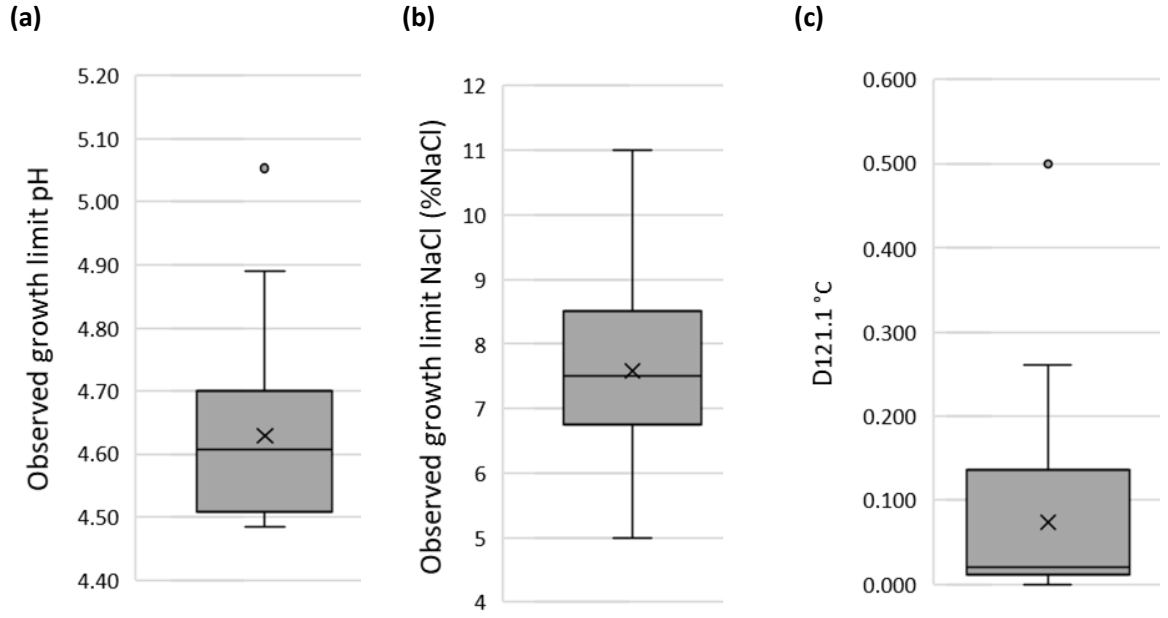


Figure 17: Boxplots of (a) observed growth limit pH, (b) observed growth limit sodium chloride concentration and (c) *D*-value calculated at 121 °C of 42 strains.

The median observed growth limit and *D*-value were pH 4.61, 7.5% NaCl and 0.021 min at 121.1 °C.

5.1.2 Maximum sodium chloride concentration for growth of *C. sporogenes* and Group I *C. botulinum* strains

The sodium chloride (NaCl) growth limits are presented in Table 4 and Figure 17b. Most of the isolates (98%) of this study did not grow at an NaCl concentration above 10%. The median concentration was 7.5% NaCl. No growth was observed over 5% NaCl concentration for *C. sporogenes* strain 32. For this strain, the growth limit as a function of NaCl concentration could not be determined more precisely because only concentrations of NaCl between 5% and 12% were tested. By contrast, the *C. sporogenes* strain 14 grew at 11.5% NaCl. No growth was observed at or above 12% NaCl, as previously reported in the literature. The growth limit NaCl concentration for Group I *C. botulinum* species is 10% (ANSES, 2019; Peck, 2009). The heterogeneity of growth limits as a function of NaCl concentration observed here was consistent with the literature (Roberts and Ingram, 1973; Russell and Gould, 2003).

5.1.3 Heat resistance of *C.* sporogenes and Group I *C. botulinum* spores

The heat resistance of 40 isolates of *C. sporogenes* and Group I *C. botulinum* spores was studied at 102 °C and 110 °C for 2 min and 10 min. To compare the heat resistance of all isolates, an extrapolated *D*-value was calculated at 121.1 °C and *z*-value of 10 °C. The results are presented in Table 4, and Figure 17c. *C. sporogenes* isolates 2 and 32 were not tested. Group I *C. botulinum* strains used in this study had a heat resistance $D_{121.1\,°C}$ of 0.03 min (strain 41) and 0.066 min (strain 42). The maximum *D*-value at 121.1 °C was 0.50 min (*C. sporogenes* strain 16) with the median heat resistance value of 0.02 min at 121.1 °C. The reference value for heat resistance of Group I *C. botulinum* species is $D_{121.1\,°C}$ = 0.21 min (ANSES, 2019; Esty and Meyer, 1922; FDA and GMA, 2010; Peck, 2009). None of the Group I *C. botulinum* strains tested in our study reached this reference heat resistance. It is recognised that the heat resistance of *C. sporogenes* spores is higher than that of Group I *C. botulinum* spores (Brown et al., 2012; Diao et al., 2014). Diao *et al.* (2014) in a meta-analysis showed that *C. sporogenes* PA 3679 strain spores had an average heat resistance $D_{121.1\,°C}$ of 1.3 min in contrast to Group I *C. botulinum*, whose average heat resistance $D_{121.1\,°C}$ was 0.2 min (Diao et al., 2014). Spores of isolates labelled *C. sporogenes* strain PA 3679 (isolates 1 and 40) examined in the present study had a lower heat resistance ($D_{121.1\,°C}$ = 0.02 and 0.16 min) than measured elsewhere (Diao et al., 2014).

5.1.4 Correlation between physiological characteristics of *C. sporogenes* and Group I *C. botulinum* strains

Principal component analysis (PCA) was performed on growth limit values as a function of pH, NaCl concentration and spore heat resistance at 121.1 °C for the *C. sporogenes* and Group I *C. botulinum* isolates (37 isolates from spoiled canned food and five reference strains). This included two reference Group I *C. botulinum* strains (strains 41 and 42, Figure 18). The three axes in the covariance circle represented pH, NaCl concentration and spore heat resistance (TT) (Figure 18a). The three axes were not correlated with each other. PCA statistics showed that dimension 1 was positively correlated with pH growth limit, and negatively correlated with the NaCl concentration growth limit. Dimension 1 explained 46.57% of the variance of the individual profiles. Dimension 2 was positively correlated to the spore heat resistance and explained 36.27% of the variance of the individual profiles.

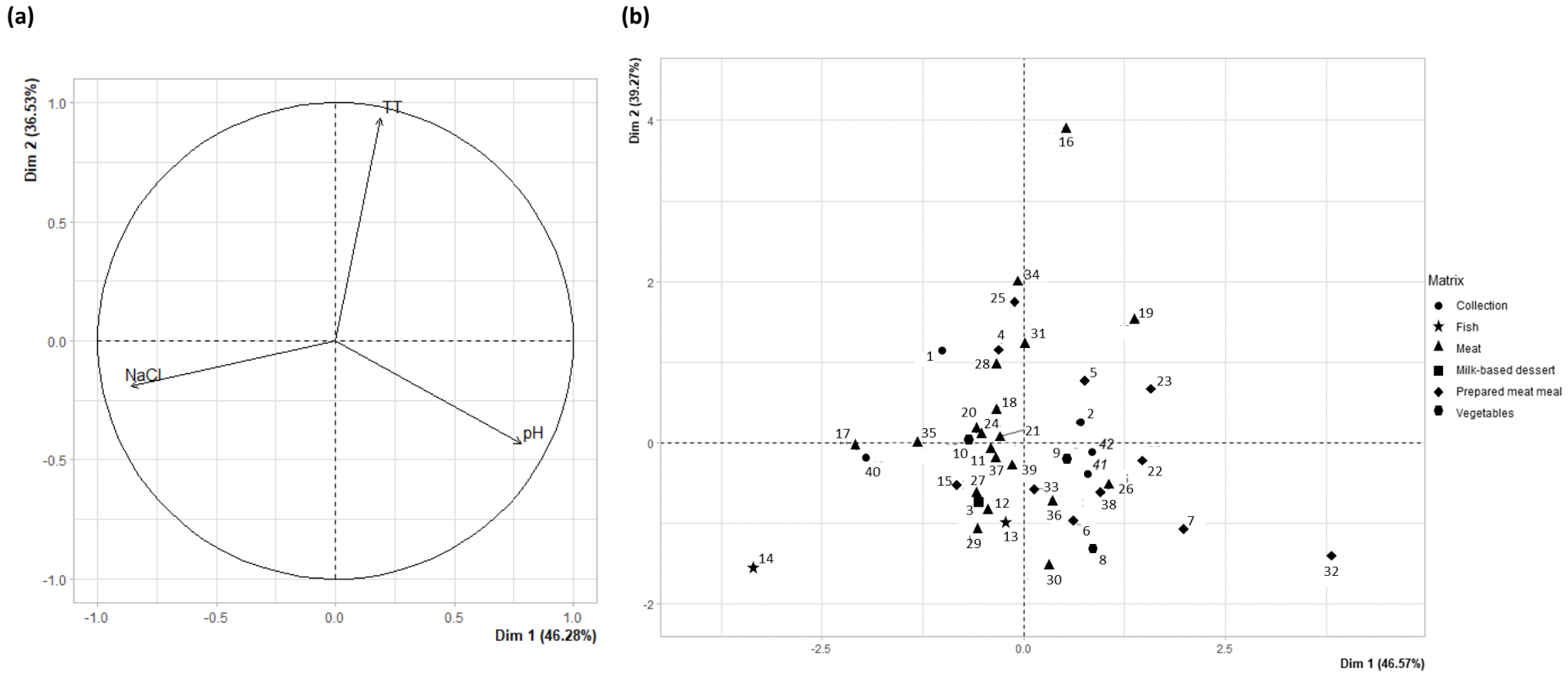


Figure 18: (a) Principal component analysis (PCA) correlation circle for growth limit as a function of pH and sodium chloride concentration (NaCl) and heat resistance (TT) of spores of 42 *C. sporogenes* and Group I *C. botulinum* isolates (at 121.1 °C). (b) PCA map for *C. sporogenes* isolates and Group I *C. botulinum* strains. Each number corresponds to the strain number. Each shape corresponds to the source of isolation of each strain (see legend).

The PCA map shows the 42 isolates of *C. sporogenes* and Group I *C. botulinum* (37 isolates isolated from spoiled canned food and five reference strains) as a function of growth limit pH and sodium chloride concentration (NaCl) and spore heat resistance (TT) (Figure 18b). The population fell into three groups: (i) a heat resistant group (top), (ii) a group resistant to acid pH and high sodium chloride concentration (bottom left) and (iii) a group that grew only at high pH and low NaCl concentration and had low spore heat resistance (bottom right). Three isolates in particular had opposite pH and NaCl characteristics (*C. sporogenes* isolates 14, 16 and 32). *C. sporogenes* strain 14 was acid- and NaCl-resistant; it could grow at pH 4.51 or 11.5% NaCl and had a $D_{121.1\,°C}$ value of 0.139 min. *C. sporogenes* strain 32 was sensitive to acid and NaCl and could grow at pH 5.05 or 5% NaCl. *C. sporogenes* strain 16 was intermediate for pH and NaCl growth limits, growing at pH 4.50 and 7.5% NaCl but was the most heat-resistant strain with an estimated $D_{121.1\,°C}$ value of 0.50 min. There was no link or correlation between the origin (culture collection, fish, meat, milk-based dessert, prepared meat meal and vegetables) and the physiological characteristics of the isolates as observed on the PCA map.

5.2 Genetic diversity a of *C. sporogenes* and Group I *C. botulinum* strains and their neurotoxin production ability

Eleven isolates of *C. sporogenes* (nine isolates isolated from spoiled canned food and two reference strains), and three isolates of non-toxigenic Group I *C. botulinum* (isolated from spoiled canned food) and one reference Group I *C. botulinum* strain (strain 41) were selected for a genetic diversity study (Table 3). In this study, the production of botulinum toxin was not quantified, only the presence of the genes allowing the production of botulinum toxin were identified by comparison of the sequences and the reference sequences by Blast. The selection was made according to their growth limits for pH and/or NaCl concentration and/or the heat resistance of their spores. For example, *C. sporogenes* strain 17 grew at an acid pH of 4.49, *C. sporogenes* strain 14 grew up to a sodium chloride concentration of 11.5%, and Group I *C. botulinum* strain 34 showed a high spore heat resistance, $D_{121.1\,°C}$ = 0.25 min.

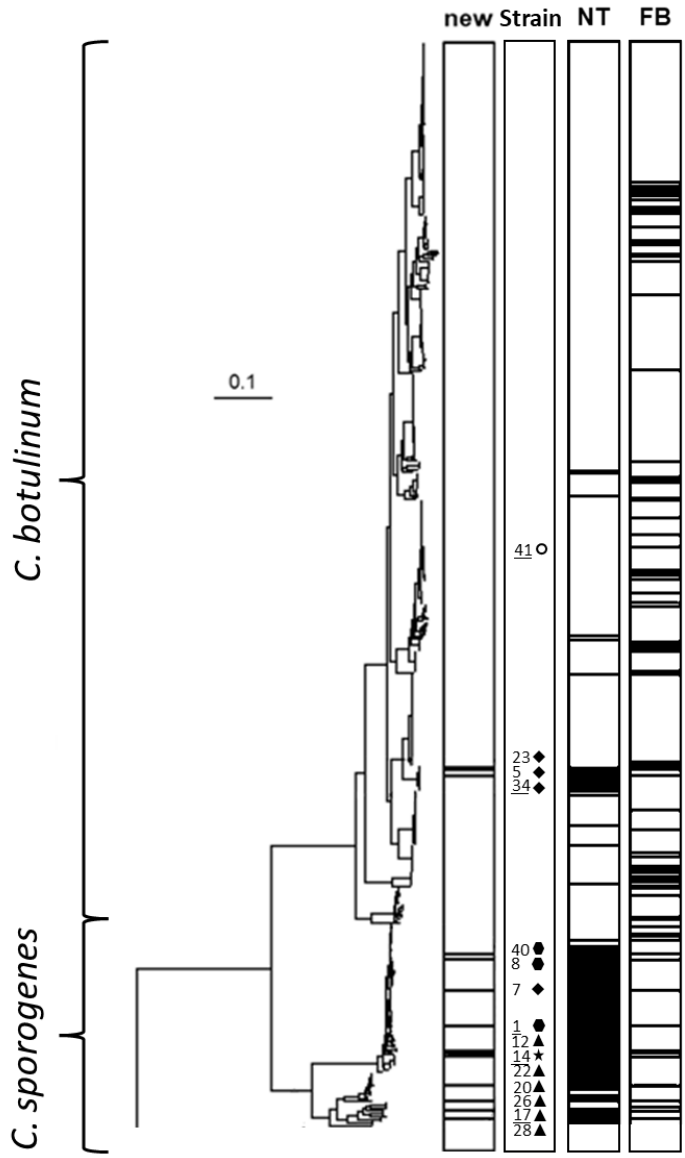


Figure 19: Phylogeny of genomes of Group I *C. botulinum* and *C. sporogenes* based on the phylogeny tree of Brunt (Brunt et al., 2020).

The phylogenetic tree was created by comparing core single nucleotide polymorphisms (SNP) identified using the ParSNP program. Treegraph v2, MEGA7 and Figtree were used to annotate and visualise the phylogenetic tree. The distance 0.10 represents the nucleotide substitution number per site for a given branch, based on the number of SNPs found in the core genome. Isolates 5, 23 and 34 are in the Group I C. botulinum clade and the other isolates are in the C. sporogenes clade (new frame). The underlined isolates (41, 34, 1, 14 and 17) were selected to assess their growth potential in

conditions combining suboptimal levels of environmental factors. White circles indicate collection strains, diamonds isolates isolated in meat, hexagons isolates isolated in vegetables, stars isolates isolated in fish and triangles isolates isolated in prepared meat meals (Table 3). NT: toxin genes. FB: isolates isolated from foodborne botulism incidents.

Two major lineages were identified: Group I *C. botulinum* and *C. sporogenes*. Strain 41 (Prevot 910) is currently recognised as a Group I *C. botulinum* producer of type A neurotoxin (Figure 19). Among our newly isolated isolates, three (isolates 5, 23 and 34) were initially identified as *C. sporogenes* strains (based on 16S ribosomal DNA sequencing, *in vivo* tests on mice and toxin gene detection by PCR) and redefined by WGS as Group I *C. botulinum* strains but lacking a botulinum toxin gene (using SNP analysis and BLAST). Toxin production was not experimentally determined for the *C. sporogenes* strains belonging to the Group I *C. botulinum* strains. Whole genome sequencing analysis provides a powerful approach to show the phylogenetic relatedness of neurotoxin-producing and non-neurotoxin-producing strains, and the genetic modifications and exchanges between closely related strains. Core genome SNP typing is currently the standard method for building large phylogenetic trees to establish relations between strains. ParSNP performs microbial genome alignments to identify both structural and point variations (Pightling et al., 2018; Treangen et al., 2014). The non-toxigenic Group I *C. botulinum* isolates (5, 23 and 34) are closely genetically related, clustered together and were isolated from meat. These three isolates showed high heat resistance at 121.1 °C up to 0.25 min for strain 34, 0.21 min for strain 5 and 0.20 min for strain 23. These three isolates had a median tolerance to sodium chloride concentration (6.5–7.5%) and a median tolerance to acid (pH 4.50–4.73).

The remaining 11 isolates were classified as belonging to the *C. sporogenes* species. The *C. sporogenes* group was divided into two subgroups, and our *C. sporogenes* isolates (11 isolates) were located in both. The phylogenetic tree showed that isolates 8 and 40 were closely related but differed in their physiological characteristics. The strain 40 was more acidophilic, and more resistant to NaCl concentration and heat treatment (pH: 4.51, 9.50% and $D_{121.1\,°C}$ = 0.02 min) than strain 8 (pH 4.83, 7.50%, and $D_{121.1\,°C}$ = 0.01 min). These results showed a genetic similarity but a physiological diversity, although both isolates were isolated from plant material. By contrast, strain 1 (pH 4.50 and 8.50%) and strain 40 (pH 4.51 and 9.50%) had close physiological characteristics, although the heat resistance of the spores of strain 1 ($D_{121.1\,°C}$ = 0.16 min) was higher than that of strain 40 ($D_{121.1\,°C}$ = 0.02 min). Isolates 1 and 40 are described as versions of strain PA 3679 and are in the same group of *C. sporogenes* in the phylogenetic tree, but distantly related. Originally, these isolates came from two different collections,

one from the Campden collection (strain 1) and the other from the ATCC collection (strain 40, ATCC 7955). This divergence between these isolates may also be due to mutations accumulated over time by successive subcultures (Treangen et al., 2014). Other studies have reported significant heterogeneity among isolates described as PA 3679. Some isolates with a lower spore heat resistance genetically resembled *C. sporogenes*, whereas other isolates with a higher spore heat resistance genetically resembled Group I *C. botulinum* (Bradbury et al., 2012; Bradshaw et al., 2010; Schill et al., 2016; Weigand et al., 2015). The two isolates described as strain PA 3679 (isolates 1 and 40) tested in the present study align with isolates in the *C. sporogenes* grouping (Figure 19).

5.3 Synergistic effect of pH, sodium chloride concentration and heat treatment on growth limits of *C. sporogenes* and Group I *C. botulinum* strains

Physiological and genetic studies of *C. sporogenes* (34 isolates from spoiled canned food and three reference strains), non-toxigenic Group I *C. botulinum* (three isolates isolated from spoiled canned food) and Group I *C. botulinum* (two reference strains) showed heterogeneity in growth limits as a function of pH and NaCl concentration and as a function of spore heat resistance (although no link was established between physiological characteristics and genetic diversity). These observations prompted us to determine how the growth limits of vegetative cells, spores and heat-treated spores varied as a function of pH and NaCl concentration.

Tests were carried out with five isolates of *C. sporogenes* or Group I *C. botulinum*: isolates 14 and 17 isolated from spoiled canned food, reference strain 1, strain 34 isolated from spoiled canned food, and reference strain 41. Strain 14 (pH 4.51, 11% NaCl and $D_{121.1\,°C}$ = 0.14 min) was the most salt-tolerant and strain 17 (pH 4.49, 9.5% NaCl and $D_{121.1\,°C}$ = 0.02 min) was the most acid-tolerant. These two isolates were classified in the two subgroups of the species *C. sporogenes*. Strain 34 was included based on the results of the genetic analysis (identified as non-toxigenic Group I *C. botulinum*) and the physiological study (growth limit: pH 4.50, 7.5% NaCl and $D_{121.1\,°C}$ = 0.25 min). The reference Group I *C. botulinum* strain 41 had a medium growth limit and heat resistance (pH 4.68, 6.75% NaCl and $D_{121.1\,°C}$ = 0.03 min). Figure 20a shows the observed germination, outgrowth and growth limit as a function of pH of *C. sporogenes* (isolates 1, 14 and 17) and Group I *C. botulinum* (isolates 34 and 41). The status of the inoculum (vegetative cells, spores or heat-treated spores) greatly impacted the limits for growth. These limits correspond to growth for vegetative cells and germination, outgrowth and growth for the spores.

For vegetative cells, the growth limits were between pH 4.5 and pH 4.7 depending on the isolates, in line with the literature (pH limit of 4.6) (Peck, 2009).

Spores showed a smaller pH range for germination and outgrowth compared with the growth limits of vegetative cells. The pH germination/outgrowth limits for spores that were heat-activated (80 °C, 10 min) were higher than the growth limit of vegetative cells by 0.24 pH units (mean value). When a stronger heat treatment was applied to *C. sporogenes* and Group I *C. botulinum* spores, the observed values of the pH growth limits increased. Indeed, the pH increased by 0.20 units between spores and heat-treated spores, and the pH increased by 0.40 between vegetative cells and spores heated at 100/110 °C. The growth limits as a function of pH thus differed between species and within the same species (0.3 pH units increase).

The limit of a_w (controlled by NaCl) for growth followed the same pattern as the pH growth limit (Figure 20b): (i) spores (activated at 80 °C for 10 min) showed a smaller interval of a_w limit for germination and outgrowth compared with the growth limits of vegetative cells (increasing by 0.007 on average), and (ii) the a_w-dependent germination/outgrowth limits for heat-treated spores were higher than for spores or vegetative cells (increasing by 0.013 on average) (see Figure 20b). Strain 17 seems to be the strain least affected by the pH or NaCl concentration on the germination and outgrowth limits of spores. This result illustrated the variability of growth limits among isolates.

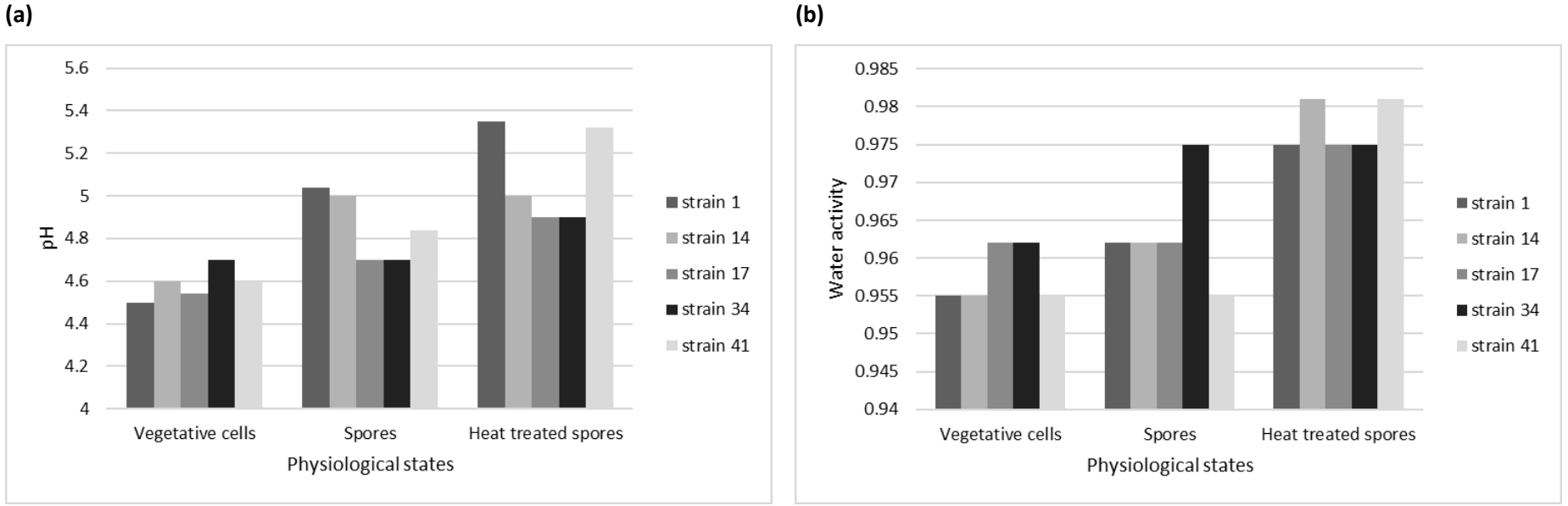


Figure 20: Effect of physiological state on (a) observed pH and (b) water activity a_w, controlled by NaCl for growth limit of *C. sporogenes* isolates 1, 14 and 17, and Group I *C. botulinum* isolates 34 and 41.

5.3.1 Assessment of the recovery probability of *C. sporogenes* and Group I *C. botulinum*

The synergistic effect of environmental factors on growth was then further investigated for the five isolates of *C. sporogenes* and Group I *C. botulinum* (presence or absence of toxin gene). The growth range of vegetative cells and germination and outgrowth of spores and heat-treated spores was studied using a factorial design combining different pH values and NaCl concentrations. A total of 30 combinations of pH (pH 4.4–6.5) and sodium chloride concentration (0–12% NaCl) were studied. Decimal reduction number as a function of pH and NaCl concentration was modelled with Equation 12. The lowest observed probability of growth or of germination and outgrowth was 8.22 log, which corresponds to less than one cell in a hundred million. Estimated coefficients of regression modelled for the probability of growth of vegetative cells and spores of *C. sporogenes* and Group I *C. botulinum* isolates and the outcomes of variance analysis of the results are shown in Table 5 and Figure 21. The developed model displayed a good fit with the observed data (root-mean-square error (RMSE) values in Table 5). The parameters of the model were distant from the actual limits observed, because pH_{min} and a_{wmin} values would only be determined from an infinite inoculation concentration. It was not possible to experimentally determine these absolute values of pH and sodium chloride concentration for high inoculation concentrations, whence insufficient data to make accurate estimations for the low probabilities.

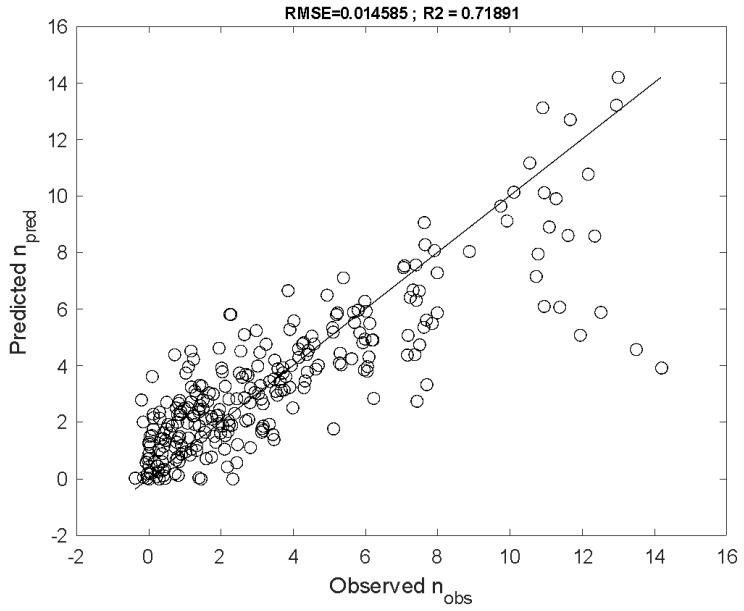


Figure 21: Comparison between observed (n_{obs}) and predicted (n_{pred}) decimal reduction numbers of *C. sporogenes* (isolates 1, 14 and 17) and non-toxigenic Group I *C. botulinum* (strain 34) and Group I *C. botulinum* (strain 41).

The growth probability of vegetative cells and the germination, outgrowth and growth probability of heat-treated spores was established. Contour plot for the non-toxigenic Group I C. botulinum strain 34 is shown in Figure 22 as an example. The interactions between pH and sodium chloride concentration, and so the probability of growth, are affected by these three physiological states. The growth range of the vegetative cells was greater than that of the spores, with a boundary at pH 4.5 and 6% sodium chloride for a probability of −8 log (Figure 22a). By contrast, for spores (heat-activated at 80 °C for 10 min), germination and outgrowth range decreased to pH 4.8 and 5% sodium chloride (Figure 22b). Spore germination and outgrowth range decreased even more as the intensity of the heat treatment increased (pH 5 and 3% of NaCl) (Figure 22c).

Similar results were observed for *C. sporogenes* strain 1 (PA 3679) and Group I *C. botulinum* strain 41 (Prevot 910) (see Supplementary Data Figure S1 and Figure S4). For Group I *C. botulinum* strain 41, only few data were acquired for spores (activated at 80 °C) so it was not possible to fit the model. However, the observed data also show an effect of heat treatment on the germination limits of the spores (see Supplementary Data, Table S6). For *C. sporogenes* strain 14, the effect of heat treatment was less marked than for the other isolates (Table 5). The probability of germination and outgrowth for spores

was slightly different between vegetative cells and spores (see Supplementary Data Figure S2). For the *C. sporogenes* strain 17, the effect of heat treatment between spores and heat-treated spores was less pronounced than for the other isolates. The probability of germination and outgrowth for the spores was not affected by the more intense heat treatment. However, the probability of growth was different between vegetative cells and spores (see Supplementary Data Figure S3). The effect of heat treatment on pH and sodium chloride concentration interactions and growth probabilities depended on isolates, but the same impacts of physiological state were observed.

Although the present dataset and derived models are extremely useful in helping to prevent the spoilage of ambient products by *C. sporogenes*, we note that food safety with respect to Group I *C. botulinum* will also require a demonstration that no botulinum neurotoxin is formed, as foodborne botulism is an intoxication.

Table 5: Estimation of the parameters of the probability model (Equation 12) for *C. sporogenes* (Isolates 1, 14 and 17) and Group I *C. botulinum* (Isolates 34 and 41).

Species	***C. sporogenes***									**Non-toxigenic Group I *C. botulinum***			**Group I *C. botulinum***		
Strain	**Strain 1[2]**			**Strain 14[3]**			**Strain 17[3]**			**Strain 34[3]**			**Strain 41[2]**		
		Spores			Spores			Spores			Spores			Spores	
Physiological state	Vegetative cells	80 °C 10 min	100 °C 1.5 min	Vegetative cells	80 °C 10 min	100 °C1.8 min	Vegetative cells	80 °C10 min	100 °C 1.7 min	Vegetative cells	80 °C 10 min	110 °C 1.46 min	Vegetative cells	80 °C 10 min	100 °C 4 min
pH_{min}	4.01	4.79	5.13	4.46	4.67	4.96	4.36	4.58	4.76	4.19	4.58	4.81	4.40	ND	5.25
CI lower[1]	3.77	4.70	4.96	4.37	4.33	4.91	4.27	4.44	4.64	3.75	4.43	4.73	4.26	ND	5.20
CI upper[1]	4.14	4.89	5.25	4.52	4.80	4.98	4.41	4.61	4.82	4.41	4.64	4.85	4.50	ND	5.29
a_{wmin}	0.944	0.951	0.966	0.950	0.960	0.968	0.958	0.957	0.967	0.956	0.964	0.973	0.947	ND	0.962
CI lower[1]	0.936	0.932	0.961	0.945	0.959	0.706	0.955	0.952	0.945	0.951	0.936	0.972	0.932	ND	0.576
CI upper[1]	0.948	0.957	0.969	0.952	0.961	0.976	0.959	0.959	0.972	0.960	0.971	0.974	0.949	ND	0.973
Number of data	50	24	12	20	15	10	21	17	14	18	14	13	20	18	11
a	10														
Π_0	0.937														
R^2	0.71														
RMSE	0.014														

[1]CI corresponding to 95% confidence intervals; [2] Strain 1 is *C. sporogenes* reference strain (PA 3679) and Strain 41 is Group I *C. botulinum* reference strain (Prevot 910); [3] Isolates 14 and 17 are *C. sporogenes* isolates and strain 34 is non-toxigenic Group I *C. botulinum* isolated from spoiled food.

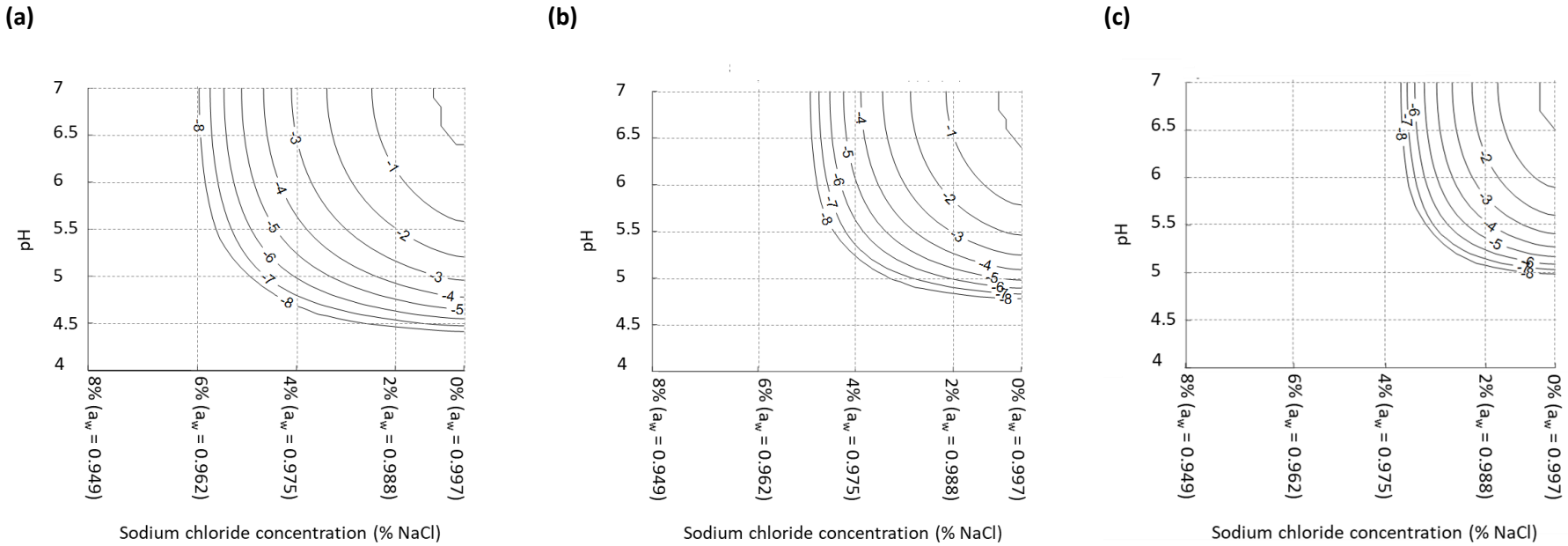


Figure 22: Contour plots (solid lines) showing the growth or recovery (including germination and outgrowth) probabilities of Group I *C. botulinum* strain 34 (a) vegetative cells, (b) spores, (c) heat-treated spores.

Each solid line represents the decimal reduction number obtained by stress during recovery.

6. Conclusion

Physiological and genetic parameters of *C. sporogenes* isolates (34 isolates isolated from spoiled food and three reference strains), non-toxigenic Group I *C. botulinum* (three isolates isolated from spoiled food) and reference strains of Group I *C. botulinum* (two reference strains) were studied. The growth limit as a function of pH and sodium chloride concentration and the spore heat resistance revealed a strong diversity within the two species. No relationship was observed between the physiological characteristics and the isolation matrix of the isolates. The genetic study revealed that three isolates isolated from spoiled canned food, initially identified as *C. sporogenes* isolates, belonged to Group I *C. botulinum*. No link was established between physiological characteristics and phylogeny. The ability of selected isolates to grow as vegetative cells or spores was assessed according to pH and NaCl concentration of the growth media. The process of germination of spores (germination, outgrowth and cell division into vegetative cells) was impacted by the pH, sodium chloride concentration and heat treatment.

One main result is the impact of pH and sodium chloride concentration on growth range, stronger for vegetative cells than for heat-treated spores. The growth/germination limits were strain-dependent and acted synergistically. In addition, the accumulated data on growth limits provide a better understanding of the behaviour of isolates, including isolates with extreme characteristics. The study of the heterogeneity of physiological and genetic characteristics allows a better assessment of the risks and helps prevent and/or minimise foodborne botulism outbreaks and canned food spoilage. In addition, the pH limit of industrial processes for acid or acidified pasteurised products stored at room temperature is currently 4.6. This pH limit is safe, based on the vegetative cell growth limits. If the recovery limits of heat-treated spores are taken into account, the pH limit for food formulation could be increased (e.g. 4.8–4.9). If the synergistic effect between food formulation and heat treatment on spore recovery is taken into account, acid canned food can be formulated up to pH 5 with 4% of salt. It is important to recognise that to ensure food safety with regard to Group I *C. botulinum*, establishing the synergistic factors also helps to avert the formation of botulinum neurotoxin. This type of synergistic action is already considered for the control of *Listeria monocytogenes* (“Règlement (CE) N°2073/2005 de la Commission,” 2005).

7. Acknowledgements

This work is part of the Safood project financed by the Association Française Interprofessionnel de l'Olive (France Olive). We thank the partners for their contributions and cooperation, Jean-Christophe Augustin (ENVa/Danone) for useful advice on the PhD committee of E. Boix. E. Boix received PhD funding from the Association Nationale de la Recherche et de la Technologie (ANRT) (CIFRE No. 2017/1608).

8. References

ANSES, 2019. Fiche de description de danger biologique transmissible par les aliments/ Clostridium botulinum, Clostridium neurotoxinogènes.

Augustin, J.C., Zuliani, V., Cornu, M., Guillier, L., 2005. Growth rate and growth probability of Listeria monocytogenes in dairy, meat and seafood products in suboptimal conditions. J. Appl. Microbiol. 99, 1019–1042. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02710.x

Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A.A., Dvorkin, M., Kulikov, A.S., Lesin, V.M., Nikolenko, S.I., Pham, S., Prjibelski, A.D., Pyshkin, A. V., Sirotkin, A. V., Vyahhi, N., Tesler, G., Alekseyev, M.A., Pevzner, P.A., 2012. SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing. J. Comput. Biol. 19, 455–477. https://doi.org/10.1089/cmb.2012.0021

Basaran-Akgul, N., 2013. Comparative study of thermal kinetics for Clostridium sporogenes PA 3679 inactivation using glass capillary tube and aluminum tube methods in carrot juice and phosphate buffer. J. Pure Appl. Microbiol. 7, 117–124.

Bigelow, W.. D.., 1921. The Logarithmic Nature of Thermal Death Time Curves. Oxford Univ. Press 29, 528–536.

Boix, E., Couvert, O., André, S., Coroller, L., 2021. The synergic interaction between environmental factors (pH and NaCl) and the physiological state (vegetative cells and spores) provides new possibilities for optimizing processes to manage risk of C. sporogenes spoilage. Food Microbiol. 100, 103832. https://doi.org/10.1016/j.fm.2021.103832

Bradbury, M., Greenfield, P., Midgley, D., Li, D., Tran-Dinh, N., Vriesekoop, F., Brown, J.L., 2012. Draft genome sequence of Clostridium sporogenes PA 3679, the common nontoxigenic surrogate for proteolytic Clostridium botulinum. J. Bacteriol. 194, 1631–2. https://doi.org/10.1128/JB.06765-11

Bradshaw, M., Marshall, K.M., Heap, J.T., Tepp, W.H., Minton, N.P., Johnson, E.A., 2010. Construction of a Nontoxigenic Clostridium botulinum Strain for Food Challenge Studies. Appl. Environ. Microbiol. 76, 387–393. https://doi.org/10.1128/AEM.02005-09

Brown, J.L., Tran-Dinh, N., Chapman, B., 2012. Clostridium sporogenes PA 3679 and Its Uses in the Derivation of Thermal Processing Schedules for Low-Acid Shelf-Stable Foods and as a Research Model for Proteolytic Clostridium botulinum. J. Food Prot. 75, 779–792.

https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-11-391

Brunt, J., van Vliet, A.H.M., Carter, A.T., Stringer, S.C., Amar, C., Grant, K.A., Godbole, G., Peck, M.W., 2020. Diversity of the Genomes and Neurotoxins of Strains of Clostridium botulinum Group I and Clostridium sporogenes Associated with Foodborne, Infant and Wound Botulism. Toxins (Basel). 12, 586. https://doi.org/10.3390/toxins12090586

Butler, R.R., Schill, K.M., Wang, Y., Pombert, J.F., 2017. Genetic characterization of the exceptionally high heat resistance of the non-toxic surrogate Clostridium sporogenes PA 3679. Front. Microbiol. 8, 1–11. https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00545

CTCPA, DGAL/SDSSA, 2015. Note conjointe de la DGCCRF et de la DGAL relative aux conditions hygiéniques et sanitaires de production et de mise sur le marché de produits végétaux ou animaux appertisés (produits à base de viande et produits de la pêche) et aux modalités de contrôle.

den Besten, H.M.W., Wells-Bennik, M.H.J., Zwietering, M.H., 2018. Natural Diversity in Heat Resistance of Bacteria and Bacterial Spores: Impact on Food Safety and Quality. Annu. Rev. Food Sci. Technol. 9, 383–410. https://doi.org/10.1146/annurev-food-030117-012808

Diao, M.M., André, S., Membré, J.M., 2014. Meta-analysis of D-values of proteolytic clostridium botulinum and its surrogate strain Clostridium sporogenes PA 3679. Int. J. Food Microbiol. 174, 23–30. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.12.029

DSMZ, 2020. DSMZ 104. PYG Medium (modified) [WWW Document]. URL https://www.dsmz.de/microorganisms/medium/pdf/DSMZ_Medium104.pdf

Efron, B., Tibshirani, R.J., 1993. An introduction to the bootstrap. Monograph. New York, NY.

Esty, J.R., Meyer, K.F., 1922. The heat resistance of the spores of B. botulinus and allied anaerobes. XI. J. Infect. Dis. 31, 650–663. https://doi.org/10.1093/infdis/31.6.650

FDA, GMA, 2010. Draft Guidance for Industry: Acidified Foods.

Fridman, O., 2020. Most Probable Number (MPN) [WWW Document]. MATLAB Cent. File Exch. URL https://www.mathworks.com/matlabcentral/fileexchange/22545-most-probable-number-mpn

Gurevich, A., Saveliev, V., Vyahhi, N., Tesler, G., 2013. QUAST: Quality assessment tool for genome assemblies. Bioinformatics 29, 1072–1075. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt086

Hauschild, A.H.W., 1993. Clostridium Botulinum : Ecology and Control in Foods Food Science and Technology (Marcel Dekker, Inc.) ; 54. CRC Press.

Le Marc, Y., 2001. Développement d'un modèle modulaire décrivant l'effet des interaction entre les facteurs environnementaux sur les aptitutdes de croissance de Listeria. Université de Bretagne Occidentale.

Lê, S., Josse, J., Husson, F., 2008. FactoMineR : An R Package for Multivariate Analysis. J. Stat. Softw. 25, 1–18. https://doi.org/10.18637/jss.v025.i01

Mazuet, C., Legeay, C., Sautereau, J., Ma, L., Bouchier, C., Bouvet, P., Popoff, M.R., 2016. Diversity of group i and II clostridium botulinum strains from France including recently identified subtypes. Genome Biol. Evol. 8, 1643–1660. https://doi.org/10.1093/gbe/evw101

Nawrocki, E.M., Bradshaw, M., Johnson, E.A., 2018. Botulinum neurotoxin – encoding plasmids can be conjugatively transferred to diverse clostridial strains. Sci. Rep. 1–11. https://doi.org/10.1038/s41598-018-21342-9

Odlaug, T.E., Pflug, I.J., 1978. Clostridium botulinum and Acid Foods. J. Food Prot. 41, 566–573. https://doi.org/10.4315/0362-028X-41.7.566

Peck, M., Smith, T., Anniballi, F., Austin, J., Bano, L., Bradshaw, M., Cuervo, P., Cheng, L., Derman, Y., Dorner, B., Fisher, A., Hill, K., Kalb, S., Korkeala, H., Lindström, M., Lista, F., Lúquez, C., Mazuet, C., Pirazzini, M., Popoff, M., Rossetto, O., Rummel, A., Sesardic, D., Singh, B., Stringer, S., 2017. Historical Perspectives and Guidelines for Botulinum Neurotoxin Subtype Nomenclature. Toxins (Basel). 9, 38. https://doi.org/10.3390/toxins9010038

Peck, M.W., 2009. Biology and Genomic Analysis of Clostridium botulinum, Advances in Microbial Physiology. Elsevier. https://doi.org/10.1016/S0065-2911(09)05503-9

Peck, M.W., van Vliet, A.H., 2016. Impact of Clostridium botulinum genomic diversity on food safety. Curr. Opin. Food Sci. 10, 52–59. https://doi.org/10.1016/j.cofs.2016.09.006

Pightling, A.W., Pettengill, J.B., Luo, Y., Baugher, J.D., Rand, H., Strain, E., 2018. Interpreting whole-genome sequence analyses of foodborne bacteria for regulatory applications and outbreak investigations. Front. Microbiol. 9, 1–13. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01482

Pouillot, R., Delignette-Muller, M.L., 2010. Evaluating variability and uncertainty separately in microbial quantitative risk assessment using two R packages. Int. J. Food Microbiol. 142, 330–

340. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.07.011

Rasetti-Escargueil, C., Lemichez, E., Popoff, M.R., 2020. Public Health Risk Associated with Botulism as Foodborne Zoonoses. Toxins (Basel). 12, 17. https://doi.org/10.3390/toxins12010017

Règlement (CE) N°2073/2005 de la Commission [WWW Document], 2005. . J. Off. l'Union Eur. URL http://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/PDF/?uri=CELEX:32005R2073&from=FR

Roberts, T.A., Ingram, M., 1973. Inhibition of growth of Cl. botulinum at different pH values by sodium chloride and sodium nitrite. Int. J. Food Sci. Technol. 8, 467–475. https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1973.tb01734.x

Rosso, L., Lobry, J.R., Bajard, S., Flandrois, J.P., 1995. Convenient Model To Describe the Combined Effects of Temperature and pH on Microbial Growth. Appl. Environ. Microbiol. 61, 610–616. https://doi.org/10.1128/AEM.61.2.610-616.1995

Rosso, L., Lobry, J.R., Flandrois, J.P., 1993. An Unexpected Correlation between Cardinal Temperatures of Microbial Growth Highlighted by a New Model. J. Theor. Biol. 162, 447–463. https://doi.org/10.1006/jtbi.1993.1099

Russell, N.J., Gould, G.W., 2003. Food Preservatives, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York. Springer US, Boston, MA. https://doi.org/10.1007/978-0-387-30042-9

Schill, K.M., Wang, Y., Butler, R.R., Pombert, J.-F., Reddy, N.R., Skinner, G.E., Larkin, J.W., 2016. Genetic diversity of Clostridium sporogenes PA 3679 isolates obtained from different sources as resolved by pulsed-field gel electrophoresis and high-throughput sequencing. Appl. Environ. Microbiol. 82, 384–393. https://doi.org/10.1128/AEM.02616-15

Townsend, C.T., Yee, L., Mercer, W.A., 1954. Inhibition of the growth of Clostridium botulinum by acidification. J. Food Sci. 19, 536–542. https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1954.tb17486.x

Treangen, T.J., Ondov, B.D., Koren, S., Phillippy, A.M., 2014. The Harvest suite for rapid core-genome alignment and visualization of thousands of intraspecific microbial genomes. Genome Biol. 15, 524. https://doi.org/10.1186/s13059-014-0524-x

Weigand, M.R., Pena-Gonzalez, A., Shirey, T.B., Broeker, R.G., Ishaq, M.K., Konstantinidis, K.T., Raphael, B.H., 2015. Implications of genome-based discrimination between Clostridium botulinum group I and Clostridium sporogenes strains for bacterial taxonomy. Appl. Environ. Microbiol. 81, 5420–5429. https://doi.org/10.1128/AEM.01159-15

Zwietering, M.H., Wijtzes, T., De Wit, J.C., Van't Riet, K., 1992. A Decision Support System for Prediction of the Microbial Spoilage in Foods. J. Food Prot. 55, 973–979.

CHAPITRE 4

CARACTERISATION DES PARAMETRES PHYSICO-CHIMIQUES DES PRODUITS A BASE D'OLIVES TRAITES THERMIQUEMENT

Dans le chapitre précédent (Chapitre 3), nous avons observé l'effet synergique des facteurs environnementaux (pH et concentration en chlorure de sodium) après un traitement thermique de faible intensité sur la probabilité de germination et de croissance des spores de *C. sporogenes* et *C. botulinum* groupe I. Cette synergie peut être retrouvée dans certains produits, tels que les produits à base d'olives traités thermiquement. En effet, la particularité physico-chimique de ces produits associée à un faible traitement thermique suggère une stabilité microbiologique à température ambiante et donc une inhibition de *C. botulinum* groupe I.

L'objectif général de ce chapitre était de caractériser les paramètres physico-chimiques des produits à base d'olives traités thermiquement pour prévoir la croissance et/ou la germination/croissance des spores de *C. sporogenes* et *C. botulinum* groupe I dans ces produits.

Dans ce chapitre, un échantillonnage de 90 produits a été obtenu avec l'aide de France Olive pour réaliser des analyses physico-chimiques telles que la mesure du pH, de la concentration en chlorure de sodium, la teneur en acide gras et en polyphénols….

1. Introduction

Les produits à base d'olives telles que les tapenades sont de plus en plus consommées lors des apéritifs (AFIDOL, 2015a, 2014, 2012, 2008). En France, la consommation d'olives de table représente environ 70 000 tonnes par an. La production d'olives de table et d'huile d'olive est concentrée au niveau du bassin Méditerranéen. La fermentation constitue une des plus importantes étapes dans le processus des olives de table permettant leurs consommations et leurs conservations (Anagnostopoulos et al., 2020; Botta and Cocolin, 2012; Heperkan, 2013; Hurtado et al., 2012; Perpetuini et al., 2020). Les produits à base d'olives ont des caractéristiques physico-chimiques qui permettent de contrôler *C. sporogenes* et *C. botulinum* groupe I. Mais, ces caractéristiques sont peu détaillées dans la littérature (pH entre 4,0 et 4,3, concentration en NaCl entre 4 et 10 % de NaCl) et sont choisies par le fabricant dans la majorité des cas (International Olive Oil Council, 2004). Les caractéristiques particulières (pH acide et forte concentration en NaCl) ainsi que la faible contamination du produit montrent un risque faible de présence de la toxine botulique dans ces produits. Cependant, plusieurs cas de botulisme alimentaire liés à la consommation de ces produits ont été recensées (*ex :* 2011, 8 cas de botulisme alimentaire après la consommation de tapenade verte aux amandes). La contamination des produits à base d'olives peut être due à une contamination de la surface des olives lors de la récolte et à une mauvaise hygiène (personnel ou matériel) (pré-process) ou post-process (défaut d'emballage ou de traitement thermique ou de formulation).

En outre, la variété (cultivars) d'olives, la saison de la récolte, l'acidité choisie pendant les processus de production, ont un impact sur les caractéristiques physico-chimiques du produit final et sur le contrôle de *C. sporogenes* et *C. botulinum* groupe I.

Dans ces produits de nombreuses questions subsistent telles que : les paramètres physico-chimiques impactent-ils la croissance de *C. sporogenes* et *C. botulinum* groupe I, si oui dans quelle mesure ? Est-ce que les facteurs pH et concentration en NaCl agissent séparément ou bien en synergie ? Quelles sont les caractéristiques physico-chimiques de ces produits traités thermiquement et conservés à température ambiante retrouvées en France ?

Pour recueillir les caractéristiques physico-chimiques de la matrice, le plan expérimental est basé sur une étude de 5 paramètres sur 7 catégories de produits. Cette étude a été réalisée en partenariat avec France Olive.

2. Matériel et Méthodes

2.1 Catégories de produits à base d'olives traités thermiquement

France Olive (Afidol) a réalisé un échantillonnage de 91 produits à bases d'olives traités thermiquement issus de 22 producteurs (Tableau 19). Tous les produits sont conditionnés dans des pots en verre ou en plastique de différentes contenances (de 90 à 200g), et sont commercialisés à température ambiante après un faible traitement thermique.

Tableau 19 : Nombre d'échantillons par catégorie de produits à base d'olives.

Catégories de produits	Nombre d'échantillons[2]	Nombre de producteurs[3]
Tapenades noires	14	14
Tapenades vertes	10	10
Pâtes d'olives	11	11
Pâtes d'olives de Nice (AOP)	8	8
Olivades (confit, régalade, crème, purée)	15	15
Olives vertes[1]	20	18
Olives vertes en saumure	7	4
Olives noires[1]	13	6
Olives noires en saumure	19	5

[1]Olives conservées sans saumure dans des sachets doypack ; [2]Nombre d'échantillons par catégorie de produits ; [3]Nombre de producteurs par catégorie de produits

2.2 Paramètres physico-chimiques mesurés

- Mesure du pH

La mesure du pH dans les produits dérivés de fruits et légumes suit la norme NF ISO 1842 : 1992 (ISO, 1993). Brièvement, le pH a été mesuré à température ambiante (20 °C), après étalonnage de l'appareil avec les solutions étalons (pH 2,00, pH 4,01 et pH 7,00). L'efficacité de l'étalonnage est vérifiée par le coefficient de corrélation (R^2), dont la valeur doit être supérieure à 97 %. Le pH a été mesuré dans les saumures des olives vertes et noires. Pour les olives entières, 20 mL d'eau distillée ont été ajoutés dans 100 g. Le pH a été mesuré au centre du pot après ré-homogénéisation des pâtes d'olives et des tapenades.

- Mesure de l'activité de l'eau

La mesure de l'a_w a été réalisée suivant la norme ISO 18787 : 2017 (ISO, 2017). L'a_w-mètre (AquaLab, METER Group, Dardilly, France) a été étalonné avec des solutions salines étalons de 0,8 ; 0,9 et 0,98 a_w, puis les échantillons ont été analysés à température ambiante (25 °C).

- Détermination de la teneur en NaCl (NaCl)

La détermination de la teneur en NaCl a été réalisée selon la norme ISO 9297 qui utilise la méthode de Mohr de dosage des chlorures (ISO, 1989). Le dosage potentiométrique par mesure de pH correspond à la différence de potentiel entre une électrode en platine et l'échantillon à doser. 5 g d'échantillon ont été pesés et un volume de nitrate d'argent ($AgN0_3$: 0,1 M) a été ajouté pour déterminer le point d'équivalence. La teneur en NaCl a été mesurée à partir de l'a_w et la teneur a été aussi déterminée sur la fraction dégraissée (Équation 3 et Équation 4).

$$[Cl] = \frac{(V_{eq} - V_{blanc}) \times C_{AgNO_3} \times MM_{Cl} \times 100}{m_{pesée}}$$

$$[NaCl] = \frac{MM_{NaCl} \times [Cl]}{MM_{Cl}}$$

Équation 3 : Teneur en NaCl.

V_{eq} est le volume (L) ajouté à équivalence de $AgNO_3$ (0,1 M) pour doser l'échantillon ; V_{blanc} correspond au volume (L) a l'équivalence de $AgNO_3$ (0,1 M) pour doser l'eau distillée ; $m_{pesée}$ est la masse (g) de l'échantillon ; C_{AgNO3} est la concentration molaire (mol/L) de la solution de nitrate d'argent ; MM_{Cl} est la masse molaire (g/mol) du chlorure ; MM_{NaCl} est la masse molaire du chlorure de sodium (g/mol) ; [Cl] est la concentration de l'ion chlorure (g/100g) et [NaCl] est la concentration en NaCl (g/100g).

$$[NaCl]_{fraction\ dégraissée} = \frac{[NaCl] \times 100}{100 - [MG]}$$

Équation 4 : Teneur en NaCl dans la fraction dégraissée.

[MG] est la concentration en matière grasse de l'échantillon (g/100 g) et $[NaCl]_{fraction\ dégraissée}$ est la concentration en NaCl de l'échantillon sur la fraction dégraissée (g/ 100 g).

- Détermination de la teneur en polyphénols totaux

La détermination de la teneur en polyphénols totaux utilise le principe du dosage de Folin (Georgé et al., 2005). L'oxydation des phénols avec le réactif de Folin-Ciocalteu (acide phosphotungstique et acide phosphomolybdique) donne un mélange d'oxydes bleus de tungstène et molybdène (l'absorption maximum est de 760 nm) est proportionnelle à la concentration en polyphénols. En raison, de la présence d'interférences dans les échantillons (vitamine C, tyrosine, sucres réducteurs) faussant l'absorbance, la mesure a été réalisée sur l'extrait brut (polyphénols totaux et interférents) et l'extrait filtré (polyphénols seuls). L'échantillon a été filtré sur une cartouche Solid Phase Extraction (SPE) ayant le rôle d'une chromatographie par adsorption. La teneur en polyphénol a été déterminée à l'aide de l'Équation 5 :

$$[PPT] = [PPT]_{interférence} - [Interférence]$$

$$[PPT]_{interférence} = \frac{DO_{760} \times V_{ex} \times 100}{p \times 1000 \times m_{pesée}}$$

$$[Interférence] = \frac{DO'_{760} \times V_{ex} \times 100 \times d}{p \times 1000 \times m_{pesée}}$$

Équation 5 : Teneur en polyphénols totaux.

DO_{760} est la densité optique de l'extrait brut (760 nm) ; DO'_{760} est la densité optique de l'extrait filtré (760 nm) ; V_{ex} est la volume (mL) du mélange HCl/Acétone utilisé pour l'extraction ; p est la pente de la droite d'étalonnage de l'acide gallique ; $m_{pesée}$ est la masse (g) de l'échantillon pesé ; d est le facteur de dilution ; [PPT] est la concentration en polyphénols totaux de l'échantillon (mg/100 g) ; $[PPT]_{interférence}$ est la concentration en polyphénols interférente de l'échantillon (mg/100 g) et [Interférence] est la concentration en interférence de l'échantillon (mg/100 g).

- Détermination de la teneur en acide gras

L'analyse est réalisée selon la méthode interne dérivée du Journal Officiel du 03/11/1977 (laboratoire partenaire). Succinctement, la teneur en acides gras a été déterminée par hydrolyse à chaud à l'aide d'acide chlorhydrique (HCl). L'extraction de la matière grasse a été réalisée à l'éther de pétrole par l'extracteur Soxhlet. Enfin, la différence de masse a permis de déterminer la teneur en acides gras.

2.3 Analyse statistique

Les données physico-chimiques des produits à base d'olives traités thermiquement conservés à température ambiante ont été analysées suivant la méthode de la boîte à moustache sur Excel.

3. Résultats

3.1 Mesure de pH

Les mesures de pH dans les échantillons ont montré un pH proche de 4,5 pour tous les produits sauf pour les olives vertes où le pH est supérieur à 4,6 pour 75 % des échantillons. Les produits du types tapenades, olivades, pâtes d'olives ont des pH nettement plus acides. Au moins un produit dans chaque catégorie présente un pH supérieur à 4,6, notamment pour les olives noires, dont les olives noires à la grecque avec un pH allant jusqu'à 6,2 (Figure 23 ; Tableau 20). Lorsque le pH médian a été mesuré dans la saumure, celui-ci est de 4,56 et 4,75 pour les olives noires et vertes respectivement. Le pH maximal de la saumure de certaines olives noires (pH 4,73) ou vertes (pH 5,49) est très largement supérieur à pH 4,6 (Figure 24 ; Tableau 21).

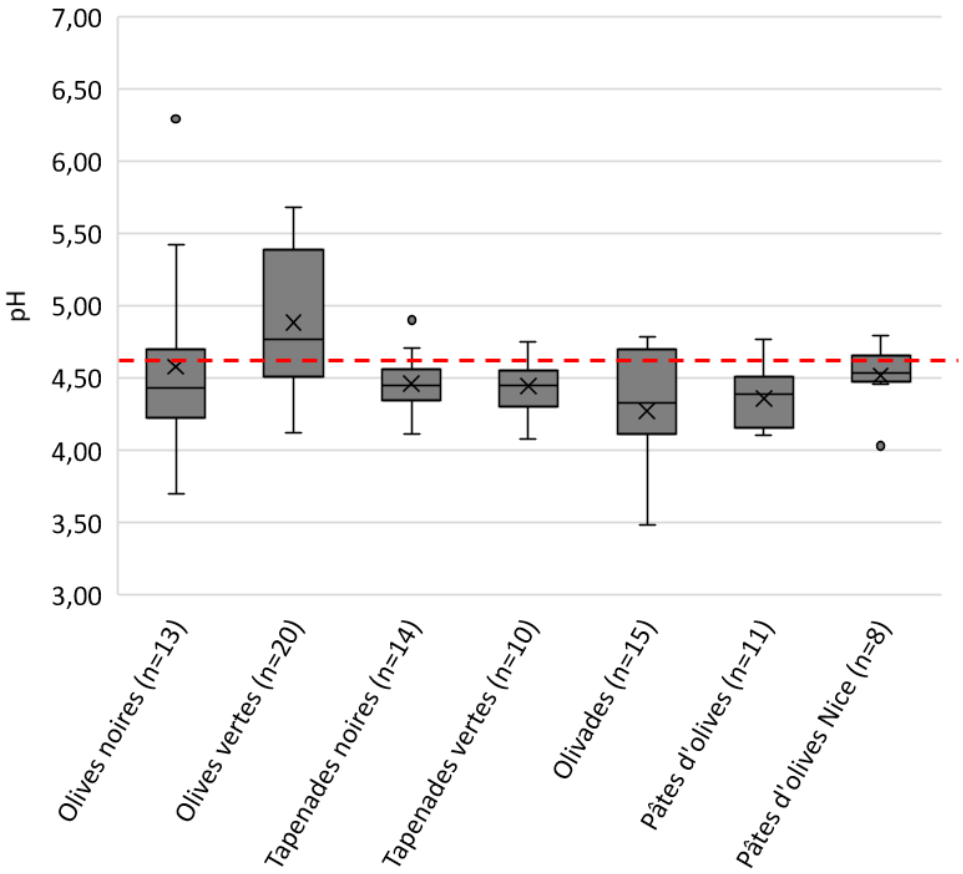


Figure 23 : Variabilité du pH des produits à base d'olives traités thermiquement.

La ligne en pointillés rouge indique la limite extrême de croissance de *C. botulinum* groupe I (pH 4,6).

Tableau 20 : Description de la distribution des valeurs de pH des produits à base d'olives traités thermiquement.

Statistiques	Olives noires	Olives vertes	Tapenades noires	Tapenades vertes	Olivades	Pâtes d'olives	Pâtes d'olives Nice
Minimum	3,70	4,12	4,11	4,08	3,48	4,10	4,03
Maximum	6,29	5,68	4,90	4,75	4,78	4,77	4,79
1er Quartile	4,29	4,54	4,38	4,34	4,17	4,19	4,50
Médiane	4,53	4,77	4,45	4,45	4,33	4,39	4,54
3ème Quartile	4,75	5,32	4,55	4,49	4,53	4,52	4,63
Moyenne	4,63	4,88	4,46	4,38	4,28	4,37	4,52
Ecart-type	0,47	0,47	0,20	0,30	0,39	0,20	0,21

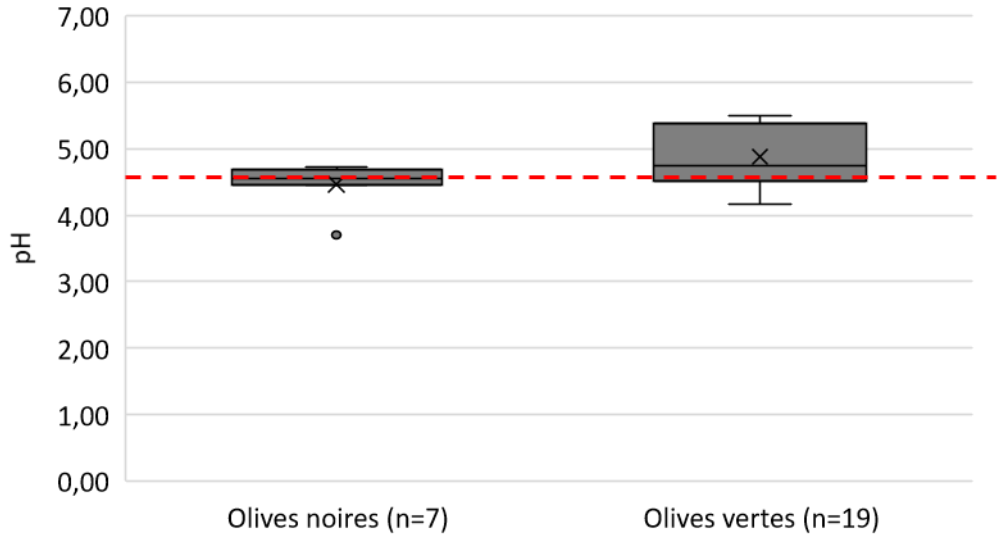


Figure 24 : Variabilité du pH des saumures des olives noires et vertes.

La ligne en pointillés rouge indique la limite extrême de croissance de *C. botulinum* groupe I (pH 4,6).

Tableau 21 : Description de la distribution des valeurs pH des produits à base d'olives traités thermiquement.

Statistiques	Olives noires	Olive vertes
Minimum	3,70	4,16
Maximum	4,73	5,49
1er Quartile	4,45	4,55
Médiane	4,56	4,75
3ème Quartile	4,67	5,30
Moyenne	4,46	4,88
Ecart-type	0,33	0,43

3.2 Mesure de l'activité de l'eau

Pour les tapenades noires, les olivades, les pâtes d'olives et les pâtes d'olives de Nice, 25 % de ces produits ont une activité de l'eau comprise entre 0,98 et 0,94. Parmi les 13 échantillons d'olives noires, 25 % ont une activité de l'eau inférieure à la limite de croissance de *C. botulinum* groupe I (a_w : 0,94) (Peck, 2009). L'activité de l'eau des olives vertes et des tapenades vertes est largement supérieure à la limite de croissance. En effet, 75 % des échantillons ont une a_w de 0,98 avec un maximum de 0,986 et 0,985 pour les olives vertes et les tapenades vertes respectivement. Par ailleurs, les échantillons d'olivade montrent une a_w très variable (écart-type de 0,035) avec un minimum de 0,870 et un maximum de 0,985. 25 % des olivades ont une a_w moyenne (0,95) pour cette catégorie de produit (Figure 25 ; Tableau 22). Les olivades présentent une activité de l'eau très variable en raison de la diversité des recettes produites.

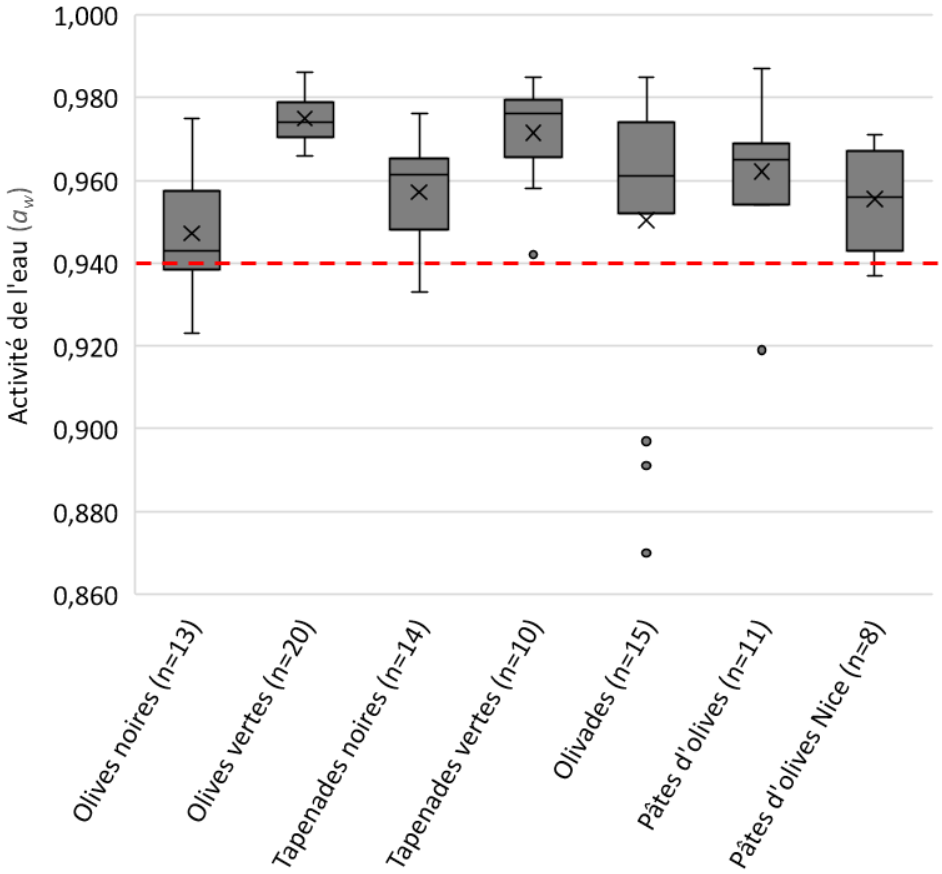


Figure 25 : Variabilité de l'activité de l'eau (a_w) dans les produits à base d'olives traités thermiquement.

La ligne en pointillés rouge indique la limite extrême de croissance de *C. botulinum* groupe I (a_w : 0,94).

Tableau 22 : Description de la distribution des valeurs d'activité de l'eau (a_w) des produits à base d'olives traités thermiquement.

Statistiques	Olives noires	Olives vertes	Tapenades noires	Tapenades vertes	Olivades	Pâtes d'olives	Pâtes d'olives Nice
Minimum	0,923	0,966	0,933	0,942	0,870	0,919	0,937
Maximum	0,975	0,986	0,976	0,985	0,985	0,987	0,971
1er Quartile	0,939	0,972	0,952	0,969	0,953	0,955	0,951
Médiane	0,969	0,974	0,962	0,976	0,962	0,963	0,956
3ème Quartile	0,975	0,976	0,965	0,979	0,970	0,968	0,963
Moyenne	0,964	0,975	0,957	0,959	0,952	0,962	0,956
Ecart-type	0,016	0,005	0,012	0,024	0,033	0,017	0,012

3.3 Mesure de la concentration en chlorure de sodium

L'activité de l'eau est contrôlée par l'ajout de sucres solubles (glucose, sucrose, etc.) ou l'ajout de NaCl (chlorure de sodium, NaCl). Dans les produits à base d'olives l'ajout de NaCl a deux fonctions, une fonction de désamérisation de l'olive par la saumure (mélange d'eau et de NaCl) et une fonction d'inhibition de la croissance bactérienne notamment *C. botulinum* groupe I dont la limite de croissance est de 10 % NaCl (a_w : 0.94) (Peck, 2009). Trois teneurs en NaCl ont été déterminées :

- Teneur en NaCl du produit,
- Teneur en NaCl de la saumure,
- Teneur en NaCl de la fraction dégraissée du produit (le NaCl n'étant pas soluble dans la fraction lipidique).

La teneur en NaCl est très inférieure à 10 % (limite de croissance pour *C. botulinum* groupe I) pour tous les produits à base d'olives traités thermiquement. 25 % des tapenades vertes, olivades et pâtes d'olives, présentent des teneurs en NaCl proches de 2 %. Les pâtes d'olives montrent une grande variabilité de presque 1 % vis-à-vis de la teneur en NaCl (a_w : 0,956) (Figure 26 ; Tableau 23). 75 % des olives noires ont une teneur en NaCl de 4,1 %, en lien avec le processus de fabrication par l'ajout de NaCl (8 à 12 %) (AFIDOL and FEDALIM, 2018).

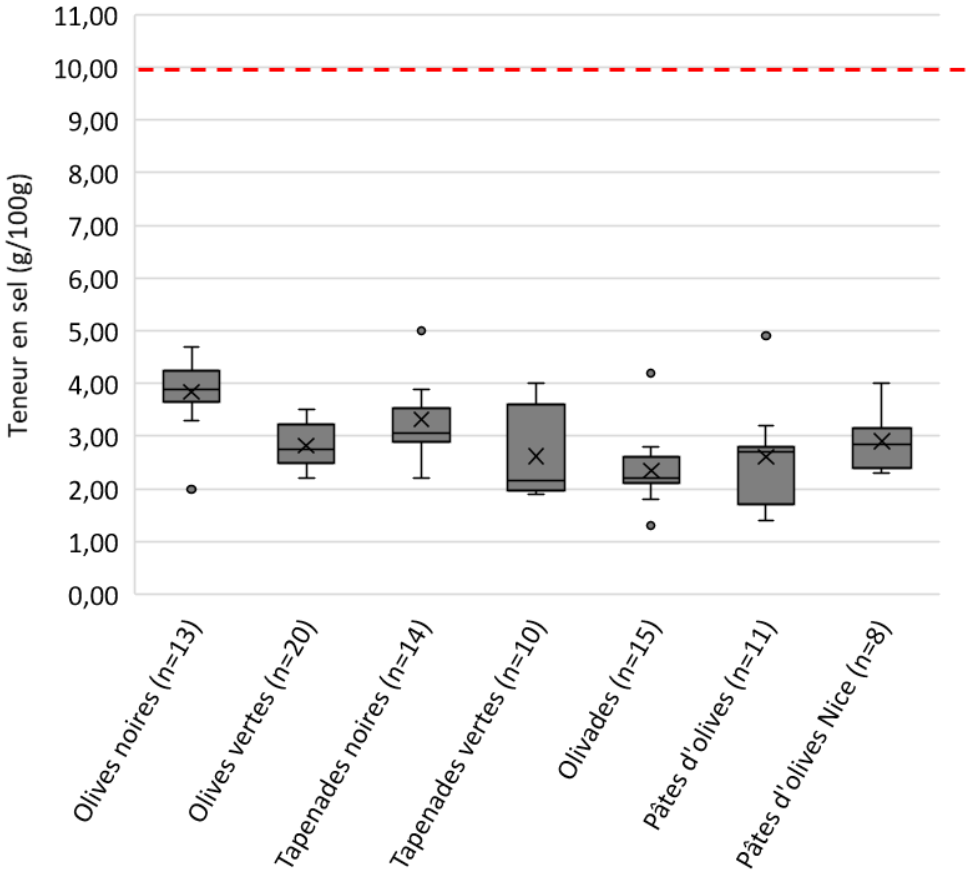


Figure 26 : Variabilité de la teneur en chlorure de sodium dans les produits à base d'olives traités thermiquement (produit).

La ligne en pointillés rouge indique la limite extrême de croissance de *C. botulinum* groupe I (10 % NaCl).

Tableau 23 : Description de la distribution de la teneur en chlorure de sodium des produits à base d'olives traités thermiquement (produits).

Statistiques	Olives noires	Olives vertes	Tapenades noires	Tapenades vertes	Olivades	Pâtes d'olives	Pâtes d'olives Nice
Minimum	2,00	2,20	2,20	1,90	1,30	1,40	2,30
Maximum	4,70	3,50	5,10	4,00	4,20	4,90	4,00
1er Quartile	3,70	2,50	2,90	2,00	2,10	2,23	2,60
Médiane	3,00	2,75	3,05	2,15	2,25	2,70	2,85
3ème Quartile	3,68	3,08	3,38	3,30	2,63	2,85	3,05
Moyenne	3,12	2,83	3,31	2,58	2,38	2,64	2,90
Ecart-type	0,80	0,38	0,80	0,76	0,61	0,88	0,51

Pour les produits types « olives noires et vertes entières », la teneur en NaCl a été mesurée dans les saumures de couverture. La saumure des olives noires a une teneur en NaCl de 7,8 % pour 75 % des échantillons. Pour les olives vertes, 75 % des produits ont une teneur en NaCl de 4 % dans la saumure (Figure 27 ; Tableau 24). Ces résultats sont en lien avec le mode de fabrication des olives en saumure à savoir une teneur en NaCl plus élevée pour les olives noires que pour les olives vertes. Cependant, la teneur en NaCl dans la saumure est largement supérieure à celle mesurée dans l'olive. En effet, la teneur moyenne en NaCl dans les olives noires et vertes est de 4 % et 3 %, respectivement (Figure 27 ; Tableau 24). Cette différence s'explique par l'osmose, le NaCl migre de la saumure vers la pulpe de l'olive. Or, la pulpe est riche en lipides où le NaCl n'est pas soluble, ce qui peut créer un biais dans la mesure de la concentration en NaCl. La mesure de la teneur en NaCl dans la fraction dégraissée du produit est celle à prendre en considération.

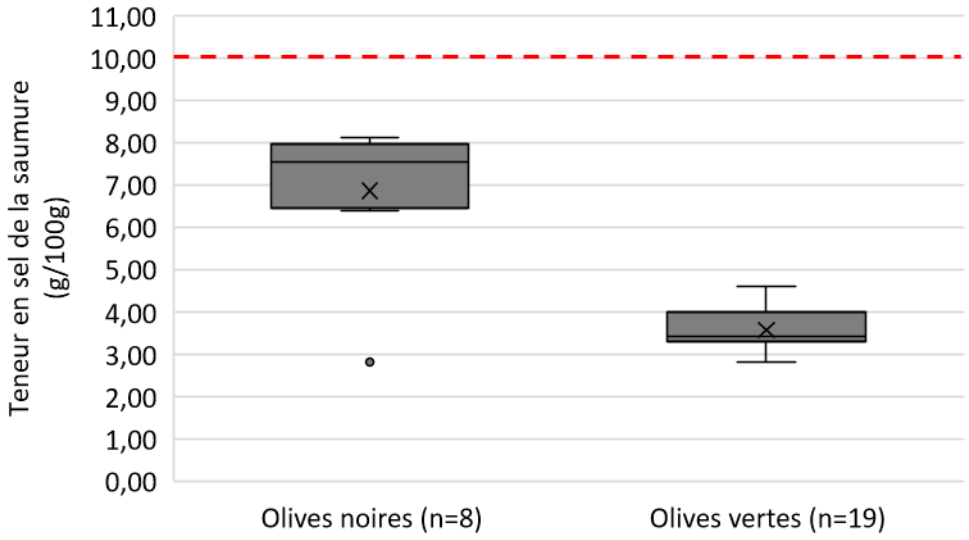


Figure 27 : Variabilité de la teneur en chlorure de sodium dans les produits à base d'olives traités thermiquement (saumure).

La ligne en pointillés rouge indique la limite extrême de croissance de *C. botulinum* groupe I (10 % NaCl).

Tableau 24 : Description de la distribution de la teneur en chlorure de sodium des produits à base d'olives traités thermiquement (saumure).

Statistiques	Olives noires	Olives vertes
Minimum	2,80	2,80
Maximum	8,10	4,60
1er Quartile	6,55	3,30
Médiane	7,55	3,40
3ème Quartile	7,85	3,95
Moyenne	6,85	3,56
Ecart-type	1,64	0,45

La teneur en NaCl dans la fraction dégraissée a été déterminée par calcul, en utilisant la teneur en matière grasse contenue dans le produit (Figure 28 ; Tableau 25). Tous les produits ont une teneur en NaCl inférieure à 10 % dans la fraction dégraissée, limite de croissance connue pour *C. botulinum* groupe I (Peck, 2009).

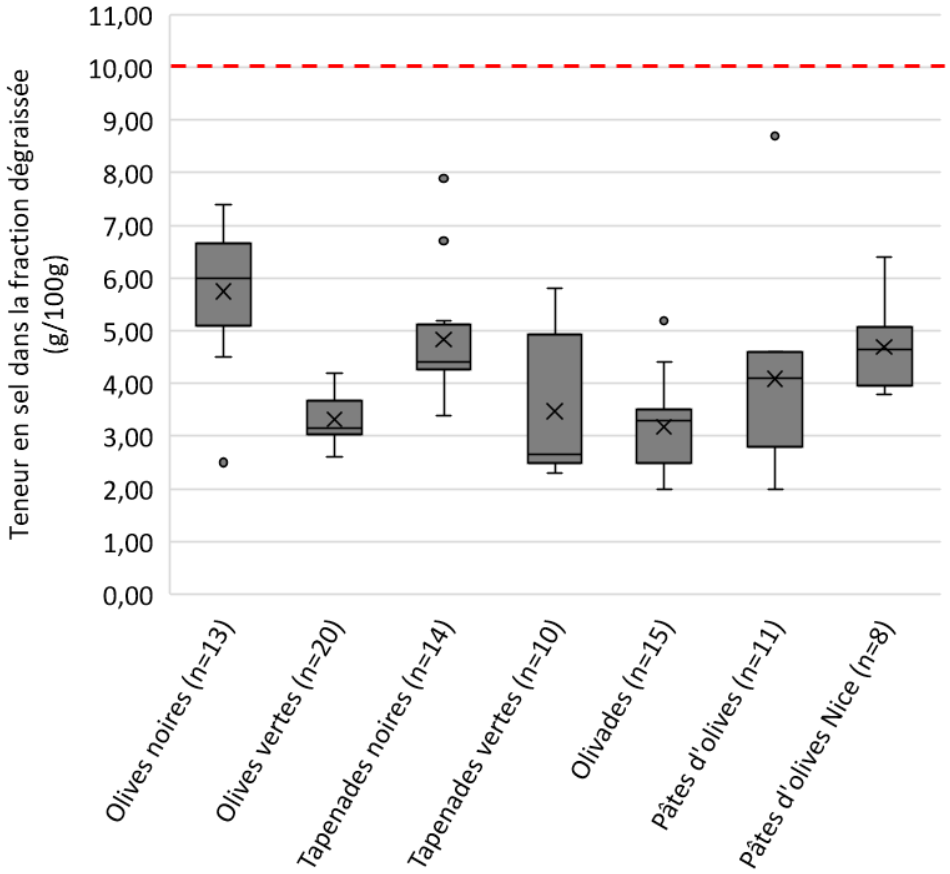


Figure 28 : Variabilité de la teneur en chlorure de sodium des produits à base d'olives traités thermiquement (fraction dégraissées).

La ligne en pointillés rouge indique la limite extrême de croissance de *C. botulinum* groupe I (10 % NaCl).

Tableau 25 : Description de la distribution de la teneur en chlorure de sodium des produits à base d'olives traités thermiquement (fraction dégraissée).

Statistiques	Olives noires	Olives vertes	Tapenades noires	Tapenades vertes	Olivades	Pâtes d'olives	Pâtes d'olives Nice
Minimum	2,50	2,60	3,40	2,30	2,00	2,00	3,80
Maximum	7,40	4,20	7,90	5,80	5,20	8,70	6,40
1er Quartile	5,50	3,08	4,30	2,50	2,55	3,25	4,05
Médiane	6,00	3,15	4,40	2,65	3,30	4,10	4,65
3ème Quartile	6,50	3,63	5,05	4,65	3,50	4,50	5,03
Moyenne	5,75	3,33	4,84	3,47	3,18	4,09	4,70
Ecart-type	1,22	0,44	1,13	1,25	0,84	1,69	0,79

Les olives vertes, tapenades vertes et olivades ont une teneur moyenne plus faible en NaCl dans la fraction dégraissée entre 3,3 à 3,1 %. Les olives noires ont la teneur en NaCl moyenne la plus élevée des produits avec une concentration de 5,7 %. Les tapenades noires et les pâtes d'olives de Nice ont des teneurs en NaCl moyenne de 4,8 à 4,6 %. Les pâtes d'olives de Nice ont une teneur en NaCl supérieure aux autres produits en raison des techniques d'élaboration. En effet, les olives de Nice sont des olives d'appellation d'origine protégée (AOP) et suivent un cahier des charges précis tel que la saumure de conservation qui doit être supérieure à 8 % en NaCl (AFIDOL and FEDALIM, 2018).

3.4 Mesure des polyphénols

Les composés phénoliques sont des métabolites secondaires présents dans les végétaux. Ces polyphénols sont composés d'un cycle aromatique portant des groupements hydroxyles (-OH) possédant une activité antimicrobienne. Les polyphénols amènent des modifications des membranes provoquant la formation de pores membranaires. Les produits de type olives noires, tapenades noires, olivades et pâtes d'olives de Nice présentent en moyenne des teneurs en polyphénols assez élevées (262 à 547 ppm). A l'inverse, les olives vertes et tapenade verte ont des valeurs moyennes en polyphénols plus faibles (74 à 183 ppm). De plus, pour une même catégorie de produits la variabilité entre échantillons est très importante (supérieure à 100 ppm) (Figure 29 ; Tableau 26).

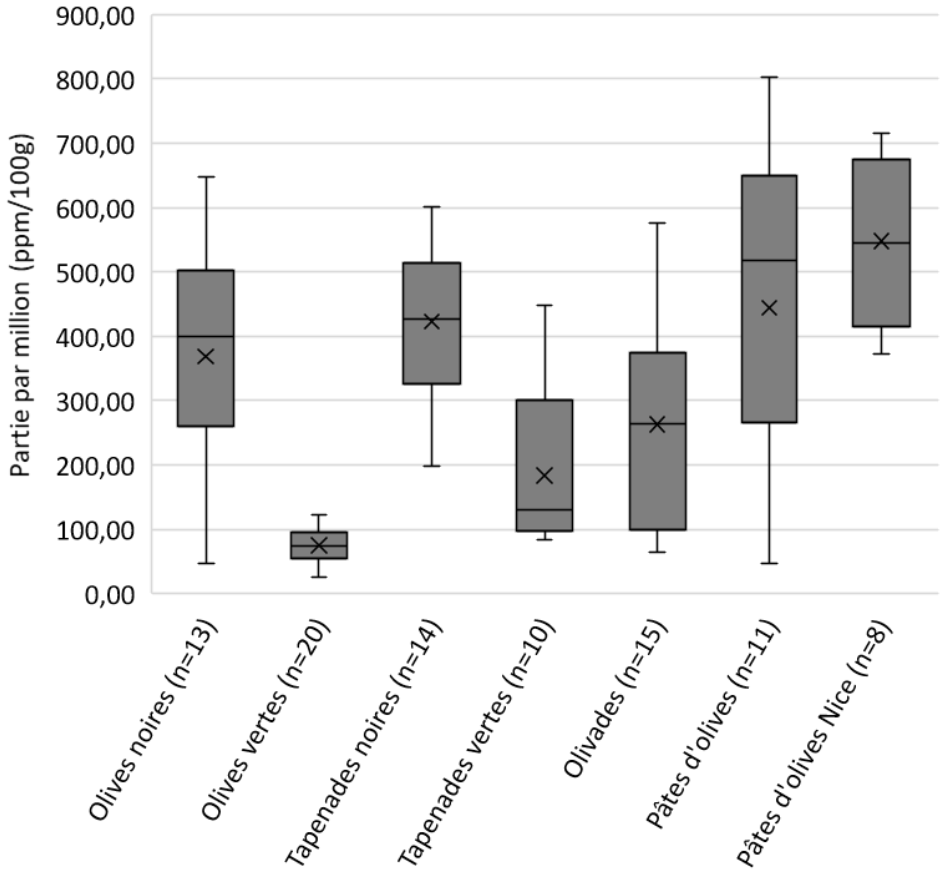


Figure 29 : Variabilité de la teneur en polyphénols dans les produits à base d'olives traités thermiquement.

Tableau 26 : Analyse statistique de la teneur en polyphénols sur les produits à base d'olives traités thermiquement.

Statistiques	Olives noires	Olives vertes	Tapenades noires	Tapenades vertes	Olivades	Pâtes d'olives	Pâtes d'olives Nice
Minimum	46,90	26,10	198,60	82,80	64,20	47,60	373,00
Maximum	648,50	123,00	600,40	447,50	576,80	803,10	715,90
1er Quartile	268,90	57,75	355,35	102,70	120,75	269,05	477,28
Médiane	163,65	74,10	426,90	129,85	265,30	525,05	544,95
3ème Quartile	414,08	91,20	497,55	257,68	346,68	599,13	636,03
Moyenne	243,69	74,78	422,51	341,79	262,73	451,44	547,80
Ecart-type	183,22	27,37	113,56	217,95	152,98	236,55	118,88

3.5 Mesure des acides gras

Les résultats de la mesure de la teneur en acide gras des produits à base d'olives sont présentés dans la Figure 30 et le Tableau 27. Les produits contenant des olives noires (31,92 g/100 g) montrent une teneur en acide gras moyenne plus élevée que les produits à base d'olives verte (15,58 g/100 g). Les olivades montrent le plus grand écart-type (8,40 g/100 g) en raison de l'ajout d'ingrédients supplémentaires contenant des matières grasses telles que les tomates séchées conservées dans l'huile.

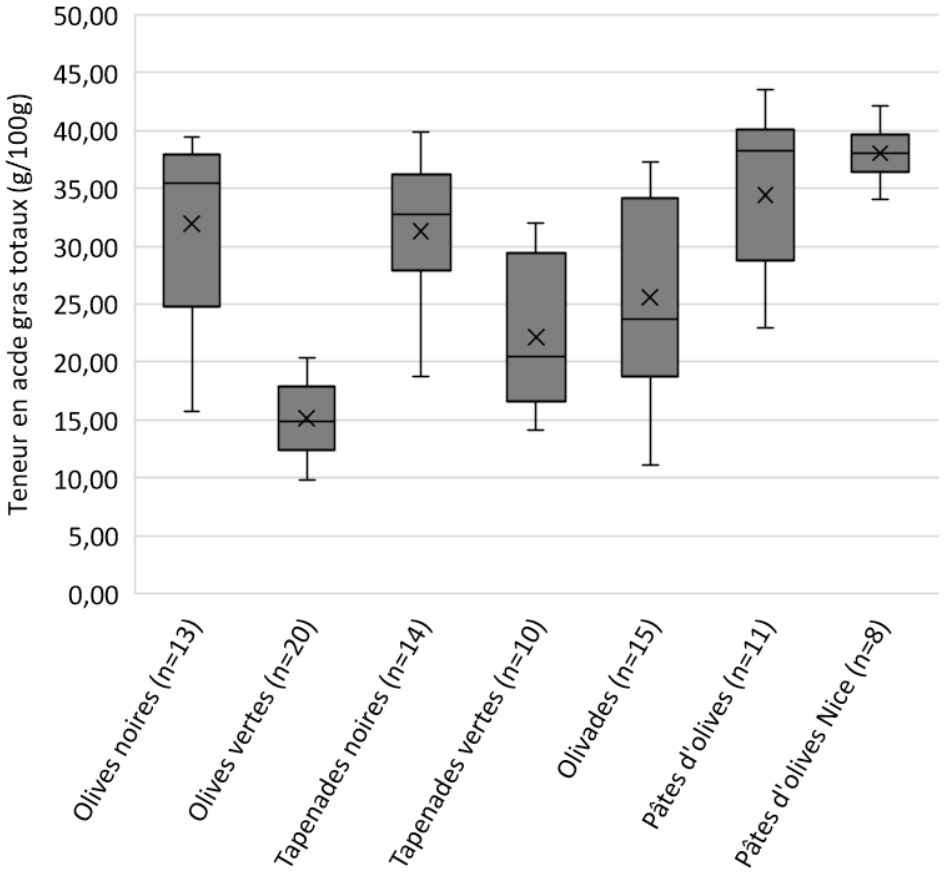


Figure 30 : Variabilité de la teneur en acide gras dans les produits à base d'olives traités thermiquement.

Tableau 27 : Analyse statistique de la teneur en acide gras sur les produits à base d'olives traités thermiquement.

Statistiques	Olives noires	Olives vertes	Tapenades noires	Tapenades vertes	Olivades	Pâtes d'olives	Pâtes d'olives Nice
Minimum	15,70	9,80	18,80	14,10	11,10	22,90	34,10
Maximum	39,40	20,40	39,90	32,00	37,30	43,50	42,10
1er Quartile	26,20	12,40	29,55	17,13	18,85	29,00	36,73
Médiane	35,50	14,90	32,70	20,50	23,70	38,20	38,05
3ème Quartile	36,90	17,75	35,75	27,40	33,70	39,75	39,08
Moyenne	31,92	15,14	31,30	22,15	25,57	34,43	38,01
Ecart-type	7,45	3,18	6,10	6,17	8,70	6,61	2,26

4. Discussion et Conclusion

Les mesures des paramètres physico-chimiques (pH, a_w, teneurs en NaCl, en lipides, en polyphénols…) ont été réalisées sur les produits commerciaux à base d'olives traités thermiquement. Certains d'entre eux ont montré des valeurs de pH supérieures à 4,6 et tous ont des valeurs de concentration en NaCl très inférieures à 10 %. Il n'y a pas d'inhibition de la croissance de *C. botulinum* groupe I lorsque les facteurs environnementaux sont pris indépendamment.

En effet, les olives vertes présentent théoriquement un risque d'instabilité et de non-maîtrise du risque sanitaire élevé, compte tenu du pH supérieur à 4,6 favorisant la croissance de *C. botulinum* groupe I (Peck, 2009). Cependant, il y a très peu de cas d'instabilité liés à ce produit révélant une inhibition de la croissance de *C. botulinum* groupe I avec le cumul et la synergie des barrières. De plus, la contamination de ces produits est très faible ce qui pourrait expliquer l'absence de *C. botulinum* groupe I et donc de la toxine dans le produit. Par ailleurs, les produits types tapenades, olivades, pâtes d'olive ont des pH nettement plus acides (4,5 à 4,2) en raison de l'ajout d'acide citrique. Les acides organiques tel que l'acide citrique ont un effet sur la croissance bactérienne et représentent un autre moyen de contrôle. La relation activité de l'eau et stabilité d'un produit est très importante. Outre l'influence de l'activité de l'eau sur la texture, l'apparence, le goût, celle-ci joue un rôle primordial dans le développement des micro-organismes. Les limites de croissances usuelles des micro-organismes suivant l'activité de l'eau :

- 0,6 : moisissures
- 0,7 : levures

- 0,8 : bactéries

Pour le pathogène le plus thermorésistant, la limite de croissance en fonction de l'activité de l'eau pour *C. botulinum* groupe I est de 0,94. Une activité de l'eau faible est critique pour les micro-organismes car les enzymes sont immobiles et ne peuvent pas participer à l'activité métabolique. Ainsi, l'a_w utilisée seule comme moyen de maîtrise dans ces produits à base d'olives ne permet pas d'inhiber la croissance de *C. botulinum* groupe I. Cependant, *C. botulinum* groupe I est capable de se développer lors de la combinaison pH 7 et a_w 0,96 mais pas avec la combinaison pH 5,8 et a_w 0,95 (National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods, 2010). Pour démontrer un potentiel effet synergique entre les facteurs pH et l'activité de l'eau, il serait nécessaire d'inoculer *C. botulinum* groupe I dans les produits à base d'olives traités thermiquement et d'étudier sa croissance. La teneur en NaCl seule des produits ne permet donc pas d'inhiber la croissance de *C. botulinum* groupe I, or l'action conjointe du pH, du NaCl et du traitement thermique peuvent permettre la maîtrise de ce pathogène.

Les produits commerciaux à base d'olives stockés à température ambiante présentent très peu de cas d'instabilité ou de toxi-infection. La teneur élevée en polyphénols et l'ajout d'acide organique (acide citrique) dans les préparations favorisent un pouvoir antimicrobien important. La teneur en polyphénols dans les produits à base d'olives varie et dépend de la variété des olives utilisées, de la maturité et du process de transformation (Charoenprasert and Mitchell, 2012; Tuck and Hayball, 2002). Ces teneurs en polyphénols suggèrent un effet antimicrobien important donc la croissance de *C. botulinum* groupe I n'est pas favorisée. Les olives contiennent environ 30 polyphénols différents dont les principaux retrouvés sont l'oleuropéine (2,3 à 9,0 mg/kg), le tyrosol (4,69 à 27,45 mg/kg) et l'hydroxytyrosol (1,4 à 5,6 mg/kg).

Par ailleurs, dans les produits de type poisson fumé à froid, le développement de *C. botulinum* groupe II (non-protéolytique) est inhibé avec une concentration minimale de 27,5 ppm (Koukou, 2019). D'autres espèces pathogènes sont sensibles aux polyphénols, par exemple une concentration de 147 ppm de polyphénol issus des olives empêche la croissance de *Staphylococcus aureus* ATCC25923. Bisignano *et al.,* ont pu déterminer l'effet des polyphénols contenus dans les olives sur *Salmonella* Typhi ATCC6539 : la concentration minimale inhibitrice (CMI) est de 219 ppm (Bisignano et al., 1999). *Bacillus cereus* est sensible aux polyphénols lorsque la CMI est comprise entre 670 et 1000 ppm (Davidson and Branden, 1981). Enfin, une concentration de 1250 ppm de polyphénols extrait d'huile d'olive empêche la croissance de *Listeria monocytogenes* (Guo et al., 2019).

La teneur en acide gras de ces produits protège le consommateur contre les maladies cardiovasculaires mais assure aussi une activité antimicrobienne (Malheiro et al., 2011). Une concentration minimale inhibitrice de l'acide oléique (acide gras majoritaire des olives) de 0,15 mg/mL permet l'inhibition de *C. botulinum* groupe I (Ababouch et al., 1992; Foster and Wynne, 1948; Zheng et al., 2004).

L'analyse des produits à base d'olives traités thermiquement montre différents profils. Les olives vertes et les olives noires forment deux groupes distincts suivant leurs caractéristiques tels que leurs degrés de maturité et le processus de fabrication. Les tapenades vertes présentent aussi leurs propres caractéristiques telle qu'une concentration similaire en chlorure de sodium. Ensuite, les pâtes d'olives, les pâtes d'olives de Nice et les tapenades noires se regroupent avec des propriétés similaires. Enfin, les olivades ne présentent pas de profil type puisque la recette établie par les fabricants varie beaucoup contrairement aux tapenades. En effet, les tapenades sont régies par une liste d'ingrédients obligatoires alors qu'il est ajouté à la base des olivades différents ingrédients (légumes conservés dans l'huile, aromates, condiments …) (AFIDOL, 2009).

Ainsi la contamination des produits à base d'olives peut provenir des ingrédients ajoutés à la préparation (tapenades, pâtes d'olives, huiles d'olives) telles que les tomates séchées, les amandes, des herbes aromatiques. L'association d'ingrédients aqueux et non-aqueux peut créer des microenvironnements dont l'eau devient disponible et favorise le développement de micro-organismes pathogènes (Heperkan, 2013; Medina-Pradas and Arroyo-López, 2015; Panagou et al., 2013, 2008).

5. Références

Ababouch, L., Chaibi, A., Busta, F.F., 1992. Inhibition of bacterial spore growth by fatty acids and their sodium salts. J. Food Prot. 55, 980–984. https://doi.org/10.4315/0362-028X-55.12.980

AFIDOL, 2015. Carnets de route - A la découverte des nos terroirs.

AFIDOL, 2014. La France Oleicole. Mark. Oléa 21.

AFIDOL, 2012. Le marché de l'huile d'olive : situation & perspectives 1–75.

AFIDOL, 2009. Etiquetage & dénomination commerciale. Circ. d'information 2, 1–2.

AFIDOL, 2008. Commercialisation & consommation des Olives en France. MarketOlea 6.

AFIDOL, FEDALIM, 2018. Code des pratiques loyales pour les olives de table.

Anagnostopoulos, D.A., Kamilari, E., Tsaltas, D., 2020. Evolution of Bacterial Communities, Physicochemical Changes and Sensorial Attributes of Natural Whole and Cracked Picual Table Olives During Spontaneous and Inoculated Fermentation. Front. Microbiol. 11. https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01128

Bisignano, G., Tomaino, A., Lo Cascio, R., Crisafi, G., Uccella, N., Saija, A., 1999. On the In-vitro antimicrobial activity of Oleuropein and Hydroxytyrosol. J. Pharm. Pharmacol. 971–974.

Botta, C., Cocolin, L., 2012. Microbial dynamics and biodiversity in table olive fermentation: Culture-dependent and -independent approaches. Front. Microbiol. 3. https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00245

Charoenprasert, S., Mitchell, A., 2012. Factors influencing phenolic compounds in table olives (Olea europaea). J Agric Food Chem 60, 7081–7095. https://doi.org/10.1021/jf3017699

Davidson, P.M., Branden, A.L., 1981. Antimicrobial Activity of Non-Halogenated Phenolic Compounds. J. Food Prot. 44, 623–633.

Foster, J.W., Wynne, E.S., 1948. Physiological studies on spore germination, with special reference to Clostridium botulinum : IV. Inhibition of germination by unsaturated C(18) fatty acids. J. Bacteriol. 55, 495–501. https://doi.org/10.1201/9781003075356-5

Georgé, S., Brat, P., Alter, P., Amiot, M.J., 2005. Rapid Determination of Polyphenols and Vitamin C in Plant-Derived Products. J. Agric. Food Chem. 53, 1370–1373. https://doi.org/10.1021/jf048396b

Guo, L., Sun, Q., Gong, S., Bi, X., Jiang, W., Xue, W., Fei, P., 2019. Antimicrobial Activity and Action Approach of the Olive Oil Polyphenol Extract Against Listeria monocytogenes. Frontier 10, 1–8. https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01586

Heperkan, D., 2013. Microbiota of table olive fermentations and criteria of selection for their use as starters. Front. Microbiol. 4, 1–11. https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00143

Hurtado, A., Reguant, C., Bordons, A., Rozès, N., 2012. Lactic acid bacteria from fermented table olives. Food Microbiol. 31, 1–8. https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.01.006

International Olive Oil Council, 2004. Norme commerciale applicable aux olives de table (FR).

ISO, 2017. Foodstuffs - Determination of water activity.

ISO, 1993. Produits dérivés des fruits et légumes - Mesurage du pH.

ISO, 1989. Qualité de l'eau - Dosage des chlorures - Titrage au nitrate d'argent avec du chromate comme indicateur (Méthode de Mohr).

Koukou, I., 2019. Extended cardinal paramter growth and growth boundary model for non-proteolytic Clostridium botulinum - effect of ten environmental factors.

Malheiro, R., Sousa, A., Casal, S., Bento, A., Pereira, J.A., 2011. Cultivar effect on the phenolic composition and antioxidant potential of stoned table olives. Food Chem. Toxicol. 49, 450–457. https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.11.023

Medina-Pradas, E., Arroyo-López, F.N., 2015. Presence of toxic microbial metabolites in table olives. Front. Microbiol. 6, 1–6. https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00873

National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods, 2010. Parameters for Determining Inoculated Pack / Challenge. J. Food Prot. 73, 140–202.

Panagou, E.Z., Nychas, G.J.E., Sofos, J.N., 2013. Types of traditional Greek foods and their safety. Food Control 29, 32–41. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.05.050

Panagou, E.Z., Tassou, C.C., Vamvakoula, P., Saravanos, E.K.A., Nychas, G.J.E., 2008. Survival of Bacillus cereus vegetative cells during Spanish-style fermentation of conservolea green olives. J. Food Prot. 71, 1393–1400. https://doi.org/10.4315/0362-028X-71.7.1393

Peck, M.W., 2009. Biology and Genomic Analysis of Clostridium botulinum, Advances in Microbial Physiology. Elsevier. https://doi.org/10.1016/S0065-2911(09)05503-9

Perpetuini, G., Prete, R., Garcia-gonzalez, N., Alam, M.K., Corsetti, A., 2020. Table Olives More than a Fermented Food 1–16.

Tuck, K.L., Hayball, P.J., 2002. Major phenolic compounds in olive oil : metabolism and health effects. Jounral Nutr. Biochem. 13, 636–644.

Zheng, B., Tice, J.D., Ismagilov, R.F., 2004. Formation of Droplets of Alternating Composition in Microfluidic Channels and Applications to Indexing of Concentrations in Droplet-Based Assays. Anal. Chem. 76, 4977–4982. https://doi.org/10.1021/ac0495743

CHAPITRE 5

SYNTHESE DES RESULTATS ET PERSPECTIVES

1. Diversité physiologique et génétique de *C. sporogenes* et *C. botulinum* groupe I

Le danger *C. botulinum* groupe I est considéré comme étant maîtrisé seulement si le pH de l'aliment est inférieur à 4,5 (règlementation européenne) ou inférieur ou égale à 4,6 (règlementation. Généralement, le pH minimum de croissance généralement attribuée à l'espèce entière est 4,6 (FDA and GMA, 2010; Great Britain and Department of Health, 1994; Peck, 2009). De nombreux travaux ont confirmé cette limite observée soit en aliment ou en milieu de culture (Dozier, 1924; Graham and Lund, 1985; Hauschild, 1993; Huhtanen et al., 1976; Ingram and Robinson, 1951; Montville, 1984, 1983; Townsend et al., 1954; Wong et al., 1988). Toutefois, nos résultats montrent qu'environ 43 % des souches collectées lors des cas d'altération de conserve se développent à un pH inférieur à 4,6 alors que cette situation est peu relevée dans la littérature (Lindstrom and Korkeala, 2006). Ces résultats pourraient s'expliquer par l'effet protecteur de la matrice vis-à-vis de la limite de croissance en fonction du pH. La présence de protéine végétale (soja) ou animale (viande/poisson dans les plats préparés) favorise la croissance de *C. botulinum* groupe I à pH égal ou inférieur à pH 4,6. Ainsi, la croissance a pu être observée jusqu'à pH 4,3 en présence de protéine de soja (inoculation à 10^3 CFU/mL, incubation à 30°C après un traitement thermique de 5 min à 100 °C) (Raatjes and Smelt, 1979; Smelt et al., 1982). De plus, une sélection des souches acidophiles pourrait être observée via la formulation des conserves altérées. Or ces produits ont un pH faiblement acide (pH compris entre 5,7 et 6,5) ne permettant pas de valider cette hypothèse.

L'activité de l'eau (aw) permet d'inhiber la croissance de *C. botulinum* groupe I lorsque l'a_w est réduite jusqu'à 0,94 (équivalent à 10 % de NaCl) (Dahlsten et al., 2015; Hauschild and Hilsheimer, 1979; Sperber, 1983; Troller, 1986). Notre étude sur les limites de croissance en fonction de l'aw a montré une limite de croissance médiane de 7,5 %. Les limites de croissance des souches vont de 5 % à 11,5 %. Parmi nos souches, la moins sensible au NaCl peut croître jusqu'à 11,5 % (souche 14). Cette tolérance aux concentrations élevées en chlorure de sodium pourrait être due à un effet de la matrice (conserve altérée de merlu sauce mousseline). Dans ce cas, il y a aussi une sélection de la souche par le process. Cette conserve est non stable à la suite d'un défaut de traitement thermique ($D_{121,1\,°C}$ = 0,14 min). Cette souche a été utilisée comme souche représentative pour déterminer la probabilité de croissance de *C. sporogenes* et *C. botulinum* groupe I en fonction du pH et de la concentration en NaCl en raison de satolérance à de fortes concentrations en NaCl.

C. botulinum groupe I est le pathogène le plus thermorésistant et est l'espèce de référence pour l'établissement des barèmes de stérilisation. On parle de « botulinum cook », c'est-à-dire un

traitement thermique de 3 min à 121,1 °C ($D_{121,1}$ °C = 0,21 min ; z = 10 °C) (Katzin et al., 1942; Peck, 2009). Notre étude des thermorésistance a montré une résistance élevée (≥ 0,19 min à 121,1 °C) pour 3/5 des souches appartenant à l'espèce *C. botulinum* groupe I (Table 4). Les analyses bio-informatiques ont montré la présence de deux opérons *spoVA* (*spoVA2*) dans 56 % des souches de *C. botulinum* groupe I ce qui pourrait expliquer ce phénomène (Brunt et al., 2020). A l'inverse, peu de *C. sporogenes* (3 %) portent plus d'un opéron *spoVA* (Brunt et al., 2020). Dans notre étude, 3 souches sur les 11 souches appartenant à l'espèce *C. sporogenes* présentent une thermorésistance plus élevée (≥ 0,13 min à 121,1 °C). Cela pourrait s'expliquer par le fait que ces souches ont été à l'origine de cas d'altération dans des conserves et donc sélectionnées par le procédé de traitement thermique.Parmi les 34 souches isolées d'altération, identifiées comme *C. sporogenes* ou de *C. botulinum* groupeI (séquençage du gène de l'ARN 16S), 5 souches présentent une thermorésistance élevée (≥ 0,15 min à 121,1 °C). Cette thermorésistance pourrait s'expliquer par la présence d'un opéron *spoVA* supplémentaire. Cette hypothèse pourrait être vérifiée par l'analyse du génome complet (Whole Genome Sequencing, WGS). De plus, cette analyse pourrait nous permettre d'identifier l'espèce à laquelle ces souches appartiennent. Les souches de *C. sporogenes* ayant une faible thermorésistance des spores s'associentau clade des *C. sporogenes* alors que les souches ayant une thermorésistance des spores plus élevées s'associeraient au clade des *C. botulinum* groupe I (Schill et al., 2016; Weigand et al., 2015).

La distinction entre *C. botulinum* groupe I et *C. sporogenes* par des analyses de routines, séquençage du gène de l'ARN 16S et test biologique du botulisme (présence/absence de toxine par injection dans une souris) présente des limites (Sebald and Saimot, 1973). La distinction entre ces deux espèces selon leur capacité à produire la toxine botulique n'est pas aussi simple. Plusieurs études ont montré que certaines souches de *C. sporogenes* produisaient la toxine et au contraire des souches de *C. botulinum* groupe I ne la produisaient pas (Weigand et al., 2015). Une analyse du génome complet d'une souche (WGS) permet de l'affecter à une espèce (*C. botulinum* groupe I ou *C. sporogenes*) et de savoir si ce génome possède les gènes nécessaires à la toxicogenèse (Bradbury et al., 2012; Brunt et al., 2020; Butler et al., 2017; Schill et al., 2016; Wells-Bennik et al., 2016). Les souches utilisées dans cette étude sont isolées de conserves altérées (37 souches, cf. Chapitre 3). Elles appartiennent à l'espèce *C. botulinum* groupe I ou *C. sporogenes* d'après le séquençage du gène de l'ARN 16S et elles sont toutes non-toxinogènes d'après le test biologique du botulisme (Sebald and Saimot, 1973). Parmi ces 37 souches, le génome complet de 14 souches représentatives a été séquencé. 11 souches ont été

affectées à l'espèce *C. sporogenes* et 3 souches ont été affectées à *C. botulinum* groupe I, aucune d'entre elle possède les gènes nécessaires à la toxicogenèse.

2. Impact des effets barrières sur les interfaces de croissance/non-croissance

Les facteurs environnementaux tels que le pH, l'activité de l'eau (a_w) et le traitement thermique constituent la base de la conservation des aliments. Le risque botulique est considéré maîtrisé lorsque le pH est inférieur à 4,6, ou bien lorsque la concentration en chlorure de sodium est supérieure à 10 % (aw ≥ 0,94), voire si un traitement thermique de 3 min à 121,1 °C est appliqué. Toutefois, ces seuils sont très stricts car ils maitrisent à eux seuls la qualité sanitaire de l'aliment. Or, dans un aliment, plusieurs facteurs (ex : pH et a_w) peuvent réduire lacontamination par des germes indésirables. Si ces facteurs s'éloignent simultanément d'une plage favorable au(x) microorganisme(s) considéré(s), il peut en résulter un effet inhibiteur additif, voire uneffet synergique. Ce concept se retrouve parmi les différents cas de « barrières » (*Hurdle technology* en anglais) que Leistner et Gould ont développé dans un ouvrage en 2002 (Leistner and Gould, 2002). Par exemple, l'absence de production de toxine botulique est observée dans des fromages fondus conservés à température ambiante. La synergie d'une l'a_w à 0,97 (4,64 % NaCl) et d'un pH à 6,0 permet leur stockage pendant une période prolongée, même si les facteurs ne limitent pas individuellement la croissance de *C. botulinum* groupe I (Glass et al., 2017). Cet exemple a été étendu à de nombreux microorganismes sporulés pathogènes (*C. perfringens*, *B. cereus*) d'origine alimentaire. Leur croissance est maîtrisée lorsque le pH ≤ 4,6 ou l'a_w ≤ 0,93 (10 % NaCl), voire à pH = 5,6 et a_w = 0,95 (8 % NaCl) (Institut of Food Technologists, 2001). Cette synergie entre le pH et l'a_w peut être quantifiéepar des modèles mathématiques, ce qui peut être très utile pour une meilleure gestion de la qualité et de la sécurité alimentaires (McMeekin et al., 2002).

Dans notre étude, nous avons choisi de mettre en évidence l'effet synergique du pH, de la concentration en NaCl et du traitement thermique subi par les spores en utilisant les modèles de microbiologie prévisionnelle. Au sein de ces modèles, les limites de croissance sont des paramètres très importants permettant de prendre en compte la spécificité physiologique des souches d'intérêt. Pour les bactéries anaérobies tels que *C. sporogenes* et *C. botulinum* groupe I, la présence d'oxygène au-delà de 1 % impacte fortement la capacité de croissance et donc la détermination des limites vis-à-vis du pH, de la concentration en NaCl ou de la température, par exemple. Dans notrecas, toutes les expériences ont été réalisées sous une station anaérobie afin de garantir les meilleuresconditions de croissance. L'impact défavorable de la présence d'oxygène sur la croissance a été observé lors du

développement de la technique de microfluidique (Focus). Lors du dépôt des micro-gouttes inoculées avec *C. sporogenes* PA 3679 (souche 1), aucune croissance n'a été observée en raisonde la présence d'oxygène résiduel dans le système de dépôt.

D'autre part, il est essentiel de considérer la manière de définir la croissance ou l'absence de croissance. Par exemple, nous pouvons considérer une absence de croissance i) lorsque la concentration bactérienne n'est pas supérieure à 1 log par rapport à la concentration initiale (Buchanan et al., 1989), ou bien, ii) lorsqu'aucun trouble n'a été observé dans les puits de microplaques après une période d'incubation et avec une confirmation par numération (Cole et al., 1990; Koutsoumanis et al., 2004). Cette dernière définition a été utilisée dans nos études pour déterminer les limites decroissance de *C. sporogenes* et *C. botulinum* groupe I.

Un avantage de ces limites de croissance est de pouvoir être utilisées directement au sein de modèles d'interface de croissance/non-croissance (Ross and Dalgarrd, 2004). Diverses approches ont été développées pour décrire les interfaces de croissance/non-croissance. Certains des modèles prennent en compte l'influence indépendante de chaque facteur par les valeurs cardinales et reflétent leur synergie sur le taux de croissance. Dans notre cas, ces modèles permettraient de définir les conditions où la croissance est possible en fonction des conditions environnementales (pH, NaCl, traitement thermique...) et donc potentiellement la production de toxine botulique. Ces valeurs cardinales sont évaluées à partir d'une population, elles expriment donc la capacité de croissance des individus les plus extrêmes. Ce type de modèle est très sécuritaire et permet de définir les conditions de formulation et procédé en deux types : celle qui permettent ou non la croissance et donc la production de toxine botulique (Masana and Baranyi, 2000; McKellar and Lu, 2005; Ross and McMeekin, 1994).

En réalité, la présence de toxine botulique est liée à la probabilité qu'une spore germe et donne naissance à une cellule végétative qui sera capable de produire la toxine dans le produit fini. Dans notre étude, nous avons travaillé sur la probabilité d'observer la croissance à partir d'un certain nombre de cellules initialement inoculées. Cette croissance observée au sein d'un puit ou d'un essai est le fruit de la croissance d'au moins une cellule. Ainsi, la prise en compte de l'hétérogénéité de la population, car les concentrations en *C. sporogenes* ou *C. botulinum* groupe I en cas de contamination sont faibles, permet une approche plus progressiste. Cette approche modélise la transition entre les conditions menant à une forte probabilité de croissance et celles menant à une faible probabilité de croissance (réponse comprise entre 0 et 1) (Augustin et al., 2005; Masana and Baranyi, 2000; McKellar and Lu, 2005; Ratkowsky and Ross, 1995).

Habituellement, la régression logistique est la technique de régression employée mais plusieurs auteurs critiquent cette approche par l'utilisation de paramètres (coefficient de régression) n'ayant pas de signification biologique (Augustin et al., 2005; Le Marc et al., 2002). Les modèles à paramètres cardinaux ont été introduits en microbiologie prévisionnelle afin d'utiliser les paramètres de modèles qui ont une interprétation biologique ou graphique. Les modèles à paramètres cardinaux reposent sur l'hypothèse que l'effet inhibiteur des facteurs environnementaux est multiplicatif, une hypothèse qui a été formalisée dans le concept gamma (γ). Ainsi, l'effet cumulatif des facteurs à des niveaux sous-optimaux peut-être estimé à partir du produit de l'inhibition du taux de croissance. L'effet inhibiteur est une valeur comprise entre 0 et 1. Le taux de croissance de référence est μ_{max}, de sorte que les niveaux de référence des facteurs environnementaux sont optimaux (T_{opt}, a_{wopt}, pH_{opt} …). L'effet combiné de plusieurs facteurs environnementaux est alors déterminé par la multiplication de leurs facteurs gamma respectifs (Zwietering et al., 1992).

Cependant, le domaine de croissance d'un micro-organisme pour une condition environnementale donnée est affecté par d'autres facteurs environnementaux. Cela suggère que les modèles gamma utilisant les modèles à paramètres cardinaux peuvent être améliorés en tenant compte des interactions entre les paramètres environnementaux. Augustin et al., (2005) ont développé un modèle incluant des termes pour les interactions qui empêchent la croissance (exemple avec *L. monocytogenes*) (Augustin et al., 2005). Les valeurs des paramètres cardinaux ont été maintenuesconstantes et l'espace des facteurs environnementaux a été divisé en (i) espace des effets indépendants (ξ = 1), (ii) espace de l'interaction (0 < ξ < 1), et (iii) espace de l'absence de croissance(ξ = 0).

Cette approche de modélisation a été développée dans ces travaux sur une souche de *C. sporogenes* PA 3679 (souche 1) (Chapitre 2), puis a été vérifiée et validée sur plusieurs souches de *C. sporogenes* (souche 14 et 17) et *C. botulinum* groupe I (souche 34 et 41) (Chapitre 3). Pour cela, un plan factoriel a été réalisé impliquant le pH (4,4-7) et la concentration en NaCl (0-12 %) utilisant la méthode du nombre le plus probable (NPP) en microplaque de 96 puits. Le modèle développé dans ces travaux présente l'avantage d'avoir une approche utilisant les paramètres cardinaux associés au concept gamma avec l'interaction des facteurs environnementaux et est applicable quelles que soit les conditions physiologiques de la bactérie (*i.e.,* cellules végétatives ou spores). En effet, les récents modèles de probabilité de croissance développés prennent en compte un seul état physiologique (*i.e.,* cellule végétative ou spores) (Koukou, 2019; Valero et al., 2020). De plus, le modèle présenté prend en compte le traitement thermique appliqué sur les spores. Il permet ainsi de décrire l'effet synergique du pH, de

la concentration en chlorure de sodium et du traitement thermique sur la probabilité de croissance des cellules végétatives, mais surtout vis-à-vis des spores et des spores traitées thermiquement.

3. Application des interfaces de croissance / non-croissance sur les effetsbarrière des produits à base d'olives

Le Chapitre 4 a été dédié à l'étude des paramètres physico-chimiques des produits à base d'olives traités thermiquement. Un plan d'échantillonnage a été établi regroupant 8 catégories de produits différentes (olives entières avec ou sans saumure, tapenades, olivades et pâtes d'olives) pour un total de 90 produits. La mesure du pH, de la concentration en chlorure de sodium, la teneur en acide gras et en polyphénols ont montré des valeurs hétérogènes entre les olives noires et vertes en raison de leur degré de maturité et leurs processus de fabrication. Il est intéressant de noter que le pH, la concentration en chlorure de sodium, la teneur en polyphénols et en acides gras indépendamment, ne permet pas l'inhibition de la croissance *C. sporogenes* et *C. botulinum* groupe I.

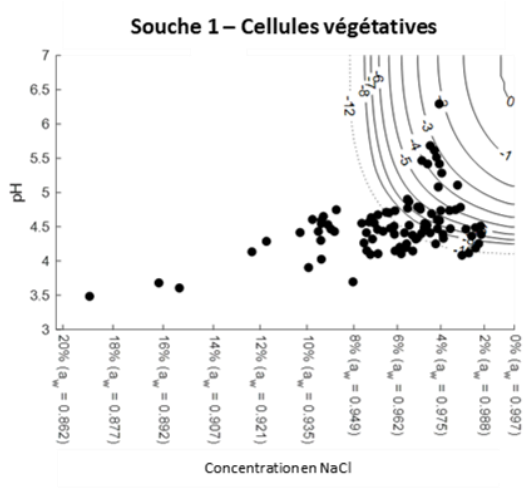
Est-ce que les caractéristiques physico-chimiques des produits à base d'olives traités thermiquement sont suffisantes pour maitriser le développement de *C. botulinum* groupe I et *C. sporogenes* ? La Figure 31 décrit les interfaces de probabilité de croissance pour les cellules végétatives et de germination et de croissance pour les spores et les spores traitées thermiquement en fonction du pH et de la concentration du NaCl. Les produits à base d'olives sont représentés par des points. Chaque ligne présente l'iso-probabilité d'observer la reprise d'activité cellulaire des spores ou des cellules végétatives de *C. sporogenes* (Figure 31a à i) et *C. botulinum* groupe I (Figure 31j à n). Les prévisions descendent jusqu'à une probabilité de croissance de 10^{-8} bactéries (limite de détection) soit, une bactérie sur cent millions capables de se développer dans les conditions données. Par extrapolation du modèle, nous pouvons identifier les conditions permettant d'atteindre cette probabilité de croissance jusqu'à 10^{-12} (ligne d'iso-probabilité en pointillé) correspondant au niveau de destruction appliqué aux spores de *C. botulinum* groupe I (3 min à 121,1 °C *i.e.,* 12 réductions décimales).

D'une part, si on considère uniquement le facteur pH à 4,6, qui est la limite de croissance de *C. sporogenes* et *C. botulinum* groupe I, alors la germination et la croissance observées dans ces produits seraient de 33 %. D'autre part, si l'on considère la limite de croissance vis-à-vis de la concentration en chlorure de sodium, soit une a_w égale à 0,93 (10 % NaCl), alors la germination et la croissance de *C. sporogenes* et *C. botulinum* groupe I devraient être observées dans 92 % des produits (Figure 31a, d, g, j et m).

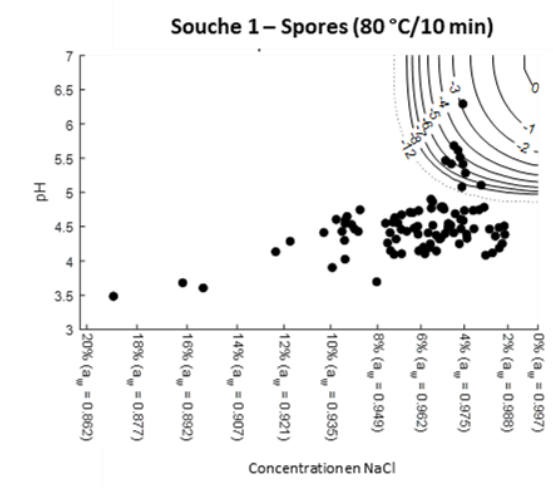
Ces limites de croissance reconnues pour *C. botulinum* group I et *C. sporogenes* sont définies pour les cellules végétatives, or, dans les produits à base d'olives conservés à température ambiante, seules les spores survivent aux traitements thermiquement. En prenant en compte les effets synergiques du pH et du NaCl sur les limites de germination et de croissance des spores de *C. sporogenes* (souche 1 et 14) et *C. botulinum* groupe I (souche 34 et 41), la proportion de produits à base d'olives présentant un risque de germination et de croissance de ces spores est de 11 %. Autrement dit, 10 produits présentent un risque botulique potentiel selon le niveau de destruction appliqué aux spores (soit une probabilité de 10^{-12} log), (Figure 31b, e et k). Cette proportion diminue jusqu'à 1 % si les spores subissent un traitement thermique en amont (soit 1 produit présentant un risque selon une probabilité de 10^{-12} log) (Figure 31c, f, l et n). Parmi les produits à base d'olives traités thermiquement, un produit correspondant aux olives noires à la Grecque présente des caractéristiques physico-chimiques particulières (~pH 6 et 4 % NaCl). Ce produit a une probabilité de présenter un risque de botulisme alimentaire élevée. En effet, dans le pire des cas, une spore sur 1000 est capable de se développer dans ce produit (Figure 31b).

Ces résultats viennent confirmer l'action conjointe des facteurs environnementaux (pH, NaCl et traitement thermique) sur la maîtrise de *C. botulinum* groupe I et *C. sporogenes* dans les produits à base d'olives traités thermiquement. Ces conclusions mettent alors en lumière l'effet synergique (pH et concentration en chlorure de sodium) de la formulation du produit et le traitement thermique ouvrant la voie vers de nouveaux processus de fabrication.

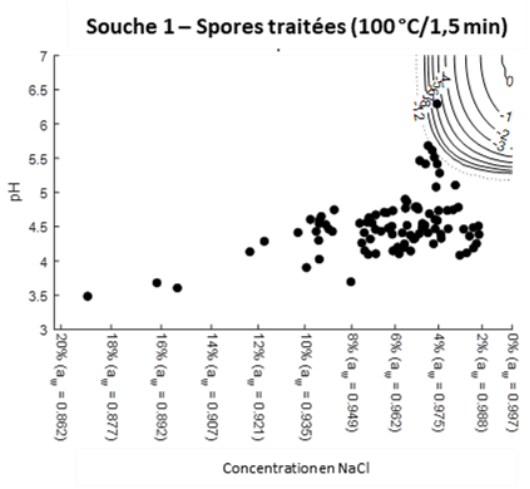
(a)


Souche 1 – Cellules végétatives
pH
Concentration en NaCl

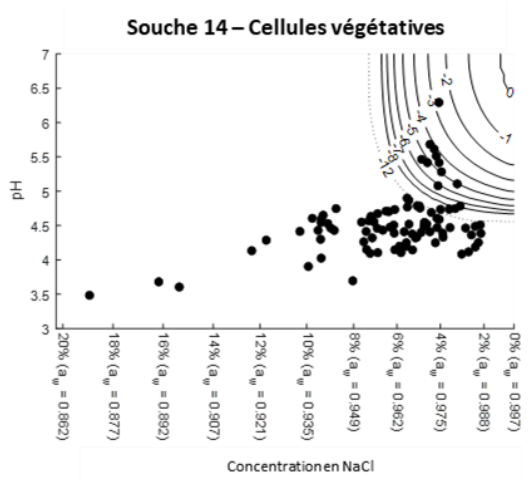
(b)


Souche 1 – Spores (80 °C/10 min)
pH
Concentration en NaCl

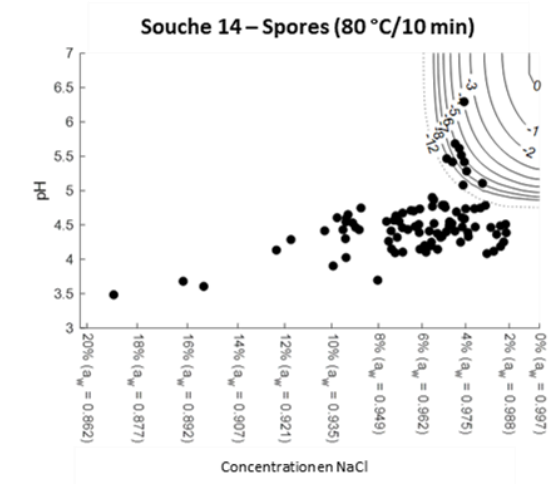
(c)


Souche 1 – Spores traitées (100 °C/1,5 min)
pH
Concentration en NaCl

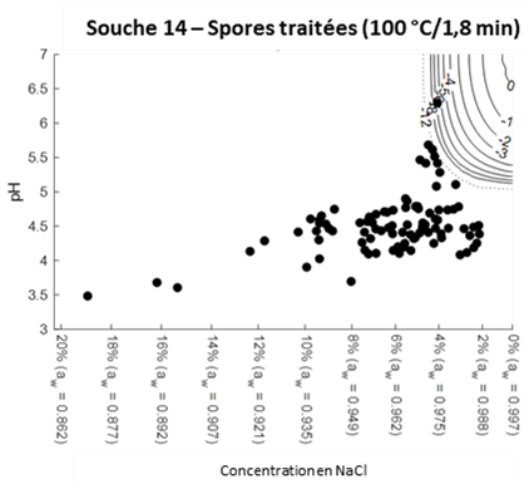
(d)


Souche 14 – Cellules végétatives
pH
Concentration en NaCl

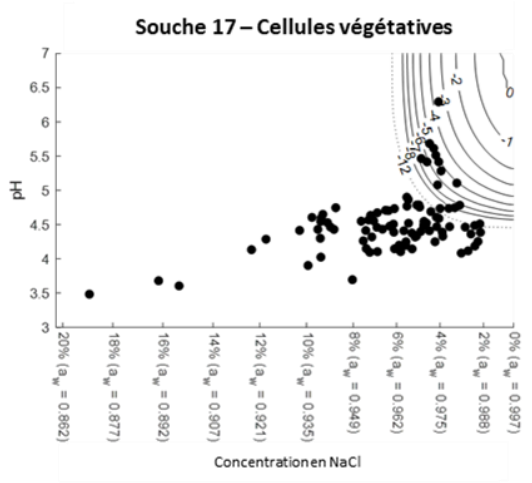
(e)


Souche 14 – Spores (80 °C/10 min)
pH
Concentration en NaCl

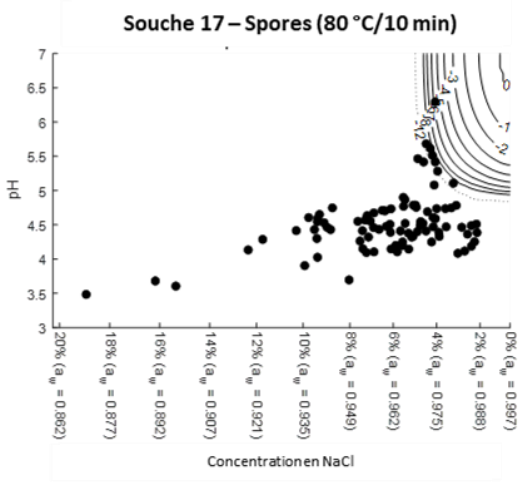
(f)


Souche 14 – Spores traitées (100 °C/1,8 min)
pH
Concentration en NaCl

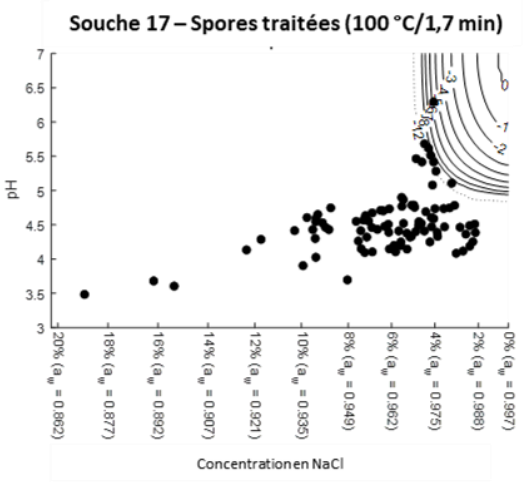
(g)


Souche 17 – Cellules végétatives
pH
Concentration en NaCl

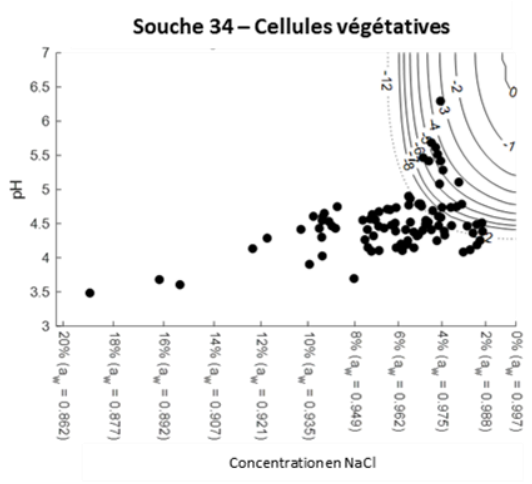
(h)


Souche 17 – Spores (80 °C/10 min)
pH
Concentration en NaCl

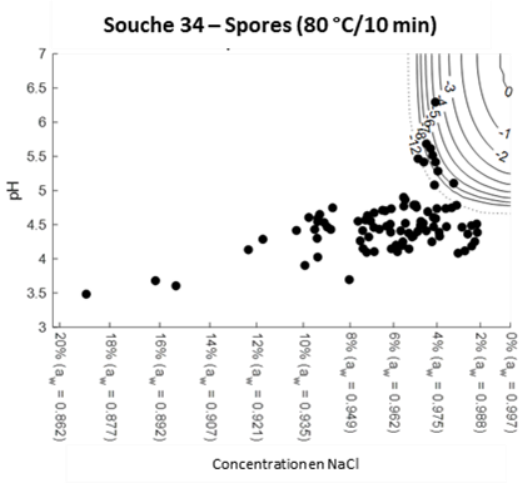
(i)


Souche 17 – Spores traitées (100 °C/1,7 min)
pH
Concentration en NaCl

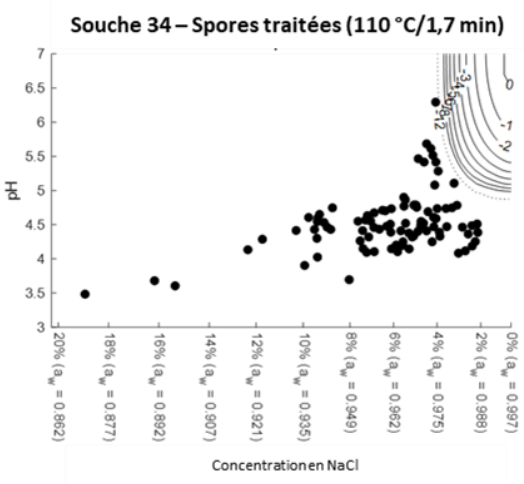
(j)


Souche 34 – Cellules végétatives
pH
Concentration en NaCl

(k)


Souche 34 – Spores (80 °C/10 min)
pH
Concentration en NaCl

(l)


Souche 34 – Spores traitées (110 °C/1,7 min)
pH
Concentration en NaCl

(m) **(n)**

Figure 31 : Interface de probabilité de croissance ou de recouvrement (germination/croissance) des cellules végétatives et des spores de *C. sporogenes* et *C. botulinum* en fonction des paramètres physico-chimiques (pH et NaCl) des produits à base d'olives traités thermiquement.

C. sporogenes Souche 1 : cellules végétatives (a), spores (b), spores traitées thermiquement (c) (souche de référence) ; *C. sporogenes* Souche 14 : cellules végétatives (d), spores (e), spores traitées thermiquement (f) (souche isolée de conserve altérée) ; *C. sporogenes* Souche 17 : cellules végétatives (g), spores (h), spores traitées thermiquement (i) (souche isolée de conserve altérée) ; *C. botulinum* groupe I non-toxinogène Souche 34 : cellules végétatives (j), spores (k), spores traitées thermiquement (l) (souche isolée de conserve altérée) ; *C. botulinum* groupe I Souche 41 : cellules végétatives (m), spores traitées thermiquement (n) (souche de référence). Le traitement thermique appliqué aux spores traitées équivaut à la destruction d'un log de la population initiale. L'interface de probabilité est définie par les lignes solides jusqu'à une probabilité de 10^{-8} bactéries (limites de détection de notre méthode) et la ligne en pointillée indique la probabilité extrapolée à 10^{-12} (niveau de destruction de *C. botulinum* groupe I requis, « botulinum cook »). Les produits à base d'olives traités thermiquement sont représentés par les points noirs suivant leurs pH et leurs concentrations en chlorure de sodium.

4. Perspectives

Ces travaux de thèse ont permis d'apporter un certain nombre de connaissances sur la maîtrise de *C. botulinum* groupe I et *C. sporogenes* dans les produits à base d'olives traités thermiquement. Plus particulièrement ces travaux ont contribué à mieux identifier les domaines de germination et de croissance des spores de *C. botulinum* groupe I et *C. sporogenes* en fonction de la synergie des facteurs environnementaux. Toutefois, ces résultats ne donnent aucune information sur les étapes de la germination et de la croissance qui sont influencées par les facteurs environnementaux (pH, NaCl et traitement thermique).

Afin de suivre l'état physiologique de ces spores bactériennes traitées thermiquement au cours du leurs cycle de germination et de croissance, une analyse par cytométrie en flux a été réalisée. La cytométrie en flux est une technique permettant d'analyser une population de cellules (~10^2 à 10^6 cellules pour 200 µL) en caractérisant les propriétés de chaque individu. Ainsi, la mesure des propriétés optiques des cellules par une source d'excitation lumineuse (laser) permet leurs caractérisations et leurs comptages selon différents paramètres. Le paramètre Forward Scatter (FSC) permet de caractériser la taille des cellules par la mesure de la lumière diffractée dans les petits angles. Le paramètre Side Scatter (SSC) permet de caractériser la granulométrie des cellules par la mesure de la lumière diffractéedans les grands angles. Enfin, le paramètre de la Fluorescence (F1) (Syto9®) permet de mesurer les niveaux de fluorescence (Trunet et al., 2019; Wilkinson, 2016). En s'appuyant sur les travaux de Trunet et al. (2019), nous avons adapté la méthodologie expérimentale afin de suivre la reprise d'activité des spores anaérobies de *C. sporogenes* PA 3679 (souche 1) marqué au Syto9® (Molecular Probes, Life Technologies, Saint Aubin, France) après un traitement thermique (Figure 32) (Trunet et al., 2019). A 1h, les spores dormantes sont majoritairement présentes (Figure 32a) et détectées dans une zone de faible fluorescence entourée en rouge. Le traitement thermique a permis d'éliminer les cellules végétatives résiduelles mais a aussi activé la germination des spores dormantes. Ainsi, une petite population de spores germées est aussiidentifiable et observable dans une zone de fluorescence plus importante entourée en jaune, les spores germées étant perméables au Syto9® (Figure 32a). Au bout de 5h, la germination des spores estbien initiée, la population des spores dormantes diminue alors que celle des spores germées augmente (Figure 32b, entourée en jaune). En même temps, les spores germées émergents pour donner des cellules végétatives identifiées par une taille, mais surtout une fluorescence plusimportante. Cette population de cellules végétatives est délimitée par la zone entourée en rouge (Figure 32b). Enfin, une grande proportion de spores germées donne

une population de cellules végétatives au bout de 8h. Il reste peu d'individus au stade dormant ou au stade germé (Figure 32c).

Ces résultats sont encourageants, et ouvrent de belles perspectives. Par exemple, nous pourrions étudier l'impact du pHet de la concentration en chlorure de sodium sur l'état physiologique des spores, quantifier la dynamique et le nombre de cellules passant d'un stade à l'autre. La maitrise de cette dynamique nous permettrait de mieux comprendre les mécanismes d'action des différents leviers, mais offrirait également des outils intéressants pour maitriser la qualité sanitaire des produits alimentaires. Nous pourrions coupler les approches de cytométrie en flux avec un dosage de toxine afin de déterminer lacapacité des cellules à produire la toxine botulique en fonction des différentes conditions environnementales (pH, NaCl) après un traitement thermique (partenariat avec l'Institut Pasteur). Enfin, nous pourrions nous interroger sur l'influence des facteurs liés à la formulation d'un produit (Tableau 3 ; Tableau 4). La validation du modèle pourrait être complétée avec l'utilisation d'autres espèces bactériennes (*B. coagulans*/*B. subtilis*) au sein d'une interface croissance/non-croissance utilisable par les industriels.

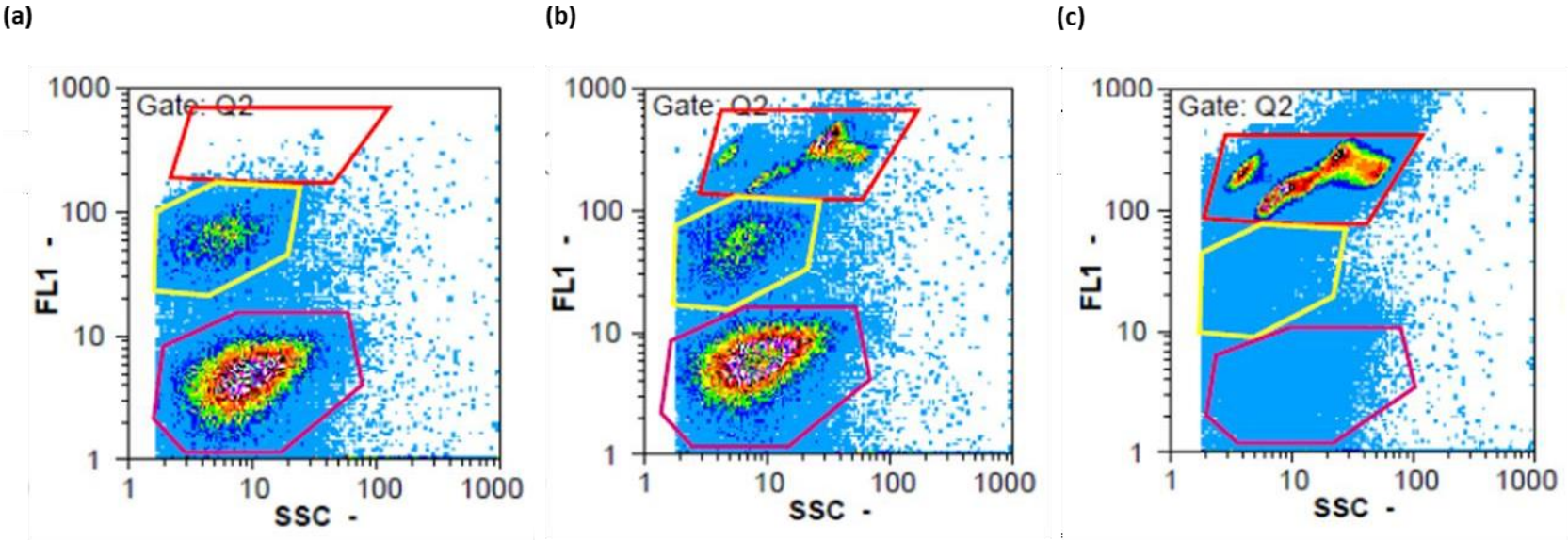


Figure 32 : Cytogramme de l'évolution de la germination et de la croissance des spores de *C. sporogenes* PA 3679 (souche 1) après un traitement thermique (80°C – 10 min) en condition optimale de croissance par cytométrie en flux.

Les spores ont été inoculées dans un bouillon PYGm et incubées à 37 °C pendant 10h en condition d'anaérobiose. Puis les spores ont été marquées au Syto9 et analysées au cours du temps par cytométrie en flux. Au début du cycle de vie (1h), la population de petite taille et de faible fluorescence est identifiée comme spores dormantes réfractives (a, cercle rose). Puis, les spores dormantes germent (5h), identifiées par une autre population avec des spores de taille identique mais d'intensité de fluorescence plus élevée (a, b, cercle jaune). Au cours du temps (8h), la population de spores dormantes germe totalement pour donner des cellules végétatives de taille et de fluorescence plus grande (c, cercle rouge). FL1, fluorescence du Syto9®, SSC, taille des particules.

5. Références

Augustin, J.C., Zuliani, V., Cornu, M., Guillier, L., 2005. Growth rate and growth probability of Listeria monocytogenes in dairy, meat and seafood products in suboptimal conditions. J. Appl. Microbiol. 99, 1019–1042. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02710.x

Bradbury, M., Greenfield, P., Midgley, D., Li, D., Tran-Dinh, N., Vriesekoop, F., Brown, J.L., 2012. Draft genome sequence of Clostridium sporogenes PA 3679, the common nontoxigenic surrogate for proteolytic Clostridium botulinum. J. Bacteriol. 194, 1631–2. https://doi.org/10.1128/JB.06765-11

Brunt, J., van Vliet, A.H.M., Carter, A.T., Stringer, S.C., Amar, C., Grant, K.A., Godbole, G., Peck, M.W., 2020. Diversity of the Genomes and Neurotoxins of Strains of Clostridium botulinum Group I and Clostridium sporogenes Associated with Foodborne, Infant and Wound Botulism. Toxins (Basel). 12, 586. https://doi.org/10.3390/toxins12090586

Buchanan, R.L., Stahl, H.G., Whiting, R.C., 1989. Effects and Interactions of Temperature, pH, Atmosphere, Sodium Chloride, and Sodium Nitrite on the Growth of Listeria monocytogenes. J. Food Prot. 52, 844–851. https://doi.org/10.4315/0362-028X-52.12.844

Butler, R.R., Schill, K.M., Wang, Y., Pombert, J.F., 2017. Genetic characterization of the exceptionally high heat resistance of the non-toxic surrogate Clostridium sporogenes PA 3679. Front. Microbiol. 8, 1–11. https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00545

Cole, M.B., Jones, M. V., Holyoak, C., 1990. Effect of pH, salt concentration and temperature on the survival and growth of Listeria monocytogenes. J. Appl. Bacteriol. 63, 63–72.

Dahlsten, E., Lindström, M., Korkeala, H., 2015. Mechanisms of food processing and storage-related stress tolerance in Clostridium botulinum. Res. Microbiol. 166, 344–352. https://doi.org/10.1016/j.resmic.2014.09.011

Dozier, C.C., 1924. Optimun and Limiting Hydrogen-Ion Concentrations for B. Botulinus and

Quantitative Estimation of Its Growth. J. Infect. Dis. 35, 105–133.

FDA, GMA, 2010. Draft Guidance for Industry: Acidified Foods.

Glass, K.A., Mu, M., LeVine, B., Rossi, F., 2017. Inhibition of Clostridium botulinum in Model Reduced-Sodium Pasteurized Prepared Cheese Products. J. Food Prot. 80, 1478–1488. https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-17-027

Graham, A.F., Lund, B.M., 1985. The combined effect of sub-optimal temperature and sub-optimal pH on growth and toxin formation from spores of Clostridium botulinum. J. Appl. Bacteriol. 2, 135–145. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1987.tb04859.x

Great Britain, Department of Health, 1994. Guidelines for the safe production of heat preserved foods. London : HMSO.

Hauschild, A.H.W., 1993. Clostridium Botulinum : Ecology and Control in Foods Food Science and Technology (Marcel Dekker, Inc.) ; 54. CRC Press.

Huhtanen, C.N., Naghski, J., Custer, C.S., Russell, R.W., 1976. Growth and Toxin Production by Clostridium botulinum in moldy tomato juice. Appl. Enviromental Microbiol. 32, 711–715.

Ingram, M., Robinson, R.H.M., 1951. A discussion of the literature on botulism in relation to acid foods. Proc. Soc. Appl. Bacteriol. 14, 73–84. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1951.tb01995.x

Institut of Food Technologists, 2001. Evaluation and Definition of Potentially Hazardous A Report of the Institute of Food Technologists, Comprehensive Reviews In Food Science And Food Safety.

Katzin, L.I., Sandholzer, L.A., Strong, M.E., 1942. Application of the decimal reduction time principle to a study of the resistance of coliform bacteria to paseurization. J. Bacteriol. 45, 265–272.

Koukou, I., 2019. Extended cardinal paramter growth and growth boundary model for non-proteolytic Clostridium botulinum - effect of ten environmental factors.

Koutsoumanis, K.P., Kendall, P.A., Sofos, J.N., 2004. Modeling the Boundaries of Growth ofSalmonella Typhimurium in Broth as a Function of Temperature, Water Activity, and pH. J. Food Prot. 67, 53–59. https://doi.org/10.4315/0362-028X-67.1.53

Le Marc, Y., Huchet, V., Bourgeois, C.M., Guyonnet, J.P., Mafart, P., Thuault, D., 2002. Modelling the growth kinetics of Listeria as a function of temperature, pH and organic acid concentration. Int. J. Food Microbiol. 73, 219–237. https://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00640-7

Leistner, L., Gould, G.W., 2002. Hurdle Technologies. Combination Treatments for Food Stability, Safety and Quality. Food Engineering Series. Int. J. Food Microbiol. 91, 224. https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00370-2

Lindstrom, M., Korkeala, H., 2006. Laboratory Diagnostics of Botulism. Clin. Microbiol. Rev. 19, 298–314. https://doi.org/10.1128/CMR.19.2.298-314.2006

Masana, M.O., Baranyi, J., 2000. Growth/no growth interface of Brochothrix thermosphacta as a function of pH and water activity. Food Microbiol. 17, 485–493. https://doi.org/10.1006/fmic.2000.0349

McKellar, R.C., Lu, X., 2005. MODELING MICROBIAL RESPONSES IN FOOD, CRC series. ed. Taylor & Francis e-Library.

McMeekin, T.A., Olley, J., Ratkowsky, D.A., Ross, T., 2002. Predictive microbiology: Towards the interface and beyond. Int. J. Food Microbiol. 73, 395–407. https://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00663-8

Montville, T.J., 1984. Quantitation of pH- and Salt-Tolerant Subpopulations from Clostridium botulinum 47, 28–30.

Montville, T.J., 1983. Interaction of pH and NaCl on culture density of Clostridium botulinum 62A. Appl. Envirionmental Microbiol. 46, 961–963.

Peck, M.W., 2009. Biology and Genomic Analysis of Clostridium botulinum, Advances in Microbial Physiology. Elsevier. https://doi.org/10.1016/S0065-2911(09)05503-9

Raatjes, G.J.M., Smelt, J.P.P.M., 1979. Clostridium botulinum can grow and form toxin at pH values lower than 4.6. Nature 281, 398–399.

Ratkowsky, D.A., Ross, T., 1995. Modelling the bacterial growth/no growth interface. Lett. Appl.

Microbiol. 20, 29–33. https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.1995.tb00400.x

Ross, T., Dalgarrd, P., 2004. Secondary models, in: McKellar, R.C., Lu, X. (Eds.), Modeling Microbial Responses in Food. pp. 63–150.

Ross, T., McMeekin, T.A., 1994. Predictive microbiology. Int. J. Food Microbiol. 23, 241–264. https://doi.org/10.1016/0168-1605(94)90155-4

Schill, K.M., Wang, Y., Butler, R.R., Pombert, J.-F., Reddy, N.R., Skinner, G.E., Larkin, J.W., 2016. Genetic diversity of Clostridium sporogenes PA 3679 isolates obtained from different sources as resolved by pulsed-field gel electrophoresis and high-throughput sequencing. Appl. Environ. Microbiol. 82, 384–393. https://doi.org/10.1128/AEM.02616-15

Sebald, S., Saimot, G., 1973. Le diaonostic biologique du bolulisme. Med. Mal. Infect. 3, 83–85.

Smelt, J.P.P.M., Raatjes, G.J.M., Crowther, J.S., Verrips, C.T., 1982. Growth and toxin formation by Clostridium botulinum at low pH values. J. Appl. Bacteriol. 52, 75–82. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1982.tb04375.x

Sperber, W.H., 1983. Influence of Water Activity on Foodborne Bacteria. J. Food Prot. 46, 142–150. https://doi.org/10.4315/0362-028X-46.2.142

Townsend, C.T., Yee, L., Mercer, W.A., 1954. Inhibition of the growth of Clostridium botulinum by acidification. J. Food Sci. 19, 536–542. https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1954.tb17486.x

Troller, J.A., 1986. Water Relations of Foodborne Bacterial Pathogens - An Updated Review. J. Food Prot. 49, 656–670. https://doi.org/10.4315/0362-028X-49.8.656

Trunet, C., Ngo, H., Coroller, L., 2019. Quantifying permeabilization and activity recovery of Bacillus spores in adverse conditions for growth. Food Microbiol. 81, 115–120. https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.06.013

Valero, A., Olague, E., Medina-Pradas, E., Garrido-Fernández, A., Romero-Gil, V., Cantalejo, M.J., García-Gimeno, R.M., Pérez-Rodríguez, F., Posada-Izquierdo, G.D., Arroyo-López, F.N., 2020. Influence of Acid Adaptation on the Probability of Germination of Clostridium sporogenes Spores

Against pH, NaCl and Time. Foods 9, 127. https://doi.org/10.3390/foods9020127

Weigand, M.R., Pena-Gonzalez, A., Shirey, T.B., Broeker, R.G., Ishaq, M.K., Konstantinidis, K.T., Raphael, B.H., 2015. Implications of genome-based discrimination between Clostridium botulinum group I and Clostridium sporogenes strains for bacterial taxonomy. Appl. Environ. Microbiol. 81, 5420–5429. https://doi.org/10.1128/AEM.01159-15

Wells-Bennik, M.H.J., Eijlander, R.T., den Besten, H.M.W., Berendsen, E.M., Warda, A.K., Krawczyk, A.O., Nierop Groot, M.N., Xiao, Y., Zwietering, M.H., Kuipers, O.P., Abee, T., 2016. Bacterial Spores in Food: Survival, Emergence, and Outgrowth. Annu. Rev. Food Sci. Technol. 7, 457–482. https://doi.org/10.1146/annurev-food-041715-033144

Wilkinson, M.G., 2016. Flow cytometry in Food Microbiology: Challenges, Opportunities and Progress to Date. Técnicas Lab. 417, 722–728.

Wong, D.M., Young-Perkins, K.E., Merson, R.L., 1988. Factors influencing Clostridium botulinum spore germination, outgrowth, and toxin formation in acidified media. Appl. Environ. Microbiol. 54, 1446–1450.

Zwietering, M.H., Wijtzes, T., De Wit, J.C., Van't Riet, K., 1992. A Decision Support System for Prediction of the Microbial Spoilage in Foods. J. Food Prot. 55, 973–979.

CHAPITRE 6

VALORISATION

1. Publications

Emmanuelle Boix, Olivier Couvert, Stéphane André and Louis Coroller. 2021. The synergic interaction between environmental factors (pH and NaCl) and the physiological state (vegetative cells and spores) provides new possibilities for optimizing processes to manage risk of *C. sporogenes* spoilage. *Food Microbiology*. 100, 10.1016/j.fm.2021.103832.

Emmanuelle Boix, Louis Coroller, Olivier Couvert, Stella Planchon, Arnoud H. M. van Vliet, Michael W. Peck, Christine Rasetti-Escargueil, Emmanuel Lemichez, Michel R. Popoff and Stéphane André. 2021. Synergic interaction between pH and NaCl on the recovery of *C. sporogenes* and *C. botulinum* vegetative cells and spores. *Food Microbiology*.

2. Communications orales

Emmanuelle Boix, Dhouha Lakhal, Clément Trunet, Olivier Couvert, Stéphane André, Louis Coroller (2019). Impact des facteurs environnementaux sur la germination des spores de *C. sporogenes* par cytométrie en flux. *23ème Congrès Annuel de l'Association Française de Cytométrie en flux, Rennes (France).*

Emmanuelle Boix, Olivier Couvert, Stéphane André, Louis Coroller (2020). Growth probability of *Clostridium sporogenes* spores in pasteurized olive product. *3rd Fruit & Vegetable Processing Symposium, Avignon (France) (visioconférence).*

Emmanuelle Boix, Olivier Couvert, Stéphane André, Louis Coroller (2021). Modélisation de la probabilité de croissance de *Clostridium sporogenes* dans les produits à base d'olives traités thermiquement. *Techn'Olive, (visioconférence).*

Emmanuelle Boix, Olivier Couvert, Stéphane André, Louis Coroller (2021). Effect of pH, sodium chloride concentration and heat treatment on viability of *C. sporogenes* vegetative cells and spores in pasteurized olive product. *IAFP European symposium, (visioconférence).*

3. Communications affichées (poster)

Emmanuelle Boix, Dhouha Lakhal, Clément Trunet, Stéphane André, Louis Coroller, Olivier Couvert (2019). Modélisation de la probabilité de croissance des spores de *Clostridium sporogenes* en milieu

acide et salé après un traitement thermique sublétal. *Les journées scientifiques de l'ED EGAAL, Rennes (France).*

Emmanuelle Boix, Dhouha Lakhal, Clément Trunet, Stéphane André, Louis Coroller, Olivier Couvert (2019). Quantification de l'impact des facteurs environnementaux sur la germination des spores de *Clostridium sporogenes* par cytométrie en flux. *23ème Congrès Annuel de l'Association Française de Cytométrie en flux, Rennes (France).*

4. Activité d'encadrement

Noëmie Cossec. 2021. Master 2 Biotechnologie spécialité Biomolécules, Micro-organismes et Bio-procédés (Université de Bretagne Sud). Impact des facteurs environnementaux sur la cinétique de germination des spores de *Clostridium sporogenes* PA 3679.

Dhouha Lakhal. 2019. Institut National des Sciences Appliquées et de Technologie option Biologie industrielle (Université de Carthage). Impact des facteurs environnementaux sur la germination de *Clostridium* sporogenes.

Lisa Guigard. 2019. IUT 2ème année Génie Biologique option Industries Alimentaires et Biologiques (IUT Avignon). Etude physico-chimique de produits à base d'olives.

DOCTORAT ECOLOGIE
BRETAGNE GEOSCIENCES
LOIRE AGRONOMIE ALIMENTATION

UBO
Université de Bretagne Occidentale

Titre : Modélisation de la probabilité de croissance de *C. sporogenes* et *C. botulinum* groupe I en fonction du pH et de la concentration en NaCl après un traitement thermique de faible intensité

Mots clés : Germination des spores, Physiologie, Microbiologie prévisionnelle, Effet barrière, Produits à base d'olives

C. botulinum groupe I est la bactérie pathogène la plus résistante à la chaleur et son élimination nécessite de forts traitements thermiques qui peuvent nuire aux qualités des aliments. Pour limiter l'intensité des traitements thermiques, les industriels doivent associer d'autres moyens de contrôle comme l'acidification et le salage communément utilisés dans les produits à base d'olives.
L'objectif de ce travail est d'étudier les effets combinés du pH et de la concentration en NaCl après un traitement thermique de faible intensité sur la croissance et la germination des spores de *C. botulinum* groupe I et de *C. sporogenes* qui est son substitut non-toxinogène et également reconnu comme espèce d'altération. Il apparait que le domaine de germination et de croissance des spores de *C. sporogenes* PA 3679 (limite à pH 4,8) est plus restreint que le domaine de croissance des cellules végétative (limite à pH 4,5). De plus, les traitements thermiques de faible intensité diminuent la gamme de pH et de concentration en NaCl où la germination et la croissance des spores est possible.
La limite chute à 3% pour des spores traitées (5,2 min à 100 °C) alors qu'elle est de 7% de NaCl pour les cellules végétatives. Ces observations ont été étendues à plusieurs souches de *C. sporogenes* et *C. botulinum* groupe I sélectionnées en fonction de leurs caractéristiques physiologies et génétiques. Cette étude a également a mis en évidence une certaine hétérogénéité au sein des deux espèces vis-à-vis de leurs limites de croissance (pH/NaCl), de la thermorésistance de leurs spores et de leurs caractéristiques génétiques (séquençage du génome complet et création d'un arbre phylogénétique).
Ces éléments permettent de confirmer la stabilité des produits à base d'olives traités thermiquement. L'association synergique du pH, du NaCl et du traitement thermique explique l'inhibition de la germination et/ou de la croissance de *C. sporogenes* et *C. botulinum* groupe I. Ces résultats ouvrent de nouvelles possibilités pour optimiser les processus de formulation/fabrication des aliments afin de gérer les risques d'altération liés à *C. sporogenes* et apporte des informations pour mieux gérer ceux liés à *C. botulinum*

Title: Modelling the growth probability of *C. sporogenes* and *C. botulinum* group I as a function of pH and NaCl concentration after low intensity heat treatment

Keywords: Spore germination, Physiology, Predictive microbiology, Hurdle technology, Olive-based product

C. botulinum group I is the most heat resistant pathogenic bacteria and its elimination requires strong heat treatments which can negatively affect the food. To limit the intensity of heat treatments, food industry must use other means of control such as the combination of an acid and salt medium after a low heat treatment as found in the pasteurised olive product.
The objective of this work is to study the combined effects of pH and concentration of NaCl after a low intensity heat treatment on the growth and germination of *C. botulinum* group I spores and *C. sporogenes* (non-toxigenic surrogate of *C. botulinum* group I and spoilage bacterium). It appears that the germination and growth range of *C. sporogenes* PA 3679 spores (pH limit at 4.8) is more restricted than the growth range of vegetative cells (pH limit 4.5). Moreover, low intensity heat treatments (5,2 min at 100°C) decrease the growth limits from 7% NaCl for the vegetative cells to 3% NaCl for the spores.
These observations were extended to several strains of *C. sporogenes* and *C. botulinum* group I selected according to their physiological and genetic characteristics. The study of their growth limits (pH/NaCl), the thermoresistance of their spores and their genetic distributions (sequencing of the complete genome and creation of a phylogenetic tree) revealed a certain heterogeneity within the two species.
These conclusions were extended to explain teh stability of heat-treated olive products. The synergy between their physico-chemical characteristics explains the inhibition of germination and growth of *C. sporogenes* and *C. botulinum* group I. These results open up new avenues for optimising food formulation and processes in order to manage spoilage risks associated with C. sporogenes and provide information to better manage those associated with *C. botulinum*.